

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

**ÇEVRESEL SİGARA DUMANI MARUZİYETİNİN  
ÇOCUKLARDA OKSİDATİF STRES DURUMUNA VE  
APOPTOZİS BELİRTECİ OLAN KASPAZ 3 VE KASPAZ 7  
AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Rümeyza ÜRKÜP

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Kabil ŞERMATOV

ŞANLIURFA

2017

T.C.  
HARRAN ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANA BİLİM DALI

**ÇEVRESEL SİGARA DUMANI MARUZİYETİNİN  
ÇOCUKLARDA OKSİDATİF STRES DURUMUNA VE  
APOPTOZİS BELİRTECİ OLAN KASPAZ 3 VE KASPAZ 7  
AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ  
Dr. Rümeyza ÜRKÜP

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Kabil ŞERMATOV

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinatörlüğü tarafından 30.05.2016 tarih ve 16072 protokol numarası ile desteklenmiştir.

ŞANLIURFA  
2017

## TEŞEKKÜR

Tez konusunun belirlenmesinde, çalışmaların planlanması ve yürütülmesi esnasında destek ve yardımlarını gördüğüm değerli tez hocam Doç. Dr. Kabil SHERMATOV'a teşekkürlerimi sunarım.

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğindeki uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emeği geçen, her konuda desteğini esirgemeyen, tecrübe ve deneyimlerinden çok şey kazandığım değerli hocalarım; Prof. Dr. C. Dost ZEYREK, Prof. Dr. Alpay ÇAKMAK, Doç. Dr. Kabil SHERMATOV, Doç. Dr. Ali ATAŞ, Doç. Dr. Bülent KOCA, Doç. Dr. Mahmut ABUHANDAN, Yrd. Doç. Dr. Mahmut DEMİR, Yrd. Doç. Dr. Abdullah Solmaz ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet Güzelçiçek' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımındaki yardım ve desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. İsmail Koyuncu' ya, biyokimya araştırma görevlileri ve laboratuvar çalışanlarına gönülden teşekkür ederim.

Asistanlık eğitimim süresince klinikteki çalışmalarım ve tezimde yardımlarını esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, sıkıntılı ve güzel günleri paylaştığım değerli arkadaşlarım Çocuk Kliniği asistanlarına, hemşirelerine ve personeline ayrıca teşekkür ederim.

Eğitim süresince maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen ve bana her konuda destek olan sevgili eşime ve biricik kızım Zeynep 'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Dr. Rümeyza ÜRKÜP**

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
TABLolar DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
GRAFİKLER DİZİNİ	VI
KISALTMALAR	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dünya’da ve Türkiye’de Sigara	3
2.1.1. Çevresel Tütün Dumanın Tanımlanması ve Bileşenleri	4
2.1.2. Sigara Dumanının Çocuklarda Neden Olduğu Sağlık Sorunları	6
2.1.3. Çevresel Tütün Dumanı Maruziyetinde Tanı	8
2.2. Apoptoz	9
2.2.1. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi	9
2.2.2. Apoptozun Genel Özellikleri	9
2.2.3. Apoptozun Gerçekleşme Aşamaları ve Moleküler Mekanizması	13
2.2.3.1. Apoptozu Baskılayan Genler Apoptozu İndükleyen Genler	16
2.2.3.1.1. Ekstrinsik Yolak (Ölüm Reseptörleri Yolu)	16
2.2.3.1.2. İntrensik Yolak (Mitokondriyal Yol)	18
2.2.4. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler	20
2.2.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemi	21
2.2.4.2. Histokimyasal Yöntemler	22
2.2.4.3. Biyokimyasal Yöntemler	24
2.2.4.4. İmmunolojik Yöntemleri	24
2.2.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri	25
2.3. Kaspazlar	25
2.3.1. Kaspazların Yapısı ve Kaspaz Türleri	26
2.3.1.1. Sitokin Aktivasyonu Yapan (Enflamatuvar) Kaspazlar	27
2.3.1.2. Başlatıcı Kaspazlar	28

2.3.1.3. Apoptozu Yürüten (Efektör) Kaspazlar	28
2.3.2. Kaspazların Aktivasyonu	28
2.3.3. Apoptozda Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'nin Önemi	29
2.4. Oksidatif Stres Göstergesi Olarak TAS, TOS ve OSİ	30
2.4.1. Total Antioksidan Seviye (TAS)	30
2.4.2. Total Oksidan Seviye (TOS)	30
2.4.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Yöntem	33
3.1.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	33
3.1.2. Kaspaz-7 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi	33
3.1.3. İdrarda Kotinin, Kreatinin Ölçüm Yöntemi	33
3.1.4. Toplam Antioksidan Düzeyinin Ölçümü	33
3.1.5. Toplam Oksidan Düzeyinin Ölçümü	34
3.1.6. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü (OSİ)	34
4. BULGULAR	35
5. TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	48
6. EKLER	60
6.1. Anket Formu	60

<b>Tablo-1:</b> Apoptoz ve Nekroz Özelliklerinin Karşılaştırılması	10
<b>Tablo-2:</b> Apoptozu Baskılayan ve Apoptozu Tetikleyen Genler	15
<b>Tablo-3:</b> Kaspaz Türleri	25
<b>Tablo-4:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan Çocuklar ile Kontrol Grubundaki Çocukların Antropometrik Ölçümlerinin Karşılaştırılması	34
<b>Tablo-5:</b> Gruplarda Annelerin Eğitim Durumları	35
<b>Tablo-6:</b> Gruplarda Babaların Eğitim Durumları	35
<b>Tablo-7:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan Çocuklar ile Kontrol Grubundaki Çocukların İdrarda Kotinin Ve Kotinin/Kreatinin Oranları	37
<b>Tablo-8:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan Çocuklar ile Kontrol Grubundaki Çocukların Oksidatif Stres Oranları	38
<b>Tablo-9:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan ile Kontrol Grubundaki Çocukların Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 Düzeyi Karşılaştırılması	38

## ŞEKİLLER DİZİNİ

## SAYFA NO

<b>Şekil-1:</b> Kurbağa, C. Elegans ve İnsanda Apoptoz	12
<b>Şekil-2:</b> Apoptotik Sürecin Gösterimi	13
<b>Şekil-3:</b> Apoptozun Moleküler Mekanizması	14
<b>Şekil-4:</b> Ekstrinsik ve İntrinsik Yolaklar	17
<b>Şekil-5:</b> Apoptoz Sırasında Hücre İçi Sinyallerle Aktifleşen Mitokondriyal Yol	19
<b>Şekil-6:</b> Elektron Mikroskopisi ile Nükleus Fragmantasyonunun Gözlenmesi	20
<b>Şekil-7:</b> Faz Kontrast Mikroskopisi Görüntüleri	21
<b>Şekil-8:</b> TUNEL Metodu Uygulanmış Spinal Kord Görünümü	22
<b>Şekil-9:</b> Kaspaz Kaskadı	26



<b>Grafik-1:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan ve Kontrol Grubundaki Çocukların Annelerinin Eğitim Düzeyi	36
<b>Grafik-2:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan ve Kontrol Grubundaki Çocukların Annelerinin Eğitim Düzeyi	36
<b>Grafik-3:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan Çocuklar ile Kontrol Grubu Çocukların İdrarda Kötinin Ve Kötinin/Kreatinin Düzeyleri Karşılaştırılması	39
<b>Grafik-4:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan Çocuklar ile Kontrol Grubu Çocukların Serum Kaspaz 3 Ve Kaspaz 7 Düzeyi Karşılaştırılması	39
<b>Grafik-5:</b> Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalan Çocuklar ile Kontrol Grubu Çocukların Oksidatif Stres Parametrelerinin Karşılaştırılması	40



## SİMGE ve KISALTMALAR

<b>AAD</b>	:Ana Akım Dumanı
<b>AB</b>	:Avrupa Birliği
<b>ABD</b>	:Amerika Birleşik Devletleri
<b>YAD</b>	:Yan Akım Dumanı
<b>ÇSD</b>	:Çevresel Sigara Dumanı
<b>ÇTD</b>	:Çevresel Tütün Dumanı
<b>ÇTDMK</b>	:Çevresel Tütün Dumanına Maruz Kalanlar
<b>DSÖ</b>	:Dünya Sağlık Örgütü
<b>ATP</b>	: Adenozin Trifosfat
<b>Bç</b>	: Baz Çifti
<b>Bad</b>	: Bcl-2 associated Aganist of Cell Death
<b>Bak</b>	: Bcl-2 Antagonist / Killer
<b>Bax</b>	: Bcl-2 Associated X Protein
<b>BCL</b>	: B-cell Lymphoma
<b>BCR</b>	: Breakpoint Cluster Region Gene
<b>Bid</b>	: BH3-interacting Domain Aganist
<b>Bim</b>	: Bcl-2 Interacting Caspases
<b>Bmf</b>	: Bcl-2 Modifying Factor
<b>Bik</b>	: Bcl-2 İnteracting Killer
<b>CD</b>	: Cluster of Differentiation
<b>CDK</b>	: Cyclin-Dependent Kinases
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>EDTA</b>	: Etilendimetiltetraasetik Asit
<b>FADD</b>	: Fas- associated Death Domain
<b>FAS</b>	: Fas Cell Surface Death Receptor
<b>FASL</b>	: Fas Ligandı
<b>HB</b>	: Hematoksilen Boyama
<b>HIV</b>	: Human Indeficiency Virus
<b>HTrA2</b>	: 5-hydroxytryptamine Receptor A
<b>IAP</b>	: Inhibitors of Apoptosis
<b>ICE</b>	: Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzyme
<b>IGF</b>	: Insulin-like Growth Factor

<b>IPNV</b>	: Infectious Pancreatic Necrosis Virus
<b>IL</b>	: Interleukin
<b>Kaspaz</b>	: Cystein-dependent Aspartate-specific Proteases
<b>TUNEL</b>	: Terminal deoxynucleotidyl Tranferase biotin- dUTP Nick End Labeling
<b>TAS</b>	: Total Antioksidan Seviye
<b>TOS</b>	: Total Oksidan Seviye



## ÖZET

### Çevresel Sigara Dumanı Maruziyetinin Çocuklarda Oksidatif Stres Durumuna Ve Apoptozis Belirteci Olan Kaspaz 3 ve Kaspaz 7 aktivitesine Etkisi

Dr. Rümeysa ÜRKÜP

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

**Amaç:** Çevresel sigara dumanı maruziyeti hem yaygınlığı hem de önlenabilir olması halk sağlığı bakımından oldukça önemlidir. Risklerini tanımlamak ve sigara karşıtı müdahalelerin yararlarını saymak için pasif sigara içiminin kesin biyokimyasal ölçümlerine gerek vardır. Oksidatif hasara ve DNA hasarına neden olduğu bilinen sigara maruziyetinin apoptozisle ilişkisi yeni çalışmalarla incelenmektedir. Bizde çalışmamızda daha önce çalışılmamış bir parametre olan kaspaz 3 ve kaspaz 7 yi seviyelerini tespit ederek bu çocuklarda oluşan etkileri göstermeyi amaçlamaktayız.

**Yöntem:** Çevresel tütün dumanına maruz kalan 0-5 yaş arası 30 adet çocuk ve tütün dumanına maruz kalmayan aynı yaş grubu 30 hasta toplandı. Anket dolduruldu ve çocuklardan serum ve idrar örnekleri toplandı. Uygun ortam ve sıcaklıkta saklanan numuneler biyokimya laboratuvarında çalışıldı. İstatistiksel analizler yapıldı ve  $p<0,05$  olması anlamlı olarak kabul edildi.

**Bulgular:** Çevresel tütün dumanı maruziyeti olan grupta anne ve babaların eğitim seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşüktü. Çevresel maruziyet olan grupta idrarda kotinin/kreatinin seviyesi, kaspaz 3 ve kaspaz 7 seviyesi anlamlı derecede yüksekti. ( $p<0,05$ ) Çevresel tütün maruziyeti olan grupta oksidan seviye kontrol grubuna göre belirgin yüksek bulundu.

**Sonuç:** Sonuç olarak çevresel tütün dumanı maruziyeti olan çocuklarda kotinin ve kotinin/kreatinin seviyesi, oksidatif stres ve kaspaz 3 ile kaspaz 7 seviyesi arttığı saptandı. Çalışmamızda çevresel tütün dumanının apoptozisi arttırdığı gösterilmiştir. Bu durum malignite riskine karşı vücudun kendini savunması ve maligniteyi önleme çabası olarak değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Çocuk, Sigara, Oksidatif Stres, Kaspaz 3, Kaspaz 7

## SUMMARY

### **Effect of Environmental Tobacco Smoke Exposure on Caspase 3 and Caspase 7 Activity Indicating Oxidative Stress and Apoptosis in Children**

**Rümeysa ÜRKÜP, MD**

**Specialty Thesis, Department Of Child Health and Diseases**

**Objective:** Environmental cigarette smoke exposure is very important for public health because it is both prevalent and preventable. . Precise biochemical measurements of passive smoking are required to identify risks and to count the benefits of non-counter-interventions. The association of cigarette exposure, known to cause oxidative damage and DNA damage, to apoptosis has been studied with new studies. In our study, we aimed to demonstrate the effects of apoptosis in these children by detecting caspase-3 and caspase-7 levels, which were previously untreated parameters in children with environmental cigarette smoke exposure.

**Methods:** 30 children aged 0-5 years who were exposed to environmental tobacco smoke and 30 children of the same age group who were not exposed to tobacco smoke were collected. The questionnaire was filled in and serum and urine specimens were collected from the children. The samples stored in the appropriate environment and temperature were studied in the biochemistry laboratory. Statistical analyzes were performed and it was accepted that  $p < 0.05$  was significant.

**Findings:** In the group with environmental tobacco smoke exposure, the education level of the parents was significantly lower than the control group. Oxidative stress, levels of cotinine / creatinine, caspase-3 and caspase-7 levels were significantly higher in the group with environmental tobacco smoke exposure ( $p < 0.05$ ).

**Conclusion:** As a result, in children with environmental tobacco smoke exposure, it was determined that the exposure determined by questionnaire should be proved by level of cotinine and cotinine / creatinine. In children with environmental tobacco smoke exposure, oxidative stress and caspase-3 and caspase-7 levels were found to increase, and exposure has been shown to increase apoptosis. This has been considered as an attempt to defend the body against malignancy risk and to prevent malignancy.

**Key Words:** Children, tobacco, smoke, Oxidative stress, Caspase 3, Caspase 7

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sigara dumanı maruziyeti, hem yaygınlığı hem de önlenebilir olması nedeniyle oldukça önemli sağlık sorunudur (1). Sigara dünyada ve Türkiye’de görülen en yaygın madde bağımlılığıdır. Sigara içilmesi, yalnız içene değil, aynı ortamda bulunanlara da zarar vermektedir. (2). Kendisi sigara içmediği halde evde, işyerinde, insanların toplu olarak buldukları kapalı ortamlarda sigara içen kişilerin dumanına maruz kalarak bu dumanda bulunan tüm zararlı maddelerin solunmasına pasif içicilik denir. Bu durumdan en çok etkilenenler çocuklardır (3, 4). Çocukluk çağında, sigara dumanının içerdiği çok sayıda toksine bağlı olarak, alt solunum yolları enfeksiyonları, sinüzit, orta kulak iltihabı, bronşial astım ataklarının sıklığı ve atakların şiddeti artmaktadır (5, 6). Aktif sigara içicilerinde ve sigara dumanına maruz kalmış sigara içmeyen kişilerde kotinin nikotinin en önemli ve en güvenilen biyomarkırıdır (7). Sigara dumanı ile çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri açığa çıkmaktadır (8).

Çocuklarda pasif sigara içiciliği; yol açtığı diğer sağlık sorunlarının yanı sıra, genotoksisiteye bağlı potansiyel kanserojen etki bakımından da hayati önem taşır (9). Sigara içimi veya sekonder maruziyetinin irdeleyen çalışmalar yapılmış olup, sigara dumanının aktif içicilerde ve pasif içiciliğine bağlı çocuklarda DNA hasarına yol açtığı kesin olarak gösterilmiştir (10). Sigara içimi veya sekonder maruziyetinin oluşturduğu ağır DNA hasarları sonucunda hücrenin apoptozis doğal süreci değişebilir. Hücredeki DNA hasarı tamir edilemezse kalıcı mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, doğal yaşlanma sürecinin değişmesine ve illeride neden kanser olabilir. Hasarlanmış DNA’nın onarım sürecinin tam olarak sağlanamaması malignansi patogenezinde çok önemli bir faktördür (11, 12, 13).

Apoptozis - DNA’ında hasar oluşmuş, düzensiz gelişmiş, yaşlanmış, işlevini yitirmiş ve kontrolsüz çoğalan hücrelerin emniyetli bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak aktarılan, programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozisi tetekleyen esas faktor hücre içi sistein proteazların (kaspazların) çeşitli uyaranlar ile aktive olmasıdır. Apoptozisin gerçekleşmesi intrinsek ve ekstrinsek adı verilen 2 yolla oluşmaktadır. İntrensek (mitokondrial) veya tip I yolda membran geçirgenliği bozulmuş olan mitokondrilerden sitokrom c’ler salınarak Apaf 1 ve başlatıcı kaspazlardan olan kaspaz 9 ile birleşerek apoptozom oluşmaktadır. Apoptozom başlangıçta inaktif halde bulunan sonlandırıcı kaspazlardan olan prokaspaz 3 ile birleştikten sonra prokaspaz 3, kaspaz 3 formuna dönüşerek aktifleşmekte ve sonuç olarak apoptoz gerçekleşmektedir. Ekstresek yolda ise (transmembran) veya tip2 yolda

hücre dışı sinyallerle CD95 ligandına (Fas ligand= CD95L) bağlanan tümör nekrozis faktör- alfa (TNF-alfa) tarafından uyarılmaktadır. Bu bağlanma, reseptörde ATP'den bağımsız değişikliklere neden olarak ölüm indükleyici sinyal kompleksi (DISC) oluşumuna neden olur. CD95 adaptör molekül Fas reseptörü ilişkili ölüm ünitesi (FADD) ile FADD da prokaspaz-8 ve prokaspaz-10 ile birleşerek DISC kompleksini oluşturmaktadır. Bu sonraki adımda prokaspaz-8 aktifleşerek, kaspaz-3'ten proteoliz ile küçük alt ünitenin ayrılmasına ve böylece enzimin aktifleşmesine neden olmaktadır. Bu yolak kaspaz - 3 aktivasyonu üzerinden mitokondriyal yolak ile birleşerek apoptoz sinyalini güçlendirmektedir.

Kaspaz molekülleri, apoptotik süreçte anahtar görev olan esas proteinlerdir (14). Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Kaspaz türleri 3'e ayrılmaktadır. Bunlar: Başlatıcı kaspazlar, etkili (efektör) kaspazlar ve enflamatuvar kaspazlardır. Bizim çalışmamızda efektör kaspazlar olan kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeyi çalışılarak apoptozis durumunu saptanmaya çalışılmıştır.

Bu çalışmada amacımız çevresel tütün dumanına maruziyeti ile apoptozis sürecinin belirteçleri olan kaspaz 3 ve kaspaz 7 arasındaki ilişkiyi belirleyip, bu ilişkiyi total oksidan ve antioksidan kapasite ile bağlantısı olup olmadığını belirlemektir. Böylelikle çevresel tütün dumanına maruz kalmanın oksidan kapasite ile ilişkisini ortaya koymak ve apoptozis sürecini etkileyip etkilemediğini tespit etmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Dünya’da ve Türkiye’de Sigara

Sigara kullanımı önemli sağlık problemi ve ölüm nedenlerinden birisidir. Günümüzde yaklaşık 1 milyar erkek ve 250 milyon kadının sigara kullandığı tahmin edilmektedir. 2000 yılında sigara kullanımı nedeniyle dünya genelinde 3.84 milyon erkek, 1 milyon kadının hayatını kaybettiği, 2008 yılında ise bu sayının 5 milyondan fazla olduğu, sigara kullanımının bu şekilde devam etmesi halinde bu sayının 2025 yılında erkek ve kadınların toplamının 10 milyonu geçeceği tahmin edilmektedir. Sigara, dünyada her yıl 4 milyon kişinin, günde 11 bin veya diğer bir ifade ile her saniyede bir kişinin ölümünden sorumludur. Sigara içme eğiliminde bir değişiklik olmaması halinde 2020-2030’lu yıllarda sigara her yıl 10 milyon kişinin ölümüne neden olacaktır (1).

Sigara dünya üzerinde en yaygın görülen madde bağımlılığıdır. Yüksek gelirli bazı ülkelerde erkekler arasında sigara kullanım prevalansında düşme görülmektedir, ancak genç nüfusta ve kadınlar arasındaki kullanımı yaygınlaşmaktadır (2). DSÖ’ye göre sigara insan sağlığını tehdit eden en önemli 10 sebepten birisidir (15).

Ülkemizde 2003 verilerine göre ortaokul ve lise öğrencilerinde toplam %10– 43, üniversite öğrencilerinde %21,2–48,2’sinin sigara içtiği saptanmaktadır. Günümüzde erişkin sigara içicilerinin %80’inden fazlası 18 yaşından önce sigaraya başlamaktadır. Bu yüzden ergenlerin sigaraya başlamasının önlenmesi en önemli sağlık politikalarından birini oluşturmaktadır (16).

Ülkemizde 2010 verilerine göre 15 yaş altı öğrencilerde sigara kullanım sıklığı %0.9-9.1 arasında ve 17 yaş altı öğrencilerde sıklığı %15.9-41.2 arasında bulunmuştur (17). Sigara içimi sadece içeni hasta edip öldürmemektedir, sigara içmeyenler de çevresel tütün dumanı ile kirlenen havayı soluyarak hastalık ve ölüm riski altında kalmaktadırlar. Pasif sigara içimi; kişilerin sigara içilen bir ortamda istemsiz olarak tütünün yanma ürünlerini soluyarak maruz kalması olarak tanımlanmaktadır (18). Pasif sigara içimi; çevresel tütün dumanı maruziyeti, ikinci el sigara içimi ya da edilgen sigara içimi olarak da isimlendirilmektedir (19,20).

Türkiye'nin de bulunduğu, çok sayıda gelişmekte olan ülkelerde sigara dumanına maruziyetini önlemek ve sigara tüketimini azaltmak amacıyla bir takım yasal düzenlemelere gidilmiştir. Örneğin, ülkemizde 4207 Sayılı Kanun gereğince, "kapalı mekânlarda tütün ve tütün mamullerinin içilmesi yasaklanmış olup, 5326 sayılı Kabahatler Kanunu'nun 39. Maddesine göre kamu hizmet binalarının kapalı alanlarında tütün mamulü tüketen kişiye idari para cezası verilmesi" hükme bağlanmıştır (21).

Gün geçtikçe bu konudaki girişimlerin boyutu da giderek artmaktadır. Söz konusu diğer düzenlemeler ile birlikte, 4207 Sayılı Kanunun kapsamı daha da genişletilerek, okul, dersane ve kursların açık alanları ile lokanta, kahvehane, kafeterya gibi yerlerde sigara içimini yasaklayan "5727 Sayılı Tütün ve Tütün Mamullerinin Zararlarının Önlenmesine Dair Kanunda Değişiklik Yapılması Hakkında Kanun" Resmi Gazete'nin 19 Ocak 2008 sayısında yayımlanmıştır. Kanun, yayım tarihinden itibaren 4 ay sonra yürürlüğe girmiş; lokanta, kahvehane, kafeterya gibi yerlerdeki sigara yasağının uygulanması ise 18 ay sonra başlamıştır (22).

### **2.1.1. Çevresel Tütün Dumanın Tanımlanması ve Bileşenleri**

Pasif içicilerin maruz kaldığı sigara dumanına "çevresel tütün dumanı" denilir. Çevresel tütün dumanının 4000'den fazla bilinen ögesi vardır ve eksojen etken olarak vücutta yüksek miktarda serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır (23). Çevresel tütün dumanının bileşimi, sigaranın hammaddesi olan tütünün bileşimiyle aynı değildir. Bu, tütünün yanması sırasında içerdiği kimyasalların kısmen ya da tamamıyla başka bileşiklere dönüşmesi ile ilişkilidir. Çevresel tütün dumanının bileşimi, sigaranın filtreli olup olmamasına, sarıldığı kağıdın hammadde özelliklerine, kağıt ve tütünün nem derecesine, sarılma tekniğine, nefes çekme sıklığına, derinliğine, yanma hızı ve sıcaklığına ve benzeri çok sayıda faktöre bağlı olarak değişir. Sigara dumanının 4 önemli bileşeni; nikotin, karbonmonoksit, katran fazındaki 5 karsinojenik madde ve bu fazdaki iritanlar olmak üzere tütünün toksisitesinde ön plana çıkmaktadır (24).

Nikotin, Nicotiana tabacum bitkisinin tütün olarak bilinen kurutulmuş yapraklarında bulunan bir çeşit alkaloiddir. İlk kez Amerika kıtasında yetiştirilmesinden sonra 16. Yüzyılda Avrupa kıtasına ve daha sonra dünya üzerindeki diğer coğrafyalara yayılmıştır. Sigara için kullanılan tütün % 0,5- 3 oranında nikotin ihtiva eder. Kimyasal yapısı; N- metil pirolidin halkası ve piridin halkasından oluşur (25, 26).



## **Çevresel tütün dumanı iki ana bileşenden oluşur;**

1. Sigara içenin nefesiyle ortaya çıkan duman - “ana akım”
2. Yanan bir sigaranın ucundan çıkan ve pasif içicilerin en çok maruz kaldıkları duman - “yan akım” Sigara dumanına maruz kalan bir pasif içici kansere yol açan 250'den fazla maddenin yanı sıra üreme ve gelişmeye karşı toksik etkili en az 6 maddeye de maruz kalmaktadır. Sigara dumanının yarattığı hava kirliliği dizel motorlu bir aracın yarattığı hava kirliliğinden 10 kat daha fazladır. Bilimsel kanıtlar çevresel tütün dumanına maruziyetin güvenli herhangi bir seviyesi olmadığını kesin olarak göstermiştir. Sigara dumanından %100 arındırılmamış bir ortam çocuktan erişkinine maruz kalan herkeste ciddi hastalıklara yol açmaktadır (27).

İşlem görme açısından ana akım, biri duman-gaz fazı diğeri de tanecikli madde (katran) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (28). Yan akım dumanı (YAD) oluşurken yanma ısısı daha düşük olduğu için YAD'nda ana akım dumanına (AAD) göre çok daha fazla kimyasal madde mevcuttur, örneğin hayvanlar için karsinojenik olduğu kesin gösterilmiş olan nitrosodimetilamin'in yan akım dumanında ana akım dumanına göre 20-100 kat daha fazla bulunmaktadır (29). Yapılan çalışmalar sigara dumanında YAD'nın AAD'na göre daha tehlikeli olduğunu göstermektedir. AAD ve YAD nikotin bileşikleri de farklıdır. AAD'nda nikotin partikül fazındayken, çevresel sigara dumanında (ÇSD) sıvı fazdadır. Diğer bir önemli fark ise ÇSD'nda partiküllerin boyutunun (0,01-1,0 µm) ana akım dumanına (0,1-1,0 µm) göre daha ufak olmasıdır (30).

Çevresel tütün dumanında nikotin, nem ve karbonmonoksit hariç geri kalan maddelerin tümünün belirgin karsinojenik etkileri vardır. Çevresel tütün dumanının katran fazı 6 olarak adlandırılırlar ve içeriğinde aromatik nitrozaminler, aromatik aminler, polisiklik hidrokarbonlar gibi çok sayıda bileşim bulunur. Bu tür maddelerin içerisinde kanserojenik etkisinin belirgin olduğu iyi bilineni, sigara içilmesi sırasında yanma sonucu oluştuğu düşünülen ve tütünespesifik N-nitrozaminler olarak adlandırılan N-nitrozonornikotin ve metilnitrozamin piridil butanon gibi bileşimlerdir. Bunların dışında da kanserojenik etkileri çok iyi bilinen ve sigara dumanında bulunan başka maddelere örnek olarak radyoaktif polonyum 210, siyanur, nikel, arsenik, akrolein, fenol bileşikleri gibi daha bir çok maddeyi saymak mümkündür (25, 26, 31).

Çevresel tütün dumanındaki malignitelerle ilişkili maddelerden bazıları şunlardır: Arsenik, Benzen, Krom, Nikel, Vinilklorur, 4-aminobifenil, Benzo(a)piren, Kadmiyum,

Formaldehit, Ortotoluidin, N-Nitrozodietilamin, Asetaldehidbenzopiren, Parakrezol, NNitrozometiletilamin, N-Nitrozonornikotin, N-Nitrozopiperidin, N-nitrozopirolidin (32). Çevresel tütün dumanının maligniteefektidışındaki diğer hasarlayıcı etkilerine yol açan maddeler: Nikotin, Karbonmonoksit, Azotoksitler, Amonyak, Hidrojensiyanur, Akroleindir.

### **2.1.2. Sigara Dumanının Çocuklarda Neden Olduğu Sağlık Sorunları**

Sigara dumanı başlıca göz, burun ve boğaz gibi organlarda zararlı olabilecek maddeleri içerir. Sigara dumanına maruz kalma sonucu siliar hareketler bozulur, solunum yollarında fazla miktarda mukus birikimi olur. Bu özellikle alt solunum yolları enfeksiyonları ve kulak enfeksiyonlarına zemin hazırlar (33). Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda bronşiolit ve pnömoni gibi alt solunum yolu enfeksiyonları sıklığı artmaktadır. Bu artış özellikle hayatın ilk yılında daha belirgindir. Annesi sigara içen çocuklarda bu enfeksiyonların gelişmesinde dozcevap ilişkisi mevcuttur. Her iki ebeveyn de sigara içtiği zaman solunum yolu enfeksiyonları %72 oranında artmaktadır. Hayatın erken döneminde geçirilen bu enfeksiyonlar hayatın ileriki dönemlerinde kronik obstrüktif akciğer hastalığına yol açabilmektedir (34).

Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda nazofarenjit ve sinüzit gibi üst solunum yolu enfeksiyonlarının sigara dumanına maruz kalmayan çocuklara göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Öksürük, hırıltılı solunum, nefes darlığı gibi kronik solunum yolu hastalık belirtileri ebeveynleri sigara içen çocuklarda daha sık görülmektedir (29-32).

Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda kronik orta kulak effüzyonlarının sıklığının artmasına neden olmaktadır. Pasif içicilik hem akut otitis media sıklığını artırır, hem de hastalık süresini uzatır (33-35).

Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda fizyolojik akciğer volümünde azalma, gelişmiş alveol sayısında azalma, parankimal elastik dokuda azalma, intersitisyum dansitesinde artma, elastin ve kollajenin gelişiminde azalma görülmektedir. Sigara dumanına maruz kalma, özellikle ilk beş yaşta akciğer fonksiyonlarını bozmaktadır. Pasif sigara içiciliğine bağlı olarak akciğer fonksiyonlarda belirgin azalma görülmektedir (36, 37).

Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda hem astım ataklarının sıklığında artış görülmekte hem de astım atakları daha ağır seyretmektedir. Bu konuda dozcevap ilişkisi

mevcuttur. Kapalı ortamlarda daha az sigara içildiği zaman astım semptomları daha hafif olmaktadır. Özellikle çocuğun yaşı küçüldükçe bu etkinin daha da arttığı bilinmektedir (36-38).

Pasif sigara içiciliği ile erken doğum, düşük doğum ağırlığı ve ABÖS arasında ilişki mevcuttur. Hamilelikte sigara içen kadınların erken doğum yapma riski sigara içmeyen kadınlara göre daha yüksektir. Hamilelikte düşük doğum ağırlıklı bebeklerin olma riski 3 kat daha yüksektir. Bu ilişki, doğum ağırlığı ile gestasyonel yaştan bağımsızdır. Hamilelik döneminde sigara kullanımının etkileri bebeklik döneminde de devam etmektedir. Annesi sigara içen bebeklerde ABÖS riski iki kat fazladır. Evde içilen sigara miktarı arttıkça bu ilişki daha belirgin hale gelmektedir. Hamilelikte hem annenin hem de babanın sigara içmesi halinde bebekte ani ölüm sıklığı, her ikisinin de içmeme durumuna göre sekiz kat artmaktadır. ABÖS'den olan ölümlerin %25'nin sigaraya bağlı olduğu düşünülmektedir (10, 27,30).

Sigara dumanında kanser yapıcı özelliği olan formaldehit, vinilklorid, arsenik, amonyum ve hidrojen siyanid gibi maddeler sorumlu tutulmaktadır. Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda görülen kanserler arasında bağlantı olduğuna ilişkin kesin kanıtlar olmamakla birlikte, bazı çalışmalar anne ve babanın sigara içmesinin özellikle annenin gebelik döneminde sigara içmesinin çocukta beyin tümörleri, lösemi ve rabdomyosarkom riskinin artmasına neden olduğunu göstermektedir. On yaşından önce annesi sigara içen çocuklarda, erişkin dönemde, lösemi, lenfoma görülme riskinin arttığı gösterilmiştir. Sigara içilen evlerde büyüyen çocukların ileriki yaşlarda akciğer kanseri olma risklerinin, sigara içilmeyen evlerde büyüyen çocuklara göre üç kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (38-40). Adolesan yaş grubunda pasif içiciliğin serum lipit profilini bozduğu gösterilmiştir. Adolesan yaş grubunda yapılan çalışmalarda yüksek plazma kotinin seviyesine sahip grupta total kolesterol/HDL kolesterol oranı yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum pasif içicilerde artmış koroner kalp hastalığı riskini açıklamaktadır (41). Pasif sigara içiciliği, özellikle adolesan ve erişkin dönemde, koroner kalp hastalığı riskini arttırmaktadır (42).

Annenin emzirme döneminde sigara kullanması prolaktinin azalmasına neden olur. Prolaktinin azalması, anne sütünün azalmasına ve bebeğin daha az anne sütü almasına neden olur. Sigara dumanına maruz kalan çocukların hastaneye yatmayı gerektiren ciddi enfeksiyonların daha sık olduğu gösterilmiştir. Pasif içiciliğe bağlı pnömoni ve bronşiolit sonucu hastaneye yatırılma sıklığı da artmıştır (31). Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda psikiyatrik bozukluklar daha sık görülmektedir, dikkat azlığı ve hiperaktif olma olasılığı artmaktadır (43).

### 2.1.3. Çevresel Tütün Dumanı Maruziyetinde Tanı

Sigara dumanının iç ortam havasındaki yoğunluğu içilen sigara miktarına, oda hacmine ve oda havalandırmasına bağlı olarak değişir. Cinsiyet, yaş, ağırlık ve karşılaşma sırasındaki aktivite de etkilidir. Ayrıca sigara dumanının alım, dağılım ve metabolizmasındaki bireysel farklılıklar da doku ve sıvılardaki biyolojik aktif maddelerin yoğunluğunu etkiler (44,45,46,47).

Çocuklardaki pasif sigara içiciliği ile ilgili yaygınlık saptamaları, sözlü bildirimlerin yanısıra nikotinin ana metaboliti olan kotininin saç, tükürük, serum ve idrar örneklerinde ölçümü ile yapılmaktadır (48,45,49,50).

Sigaranın en etkili ürünleri nikotin ve onun asıl metaboliti olan kotinindir. Bunlar pasif içicilikte temel olarak bakılan biyolojik ürünlerdir. Nikotinin yarı ömrü yaklaşık iki saat olup, birkaç saat önce sigara ile karşılaşma ve etkileşimi gösterir. Yarılanma ömrü daha uzun olduğundan araştırmalarda kotinin düzeyine bakılması önerilmektedir. Plazma ve tükürükte kotinin düzeyleri birbirine benzerken, idrar değerleri plazma değerinin 5/6'sı kadardır. idrardaki kotinin değerleri; kifliler arasında, yaşa bağlı olarak değişirken böbrek işlevleri, idrar akımı ve idrar pH'sından etkilenir. Seyreltme etkisindeki farklılıklar da göz önüne alındığında idrar kotinin düzeylerinin nanogram/mg kreatinin olarak ölçülmesinin daha doğru olduğu bildirilmektedir. Kotininin biyolojik sıvılardaki (idrara, serum, tükürük) yarı ömrü 15–19 saat kadardır; yakın zamandaki (son 2–3 gün) pasif sigara ile karşılaşımı gösterir, ancak bu süre nikotine göre daha uzundur. Kotininin süt çocuğu ve daha büyük çocuklardaki yarılanma ömrü erişkinden yüksektir; yenidoğanda 65 saat, 18 ayın altındaki süt çocuğunda 60 saat, 18 ayın üstündeki çocuklarda yaklaşık 40 saattir. Serum, tükürük ve saç gibi çeşitli sıvı ve dokularda bakılmasına karşın, yayılma olmaması ve görece daha uzun süreli etkilenim göstermesi açısından özellikle epidemiyolojik araştırmalarda idrarda kotinin ölçümü seçilmektedir. Kotinin en fazla annenin sigara içiminden etkilenir (48,51-52,49).

Literatürdeki çalışmalarda idrarda kotinin ölçümlerine dayalı pasif sigara karşılaşımında belirtilen kesim değeri (cut-off) için genellikle Henderson'un (54) okul öncesi çocuklarda yaptığı çalışmasında belirttiği 30 ng/mg kreatinin değeri kaynak gösterilmektedir. Bununla birlikte Türkiye gibi aktif ve pasif sigara içiciliğinin yüksek olduğu ülkelerde sigaranın doza bağlı olumsuz sağlık etkilerini göstermede 60 ng/mg ve üzeri gibi daha yüksek kesim değer üzerinden içicilik sıklığının belirlenmesi bize göre daha gerçekçi bir yaklaşım olacaktır. Epidemiyolojik

araştırmalar pasif sigara ile karşılaşma sıklığını belirlemede sözlü bildirimlerin nicel ölümlere göre daha az güvenilir olduğunu göstermektedir (53,50).

## **2.2. Apoptoz**

### **2.2.1. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi**

İmmün sistemin hemostazının ve maturasyonunun temel bir başlangıcı olan apoptoz, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin, zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre lmdr (14,55). Apoptoz terimini ilk olarak 1972’de Kerr, Wyllie ve Currie, Yunanca da apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) terimlerini birleştirerek ‘ağaçtan dökülen yapraklar’ anlamındaki ‘apoptosis’ terimiyle açıklamışlardır (56,57).

Wyllie 1984’de apoptotik hücrede morfolojik değişimlerin yanında birçok karakteristik biyokimyasal marker olduğunu gözlemlemiştir (58). Bunlardan en önemlisi agaroz jel elektroforezi yöntemi ile DNA’da mono ve oligonükleozomal (180-200 b) birimlerin merdiven gibi belli aralıklarla kırıklar göstermesinin nükleer kromatin fragmantasyonu olarak bilinmesidir (56).

1993 yılında Cohen yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozu seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozu yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozun genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır (59)

### **2.2.2. Apoptozun Genel zellikleri**

Organizma sürekli bir denge halindedir. Bir taraftan yeni hücreler sentezlenirken, diğer yandan var olan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmaktadır. Böylece denge korunmaktadır. Hücre lmnn iki tipi vardır. Bunlar; apoptoz ve nekrozdur (60,61). Nekroz; hipoksi, aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi hücre dışından gelen çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonucunda gelişen travmatik hücre lmdr. Apoptoz ise yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir Şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre

ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptoz ise fizyolojik veya patolojik uyarılarla oluşabilir (14,55,61).

Nekroz hücredeki aşırı travma ya da hasarın bir sonucu olarak gelişmektedir ve akut işlevsel bozukluğa bağlı olarak hücrenin ölümü gerçekleşir. Hücrede iyon akışının kontrolü hızla kaybedildiği için pasif ve yıkıcı bir süreç olarak değerlendirilmektedir. İyon akış kontrolünün kaybedilmesi hücre içerisine fazla miktarda su girişine, hücre ve organellerin enerji harcamasına gerek kalmadan şişerek sitolize uğramalarına neden olmaktadır. Ölen hücre içeriğinin ekstraselüler alanlara akması ve proenflamatuvar hücrelere infiltrasyonu ile komşu hücrelerin ölmesi ve doku hasarının yaygınlaşması meydana gelmektedir (62).

Apoptozda morfolojik değişimler; nükleer kondensasyon, hücre büzülmesi, membran şişmesi gibi değişimleri kapsarken, fizyolojik değişimler; spesifik endonükleazlarla DNA'nın 80-200 bazlık oligonükleotid fragmentlerine parçalanması, kaspazların aktivasyonu sonucu proteinlerin sindirilmesini kapsamaktadır (62,63).

**Tablo-1: Apoptoz ve Nekroz Özelliklerinin Karşılaştırılması**

Özellik	Nekroz	Apoptoz
Yol açan nedenler	<input type="checkbox"/> İskemi <input type="checkbox"/> Hipertermi <input type="checkbox"/> Hipoksi <input type="checkbox"/> Litik viral enfeksiyon <input type="checkbox"/> Toksik maddelerin yüksek konsantrasyonları <input type="checkbox"/> Şiddetli oksidatif stress	<input type="checkbox"/> Büyüme faktörü eksikliği <input type="checkbox"/> Hücre yaşlanması "Senescence" <input type="checkbox"/> HIV <input type="checkbox"/> Kanser ilaçları <input type="checkbox"/> Radyasyon <input type="checkbox"/> Yüksek doz glukokortikoid <input type="checkbox"/> Fas veya TNFR-1 reseptörlerinin aktivasyonu <input type="checkbox"/> Sitotoksik T lenfositler <input type="checkbox"/> Çok şiddetli olmayan oksidatif stres
Morfolojik özellikler	<input type="checkbox"/> Hücre membranı bütünlüğünün kaybı <input type="checkbox"/> Kromatin "flocculation"u <input type="checkbox"/> Hücre şişmesi <input type="checkbox"/> Organellerin disintegrasyonu <input type="checkbox"/> Endoplazmik retikulumun dilatasyonu <input type="checkbox"/> Büyük vakuollerin oluşumu <input type="checkbox"/> Hücre lizisi	<input type="checkbox"/> İntakt hücre membranı fakat membranda "bleb"lerin oluşumu <input type="checkbox"/> Kromatinin nükleer membran civarında toplanması ve yoğunlaşması <input type="checkbox"/> Hücre küçülmesi <input type="checkbox"/> Organellerde disintegrasyon yok <input type="checkbox"/> Hücrenin intact mitokondri, ribozom, nükleus parçaları ve diğer organelleri içeren membranla kaplı apoptotik cisimciklere parçalanması
Biyokimyasal özellikler	<input type="checkbox"/> Bozulmuş iyon homeostazisi <input type="checkbox"/> ATP gerekmez (pasif süreç) <input type="checkbox"/> +4 C'de gerçekleşebilir <input type="checkbox"/> DNA rastgele parçalanır (agaroz jel elektroforezinde "smear" görüntüsü) <input type="checkbox"/> Postlitik DNA fragmentasyonu (=ölümün geç safhasında)	<input type="checkbox"/> İyi kontrollü, bazı aktivasyonların ve enzimatik basamakların olması <input type="checkbox"/> ATP gereklidir (aktif süreç) <input type="checkbox"/> +4 C'de gerçekleşmez <input type="checkbox"/> DNA internükleozomal alanlarda 180 kb çiftinin katları olacak şekilde kırılır (agaroz jel elektroforezinde merdiven patterni = apoptozun en önemli belirteci) <input type="checkbox"/> Prelitik DNA fragmentasyonu (=erken evrede gerçekleşir)
Diğer özellikler	<input type="checkbox"/> Hücreler gruplar halinde ölür <input type="checkbox"/> Fizyolojik olmayan (patolojik) etkiler sonucu gerçekleşir <input type="checkbox"/> Lizozomal enzimler salınır <input type="checkbox"/> İnflamasyona neden olur	<input type="checkbox"/> Hücreler tek tek veya birkaçı birarada ölür <input type="checkbox"/> Fizyolojik şartlarda da gerçekleşebilir <input type="checkbox"/> Komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilirler <input type="checkbox"/> İnflamasyon görülmez

Apoptozisda ana morfolojik olay, nükleusun yoğunlaşması ve daha sonra parçalara ayrılmasıdır. İmmun elektroforez yapıldığında 'ladder pattern' olarak isimlendirilen merdiven şeklinde bir görünüm oluşur. Normalde bir hücrede birbirini takip eden 7 kırılma onarılrken, apoptozda yaklaşık 300.000 kırılma meydana gelir ve hücre onarımı tam yapılamaz (64,65). Apoptoz işlevi intrauterin dönemden itibaren başlar. Fizyolojik ve patolojik birçok olayda önemli bir rol oynar. Apoptoz, homeostazinin korunmasında embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boş organların oluşumunda, dişi fetüste Wolf ya da erkek fetüste Müller kanallarının körelmesi sırasında ve merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde yer alarak;

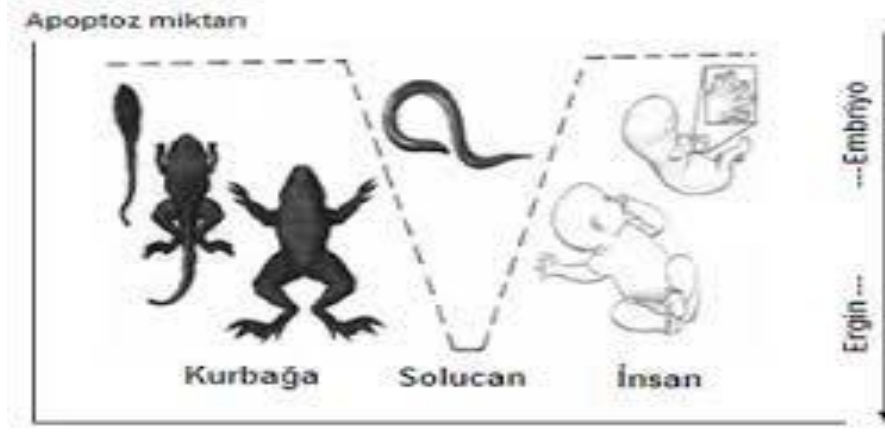
doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürütmektedir. Ayrıca virüsle enfekte olan ya da DNA'sı ağır hasar gören hücrelerin ölümünü sağlayarak temel bir rol üstlenmektedir (66,67). Büyüme faktörlerinin ortamdaki çekildiği koşullarda (emzirme sonunda meme bezinin, doğum sonrası uterusun) organlarda gerçekleşen küçülmenin de temel mekanizması, ilgili organlardaki hücrelerin apoptozisidir (14).

Bunlar dışında; embriyonik ve fetal dönemde; immün sistemin ve sinir sisteminin gelişmesinde apoptozis önemli role sahiptir. İntrauterin dönemde, immün sistemin maturasyonu esnasında, santral lenfoid organlardaki otoreaktif lenfositlerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Böylece periferik lenfoid ve myeloid kompartmanların aşırı büyümesi kısıtlanır. Sinir sistemi gelişirken; aksonları hedef organlara ulaşamayan nöronların ortadan kaldırılmasını ve nöronlarla hedef organlar arasında oluşan bağlantı hatalarının onarılmasını sağlar (14,55,68).

Dokularda hücre homeostazının sağlanmasında, bağırsaktaki kript epitellerinin sürekli yenilenmesinde, immün reaksiyonlarda; viral hepatitte karaciğerde oluşan apoptotik hücrelerde (Concilman cisimcikleri ) veya graft versus host reaksiyonlarında, hücrelerin herhangi bir nedenle hasarlanmaları durumunda veya yaşlılıkta; örneğin ısı, radyasyon, antikanser ilaçlar, hipoksi gibi durumlarda apoptoz mekanizması devreye girmektedir (14,55).

Apoptoz çok hücreli canlıların gelişimi esnasında da görülür. Çok hücreli canlıların normal ve doğru gelişimleri seçilmiş bazı hücrelerin apoptozla ölmesine bağlıdır. Örnek olarak 1 mm uzunluğunda transparant bir kurtçuk olan *Caenorhabditis elegans*'ın başlangıçta 1090 olan hücre sayısı tam olarak apoptozla 131 hücre azalır ve böylece hermafroditik formdan yetişkin forma dönüşür (64,69). Kurbağaların metamorfozu esnasında kuyruklarının kaybolarak erişkin forma geçmeleri apoptozla gerçekleşir. Böylece yetişkin forma geçerler. Kuyruktaki hücreler apoptozla ölecek kaybolur. İnsan embriyosunun el parmakları arasında bulunan perdelere oluşturan hücreler apoptoz sonucu kaybolarak parmaklar daha işlevsel hale gelmektedir (70,71).





**Şekil-1:** Kurbağa, C. elegans ve insanda apoptoz (75).

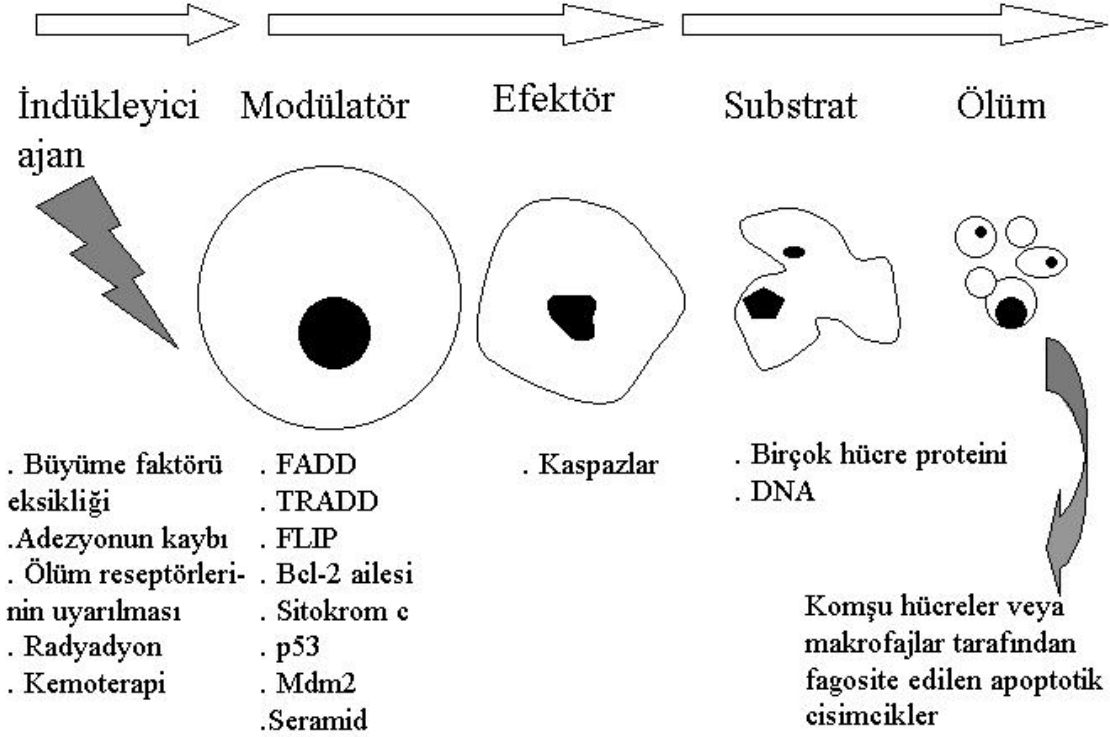
### 2.2.3. Apoptozun Gerçekleşme Aşamaları ve Moleküler Mekanizması

Apoptoz, belirli uyarılarla başlatılan moleküler olayların enerjiye bağımlı döngüsünün son noktasıdır ve dört ardışık basamağı vardır.

Bunlar:

1. Ekstra ve intraselüler sinyallerle apoptozun başlatılma fazı.
2. **Kontrol ve düzenlenme fazı:** İntraselüler pozitif ve negatif düzenleyici moleküllerle apoptozun stimülasyonu veya inhibisyonu söz konusudur.
3. **İnfaz fazı:** Genel final fazı ve fiili ölüm programından oluşur ve bu faz çoğunlukla proteazların kaspaz ailesi tarafından gerçekleştirilir.
4. **Fagositoz fazı:** Fagositoz ile ölü hücrelerin temizlenmesidir.

## APOPTOTİK SÜREÇ



Şekil-2: Apoptotik Sürecin Gösterimi

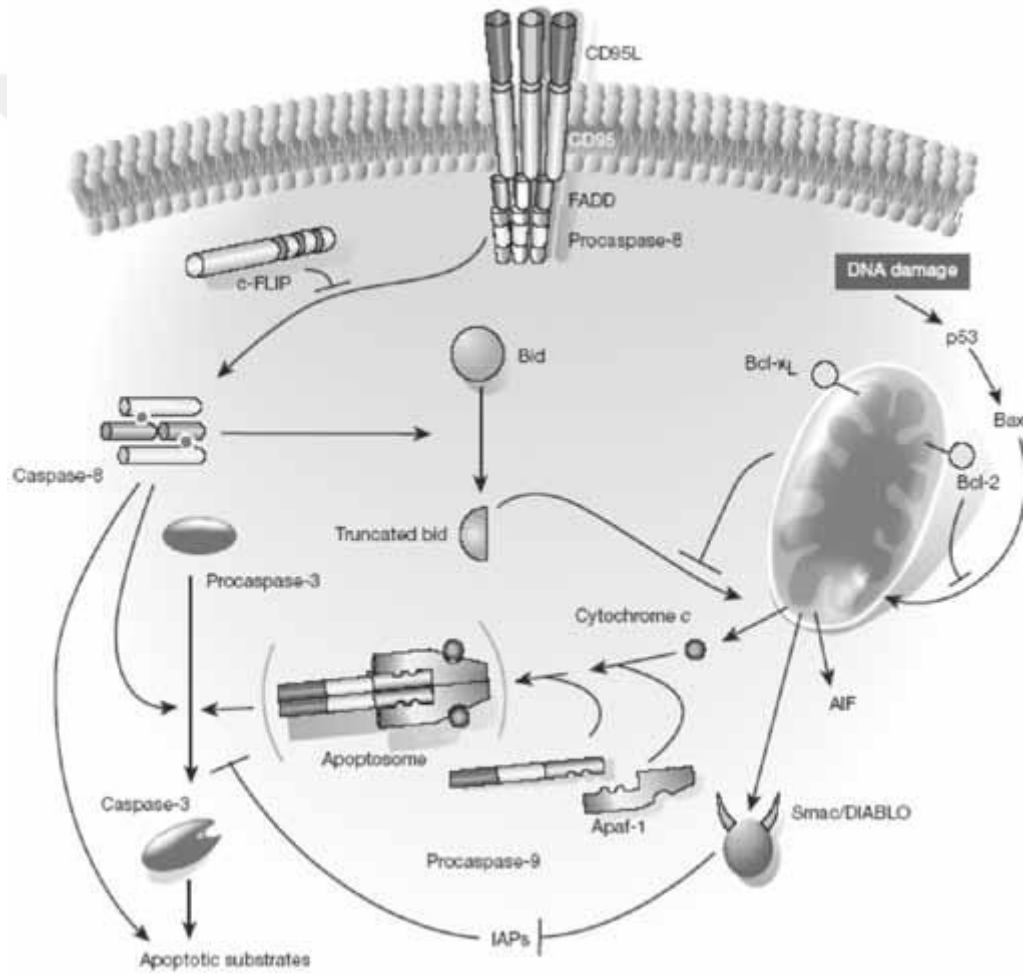
**Apoptozun Başlatılma Fazı:** Hücrenin apoptoza gidebilmesi için ilk önce, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek bir sinyalle karşılaşması gerekir. Bu sinyal hücre içinden (intrinsik) veya hücre dışından (ekstrinsik) gelebilir (65,69).

### Hücre Dışı Sinyaller

- Çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliği
- Ölüm reseptörlerinin aktivasyonu
- FAS – FAS Ligand aracılı apoptoz
- TNF aracılı apoptoz
- Sitotoksik T lenfosit aracılı apoptoz
- Koloni uyarıcı faktörler (CSF)
- Nöron büyüme faktörü (NGF)
- İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF)
- IL-2 gibi maddelerin ortamda azalması
- Glukokortikoidler
- Dış etmenler (İskemi, toksinler, radyasyon, ilaçlar, çeşitli antijenler) dir

## Hücre İçi Sinyaller

- Hücre içi Ca<sup>++</sup> düzeyi artışı
- Hücre içi pH azalışı
- Metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları (80).
- Sitokinler,
- Tümör Nekroz Faktör (TNF),
- DNA hasarı nedeniyle bir tümör süpressör gen olan p53'ün aktive olması,
- Viral-bakteriyel enfeksiyonlar
- Onkojenler dir



\*Hengartner M.O. (2000): The Biochemistry Of Apoptosis Nature | Vol 407'den uyarlanmıştır.

Şekil-3: Apoptozun Moleküler Mekanizması (68).

Organizmada apoptozu uyarıcı ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır.

**Tablo-2:** Apoptozu Baskılayan ve Apoptozu Tetikleyen Genler

Apoptozu Baskılayan Genler	Apoptozu İndükleyen Genler
<ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> Bcl-2 grubundan; BHRL-1, bcl-xl, bcl-w, bfl-1, brag-1, mcl-1, A1</li><li><input type="checkbox"/> c-abl geni</li><li><input type="checkbox"/> ras onkogeni</li><li><input type="checkbox"/> çözünebilir fas</li><li><input type="checkbox"/> p35</li><li><input type="checkbox"/> A20</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li><input type="checkbox"/> Bcl-2 grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, bid, bik, Hrk1</li><li><input type="checkbox"/> c-myc</li><li><input type="checkbox"/> p53, p21</li><li><input type="checkbox"/> fas (CD95/APO1)</li><li><input type="checkbox"/> FADD/MORT, RIP, FAST</li><li><input type="checkbox"/> İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE)</li><li><input type="checkbox"/> LOH (MTS1/CDK41)</li></ul>

### 2.2.3.1. Apoptozu Baskılayan Genler ve Apoptozu İndükleyen Genler.

DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH değişiklikleri ve hücre siklus bozuklukları hücreyi apoptoza götüren hücre ölüm sinyallerini başlatır. Ölüm reseptörlerinin hücre yüzeyinde spesifik ligandlarına bağlanması sonucu hücre içi proteazlar yani kaspazlar aktive olur. Aktive olan kaspazlar hedef proteinleri yıkarak, hücre içi değişikliklere neden olur. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bunlara “apoptotik cisim” adı verilir. Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek yok edilir (14,72,73,74).

Apoptoz; hücre yüzey ve ölüm reseptörlerine gereksinim duyan ekstrinsik yolak (ölüm reseptörleri yolu) ve mitokondriyal kaynaklı intrinsik yolak (mitokondriyal yol) olmak üzere iki ana yolla gerçekleşmektedir (75 - 78).

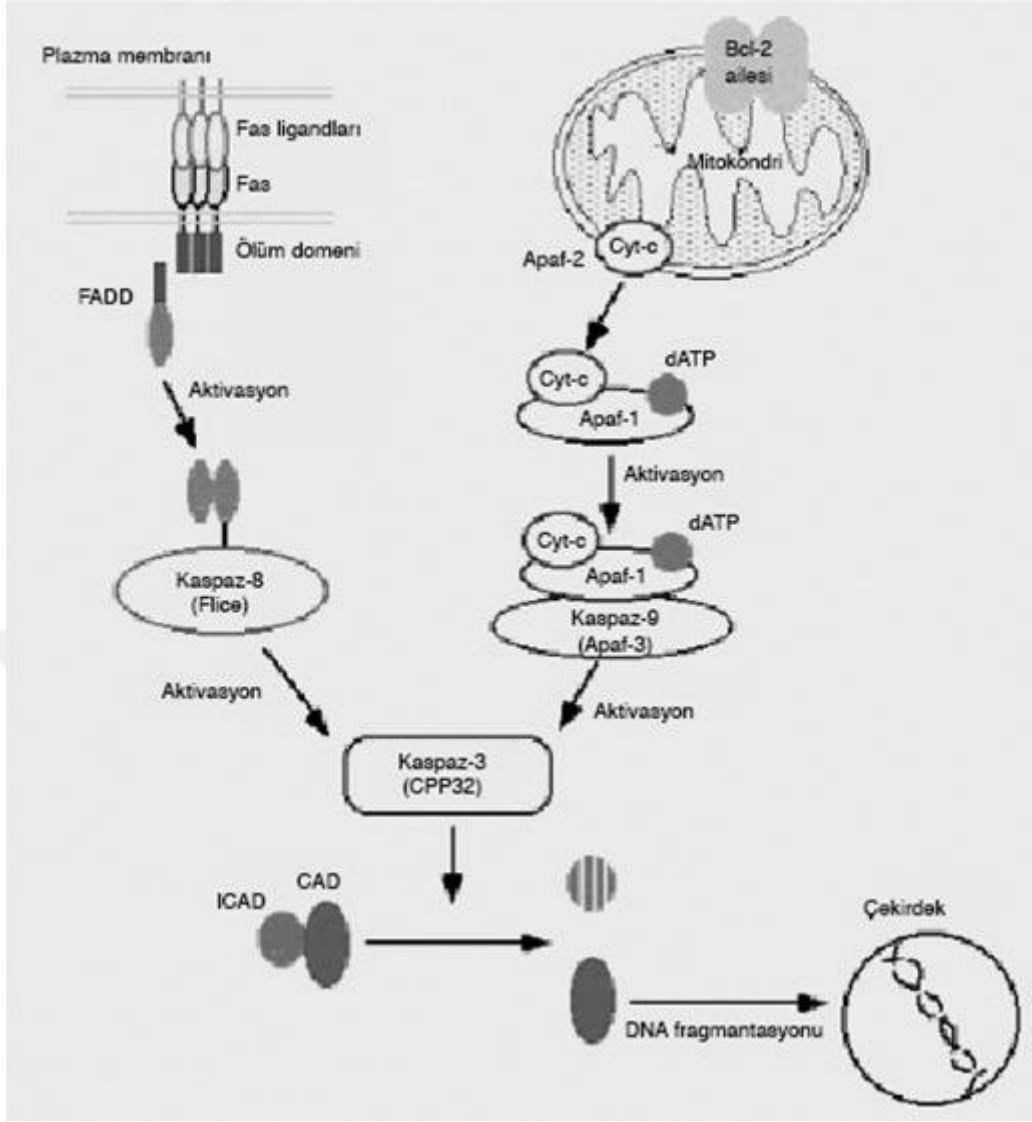
#### 2.2.3.1.1. Ekstrinsik Yolak (Ölüm Reseptörleri Yolu).

Bu yolda Fas (APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) görev almaktadır. Fas ve TNFR-1’in ilgili ligandları ile etkileşime girmeleri sonucu apoptoz indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyeleridir (75,79). Apoptozda rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup ‘tumor necrosis factor receptor (TNFR)’ ailesidir. Bu reseptör grubunun en az 19 üyesi vardır. Ancak en önemlileri Fas ve TNFR-1’dir. Fas’ın ilgili ligandına Fas ligandı (FasL) denir (79,80).

TNFR-1’inde aynı şekilde isimlendirilen ligandı mevcuttur. Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde ve akciğerlerde bulunur. FasL, tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin bir üyesidir. FasL sitotoksik T lenfositlerinde ve “natural killer” hücrelerinde bulunur (81,72,80).

Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein: protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm efektör domain (DED: “death domain”) bölgeleri adı verilen TRADD (“TNFR-1 associated death domain”) ve FADD (“Fas associated death domain”) ile interaksiyona girerler. Böylece ölüm indükleyici sinyal kompleksi DISC (Death İnducing Signalling Complex) oluşur (75 - 78). Bu kompleks ise kaspaz-8 ya da kaspaz-10’un doğrudan aktivasyonlarına öncülük eder (73,82).

Kaspaz-8 hem doğrudan kaspaz yolunu aktive eder, hem de mitokondriyal geçirgenliği değiştiren ekstrinsik ve intrinsik yolları birbirine bağlayan Bid’in aktif formu olan tBid’e dönüşümünü sağlar. Prokaspaz 8’in aktif hali olan kaspaz 8 (ya da kaspaz-10) diğer kaspazları uyarır ve başta kaspaz 3 olmak üzere diğer kaspazları aktive ederek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatırlar. Böylece apoptotik döngü başlatılmış olur ve hücre ölümü apoptotik hücrenin fagositozu ile sonlanır. (75,76,72,74).



**Şekil-4:** Ekstrinsik ve İntrensik Yolaklar

### 2.2.3.1.2. İntrensik Yolak (Mitokondriyal Yol)

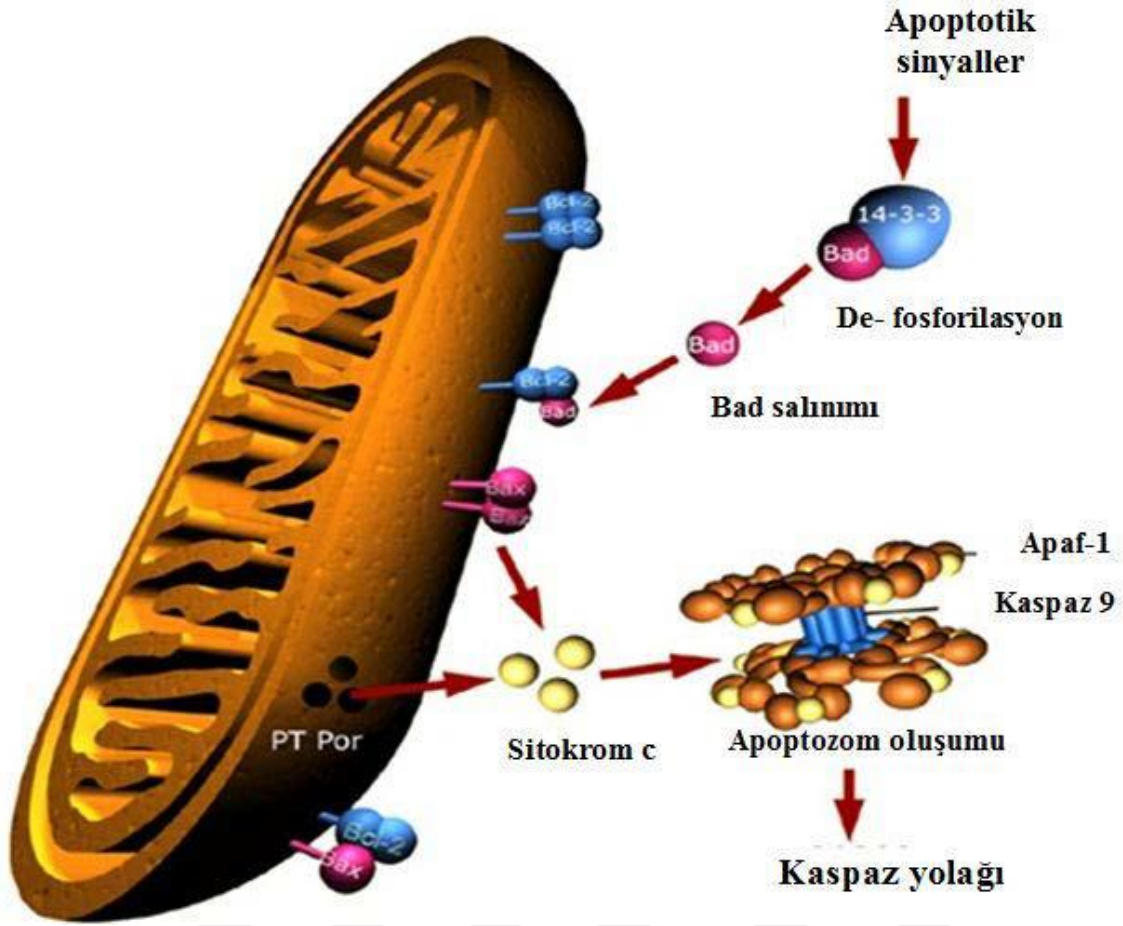
Mitokondri, hücre içinde ATP üretiminin kaynağı olmasının yanı sıra, hücre içi ya da hücre dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Mitokondri iç ve dış zarla çevrili yapıdadır, bu zarlar tıpkı hücre zarında olduğu gibi bir zar potansiyeline sahiptir. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar (83,68).

Mitokondri; hücrenin enerji deposu olmasının yanında, sitoplazmaya geçerek ölüm programını aktive eden faktörleri salan, böylece apoptozda büyük rol oynayan bir organeldir. Bu faktörlerden en önemlisi sitokrom c dir. Apoptozu indükleyen mitokondride bulunan; AIF (Apoptoz Uyarıcı Faktör), Sma c / ENDO G adlı DNaz enzimi, Omi / HtrA2, IAPs Endonükleaz G ve çok sayıda kaspaz (prokaspaz 2, 3 ve 9) tanımlanmıştır (68).

Apoptozun regülasyonu Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu ailenin 20 üyesi tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları apoptoz inhibitörü yani antiapoptotik, bazıları ise apoptozu uyarıcı ve proapoptotik genler olarak tanımlanırlar (84). Bcl-2 ve Bax genleri mitokondri dış zar geçirgenliğini ayarlarlar (85). Hücrede antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2 ve Bcl-x, yine aynı ailenin üyeleri olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 genleri gibi proapoptotik genler tarafından baskılanır. Ailenin proapoptotik üyeleri normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak çeşitli uyarılar proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar. Örneğin; büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışını Bmf'nin aktifleşmesini sağlamaktadır. Sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır. Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeability transition porlarının oluşumuna ve zar potansiyelinin değişimine yol açar (85,86).

Bu değişim dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom c'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom c bir sitoplazma proteini olan Apaf-1'e bağlanarak prokaspaz-9'u aktive eder ve oluşan bu kompleks 'apoptozom' olarak isimlendirilir (84,87).

Prokaspaz-9'un aktivasyonu, bir seri kaspaz aktivasyonunu başlatır. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozu neden olur (69,86,89). Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (74,88).



Şekil-5. Apoptoz Sırasında Hücre İçi Sinyallerle Aktifleşen Mitokondriyal Yol (61)

#### 2.2.4. Apoptozun Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

1972 yılında, apoptoz terimi ilk kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmiştir. Günümüzde morfolojik değerlendirmenin yanı sıra apoptoza özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örn. aktif kaspaz 3 tayini) moleküler düzeyde belirlenebilmesiyle de apoptoz saptanabilmektedir.

İlk kez morfolojik kriterlere göre belirlenen apoptoz, seksenli yılların sonlarına doğru DNA kırıklarının saptanmasına yönelik yöntemlerle saptanmaya başlamıştır. Doksanların ortasında ise apoptotik hücrelerde kaspazların aktifleştiği bulunmuştur. Böylece, kaspaz aktivasyonlarının belirlenmesine yönelik metotlarla saptanabilen apoptoz, doksanlı yılların sonuna doğru fosfatilserin translokasyonunu belirleyen yöntemlerle de saptanmaya başlamıştır.

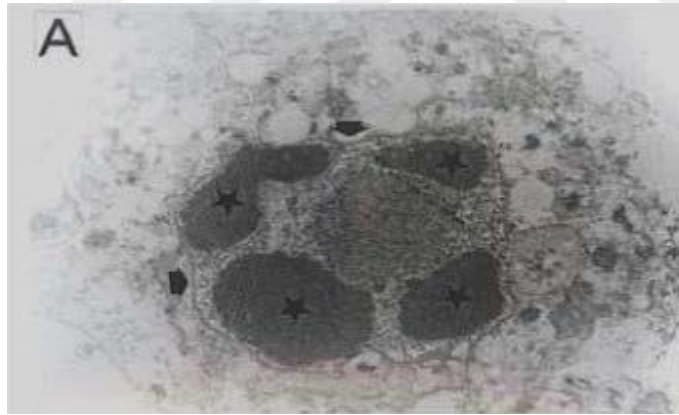


### 2.2.4.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

**Işık Mikroskopisi:** Bu yöntemde hematoksilen ve giemsa boyama yöntemleri kullanılır. Morfolojik görüntüleme yöntemleri içinde en ucuz ve kolay olanı hematoksilen ile boyamadır (HB). Hematoksilen boyası, kromatini boyadığından apoptotik hücreler nükleus morfolojisine göre değerlendirilir. Hücrede gözlenen değişiklikler; hücre küçülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanse olması ve nükleus zarının kenarında toplanması, nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi şeklindedir (89).

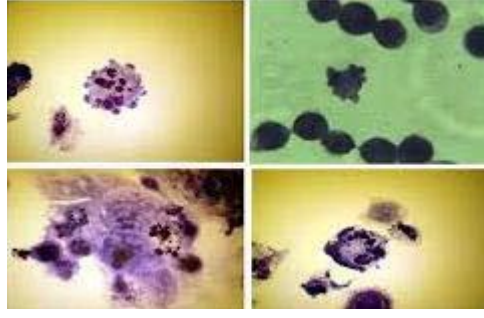
Giemsa ile boyamada hematoksilenle boyamada da olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksilen boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksilen boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (89).

**Elektron Mikroskopisi:** Apoptozda en değerli yöntem olarak kabul edilmektedir. Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözleendiği yöntemdir. Üstelik subsellüler detaylar da (mitokondrinin durumu, hücre zarı ve nükleus zarının bütünlüğü) bu yöntemle incelenebilir (89).



**Şekil-6:** Elektron Mikroskopisi İle Nükleus Fragmentasyonunun Gözlenmesi

**Faz Kontrast Mikroskopisi:** Sadece hücrelerin kültür ortamında "flask" veya "plate"lerde büyütüldüğü çalışmalarda kullanılmaktadır. Faz kontrast mikroskopu ile apoptotik hücreler üzerinde gelişen cepcikler izlenebilir (89).



**Şekil-7:** Faz Kontrast Mikroskopisi Görüntüleri

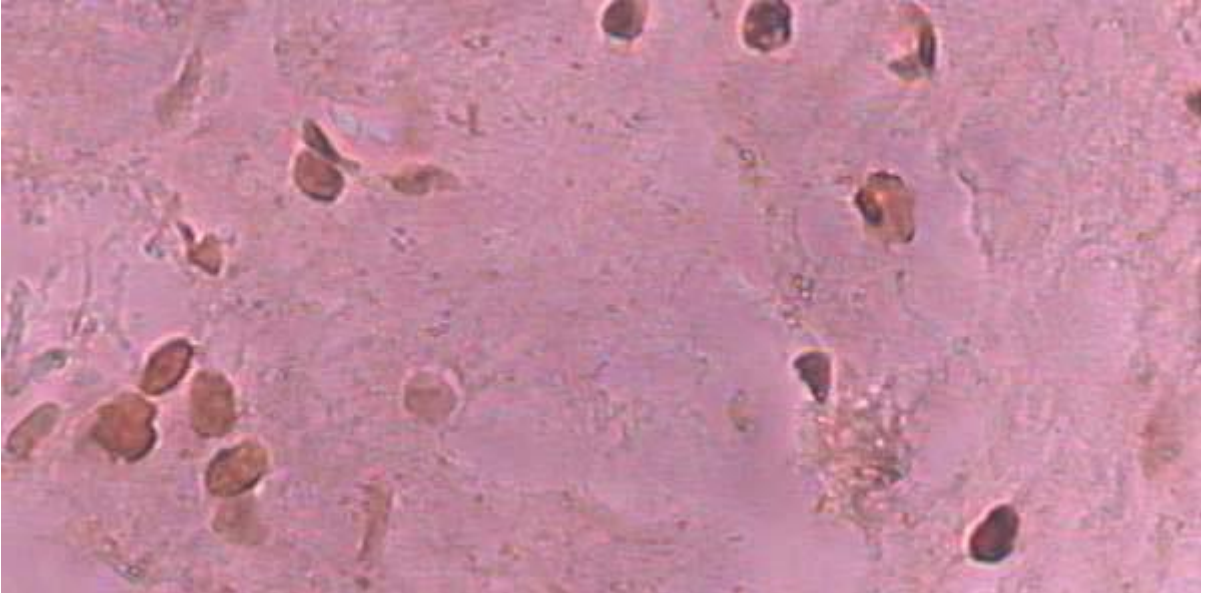
**Floresan Mikroskopu / Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı:** Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Eğer hücre kültürü çalışmasında kullanılırlarsa, canlı hücre ile cansız hücrenin ayırımına olanak tanır. Oysa hematoksilen ya da Giemsa boyamanın kullanıldığı örneklerde hücrelerin tamamı yöntemin prensibi gereği zaten ölmektedirler. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen bir boya (örn: hoechst boyası) ile sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya (örn: propidium iyodur) beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodur gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilirler. Kuşkusuz bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozla veya nekrozla ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır (89).

#### **2.2.4.2. Histokimyasal Yöntemler**

**Anneksin V Yöntemi:** Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde bulunan fosfatidilserinin (PS) apoptotik hücrelerde, hücre zarının dış yüzüne transloke olmasından faydalanılmaktadır. Dış yüze transloke olan PS'ler, floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur (90).

### **TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferase biotin – dUTP Nick End Labeling)**

**Yöntemi:** DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağladığı için hücre kültürlerinde ve doku kesitlerinde çok duyarlı bir testtir. Çalışmalarda testin duyarlılığı % 60–90 aralığındadır. Spesifitesi % 87 olarak belirtilmekte, nekrotik hücre ölümünün indüklenmesi ile spesifitenin % 70'lere düştüğü belirtilmektedir (91). Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozun varlığı bu metodla saptanabilir (89).



**Şekil-8:** TUNEL metodu uygulanmış spinal kord görünümü

**Kaspaz 3 Yöntemi:** Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz 3 immunohistokimyasal metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz 3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz 3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilirse apoptotik hücreler bu metotla tespit edilebilirler (89).

**M30 Yöntemi:** M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i eksprese eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (89).

### 2.2.4.3. Biyokimyasal Yöntemler

**Agaroz Jel Elektroforezi:** DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptozda DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internukleozomal bölgeler) kırıldığı için merdiven görüntüsü 'ladder pattern' oluşur. Bu bulgu apoptozun karakteristik özelliğidir ve nekrozda görülmez. O yüzden apoptozu nekrozdan ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (89).

**Western Blotting Yöntemi:** Bu yöntemle apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (kaspaz 3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metod ile saptanabilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır (89).

**Flow Sitometri Yöntemi:** Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen herhangi hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun saptanmasında kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptoz deteksiyonu yapılır.

- a. Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
- b. Anneksin V kullanılarak.

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptoz lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre populasyonu tayin edilir (89).

### 2.2.4.4. İmmunolojik Yöntemler

**ELISA Yöntemi:** Bu yöntemle gerek kültürü yapılmış hücre gruplarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür (89).

**Fluorimetrik Yöntem:** Fluorimetrik yöntem kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lizatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur, sonrasında orijinal kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresans şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır.

#### 2.2.4.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

**DNA Microarray Teknolojisi:** Henüz çok yeni ve pahalı bir yöntemdir. Kısa bir süre içerisinde binlerce genin ekspresyon derecelerinin ve apoptoza özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı sunmaktadır. M30 fare monoklonal antikorları ile yapılan immün enzim köprü ile henüz DNA parçalanmadan apoptoza gidecek hüceyi erken evrede gösterebilmektedir (89).

### 2.3. Kaspazlar

Kaspazlar, sitoplazmada normalde inaktif proenzimler olarak bulunur. Fakat proteolitik parçalanmadan sonra aktif hale geçerler ve böylece kaspaz aktivasyon zinciri başlar. Kaspazlar, (cysteine-dependent aspartate-specific proteases) kalsiyum bağımsız hücre içi sistein proteaz sınıfının en önemli bölümünü oluştururlar ve latent intrasellüler proenzimler olarak sentezlenmektedirler (92,93).

Kaspazlar aktif merkezlerinde sistein aminoasidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri ASP (aspartat, aspartik asit) bölgesinden keserler. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Sitokrom c'ler prokaspaz zimogenlerini aktive etmektedir (14). Kaspazlar apoptotik yolun cellatlarıdır ve apoptozdaki karakteristik değişikliklerin en önemli sebebidir (68).

Kaspaz aktivasyonunun inhibitörleri, sitokrom c'nin mitokondriden salınımını bloke etmez ancak ardışık kaspaz aktivasyonunu bloke ederek, hücre ölümünü önler. Sitokrom c gibi apoptozu indükleyen AIF'in de mitokondriden salınımı kaspazların aktivasyonuna sebep olur (95-96). Başlangıçta, kaspazlar mitokondride membran hasarı oluşturur ve bu olayların sonucunda; zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine yol açan hasarlar ortaya çıkar (14,68).

Günümüze kadar 14 memeli kaspazı tespit edilmiş olup hayvanlarda bulunan kaspaz 11 ve 12'nin insandaki karşılığı hala gösterilememiştir. Kaspaz 9, bcl-2 ailesi tarafından stimüle veya inhibe edilir. Kaspaz 2 ve kaspaz 8, TNF- $\alpha$  gibi sitokinler tarafından aktive edilir. Kaspazlar apoptozu aktive eden sinyaller tarafından tetiklenip, apoptoz yolaklarında aktif olarak görev alırlar (89, 96).

### 2.3.1. Kaspazların Yapısı ve Kaspaz Türleri

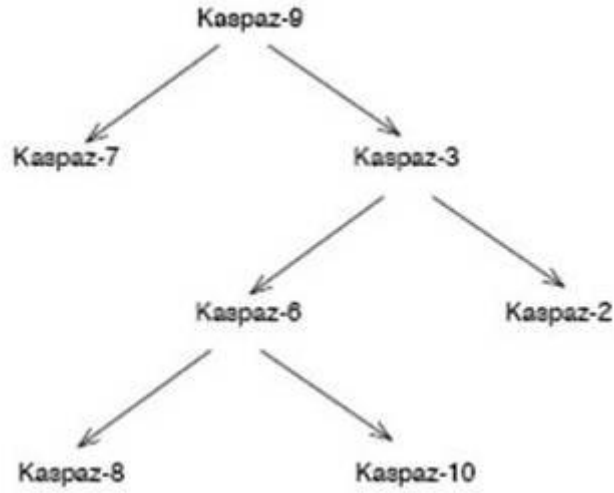
Kaspazlar 3 subunit içeren prokaspazlar olarak sentezlenir: Bunlar NH<sub>2</sub> terminal subunit, büyük subunit, ve küçük bir subunittir. Büyük ve küçük alt birimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar. Her prokaspaz çeşitli uzunluklarda bir ön bölge veya NH<sub>2</sub>-terminal peptid bölgesi içermektedir ve bu ön bölgeler düzenleyici olarak görev yaparlar.

Kaspazların ön bölgeleri çeşitlilik gösterir. CARD ( Caspase Recruitment Domain) ve DED kaspazların ön bölgelerinin özel motifleridir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar. Bu bölgeler prokaspazlar ve adaptörleri arasında homofilik etkileşime aracılık ederek prokaspaz aktivasyonunda önemli rol oynarlar. DED-DED etkileşiminde hidrofobik bir bağlantı kurulur, CARD-CARD bağlantısında yük etkileşimi gözlenir. Başlatıcı kaspazların kümelenmesi ve aktivasyonu için ölüm reseptörleri ile bağlantı kuran adaptör moleküller bulunur. Bunlardan DED kaspaz 8 ve 10 etkileşiminde, CARD ise kaspaz 9 ve Apaf-1 etkileşimde görev alır (88,95-97).

Her bir kaspaz enziminin optimum kesme bölgesi vardır ve bu bölge aspartik kesim noktasının N-terminalinde bulunan dört aminoasitlik bir motiftir. Bu motifin görevi, kaspazın hedef proteininin seçimini belirlemektir. Ayrıca bu motif ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektedir (95).

Aktif kaspazların 3 boyutlu yapısı tespit edilmiş olup 2 heterodimer, 2 geniş subunit tarafından çevrelenmiş 2 komşu küçük subunitle karşı yönde bir tetramer oluşturur. Her bir heterodimer substratın bağlanması ve katalizi için gerekli küçük ve geniş subunitler içerir (96).

Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları aktive eder. Proteolitik olarak birbirlerini aktifleştiren kaspazlar bir kaskad şeklinde işlerler (98).



**Şekil-9:** Kaspaz Kaskadı

Kaspazlar biyolojik fonksiyonlarına göre 3 ana grupta incelenmektedir (88,95,99,100).

**Tablo-3:** Kaspaz Türleri

<input type="checkbox"/> Kaspaz 1 (ICE)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 8 (FLICE, MACH, Mch 5)
<input type="checkbox"/> Kaspaz 2 (ICH-1)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 9 (ICE-LAP 6, Mch 6)
<input type="checkbox"/> Kaspaz 3 (CPP32, Yama, Apopain)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 10 (Mch 4, FLICE 2)
<input type="checkbox"/> Kaspaz 4 (ICERel-II, TX, ICH 2)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 11 (ICH-3)
<input type="checkbox"/> Kaspaz 5 (ICERel-III, TY)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 12
<input type="checkbox"/> Kaspaz 6 (Mch 2)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 13 (ERICE)
<input type="checkbox"/> Kaspaz 7 (Mch 3, ICE-LAP 3, CMH-1)	<input type="checkbox"/> Kaspaz 14 (MICE)

### 2.3.1.1. Sitokin Aktivasyonu Yapan (Enflamatuvar) Kaspazlar

Sitokin sekresyonu ve inflamasyondan sorumludurlar. Bunlar lenfokin üretiminden de sorumludur. Lenfokin; özel bir akyuvar tipi olan lenfositlerin ürettiği bir maddedir. İmmün sistemdeki diğer hücreler üzerinde etkisi vardır. Bu gruba dahil olan kaspaz türleri; kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 tür. Ayrıca kaspaz 1, 4, 5 tetrapeptid olup kendi kendilerine aktive olabilmektedirler (88, 101).

### 2.3.1.2. Başlatıcı Kaspazlar

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara yani ikincil kaspazlara ileten kaspaz türleridir. Kaspaz 2, 8, 9 ve 10 başlatıcı kaspazlar grubunda yer almaktadır. Başlatıcı kaspazların üç önemli özelliği vardır; farklı şekillerde gelen uyarıları, genel bitirici faza taşırlar, yeterli miktarda bitirici kaspazın aktifleşmesini sağlayarak apoptotik sinyalin çoğalmasını sağlarlar, ölümün en son basamağında bir kontrol noktası olarak bulunurlar. Apoptotik ölüm işlem sırasına göre kaspazlardan ilk görev alanlar başlatıcı ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun öncül bölgeleri bulunur.

### 2.3.1.3. Apoptozu Yürüten (Efektör) Kaspazlar

Efektör kaspazlar, ilgili proteinleri parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. Apoptozda sonlandırıcı kaspazlar olarak görev almaktadırlar. Kaspaz 3, 6 ve 7 bu gruba dahil olan kaspaz türleridir. Kaspaz 3, 6 ve 7 başlatıcı kaspazlardan farklı olarak kısa bir N-terminal peptid (23-28 aminoasitlik) bulundurulur. Substrat ve inhibitör özgüllüğünde kaspaz 3 ve 7 genellikle benzerdir. Kaspaz 6 ve 7, kaspaz 3 tarafından aktifleştirildiği için bitirici kaspazlar olarak sınıflandırılırlar.

### 2.3.2. Kaspazların Aktivasyonu

Kaspazların en az 3 yolla aktive edilebildiği gösterilmiştir: Otoaktivasyon, transaktivasyon ve non-kaspaz proteazları ile proteoliz (72,78). Prokaspazlar düşük fakat saptanabilir bir proteolitik aktiviteye ve belli koşullar altında otoaktivasyon potansiyeline sahiptir. Wild tip kaspazların aşırı salınımı ile prokaspaz 8 veya prokaspaz 9 uzun subunitleri arasındaki protein etkileşimi aracılığıyla oligomerler oluşturulur. Prokaspazların oligomerizasyonu otoaktivasyon için gereklidir. Başlangıç kaspazları bir kez aktive olduğunda diğer prokaspazları transaktive eder. Kaspaz aktivasyonu için diğer bir mekanizmada non-kaspaz proteazları ile direkt proteolizdir. Örnek olarak sitotoksik T hücre proteinazı, granzim-B, bir aspartat-spesifik serin proteinazı prokaspaz 3 ve 7'nin etkin bir aktivatörüdür. Granzim-B ayrıca prokaspaz 8, 9 ve 10'un aktivasyonunda da görev alır (81,88,97).

Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya



fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli ADP-riboz polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İnaktif (zimojen) formdaki kaspazlar kırılarak aktifleşirler ve dimerize olurlar. Kaspaz aktivasyonu (dimerizasyonu), ya hücre yüzey ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, ya da kaspaz 9 bağlayıcı protein olan Apaf-1'in oligomerize olmak üzere indüklenmesi ile gerçekleşir. Kaspaz ailesinin ve kaspaz inhibitörlerinin keşfi apoptotik hastalıklara terapötik yaklaşımda bizleri cesaretlendirmektedir. Zira farklı kaspazlara spesifik farklı sentetik inhibitörlerin yanı sıra kaspaz aktivasyonunu ya da kaspaz aktivitesini önleyen doğal kaspaz inhibitörleri de bulunmuştur (97,102).

Kaspaz ailesi CED-3'un, Bcl-2 ailesi ise CED-9'un homologudur. Kaspazlar proteolitik kaskadı aktive ederek apoptozu indüklerler. Gerek solucanlarda, gerekse de memelilerde temel apoptoz mekanizmaları birbirine benzer. Memelilerde apoptozun farklı formlarındaki ana kontrol noktası mitokondridir (103,104). Bu yüzden mitokondrinin aktivasyonu (Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması) apoptotik süreçte irreversibl noktayı gösterir. Mitokondrinin aktivasyonuna yol açan en önemli faktör bcl-2 ailesidir (91,103,104).

Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin üyelerinin mitokondri üzerindeki etkileriyle, ya sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir (apoptozun başlaması) ya da sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması baskılanır (apoptozun inhibisyonu).

Kaspaz aktivasyonunun başlaması için mitokondrinin devreye girmesi gereklidir. Apaf-1 latent sitozolik bir protein olup mitokondri tarafından salınan sitokrom c ile bağlanarak kompleks oluşturur. Bu da inaktif prekursor haldeki kaspaz 9'u aktive eder (102,106).

### **2.3.3. Apoptozda Kaspaz 3 ve Kaspaz 7'nin Önemi**

Diğer kaspazlar gibi kaspaz 3 ve kaspaz 9 da prokaspaz olarak sentez edilir. Kaspaz 3 ve kaspaz 9, kaspaz 8 ve kaspaz 10 ile birlikte aktive edilirler. Daha sonra kaspaz 3, kaspaz 6 ve 7'yi aktive etmektedir. Kaspaz 3 apoptozun efektör fazındaki en önemli kaspaz rolünü üstlenir. DNA fragmentasyonunda, DNAase aktivasyonuna sebep olan kaspaz 3'ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. Kaspaz 3 geninin yeteri kadar açığa çıkmamış olmasıyla beraber kromozom 8 üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir. Bu gen embriyonun 4. günden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3'teki eksiklik 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir (107).

## **2.4. Oksidatif Stres Göstergesi Olarak TAS, TOS ve OSİ**

### **2.4.1. Total Antioksidan Seviye (TAS)**

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemlidir. Çünkü kan antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirmektedir (108).

Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirübin, serbest demiri toplayan transferin ve serüloplazmin, ürik asit, E vitamini, C vitamini gibi proteinler yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Albümin, ürik asit, askorbik asit insan plazmasındaki total antioksidan kapasitenin %85'inden fazlasını oluşturmaktadır. Bunun nedeni, kanda bilirübin, glutatyon, flavinoidler, alfa-tokoferol ve beta-karoten gibi antioksidan sistemin komponentlerine nazaran albümin, ürik asit ve askorbik asitin seviyelerinin fazla olmasıdır (109,110).

Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjistik olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Total antioksidan kapasitenin ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler vermektedir (111, 112, 113).

### **2.4.2. Total Oksidan Seviye (TOS)**

Oksidatif stres; vücudumuzda mevcut oksidatif-antioksidatif dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu meydana gelen patolojik durumdur. Oksidatif stresin toplam değeri, TOS olarak ifade edilir. Bu fenomen, aşırı reaktif oksijen ve/veya nitrojen türlerinin üretimi veya antioksidan tampon mekanizmasının eksikliği sonucu oluşur. Reaktif oksijen ve nitrojen ürünleri toksiktir ve hücrenin lipid, protein ve DNA gibi biyomoleküllerine zarar verir. Damar endotelinde de bu durumdan kısmen etkilenmektedir.

### 2.4.3. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Total peroksitlerin, total antioksidanlara bölünmesiyle elde edilen oransal bir indekstir. OSİ'nin yüksek olması oksidatif stresin arttığını gösterir.  $OSİ \text{ (Arbitrary Unit)} = \frac{TOS \text{ (}\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Equiv./L)}}{TAS \text{ (mmol Trolox Equiv. /L)}}$



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Nisan 2016 - Eylül 2016 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi genel çocuk polikliniğine başvuran kronik hastalığı olmayan, çevresel tütün dumanına maruz kalan 51 çocuk (esas grup) ve çevresel tütün dumanına maruz kalmayan 28 çocuk (kontrol grup) çalışma için seçildi. Çevresel sigara dumanına maruz kalanlar (ankette belirtilmesine göre ailesinde günde en az 1 adet sigara içilen veya en az 2 saat süreyle çevresel sigara dumanına maruziyet olanlar) pasif içici, ailesinde hiç sigara içilmeyen ve çevresel sigara dumanına maruz kalmayanlar ise kontrol grubu olarak kabul edildi. Sigara maruziyeti elirlenmesinde anket yönteminin subjektifliği düşünülerek çalışmaya katılan tüm çocuklarda maruziyetin kesin göstergesi olan idrarda kotinin düzeyi çalışıldı.

Çalışma kontrollü, kesitsel olarak planlandı ve Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun onayı alındıktan sonra başlatıldı. Çalışmaya alınan çocukların velilerinden bilgilendirilmiş onam alındı. Veriler araştırmacının kendisi tarafından, yüz yüze görüşme tekniği kullanılarak toplandı. Çocukların ebeveynlerine çalışma anlatılmış, kendilerine anketle bazı sorular sorulup, çocuklarından kan ve idrar örneği alınacağı bildirilmiştir. Hazırlanan anket formunda; görüşme yapılan kişinin çocuğa yakınlık derecesi, ailede akraba evliliği olup olmadığı, çocuğun kardeş sayısı, anne ve babanın eğitim durumu, anne ve babanın işi ve ailenin ortalama aylık geliri, annenin gebelikte sigara içip içmediği, babanın sigara içip içmediği, içiyorsa miktar ve türü, evde anne ve babadan başka sigara içen olup olmadığı, içiliyorsa - miktarı ve türü, evde günde içilen toplam sigara miktarı, evin ısıtılmasının şekli, çocukta ve ailesinin diğer bireylerinde sürekli kontrol gerektiren veya sürekli ilaç kullanımı gerektiren bir durum var olup olmadığı soruldu.

Uygulanan anket formu Ek 1’de sunulmuştur. Tüm çocukların antropometrik ölçümleri yapıldı. Tüm çocuklardan idrar örnekleri steril ve kapaklı idrar kaplarına alınmıştır (idrara kreatinin ve kotinin düzeyleri için). Aynı sırada heparin ile yıkanmış tüplere alınan 5’cc’lik kan örnekleri apoptozis belirteçleri olan kaspaz 3, kaspaz 7, prooksidan ve antioksidan kapasite düzeyleri çalışılmak üzere alındı. Alınan kan örnekleri 10 dakika 3000 rpm ’de santrifüj edildi ve ayrılan serumlar çalışma tarihine kadar -80 °C’de dondurularak saklandı.

## **3.1.Yöntemler**

### **3.1.1. Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi**

Apoptozisin bir göstergesi olarak Kaspaz-3 enzim aktivitesi serumda kantitatif olarak Colorimetric Protease Assay Kit Yöntemi ile değerlendirildi. Kaspaz-3, Caspase-3/ CPP32 Colorimetric Assay Kit (Elabscience kit, USA) ile kullanım kılavuzunda açıklandığı şekilde ölçüldü. Yöntemin prensibi, işaretlenmiş substratın (DEVD-pNA) Kaspaz-3 ile kırılmasıyla açığa çıkan kromofor p-nitroanilitin (pNA) spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Kromofor pNA miktarı 405 nm'de mikrotiter plak okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) absorbans değeri tayin edildi.

### **3.1.2. Kaspaz-7 Enzim Aktivitesi Ölçüm Yöntemi**

Apoptozisin bir göstergesi olarak Kaspaz-7 enzim aktivitesi serumda kantitatif olarak Colorimetric Protease Assay Kit Yöntemi ile değerlendirildi. Kaspaz-7, FLICE/Caspase-7 Colorimetric Protease Assay Kit (Elabscience kit, USA) ile kullanım kılavuzunda açıklandığı şekilde ölçüldü. Yöntemin prensibi, işaretlenmiş substratın (IETD-pNA) Kaspaz-7 etkisi ile kırılmasıyla açığa çıkan kromofor p-nitroanilitin (pNA) spektrofotometrik olarak ölçüm esasına dayanmaktadır. Kromofor p-nitroanilitin (pNA) miktarı 405 nm'de mikrotiter plak okuma cihazında (ELX 800, Biotek, Türkiye) absorbans değeri tayin edildi.

### **3.1.3. İdrarda Kotinin, Kreatinin Ölçüm Yöntemi**

İdrar kotinin düzeylerinin ölçümü, DPC marka Immulite 2000 model cihaz ile (Siemens, USA) kemilüminesan yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Kotinin düzeyleri ng/ml cinsinden hesaplanmıştır. İdrarda kreatinin Architectc-8000 otoanizatör cihazı ( Abbott Türkiye ) ile ölçüldü. Elde edilen idrar kotinin düzeyleri idrar kreatinin düzeylerine göre standardize edildi.

### **3.1.4. Toplam Antioksidan Düzeyinin Ölçümü**

Örneklerin total antioksidan statusü, Ö. Erel tarafından geliştirilen Rel Assay Kit Diagnostics ticari kitler kullanılarak ölçüldü. Ölçüm tam otomatik bir yöntem olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur (146). Bu

yöntemde, örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS\* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikali antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır. Kalibratör olarak E vitamininin suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar mmol Trolox Eqiv/L olarak ifade edildi.

### 3.1.5. Toplam Oksidan Düzeyinin Ölçümü

Örneklerin total oksidan düzeyi, Ö. Erel tarafından geliştirilen Rel Assay Kit Diagnostics marka ticari kitler kullanılarak ölçülen, tam otomatik bir yöntem olup, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu kümülatif olarak ferrik iyonla oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntemdir (147).

**Prensip:** araştırılan örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak, yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xylenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Kalibratör olarak Hidrojen Peroksit ( $H_2O_2$ ) kullanılır. Sonuçlar  $\mu\text{mol } H_2O_2$  Eqiv./L olarak ifade edilir.

### 3.1.6. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Hesaplanması.

Bireylerin oksidatif stres indeksi (OSİ), ölçülen toplam oksidan status (TOS) düzeylerinin, elde edilen toplam antioksidan status (TAS) oranına yüzdesi olarak belirtilir (148). Hesaplamadan önce TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi mikromol birimine çevrilir. Sonuçlar Arbitrary Units (Türetilmiş büyüklük) olarak ifade edildi.

## 4. BULGULAR

Çalışmaya okul öncesi dönem 60 çocuk (0-5 yaş aralığında) dahil edildi. Çocuklar, çevresel tütün dumanı maruziyetine göre iki gruba ayrıldı. Çevresel tütün dumanına maruz kalan grup toplam 30 çocuktan oluşmaktaydı (16 kız - %53,3, 14 erkek - %46,7). Yaş ortalaması  $25,46 \pm 12,04$  ay idi. Kontrol grubu ise toplam 30 çocuktan oluşmaktaydı (14 kız - %46,7, 16 erkek - %53,3) ve onların yaş ortalaması  $25,40 \pm 11,81$  ay idi. Gruplar arasında cinsiyet ve yaş oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu. (Tablo 4).

Çevresel tütün dumanına maruz kalan grubun kilo ortalaması  $11,65 \pm 2,19$  kg idi ve kontrol grubunun kilo ortalaması  $12,41 \pm 2,23$  kg idi. ÇTDMK grubunun boy ortalaması  $84,73 \pm 9,48$  cm idi, kontrol grubunda ise  $87,60 \pm 9,14$  cm idi. Vücut kitle indeksleri hesaplandığında ÇTDMK grupta ortalama  $15,93 \pm 0,54$  kg/cm<sup>2</sup> idi, kontrol grubunda ise  $15,92 \pm 0,43$  kg/cm<sup>2</sup> idi. (Tablo 4).

Gruplar arasındaki yaş, ağırlık, boy, BMI oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ( $p > 0,05$ ). Her iki gruba ait antropometrik veriler tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 4. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubundaki çocukların antropometrik ölçümlerinin karşılaştırılması

	ÇTDMK n=30	Kontrol n=30	P ≥
	X±SD	X±SD	
Yaş (ay)	$25,46 \pm 12,04$	$25,40 \pm 11,78$	0,983
Boy (kg)	$84,73 \pm 9,46$	$87,60 \pm 9,14$	0,238
Kilo (cm)	$12,04 \pm 2,19$	$12,41 \pm 2,23$	0,189
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	$15,93 \pm 0,54$	$15,92 \pm 0,43$	0,917

Çalışmaya alınan çocukların ebeveynlerinin eğitim durumları değerlendirildiğinde; ÇTDMK çocukların annelerin 14’ü (%46,7) okuma yazma bilmiyorlardı, 5’i (%16,7) sadece okur yazardı, 10’u (%33,3) ilköğretim mezunu, 1 anne (%3,3) ise lise mezunuydu. Kontrol grubunda annelerin 3’ü (%10) okuma - yazmayı bilmiyordu, 5’i (%16,7) sadece okur yazardı, 18’i (%60) ilköğretim mezunu, 4 anne (%13,3) ise lise mezunuydu (Tablo 5).

ÇTDMK çocukların babaların ise 1 baba (%3,3) üniversite mezunu, 3 baba (%10) lise mezunu, 22'si (%73,3) ilköğretim mezunu, 3 (%10) baba sadece okur yazardı, 1 baba (%3,3) ise okuma yazmayı bilmiyordu. Kontrol grubundaki çocukların ise 3 babası (%10) üniversite mezunu, 8 baba (%26,7) lise mezunu ve babaların 19'u (%63,3) ilköğretim mezunuydu (Tablo 6).

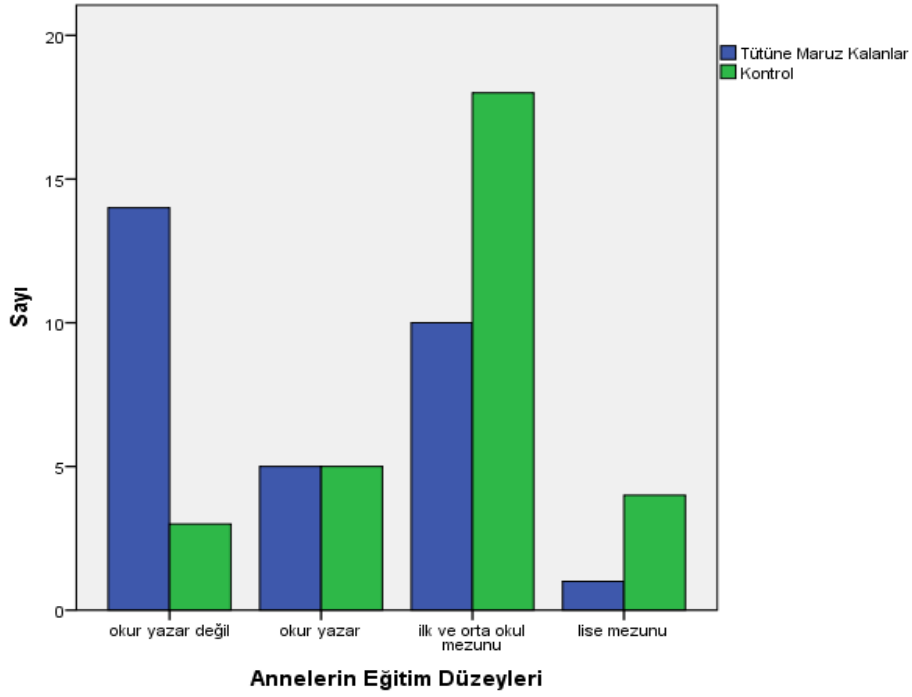
Tablo 5: Çalışmaya alınan annelerin eğitim durumu.

Grup	Okur - yazar değil	Okur - yazar	İlköğretim mezunu	Lise mezunu	Üniversite mezunu
ÇTDMK	14 (%46,7)	5 (%16,7)	10 (%33,3)	1 (%3,3)	0
Kontrol	3 (%10)	5 (%16,7)	18 (%60)	4 (%13,3)	0

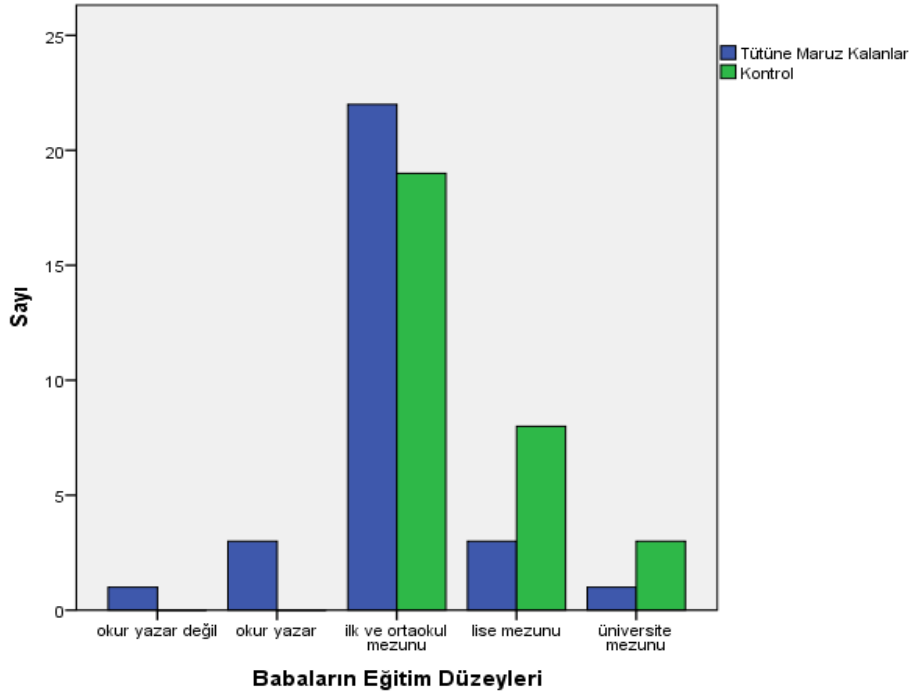
Tablo 6: Çalışmaya alınan babaların eğitim durumu.

Grup	Okur - yazar değil	Okur - yazar	İlköğretim mezunu	Lise mezunu	Üniversite mezunu
ÇTDMK	1 (%3,3)	3 (%10)	22 (%73,3)	3 (%10)	1 (%3,3)
Kontrol	0	0	19 (%63,3)	8 (%26,7)	3 (%10)





Grafik 1. Çevresel tütün dumanına maruz kalan ve kontrol grubundaki çocukların annelerinin eğitim düzeyi.



Grafik 2. Çevresel tütün dumanına maruz kalan ile kontrol grubundaki çocukların babalarının eğitim düzeyi.

Babaların eğitim düzeyleri irdelendiğinde ÇTDMK çocukların babalarında kontrol grubuna göre eğitim seviyesi daha düşüktü ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p \leq 0,010$ ) Annelerin eğitim düzeyleri araştırıldığında ÇTDMK çocukların annelerinde kontrol grubuna göre eğitim seviyesi hem daha düşüktü ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p \leq 0,023$ )

ÇTDMK grupta idrar ile atılan kotinin ortalaması  $1,72 \pm 0,21$  idi, kontrol grubunda ise  $0,75 \pm 0,27$  idi. Çalışmamızda ÇTDMK grupta idrar ile atılan kotinin miktarı kontrol grubundaki miktara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p \leq 0,002$ ). ÇTDMK grupta idrardaki kotinin/kreatinin oran ortalaması  $41,08 \pm 15,36$  idi, kontrol grubunda ise bu oran ortalaması  $20,13 \pm 9,01$  idi. Çalışmamızda çevresel tütün dumanına maruz kalan çocukların idrarında kotinin/kreatinin düzeyi kontrol grubundaki rakamlara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p \leq 0,001$ ) (Tablo 7).

Tablo 7. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubundaki çocukların idrarda kotinin ve kotinin/kreatinin oranları.

	ÇTDMK n=30 X±SD	Kontrol n=30 X±SD	P ≤
İdrarda Kotinin (ng/ml)	$1,72 \pm 0,21$	$0,75 \pm 0,27$	0,002
Kotinin / Kreatinin (ng/mg)	$41,08 \pm 15,36$	$20,13 \pm 9,01$	0,001

ÇTDMK grupta TAS ortalaması  $1,16 \pm 0,28$  idi, kontrol grubunda ise  $1,58 \pm 0,23$  idi. Çalışmamızda ÇTDMK grupta TAS düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu. ( $p \leq 0,001$ ) ÇTDMK grupta TOS ortalaması  $14,74 \pm 3,64$  iken kontrol grubunda  $10,70 \pm 1,94$  idi. Çalışmamızda ÇTDMK grupta TOS düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. ( $p \leq 0,002$ ) (Tablo 8)

ÇTDMK grupta OSİ ortalaması  $1,28 \pm 0,38$  iken kontrol grubunda ise  $0,67 \pm 0,15$  idi. Çalışmamızda çevresel tütün dumanına maruz kalan grupta OSİ düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. ( $p \leq 0,001$ ) (Tablo 8)

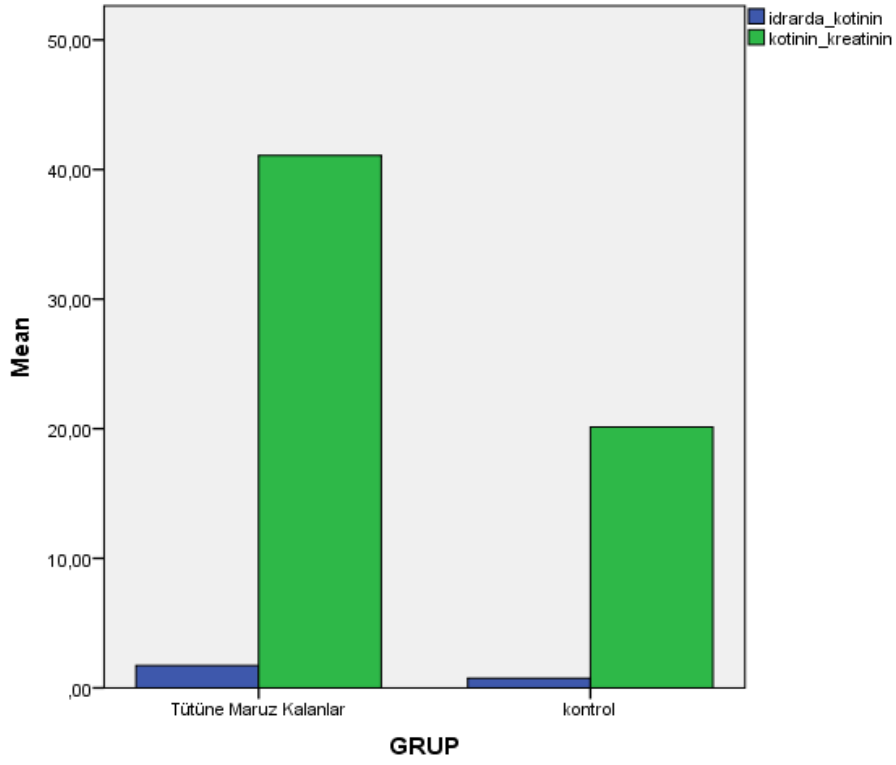
Tablo 8. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubundaki çocukların oksidatif stres oranları

	ÇTDMK n=30 X±SD	Kontrol n=30 X±SD	p≤
TAS (mmolTro.Eqv./L)	1,16±0,28	1,58±0,23	0,001
TOS (µmolH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Eqv./L)	14,74±3,64	10,70±1,94	0,002
OSİ (AU)	1,28±0,38	0,67±0,15	0,001

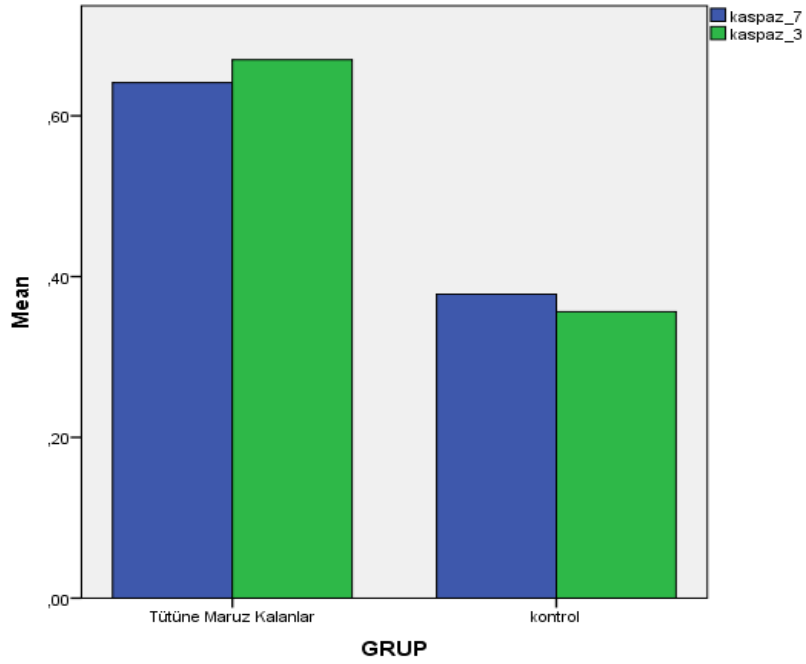
ÇTDMK grupta kaspaz 7 ortalaması 0,64±0,19 iken kontrol grubunda 0,37±0,16 idi. Çalışmamızda ÇTDMK grupta kaspaz 7 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. (p≤0,001) Çevresel tütün dumanına maruz kalan grupta kaspaz 3 ortalaması 0,66±0,21 iken kontrol grubunda 0,35±0,10 idi. Çalışmamızda çevresel tütün dumanına maruz kalan grupta kaspaz 3 düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p≤0,001) (Tablo 9).

Tablo 9. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubu çocukların kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeyi karşılaştırılması

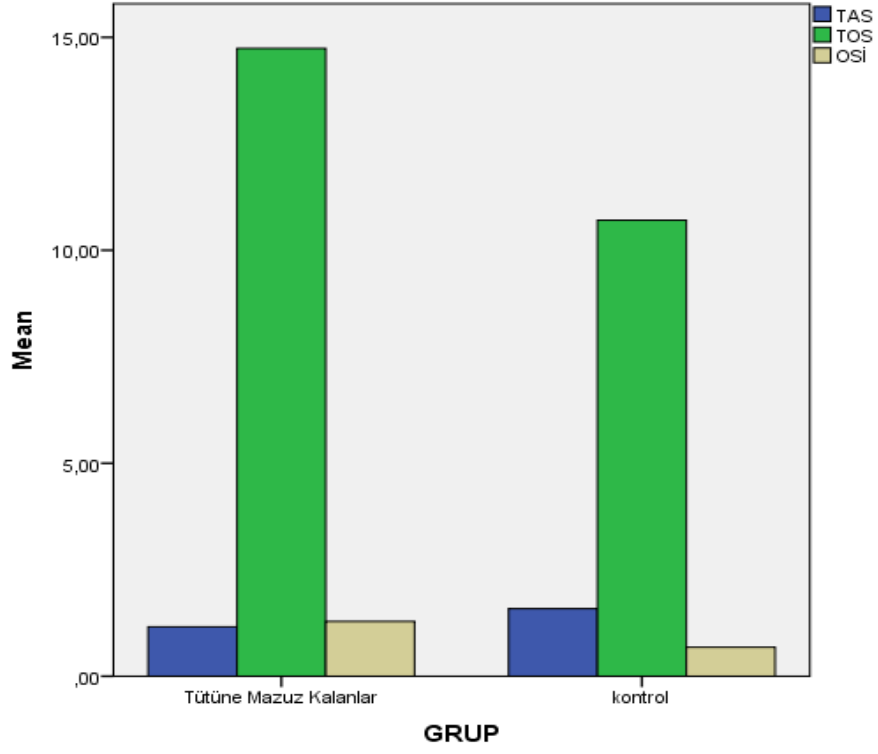
	ÇTDMK n=30 X±SD	Kontrol n=30 X±SD	p≤
Kaspaz 7 (ng/ml)	0,64±0,19	0,37±0,16	0,001
Kaspaz 3 (ng/ml)	0,66±0,21	0,36±0,10	0,001



Grafik 3. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubu çocukların idrarda kotinin ve kotinin/kreatinin düzeyleri karşılaştırılması



Grafik 4. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubu çocukların serum kaspaz 3 ve kaspaz 7 düzeyi karşılaştırılması



Grafik 5. Çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar ile kontrol grubu çocukların oksidatif stres parametrelerinin karşılaştırılması

## 5. TARTIŞMA

Pasif sigara içiciliği, tıbbi sonuçlarından, sosyolojik ve hukuki boyutlarına kadar çok değişik yönleriyle günümüzde oldukça fazla tartışılan konulardan birisidir. Bu konu, çocukların maruziyeti bakımından ele alındığında genellikle sigara kullanan yakın aile bireyleri yüzünden çocukların pasif içici konumuna düştükleri gözlenmektedir. Pasif içiciliğin derecesine göre çocuklarda çok çeşitli sağlık sorunları ortaya çıkabilmektedir. Bu sorunların başında bebeklerde İUGG, düşük doğum ağırlığı, perinatal ve neonatal ölüm oranında yükselme, akciğer fonksiyonlarında azalma, bronşit, pnömoni, astım, otitis media gibi solunum yolları hastalıklarına yatkınlık, nörogelişimsel gecikmeler, davranış problemleri, okul başarısında azalma ve ani bebek ölümlerin sıklığında artma gelmektedir (114 - 118).

Bununla beraber genel popülasyonda pasif içiciliğin insan geneteğinin üzerine olan olumsuz etkisi merakla takip edilmektedir. Sigara içen ve pasif içici erişkin bireylerde yapılmış çok sayıda araştırma, bu kontaminant maddenin hücre DNA'sı yapısını bozarak genotoksik etkilere yol açtığı tartışılmaktadır (119, 11, 13, 120, 121). Gelişen genotoksik etkilerin ileride maligniteye zemin hazırlanması bu konunun klinik önemini daha da artırmaktadır. Benzer risklerin çocuklarda da bulunduğu değinen araştırmaların olduğu da dikkate alındığında, çocuklarda pasif içiciliği; yol açtığı diğer sağlık sorunlarının yanı sıra, genotoksisiteye bağlı potansiyel kanserojen etkisi bakımından da hayati önemdedir (122, 123). Her ne kadar çocuklarda pasif içiciliği azaltmak için ciddi tedbirler alınmaya çalışılsa da yakın bir gelecekte bu maruziyeti ortadan kaldırma olasılığı düşük görülüyor. Dolayısıyla bu sorunun daha uzun yıllar devam edeceği düşünülebilir. Bu durumda çocukların pasif içicilikten ne oranda etkilendiklerinin aydınlatılması önemlidir. Gün geçtikçe bu genotoksik etkilerin daha hassas bir şekilde erken tespit edilmesi ve endişe duyulan kanserojen etkinin rutinde tespitine yönelik kullanılabilir bir markerı olup olmayacağı tartışılmaktadır (118, 123, 124, 125).

Sigara dumanından kaynaklanan birçok prooksidan ve serbest radikalın oksidatif hasarı başlattığı veya artırdığı ve malignensi dahil çeşitli ciddi pulmoner ve kardiyovasküler hastalıklara yol açtığı tespit edilmiştir (126, 127). Sigara dumanı ile ilişkili artmış reaktif oksijen ürünlerinin üretimi antioksidan savunma sistem kapasitesini aşarak proteinler, lipidler ve DNA'da oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir (128 - 131). Her ne kadar sigara dumanı maruziyeti ile ilgili patolojilerde görevli altta yatan patogenetik mekanizmalar hakkında tam bir fikir birliği olmasa da

sigara dumanı ile ilgili bozukların birçoğunun patogeneğinde serbest radikallerce oluşturulmuş oksidatif hasarın rolü olduğu öngörölmüştür.

Çalışmamızda çocukların pasif sigara maruziyetini değerlendirmek için ebeveynleriyle anket ve çocukların idrarlarında kotinin seviyelerinin ölçümü yapılmıştır. Ölçülen spot idrarda kreatinin düzeyi ile idrarın kotinin/kreatinin düzeyine göre kotinin standardizasyonu sağlanmıştır.

Çeşitli araştırmalarda ebeveynlerin çocukların sigara dumanı maruziyeti konusunda verdikleri bilgilerin, çocukların idrarında ölçülen kotinin düzeyi ile korele olmadığı, bu nedenle bu bilgilerin tek başına güvenli olamayacağı bildirilmiştir (132,133). A. Karadağ ve ark. astım atağı ile başvuran çocukların ebeveynlerine uyguladıkları ankete verilen cevaplarla, çocukların idrarında ölçülen kotinin düzeyinin uyumlu olmadığını, dolayısıyla çocukların sigara maruziyeti konusunda ebeveynlerden alınan bilgilerin fazla güvenilir olmadığını vurgulamışlardır (133). Bizim çalışmamızda da yanında sigara içilmediğı bildirilen çocuklardan alınan idrar örneğinde kotinin düzeyinin yüksek bulunması oldukça düşündürücüdür. Bu oran %10 olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar ve istatistikte anlamlı bir değışiklik oluşturmamıştır. Bu sonuçlar çocuklarda pasif içicilik oranları belirlenirken ailelerin verdiği bilgilerle birlikte objektif bir kriter olan kotinin seviyesinin çalışılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Çobanoğlu N. ve ark.'nın 9-12 yaş çocuk grubunda yapmış oldukları bir çalışmada babaları sigara içen öğrencilerin idrar kotinin düzeyleri babaları sigara içmeyen çocuklarda saptanmış kotinin düzeyine göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksekti (134). L. Irvine ve ark. çocuklarda evde içilen sigara sayısı ve evde sigara içen kişi sayısı ile kotinin düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptamış (135). Bizim çalışmamızda da sigara dumanına maruz kalan grubun idrar kotinin ve idrar kotinin/kreatinin düzeyleri, sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu sonuçlar daha önce yapılmış benzer çalışmalarla uyumluydu. (133, 134, 135).

Zalata A. ve ark. 1-8 yaş arasındaki çocuklarda yaptıkları klinik bir çalışmada, sigara dumanı maruziyetinin oksidatif stresi arttırdığını, bunun da DNA hasarına neden olduğunu göstermişlerdir (9). Kösecik M. ve ark.'nın yaptığı klinik bir çalışmada ise pasif sigara içicisi olan çocuklarda total lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir. Bunun da erişkin yaşlarda ortaya çıkabilecek, patogeneğinde ateroskleroz süreci olan 100'e yakın hastalığın sebebi olduğu düşünülmüştür (136). Ayrıca Başkaran S. ve ark. yaptıkları bir başka deneysel çalışmada da sigara

dumanı maruziyetinin, lipid peroksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (137). Bizim daha önceki çalışmamızda da sigara dumanına maruz kalan grubun TOS ve OSİ düzeyleri, sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre anlamlı derecede yüksekti. Sigara dumanına maruz kalan grupta TOS ve OSİ düzeylerinin sigara dumanından etkilenmeyen gruba göre anlamlı derecede yüksek olması bize artmış oksidatif stresin DNA hasarını tetiklediğini düşündürdü. (138)

Tüm oksidan maddeler direk ve indirekt olarak serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Güçlü oksidan seviyenin olması antioksidan sisteminde aşırı tüketimlere neden olur. Düşük antioksidan seviyenin oluşması birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. Plazmada birçok antioksidan madde bulunmaktadır. TAS'nin antioksidan sisteminin hepsini temsil ettiği bildirilmiştir (131,139). Ayçiçek A. ve ark. yaptıkları bir çalışmada pasif sigara içici konumundaki anneler ile onların bebeklerinde TAS'nin düşük olduğunu gösterilmiştir (140).

Yılmaz G. ve ark. yaptıkları bir çalışmada nonenzimatik antioksidan sistemin en önemli öğelerinden olan vitamin A, vitamin C ve vitamin E seviyelerini, annesi sigara içen bebeklerde içmeyenlere göre anlamlı düzeyde düşük saptamışlardır (141). Jendryczko A. ve ark. sigaraya maruz kalan okul çocuklarında yaptıkları bir çalışmada, plazma vitamin E seviyeleri değişmezken, askorbik asit seviyeleri, sigaraya maruz kalan çocuklarda belirgin olarak düşük bulunmuştur. Plazma vitamin E seviyesi değişmemesine rağmen sigaraya maruz kalan çocukların eritrositleri, sigaraya maruz kalmayanlara göre in vitro çok daha kolay oksitlenmeye meyilli bulunmuştur; bu durum dışarıdan vitamin E verilmesiyle düzeltilebilmiştir (142). Yıldırım F. ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada da çevresel tütün dumanı maruziyetinde TOS ve OSİ artmış bulunurken TAS düşük bulunmuştur. (143). Bizim çalışmamızda da çevresel tütün maruziyeti olan çocuklarda antioksidan savunmanın göstergisi olan TAS anlamlı olarak düşük bulunmuştur.

Günümüzde tütün ürünlerinin her kesimden insan tarafından yaygın kullanımı vardır ve bu durum bir pandemi olarak değerlendirilmektedir. Öksüz A. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada çevresel tütün dumanına maruz kalan çocukların babalarının kontrol grubuna göre eğitim seviyeleri anlamlı oranda düşük bulunmuş (144). Bizim çalışmamızda çevresel tütün dumanına maruz kalan çocukların baba ve annelerinin eğitim düzeyi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Eğitim seviyesi düşük ebeveynlerin çocuklarının yanında daha sık sigara içtiği saptanmıştır. Sigara kullanımının toplumda hem eğitilmiş ve hem de eğitimsiz kesimde yaygın olduğu düşünüldüğünde eğitim düzeyi yüksek ebeveynlerinin çocukların bulunduğu ortamdan daha uzakta tütün kullandıkları yorumu yapılabilir.



Apoptoz embriyogenez aşamasında yanlış şekillenen hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve dokunun yeniden şekillendirilmesinde; daha sonraki aşamalarda gelişim, homeostazın sağlanması ve yaşlanmada, tüm yaşam süreci boyunca hasar görmüş, transformasyona uğramış, enfektif olmuş ve yaşam süresini doldurmuş hücrelerin elimine edilmesinde fonksiyon gören programlanmış hücre ölümüdür.

Embriyolojik dönemde el ve ayak parmak taslaklarının arasındaki ara dokunun ortadan kalkması, merkezi sinir sisteminin şekillenmesi, kan damarlarının sayısının azaltılması, fötusun seksual gelişimi sırasında duktus sisteminin cinsel gerilemesi apoptoz ile gerçekleşir. Postnatal hayatta menstruel siklus sonunda korpus luteumun involusyonu, süttten kesilen dişilerin meme bezlerinde glandüler dokunun küçülmesi apoptozis ile gerçekleşir. Bunların dışında diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, bağışıklık sistemi hastalıkları, folliküler atrezi, viral enfeksiyonlar, tümör oluşumu, AIDS, aterosklerozis, miyokard infarktüsü, organ transplantasyonları, oksidatif stres, alkolizm, X ışınları ve radyasyona maruz kalma da canlıda apoptoza neden olan patolojik süreçlerdir (145).

Apoptozis vücut dengesinin korunmasında önemli bir yer oluşturur. Tetiklenmiş apoptoz organ yetmezliğine neden olurken, engellenmiş apoptoz hiperplazi ve malignansi oluşumu olarak kendini göstermektedir. Programlı hücre ölümünün aksaması gelişimsel, otoimmün ve nörodejeneratif hastalıklarda ve kanser sürecinde büyük öneme sahiptir (146). Apoptotik süreçte anahtar rol oynayan esas proteinlerden kaspaz molekülleridir. Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağımlıdır. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktive ederler. Takriben 100 farklı hedef protein yapısını etkileyerek apoptoza neden olurlar. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive edebilirler ve hücre iskeletini oluşturan proteinlerinin morfolojisini etkileyerek hücreyi ölüme götürürler.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı kanser hücre hatlarında kaspaz 3'ün belirlenebilir limitlerin çok altında sentezlendiği ortaya konulmuştur. Yapılan bir çalışmada bunun nedeninin kaspaz 3 genindeki (CASP-3) parsiyal delesyondan kaynaklandığı ortaya konulmuştur (147). Kanser oluşum nedenlerinden biri apoptozisi kontrol eden genlerin mutasyonu ve sonucunda da kaspazların sentezinde azalma ya da hiç sentezlenmemesidir. Olası kanser terapötik ajanlarının geliştirilmesi, bu enzimlerin sentezlerinin uyarılabilmesinin sağlanması esasına dayanır.

Sun H. ve ark. tarafından hepatosellüler karsinom hücreleri ile yapılan çalışmada, kaspaz 3 enzim aktivitesi ölçülmüş ve kanserli dokularda normal karaciğer dokusuna oranla kaspaz 3 aktivitesinin düşük olduğu bildirilmiştir. Kaspaz 3 ifadesindeki azalmanın hepatosellüler oluşumunda etkili olduğu sonucuna varılmıştır (147). Kısmalı G. ve Sel T. yaptıkları çalışmada hepatosellüler karsinom hücreleri paraquat ile oksidatif strese maruz bırakılmış ve zamanla artan kaspaz seviyelerini ve sonucunda oluşan apoptozisi gözlemlemişlerdir (148). Oksidatif stres ve DNA hasarı varlığında kaspaz kaskadı aktifleşmesi ile apoptozis artmaktadır.

Apoptozis süreci vücutta kanser önleyici bir mekanizma olduğu gibi kanser tedavisinde kullanılan ilaçların da etki mekanizmasında yararlanılan bir durumdur. Kanser tedavisinde kullanılan kemoteropötik bir ajan olan etoposid DNA replikasyonu ve transkripsiyonunda görev yapan topoizomerez II enzimini inhibe ederek çift zincir DNA kırıkları oluşturur. Bu hücrelerin apoptozis mekanizması ile ortadan kaldırılması malignansi tedavisinin bir parçasını oluşturmaktadır (149).

Sigara dumanındaki bileşenler oksidatif stresi arttırdığı ve DNA kırıklarını tetiklediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Akıncı N. ve ark'ı yaptıkları bir çalışmada pasif sigara içimine maruz kalan çocuklarda periferik kandaki lenfositlerden Comet yöntemiyle DNA hasarını araştırmışlar ve DNA hasarının arttığını tespit etmişlerdir (150). Kılıç M. yaptığı çalışmada çevresel tütün dumanına maruz kalan çocukların periferik kan lenfositlerinde Comet assay yöntemi ile araştırdığı DNA hasarı kontrol grubuna göre yüksek bulmuştur (151). Pek çok çalışmada sigara maruziyetinde gösterilen DNA hasarı sonucunda artmış apoptozis beklenen bir süreçtir. Sigara maruziyetinin bronşiyal epitel hücrelerinde, fibroblastlarda, alveolar makrofajlarda, plasentada ve endotel hücrelerinde apoptozisi arttırdığı pek çok çalışmada gösterilmiştir (152-155).

Güzel B. yaptığı bir çalışmada çevresel tütün dumanı maruziyeti olan çocuklarda apoptozis belirteci olan M30 ve M65 proteini çalışmış. Çevresel tütün dumanına maruz olan grupta M30 proteinin seviyesi düşük bulunurken, M65 proteinin miktarında iki grupta anlamlı fark bulunmamıştır. M30 proteinin sadece apoptozisi gösterirken M65 proteini apoptozis ve nekrozisten sorumludur. Çevresel tütün dumanı maruziyetinde apoptozisin baskılandığından bahseden bu çalışma bizim çalışmamız sonuçları ile çelişmektedir. (156)

Ozan E. ve ark.'nın bir çalışmasında çevresel sigara dumanı maruziyeti olan gruptaki bireylerinin trakea lümeninde epitelyal hücre dökülmelerine, trakea epitelinde apoptozise giden hücrelere, aktive olmuş granüllü hücrelere rastlamışlardır. Sigara dumanının yol açtığı hipoksiye bağlı olarak epitel tabakasındaki granüllü hücrelerin aktivasyonunu ve epitelyal hücrelerdeki apoptozisin indüklendiğini saptamışlardır (157). Dündar S. ve ark.'nın yaptıkları çalışmada çevresel sigara dumanı maruziyeti olan ratların retina ve koroid dokusunda kaspaz 3 düzeyi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Böylece sigara dumanının makula dejenerasyonu ve diğer retinal hastalıklarda risk faktörü olduğundan bahs ediyorlar (158). Yapılan bir başka çalışmada ise Wang ve arkadaşları sigara dumanının endotel hasarına neden olduğunu, bunun sonucunda p 53 yolağı ile kaspaz 3 düzeyinin arttığını ölçmüşlerdir. Oluşan endotel hasarının damar duvarında vasküler kökenli pek çok hastalık oluşmasında zemin hazırladığı gibi ateroskleroza da arttırdığını göstermişlerdir (159). Wu-Hsien kuo ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada sigara dumanına maruz kalan deney farelerinin akciğer dokusunda apoptozisin artmış olduğunu tespit etmişlerdir (160). Sigaranın maruziyetinde artan apoptozis maligniteyi önleme amaçlı olduğu gibi kronik süreçte akciğer dokusunda harabiyete yol açarak hasarı arttırdığını tahmin etmişlerdir.

Bizim çalışmamızda çevresel tütün dumanına maruz kalan grupta kaspaz 3 ve kaspaz 7 seviyeleri sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Tütün dumanına maruz kalan grupta kaspaz 3 ve kaspaz 7 seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olması apoptozisin DNA hasarı oluşmuş hücreleri ortadan kaldırmak amacıyla arttığına işaret ediyor. Artan oksidatif stres ve DNA hasarının neden olduğu malignite riski taşıyan hücrelerinin apoptozis ile ortadan kaldırılmaya çalışılmasını anlamlı buluyoruz.

Sonuç olarak çalışmamız bildiğimiz kadarıyla bugüne kadar sigara dumanına maruz kalan çocuklarda apoptozis sürecini kaspaz 3 ve kaspaz 7 belirteçlerini kullanarak değerlendiren ilk çalışmadır. Sigara dumanına maruz kalan çocuklarda kaspaz 3 ve kaspaz 7 belirteçlerinin anlamlı düzeyde yüksek bulunması, vücudun çevresel tütün dumanına maruziyetine karşı kendini savunduğunu göstermektedir. Çocukların çevresel tütün dumanına maruziyetinin objektif bir göstergesi olan kotinin ve kotinin/kreatinin seviyesi de tespit edilen etkilerin güvenilirliğini sağlaması açısından değerlidir. Bununla birlikte, bu konuda, uzun dönemli ve daha geniş çocuk popülasyonlu farklı yöntemler ile çalışmalara gereksinim olduğunu kaanatındayız..

## KAYNAKLAR

1. Domalaga-Kluwik J. Effects of cigarette smoke on the lung and systemic immunity. *J Physi Pharm* 2008; 59: 19-34.
2. Tobacco Control. Country profiles Atlanta. American Cancer Society, 2000; 46-50.
3. Türkiye Nüfus ve Sağlık Araştırması, 2003; 1-12.
4. Bilir N, Güçüz B, Yıldız N. Sigara içme konusunda davranışlar ve tutumlar. Hacettepe Halk Sağlığı Vakfı Yayını, 1997; 1-20.
5. Bilir N, Güçüz B, Yıldız N. Sigara içme konusunda davranışlar ve tutumlar. Hacettepe Halk Sağlığı Vakfı yayını, 1999;1-16.
6. American Academy of Pediatrics. Committee on Environmental Health. Environmental tobacco smoke: a hazard to children. *Pediatrics* 1997; 99: 639-42.
7. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev.* 1996;18: 188-204.
8. Eiserich JP, van der Vliet A, Handelman GJ, Halliwell B, Cross CE. Dietary antioxidants and cigarette smoke-induced biomolecular damage: a complex interaction. *Am J Clin Nutr.* 1995 Dec; 62(6 Suppl):1490-500.
9. Zalata A, Yahia S, El-Bakary A, Elsheikha HM. Increased DNA damage in children caused by passive smoking as assessed by comet assay and oxidative stress. *Mutat Res.* 2007; 629(2): 140-7.
10. Shermatov K, Zeyrek D, Yildirim F, Kilic M, Cebi N, Kocyigit ADNA damage in children exposed to secondhand cigarette smoke and its association with oxidative stress. *Indian Pediatr.* 2012 Dec;49(12):Epub 2012 Jun 10: 958-62.
11. Akbaş E, Çelik A, Derici E, Söylemez F. Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresi ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Geriatrici* 2001; 4(1): 15-8.
12. Michalska J, Motykiewicz G, Pendzich J, Kalinowska E, Midro A, Chorazy M. Measurement of cytogenetic endpoints in women environmentally exposed to airpollution. *Mutat Res.* 1999; 445(2): 139-45.
13. Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis.* 2005; 26(11): 1846-55.
14. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002; 9: 143-8.
15. Nothrop-Clewes CA, Thurnham DI. Monitoring micronutrients in cigarette smokers. *Clin Chim Acta* 2007; 377: 14-38.

16. Sağlık Bakanlığı Madde Bağımlılığı Şube Müdürlüğü Türkiye Küresel Gençlik Tütün Araştırması, 2003; 1-26.
17. Sağlık Bakanlığı Madde Bağımlılığı Şube Müdürlüğü Türkiye Küresel Gençlik Tütün Araştırması, 2010;1-18.
18. Özyardımcı N. Sigara ve Sağlık, Uludag Üniversitesi (Tıp Fakültesi) Basımevi, Bursa, 2002;
19. Karlıkaya C, Öztuna F, Solak ZA, Özkan M, Örsel O. Tütün Kontrolü. Toraks Dergisi. 2006; 7(1): 51-64.
20. Edwards R. The problem of tobacco smoking. BMJ. 2004; 328(7433): 217–19.
21. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Sağlık İşleri Dairesi Başkanlığı Genelge. 4207 sayılı Kanunun Uygulanması 1996; 76: 39
22. T.C. Resmi Gazete- Kanun. Tütün mamullerinin zararlarının önlenmesine dair kanunda değişiklik yapılması kanunu. 19 Ocak 2008; Sayı: 26761
23. C.J. Smith, T.H. Fischer, Particulate and vapor phase constituents of cigarette mainstream smoke and risk of myocardial infarction, Atherosclerosis 2001; 158: 257–67.
24. Costa DL. Air Pollution. Kendall RJ, Anderson TA, Baker RJ, et al. Ecotoxicology. Chapter: 28 and 29. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. Sixth ed. Klaassen CD. Ed. McGraw-Hill NY; 2001;977-1046.
25. Giovino GA. The tobacco epidemic in the United States. Am J Prev Med. 2007; 33(6 Suppl): 318-26.
26. Kayaalp SO, Guven H. Nikotin ve diğer ganglion stimule ediciler, sigara ve sağlık, ganglion bloke edici ilaçlar: Kayaalp Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Onbirinci baskı; Kayaalp SO. ed, Hacettepe-Taş, Ankara. 2005; 2:106-1016.
27. The health consequences of involuntary exposure to tobacco smoke: a report of the Surgeon General. – [Atlanta, Ga.] : U.S. Dept. of Health and Human Services (USDHHS), Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 2006;
28. Benowitz NL. Biomarkers of enviromental tobacco smoke. Environ Health Perspect. 1999 May;107 Suppl 2: 349-55.
29. Brunnemann KD, Yu L, Hoffmann D. Assessment of carcinogenic volatile Nnitrosamines in tobacco and in mainstream and sidestream smoke from cigarettes. Cancer research, 1977; 37: 3218–22.

30. Environmental Tobacco Smoke Air Quality Guidelines -Second Edition WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000 Erişim adresi:www.euro.who.int
31. Karlıkaya C. Sigara ve meslek. Solunum 2004; 6(6): 262-75.
32. Fergusson DM, Horwood LI, Shannon FT. Parental smoking and respiratory illness in infancy. Arch Dis Child 1980; 55: 358-361.
33. Rantakkallio P. Relationship of maternal smoking to morbidity and mortality of the child up to the age of five. Acta Paediatr Scand 1978; 67: 621-631.
34. American Thoracic Society: Cigarette Smoking and Health. Am J Respir Crit Care Med 1996; 153: 861-5.
35. Owen MJ, Baldwin CD, Swank PR, Pannu AK, Johnson DL, Howie VM. Relation of infant feeding practices, cigarette smoke exposure and group child care to the onset and duration of otitis media with effusion in the first two years of life. J Pediatr 1993; 123: 702-11.
36. Ey JL, Holberg CJ, Aldous MB, Wright AL, Martinez FD, Taussig LM. Passive smoke exposure and otitis media in the first year of life. Pediatrics 1995; 95: 670-7.
37. Chilmonczyk BA, Salmun LM, Megathlin KN. Association between exposure to environmental tobacco smoke and exacerbations of asthma in children. N Eng J Med 1993; 328: 1665-9.
38. Strachan DP, Cook DG. Health effects of passive smoking. VI. Parental smoking and childhood asthma: longitudinal and case control studies. Thorax 1998; 53: 204-12.
39. Murray AB, Morrison BJ. The decrease in severity of asthma in children of parents who smoke since the parents have been exposing them to less cigarette smoke. J Allergy Clin Immunol 1993; 91: 102-10.
40. Tyc VL, Throckmorton-Belzer L, Klosky JL. Smoking among parents of pediatric cancer patients and children's exposure to environmental tobacco smoke. J Child Health Care 2004; 8: 288-300.
41. Feldman J, Shenker IR, Etzel RA. Passive smoking alters lipid profiles in adolescents. Pediatrics 1991; 88: 259-64.
42. Başar E. Pasif Sigara İçiminin Kardiyak Etkileri. Türk Kardiyol Derneği Araş, 2000; 28: 239-44.
43. Di Franza JR, Aligne CA, Weitzman M. Prenatal and postnatal environmental tobacco smoke exposure and children's health. Pediatrics 2004; 113: 1007- 15.
44. Karlıkaya C. Sigara ana ve yan dumanın içerikleri. www.toraks.org.tr/archive.php. Son eriflim tarihi: 10 Mayıs 2007;

45. Couriel JM. Passive smoking and the health of children. *Thorax* 1994; 49: 731-4.
46. Li JS, Peat JK, Xuan W, Berry G. Meta-analysis on the association between environmental tobacco smoke (ETS) exposure and the prevalence of lower respiratory tract infection in early childhood. *Pediatr Pulmonol* 1999; 27:5-13
47. Gilliland FD, Berhane K, Islam T, et al. Environmental tobacco smoke and absenteeism related to respiratory illness in school children. *Am J Epidemiol* 2003;157:861-9.
48. California Environmental Protection Agency. Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. Final Report. California Environmental Protection Agency Office Of Environmental Health Hazard Assessment, 1997;
49. Willers S, Svenonius E, Skarping G. Passive smoking and childhood asthma. Urinary cotinine levels in children with asthma and in referents. *Allergy* 1991; 46: 330-4.
50. Willers S, Axmon A, Feyerabend C, et al. Assessment of environmental tobacco smoke exposure in children with asthmatic symptoms by questionnaire and cotinine concentrations in plasma, saliva, and urine. *J Clin Epidemiol* 2000; 53: 715-21.
51. Karakoç F, Dağlı E, Kut A, Pamukçu A. Çocuklarda pasif sigaraya maruziyetin serum kotinin düzeyi ile belirlenmesi. *Türkiye Klinikleri Dergisi* 1998; 7: 77-82.
52. Jarvis MJ, Goddard E, Higgins V, et al. Children exposure to passive smoking in England since the 1980's: cotinine evidence, from population surveys. *BMJ* 2000; 321: 343-5.
53. Illi S, von Mutius E, Lau S, et al. Early childhood infectious diseases and development of asthma up to school age: a birth cohort study. *BMJ* 2001;322:390-5.
54. Henderson FW, Reid HF, Morris R, et al. Home air nicotine levels and urinary cotinine excretion in preschool children. *Am J Respir Dis* 1989;140:197-201.
55. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. Lippincott-Raven Publishers, 1999; 90-8
56. Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A. *Molecular biology in reproductive medicine*. Parthenon Publishing Group Inc. New York. 1th Edition, 1999; 80-7.
57. Kerr JFR. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 2002;181-182: 471-4.
58. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *American Journal of Pathology*, 1995; 146: 3-15.
59. Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract*, 1993; 15: 3543-4.
60. Ameisen JS. The origin of programmed cell death. *Science*, 1996; 272: 1278-9.

61. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 67: 1456-62.
62. Samali A, Orrenius S. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress and Chaperones*. *Nature*, 1998; 3: 228-36.
63. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. A comprehensive review. *Pharmacology and Therapeutics*, 2004; 101: 227-57.
64. Akşit H, Bildik A. Apoptozis. *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 2008; 19(1): 55-63.
65. Walker PR, Leblanc J, Smith B, Pandey S, Sikorska M. Detection of DNA fragmentation and endonucleases in apoptosis. *Enzymology*, 1999; 17: 329-38.
66. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*, 1999; 96: 245-54.
67. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions*. Lippincott Williams & Wilkins, 2001; 250-6
68. Hengartner MO. The Biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000; 407-8.
69. Herrmann M, Kalden JR. Apoptosis and autoimmunity, Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, University of Erlangen-Nuremberg, Institute for Clinical Immunology, Weinheim, Germany 2003; 50-9
70. Piret JP, Arnould T, Fuks B, Chatelain P, Remacle J, Michiels C. Caspase activation precedes PTP opening in TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in L929 cells. *Mitochondrion*, 2004; 3: 261-78.
71. Mcphie DL, Coopersmith R, Peralta AH, Chen Y, Ivins KJ, Manly SP, Kozlowski MR, Neve KA, Neve RL. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23(17): 6914–27.
72. Munoz PC. Signalling Pathways That Regulate Life And Cell Death. *Evolution of Apoptosis in the Context of Self Defense*. Landes Bioscience and Springer Science, 2011; 1-20.
73. Bijl M, Limburg PC, Kallenberg CGM. New insights into the pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE): the role of apoptosis Erişim: [www:dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/medicine/2001/m.bijl/c10\\_on.pdf](http://www.dissertations.ub.rug.nl/FILES/faculties/medicine/2001/m.bijl/c10_on.pdf) Erişim tarihi: 20.06.2008. 20-5
74. Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, 2000; 25: 1859-66.



75. Kaufmann T, Strasser A, Jost PJ. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell Death and Differentiation*, 2012; 19: 42-50.
76. Ssang-Goo C, Eui-Ju C. Apoptotic Signaling Pathways Caspases and Stress-Activated Protein Kinases. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2002; 35(1): 24-7.
77. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 2007; 35: 495–516.
78. Tang D, Lotze MT, Kang R, Zeh HJ. Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene*, 2011; 30: 1851–4.
79. Gürbilek M, D ağlar C, A köz M, T opçu C. Diabetes mellituslu hastalarda hastalık süresinin eritrosit membranı Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaz enzim aktivitesi, lipid peroksidasyonu ve DHEA(S), glukoz, lipid düzeyleri üzerine etkisi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 2004; 29(3):237-42.
80. Avi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2008; 325–31.
81. Inna NL. Systems biology of apoptosis signaling Networks. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010; 21: 1-5.
82. Lou J, Lenke LG, Ludwig FJ, O'Brien MF. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord*, 1998; 36: 683-90.
83. Ow YL P, Green RD, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008; 9: 532-42.
84. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997; 88:355-365.
85. Shi YA. Structural view of mitochondria mediated apoptosis. *Nos Struct Biol*, 2001; 8: 394-401
86. Xu C, Bailly MB, Reed JC. Endoplasmic reticulum stres: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 2005; 115(10): 2656-7.
87. Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family of proteins in apoptosis. Apoptosomes or mitochondria *Genes Cell*, 1998; 3: 697-707.
88. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001; 60: 422-9.
89. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı.

90. Choi WS, Lee EH, Chung CW. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem*, 2001; 77:1531- 41.
91. Kelly KJ, Sandoval RM, Dunn KW, Molitoris BA, Dagher PC. A novel method to determine specificity and sensitivity of the TUNEL reaction in the quantitation of apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003; 284:1309-18.
92. Mukae N, Enari M, Sakahira H, Fukuda Y, Inazawa J, Toh H, Nagata S. Molecular cloning and characterization of human caspase-activated DNase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:9123-8.
93. Ozawa H, Keane RW, Marcillo AE, Diaz PH, Dietrich WD. Therapeutic strategies targeting caspase inhibition following spinal cord injury in rats. *Exp Neurol*, 2002; 177: 306-13.
94. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The J Cell Biology*, 1994; 124: 1-6.
95. Li H, Colbourne F, Sun P. Caspase inhibitors reduce neuronal injury after focal but not global cerebral ischemia in rats. *Stroke*, 2000; 31: 176-82.
96. Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference. *Trends Neurosci*, 2000; 23(2):59-60.
97. Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz*, 1999; 24: 236-41.
98. Chou KC, Tomasselli AG, Henrikson RL. Prediction of the tertiary structure of a caspase-9/inhibitor complex. *FEBS Lett*, 2000; 470:249-56.
99. Nuttall ME, Nadeau DP, Fisher PW et al. Inhibition of caspase-3 like activity prevents apoptosis while retaining functionality of human chondrocytes in-vitro. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 2000; 18: 356-63.
100. Springer JE, Azbill RD, Knapp PE. Activation of the caspase-3 apoptotic cascade in traumatic spinal cord injury. *Nat Med*, 1999; 5: 943-6.
101. Kuida K, Zheng TS, Na SQ, Kuan CY. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in cyp32 deficient mice. *Nature*, 1996; 384: 368-72.
102. Hu YM, Benedict MA, Ding LY. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-I-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *Embo J*. 1999; 18: 3586- 95.
103. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, Deveraux Q L, Salvesen G S, Bredesen DE, Rosenthal RE, Fiskum G, Reed JC. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1999; 96: 5752-7.

104. Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am. Soc. exp. Biol. J.* 1995; 9: 1277-87.
105. Takahaski K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adults rats. *J Comp Neurol*, 1999; 404:159-71.
106. Bao F, Liu D. Peroxynitrite generated in the rat spinal cord induces apoptosis cell death and activates caspase-3. *Neuroscience*, 2003;116: 59-70.
107. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15: 725-31.
108. Gutteridge JM, Peterson SK, Segal AW, Halliwell B. Inhibition Of Lipid Peroxidation By The Iron Binding Protein Lactoferrin. *Biochem J* 1981; 199 (1): 259-61.
109. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987; 235 (4792): 1043-6.
110. Bolisetty S, Naidoo D, Lui K et al. Postnatal changes in maternal and neonatal plasma antioxidant vitamins and the influence of smoking. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*, 2002; 86(1): 36-40.
111. Scher AI, Gudmundsson LS, Sigurdsson S, Ghambaryan A, Aspelund T, Eiriksdottir G, van Buchem MA, Gudnason V, Launer LJ. Migraine headache in middle age and late-life brain infarcts. *JAMA* 2009; 24: 2563-70.
112. Romay C, Pascual C, Lissi EA. The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz J Med Biol Res*, 1996; 29(2): 175-83.
113. Stocker R, Peterhans E. Synergistic interaction between vitamin E and the bile pigments bilirubin and biliverdin. *Biochim Biophys Acta*, 1989; 1002 (2): 238-44.
114. Ana Florescu, Roberta Ferrence, Tom Einarson, Peter Selby and Gideon Koren. Methods for Quantification of Exposure to Cigarette Smoking and Environmental Tobacco Smoke: Focus on Developmental Toxicology. *Ther Drug Monit* 2009; 31: 14–30.
115. Jinot J, Bayard S. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Rev Environ Health*. 1996; 11: 89–100.
116. Weitzman M, Byrd RS, Aligne CA, et al. The effects of tobacco exposure on children's behavioral and cognitive functioning: implications for clinical and Public health policy and future research. *Neurotoxicol Teratol.* 2002; 24: 397–406.

117. Murphy TD. Passive Smoking and Lung Disease. 2009 Erişim adresi: [www.emedicine.com/ped/GeneralMedicine/Pulmonology](http://www.emedicine.com/ped/GeneralMedicine/Pulmonology)
118. Mackay J, Eriksen M. Tobacco Atlas. <http://www.who.int/tobacco/en/atlas10>.
119. Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P et al. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006; 600(1-2): 37-45.
120. D.H. Phillips, Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues, *Carcinogenesis* 2002; 25: 1979–2004.
121. Debeleç-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2006; 35(2): 149-70.
122. Neri M, Ugolini D, Bonassi S, Fucic A, Holland N, Knudsen LE et al. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. II. Results of a comprehensive literature search and meta-analysis. *Mutat Res.* 2006; 612(1): 14-39.
123. Hawamdeh A, Kasasbeh FA, Ahmad MA. Effects of passive smoking on children's health: a review. *East Mediterr Health J.* 2003; (3): 441-7.
124. Dabson R. Passive smoking increases children's risk of nasal cancer. *BMJ* 2005; 331: 534- 5.
125. Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Hogstedt B, Knudsen L, Lambert B, Linnainmaa K, Mitelman F, Nordenson I. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic Study Group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 1994; 54(11): 2919-22.
126. Aitio A. Biomarkers and Their Use in Occupational Medicine, Human Monitoring After Environmental and Occupational Exposure to Chemical and Physical Agents. D. Anderson et al. *Ios Pres*, 2000; 12-21.
127. Kim DH, Suh YS, Mun KC. Tissue levels of malondialdehyde after passive smoke exposure of rats for a 24-week period. *Nicotine Tob Res.* 2004; 6: 1039–42.
128. Schwertner HA. Association of smoking and low serum bilirubin antioxidant concentrations. *Atherosclerosis.* 1998;136(2):383–7.
129. Cross CE, O'Neill CA, Reznick AZ, Hu ML, Marcocci L, Packer L, Frei B. Cigarette smoke oxidation of human plasma constituents. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 686:72-89; discussion 89-90.
130. Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis.* 1997;18(7):1359-63.

- 131.** Derauf C, Katz AR, Easa D. Agreement between maternal self-reported ethanol intake and tobacco use during pregnancy and meconium assays for fatty acid ethyl esters and cotinine Am J Epidemiol. 2003;158(7):705-9.
- 132.** Cornelius MD, Goldschmidt L, Dempsey DA. Environmental tobacco smoke exposure in low-income 6-year-olds: parent report and urine cotinine measures. Nicotine Tob Res. 2003;5(3):333-9.
- 133.** Karadag B, Karakoc F, Ceran O, Ersu R, Inan S, Dagli E. Does passive smoke exposure trigger acute asthma attack in children? Allergol Immunopathol (Madr). 2003;31(6):318-23.
- 134.** Cobanoglu N, Kiper N, Dilber E, et al. Environmental tobacco smoke exposure and respiratory morbidity in children. Inhal Toxicol. 2007; 19: 779-85.
- 135.** Irvine L, Crombie IK, Clark RA, Slane PW, Goodman KE, Feyerabend C, Cater JI. What determines levels of passive smoking in children with asthma? Thorax 1997; 52: 766-9.
- 136.** Kosecik M, Erel O, Sevinc E, Sele S. Increased oxidative stress in children exposed to passive smoking. Int J Cardiol. 2005;100(1):61-4.
- 137.** Baskaran S, Lakshmi S, Prasad PR. Effect of cigarette smoke on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in albino rat. Indian J Exp Biol. 1999; 37(12): 1196-200.
- 138.** Shermatov K, Zeyrek D, Yıldırım F, Kılıç M, et al. DNA damage in children exposed to secondhand cigarette smoke and its association with oxidative stress Indian Pediatr 2012;49: 958-962
- 139.** Kelly G. The interaction of cigarette smoking and antioxidants. Part III: Ascorbic acid. Altern Med Rev. 2003; 8: 43-54.
- 140.** Aycicek A, Ozcan E, Kocyigit A. Decreased total antioxidant capacity and increased oxidative stress in passive smoker infants and their mothers. Pediatrics International, 2005; 47: 635-9.
- 141.** Yilmaz G, Isik Agras P, Hizli S, Karacan C, Besler HT, Yurdakok K, Coskun T. The effect of passive smoking and breast feeding on serum antioxidant vitamin (A, C, E) levels in infants. Acta Paediatr. 2009;98(3):531-6.
- 142.** Jendryczko A, Szpyrka G, Gruszczynski, Kozowicz M. Cigarette smoke exposure of school children: Effect of passive smoking and vitamin E supplementation on blood antioxidant status. Neoplasma. 1993; 40: 199-203.
- 143.** Yıldırım F. Sigaraya maruz kalan çocuklarda idrarda kotinin düzeyi ile total oksidan ve antioksidan kapasitelerin değerlendirilmesi Uzmanlık tezi, Şanlıurfa 2010; 22-5

144. Öksüz A. Ve ark. Sık solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocuklarda idrar kotinin düzeyi ile pasif sigara içiciliği arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi Uzmanlık tezi Necmettin Erbakan Üniversitesi
145. Ayaşlıoğlu E. [Apoptosis]. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2001;21(1):57-62.
146. Janicke UR, Sprengart M, Wati R, Porter A. Caspase-3 is required for DNA fragmentation on morphological changes associated with apoptosis. J Bio Chem 1998; 273: 9357-60.
147. Sun HB, Zhang B, Zhao PX, et al. Analysis of in vivo patterns of caspase 3 gene expression in primary hepatocellular carcinoma and its relationship to p21Waf1 expression and hepatic apoptosis. World J Gastroentero 2000; 6(3): 356-60.
148. Kısmalı G, Sel T. Et al. Paraquat İle Oluşturulmuş Oksidatif Stresin HepG2 Hücrelerinde Apoptozis Üzerine Etkisinin Araştırılması 2012; 26(2); 79-85.
149. Doğan İ, Yar A, The Effects of Topoisomerase Inhibition on DNA Repair and Apoptosis in L929 Fibroblasts Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry–Turk J Biochem] 2013; 38 (2) ; 229–37.
150. Akıncı N. ve ark. Sigara dumanına maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda DNA hasarının araştırılması, Uzmanlık Tezi İstanbul 2008; 54-5.
151. Kılıç M. Sigaraya maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda kotinin düzeyi ile DNA hasarının değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi Şanlıurfa 2011; 33-5.
152. Raveendran M, Wang J, Senthil D, et al. Endogenous nitric oxide activation protects against cigarette smoking induced apoptosis in endothelial cells. FEBS Lett 2005; 579: 733-40.
153. Kim H, Liu X, Kobayashi T, et al. Reversible cigarette smoke extract-induced DNA damage in human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 2004; 31: 483-90.
154. Liu L, Yuan Y, Li F, Liu H. Relationship between apoptosis and E-cadherin expression in bronchial epithelium of smoking mouse. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2003; 23: 216-8.
155. Vogt Isaksen C. Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. Pediatr Dev Pathol 2004; 7: 433-42.
156. Güzel B. Sigaraya maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda idrarda kotinin ve apoptozis belirteci olan serum M30, M65 proteinlerinin seviyelerinin araştırılması, Uzmanlık tezi Şanlıurfa 2014; 25-3

- 157.** Ozan E, Çolakoğlu N, Sönmez N, Ozan S, Yılmaz S et al. Sigara İnhalyasyonunun Trakea'da Oluşturduğu Yapısal Değişiklikler Üzerine Melatonin ve C Vitamininin Etkileri Fırat Tıp Dergisi 2005;10(2): 40-4.
- 158.** Dundar S, Ozkura F, Meteoğlu İ et al. Effects of long-term passive smoking on the vascular endothelial growth factor and apoptosis marker expression in the retina and choroid: an experimental study Turk J Med Sci 2012; 42 (3): 377-83.
- 159.** Jun Wang, David E. L. Wilcken, Xing L. Wang et al. Cigarette Smoke Activates Caspase-3 to Induce Apoptosis of Human Umbilical Venous Endothelial Cells, Molecular Genetics and Metabolism 2001: 72: 82-8.
- 160.** Wu-Hsien Kuo, Jing-Hsien Chen, Hui-Hsuan Lin, Bi-Chiou Chen, Jeng-Dong Hsu et al. Induction of apoptosis in the lung tissue from rats exposed to cigarette smoke involves 11. Chemico-Biological Interactions 2005; 155: 31-42.

## 6. EKLER

### 6.1. Anket Formu

Görüşme Yapılanın Araştırmaya Katılacak Çocuğa Yakınlık Derecesi:

Anne Baba Diğere Ebeveyn (ise açıkça belirtiniz: .....)

Adı ve Soyadı:

Çocuğun Adı ve Soyadı:

Görüşme Tarihi:

Telefon:

Boy:

Kilo:

Akraba evliliğı: 1. derece 2. derece 3. derece Yok

1- Çocuğun yaşı:

2- Çocuğun cinsiyeti:

3- Kardeş sayısı:

4- Annenin öğrenim durumu: 1. Okur-yazar değil 4. Ortaokul mezunu

2. Okur-yazar

5. Lise mezunu

3. İlkokul mezunu

6. Üniversite-yüksekokul mezunu

5- Babanın öğrenim durumu: 1. Okur-yazar değil 4. Ortaokul mezunu

2. Okur-yazar

5. Lise mezunu

3. İlkokul mezunu

6. Üniversite-yüksekokul mezunu

6- Annenin işi: 1. Ev hanımı 2. Gelir getiren bir işte çalışıyor

7- Babanın işi:

8- Ailenin aylık ortalama geliri kaç TL?

1- 500 veya altında

2- 501-1000 TL

3- 1001-1500 TL

4- 1501-2000 TL

5- 2000 üstü

9- Çocuğa hamile iken sigara içme durumu: 1. Hiç içmemiş 2. Düzenli kullanmış

3. Yanında sürekli sigara içilmiş

4. Ara sıra içmiş

10- Yaşanılan evin tipi: 1. Apartman dairesi 2. Gecekondu

11- Evde yaşayan kişi sayısı:

12- Çocuğun bulunduğu ortamda sigara içme durumu: 1. Kesinlikle içilmez

2. Ara sıra içilir

3. Balkonda ya da evin diğer bölümlerinde sigara açılıyor

- Sadece anne: ....tane/gün

- Sadece baba: ....tane/gün

- Her ikisinde: ....tane/gün

- Diğer: ....tane/gün



14- Evinizin ısıtma sistemi nedir?

- 1- Kömür sobası    2- Odun sobası    3- Doğal Gaz    4-Elektrikli ısıtıcı  
5- Merkezi Kalorifer    6- Kat Kaloriferi    7-Diğer (belirtiniz.....)

15- Sizce çocuğunuz herhangi bir şekilde sigara dumanına maruz kalıyor mu?

- 1- Evet    2- Kesinlikle hayır    3- Bilmiyorum/ herhalde oluyordur

16- Çocuğunuzun sürekli kontrol gerektiren veya sürekli ilaç kullanımı gerektiren bir hastalığı var mı?    1- Yok    2- Var .....

17- Çocuğun anne, baba ve kardeşlerinde sürekli kontrol gerektiren veya sürekli ilaç kullanımını gerektiren bir hastalığı var mı?    1- Yok    2- Var .....

