

T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

SİGARAYA MARUZ KALAN PASİF İÇİCİ DURUMUNDAKİ
ÇOCUKLARDA İDRAR KOTİNİNİN VE APOPTOZİS
BELİRTECİ OLAN SERUM M30, M65 PROTEİNLERİNİN
SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Bülent GÜZEL

DANIŞMAN
Doç. Dr. Kabil SHERMATOV

ŞANLIURFA

2014

T.C.

**HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI ve HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**SİGARAYA MARUZ KALAN PASİF İÇİCİ DURUMUNDAKİ
ÇOCUKLARDA İDRAR KOTİNİNİN VE APOPTOZİS BELİRTECİ
OLAN SERUM M30, M65 PROTEİNLERİNİN SEVİYELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Bülent GÜZEL**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Kabil SHERMATOV**

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13015 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ŞANLIURFA
2014**

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimime ve tez hazırlamama sonsuz katkıda bulunan değerli hocam Doç. Dr. Kabil SHERMATOV'a,

Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğindeki uzmanlık eğitimim süresince her türlü konuda desteğini esirgemeyen, tecrübe ve deneyimlerini paylaşan değerli hocalarım; Prof. Dr. Dost ZEYREK, Prof. Dr. Akın İŞCAN, Prof. Dr. Ahmet KOÇ, Doç. Dr. Alpay ÇAKMAK, Doç. Dr. Ali AYÇİÇEK, Doç. Dr. Ali ATAŞ, Doç. Dr. Mustafa ÇALIK, Doç. Dr. Bülent KOCA, Yrd. Doç. Dr. Mahmut ABUHANDAN, Dr. Yeşim OYMAK, Yrd. Doç. Dr. Erdal EREN'e

Tez çalışmalarımındaki yardım ve desteklerinden dolayı Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocam Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarından dolayı biyolog Abdullah TAŞKIN'a ve Biyokimya AD. çalışanlarına,

Uzmanlık eğitimimin değişik zamanlarında birlikte ekip ruhu içerisinde keyifli ve verimli şekilde çalışma fırsatını bulduğum ve desteklerini her zaman yanımda hissettiğim, bazıları şu anda uzman, bazıları ise uzman adayı olan tüm asistanlık dönem arkadaşlarıma,

Eğitimim boyunca ilk günden beri şefkat ve desteklerini her zaman gördüğüm, yoğun iş yükümü hafifletmede bizlere sürekli yardımcı olan kliniğimizin tüm kıymetli hemşire ve sağlık memurlarına; çalışma ortamımızın temiz, rahat ve güvenli olmasına katkısı olan tüm personelimize,

Asistanlık eğitimim boyunca her türlü destek ve katkılarını esirgemeyen, canım anneme ve babama ve güzel aileme,

...içtenlikle TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.

Dr. Bülent GÜZEL

İÇİNDEKİLER	SAYFA NO
TEŞEKKÜR	İ
İÇİNDEKİLER	İİ
TABLolar LİSTESİ	İİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ	İV
SİMGE VE KISALTMALAR	V
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dünya’da ve Türkiye’de Sigara	3
2.2. Çevresel Tütün Dumanın Tanımlanması ve Bileşenleri	4
2.3. Pasif Sigara İçiciliği ve Çocuklarda Oluşturduğu Riskler	6
2.4. Çevresel Tütün Dumanı Maruziyetinin Ölçümü	8
2.5. Apoptozis	12
2.5.1. Apoptozis Mekanizması	14
2.6. Sitokeratinler	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	22
3.1. Serum Sitokeratin 18 Düzeyinin ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi	23
3.2. Test Prensipleri	23
3.3. İstatistiksel Analizler	24
4. BULGULAR	25
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR	32
7. EKLER	33
7.1. Anket Formu	33
8. KAYNAKLAR	34

TABLolar LİSTESİ

SAYFA NO

Tablo 1. Çalışmadaki çocukların ortalama yaş, cinsiyet, ağırlık, boy ve BMI değerlerinin karşılaştırılması	25
Tablo 2. Grupların idrar kotinin, M30 ve M65 düzeyleri	26

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA NO

- | | | |
|----------|--|----|
| Şekil 1. | Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların idrar kotinin seviyeleri | 26 |
| Şekil 2. | Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların M30 seviyeleri | 27 |
| Şekil 3. | Sigara dumanına maruz kalmaya göre çocukların M65 seviyeleri | 27 |

SİMGE VE KISALTMALAR

AAD	:Ana Akım Dumanı
AB	:Avrupa Birliđi
ABD	:Amerika Birleşik Devletleri
ABÖS	:Ani Bebek Ölüm Sendromu
Ark.	:Arkadaşları
YAD	:Yan Akım Dumanı
BMI	:Vücut Kitle İndeksi
cm	:Santimetre
CO	:Karbonmonoksit
ÇSD	:Çevresel Sigara Dumanı
ÇTD	:Çevresel Tütün Dumanı
DSÖ	:Dünya Sağlık Örgütü
FEV1	:1. Saniyedeki zorlu Vital Kapasite
GGST	:Global Gençlik Sigara Taraması
IUGG	:İntrauterin Gelişme Geriliği
kg	:Kilogram
m ²	:Metre kare
ng	:Nanogram
O ₂	:Oksijen
SS	:Standart Sapma
ÜSYE	:Üst Solunum Yolu Enfeksiyonu
CK	:Sitokeratin
EBV	:Ebstein-Barr virüsü
HPV	:insan papilloma virüsü
TNF	:Tümör Nekrozis Faktör
TNFR	:Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
FADD	:Fas adapter protein with a death domain
TRADD	:TNFR adapter protein with a death domain
CTL	:Sitotoksik T lenfositler
Apaf 1	:apoptozis proteaz aktive edici faktör 1
GATS	:The Global Adult <i>Tobacco</i> Survey

ÖZET

SİGARAYA MARUZ KALAN PASİF İÇİCİ DURUMUNDAKİ ÇOCUKLARDA İDRAR KOTİNİNİN VE APOPTOZİS BELİRTECİ OLAN SERUM M30, M65 PROTEİNLERİNİN SEVİYELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Bülent GÜZEL

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Amaç: Sigaraya maruz kalma; 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. Sigaraya maruz kalmış sigara içmeyen kişilerde ve aktif sigara içicilerinde kotinin nikotinin en önemli ve en güvenilen biyomarkeridir. Sigara içimi sırasında çok sayıda serbest radikal ve reaktif oksijen ürünleri açığa çıkmaktadır. Sigara içimi veya maruziyetinin DNA hasarı üzerine çalışmalar yapılmış, sigaranın çocuklarda pasif içiciliğe bağlı DNA hasarına yol açtığı kesin olarak gösterilmiştir. Sigara içimi veya maruziyetinin oluşturduğu ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis sürecini değiştirebilir. Apoptotik veya proliferasyon halindeki hücrelerden sitokeratinler (CK) salgılanır. CK-18 molekülü kaspazlarla aspartat-238 ve aspartat-396 noktasında bölünebilir. CK-18'in aspartat 396'da bölünmüş fragmanını tanıyan antijene M30 belirteci denilir. Bununla beraber M65 belirteci genel olarak hem sağlam CK-18 hemde bölünmüş CK-18 ile ilişkilidir. M30-M65 belirteçleri apoptozis sürecini gösteren markerlardır ve bu belirteçler kantitatif olarak ölçülebilir.

Bu çalışmada amacımız sigaraya maruz kalan çocuklarda kotinin düzeyi ölçülerek maruziyet derecesini belirlemek ve maruziyet derecesiyle apoptozis belirteçleri olan m30 ve m65 arasındaki ilişkiyi belirleyerek sigaranın apoptozis üzerindeki etkisini ortaya koymaktır.

Yöntem: Çalışmaya toplam 79 çocuk alındı. Çalışmada sigara maruziyetini değerlendirmek için anket ve idrar kotinin seviyelerinin tespiti yapılmıştır. Çocukların idrarından kotinin kemilüminesan yöntemiyle, periferik venöz kandan apoptozis belirteci olan

M30 ve M65 incelemesi (ELISA) için kan örnekleri alınacaktır. SPSS 20 kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. P değerinin $<0,05$ olması anlamlı olarak kabul edildi.

Bulgular: Ortalama idrar kotinin düzeyi sigaraya maruz kalan grupta sigaraya maruz kalmayan gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,01$). Serum M30 düzeyleri maruz kalan grupta sigaraya maruz kalmayan gruba göre anlamlı derecede düşük bulundu ($p=0,01$). Serum m65 değeri iki grup için anlamlı değildi ($p=0,1$). Ortalama kotinin düzeyi ile M30 $r=0,25$ ($p=0,02$) ve M65 $r=0,16$ ($p=0,15$) düzeyleri arasında korelasyon bulunmadı.

Sonuç: Çalışmamızda sigaraya maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda apoptozis belirteci olan M30 düzeylerinin sigaraya maruz kalmayan çocuklara göre düşük olması sigaraya maruz kalanlarda apoptozisin inhibisyonu şeklinde yorumlanabilir. M65 düzeyinin iki grup arasında anlamlı olmaması hücrenin nekrotik ve otofajik ölüm moduna etki etmediğini düşünüyoruz. Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda maruziyet derecesinin objektif bir kriteri olan idrar kotinin düzeyi kullanılmıştır.

Anahtar kelimeler: Pasif sigara, çocuk, kotinin, apoptozis, M30, M65.

SUMMARY

THE EVALUATION OF THE URINE COTININE LEVEL WITH SERUM M30 AND M65 WHICH INDICATIVE APOPTOSIS LEVELS IN SMOKE EXPOSED CHILDREN

Bülent GÜZEL, MD

Speciality Thesis, Department of Pediatrics

Aim: Exposure to cigarette smoke important topic because of it's prevalence and preventability. Certain biochemical measurements are needed to identify the risks and to count benefits of antismoking interventions. In people who have been exposed to cigarette but not smoking and in active smokers, cotinine is the most important and most trusted biomarker of nicotine. During smoking so many reactive oxygen products and free radicals are formed. Studies have been done to show smoking or cigarette smoke exposure's effect of DNA damage, it has been shown certainly passive smoking leads DNA damage in children. Severe DNA damage which induced smoking or exposure of smoking lead cells to death by activating the cell's apoptotic path. M30 and M65 proteins that are markers of apoptosis. Severe DNA damage which is formed by smoking or exposure to cigarette can modify the process of apoptosis. Cytokeratins are secreted by apoptotic cells. CK-18 molecule can be divided with caspase in aspartate-238 and aspartate-396 point. CK-18 fragment that aspartate 396 divided antigen marker is called M30. However, M65 marker, in general, is associated with both solid CK-18 and divided CK-18. M30-M65 markers indicates the progression of apoptosis and these markers can be measured quantitatively.

In this study our aim is, measure the cotinin levels in children who exposed cigarette, determine the degree of exposure, relationship between the degree of exposure and m30 and m65 proteins that are markers of apoptosis and assess the effects of smoking on apoptosis.

Method: In this study we include 79 children. The study have been made to evaluate the cigarette exposure and to determine the urine cotinine level. Urine cotinine level of children studied with chemiluminescence method, serum M30 and serum M65 looked from peripheric venous blood with an. For statistical analysis the SPSS 20 is used. The $p < 0,05$ were accepted significant.

Results: Mean urine cotinine levels in the group exposed to cigarette smoke exposure were found to be significantly higher than the other group. Serum levels of M30 ($p=0,01$) in the group exposed to smoke exposure was significantly lower than the other group. M65 levels between two groups are not significant ($p=0,1$). M30 $r=-0,25$ ($p=0,02$) and M65 $r=-0,16$ ($p=0,15$) with average cotinine levels were not correlated.

Conclusion: In our study , m30 protein levels in children who are passive smoker is lower than the children without cigarette exposure. This can be interpreted inhibition of apoptosis in children with cigarette exposure. We think that no significant M65 level between two groups is lack of effect for cell death mode. In our study urinary cotinine levels are used which is an objective criterian of the exposure degree in children who exposed the cigarette smoke.

Keywords: exposure to smoke, child, cotinine, apoptosis, M30, M65.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çevresel tütün dumanı (ÇTD); her yerde karşılaşılabilecek ve oldukça yüksek oranda insan sağlığı için zararlı bir kirleticidir. Çevresel tütün dumanına maruziyet; hem yaygınlığı hem de önlenbilir olması bakımından oldukça önemlidir. Annenin gebeliğinde sigara kullanmasının, gebeliğe bağlı komplikasyonlar riskini artırması, intrauterin gelişme geriliği gibi hem anne hem de çocuk açısından zararlı sonuçlar doğurduğu, sigara içiciliğinin çeşitli organlarda malignitelere neden olabileceği ve diğer birçok yan etkisi olduğu bilinmektedir(1). Çevresel tütün dumanına maruziyet düşük düzeyde olsa bile çocuklarda solunumsal problemler (astım ve benzer hastalıklar), ani çocuk ölümü sendromu, düşük doğum ağırlığı, lipid profilinde bozulma ve hemogloblin konsantrasyonunda azalma gibi zararlı etkiler görülebilir (2,6). Çevresel tütün dumanının 4000'den fazla bilinen kimyasal bileşeni tespit edilmiş ve onlar eksojen olarak yüksek miktarda serbest radikal oluşumuna neden olurlar (7). Çevresel tütün dumanına maruz kalmış kişilerde ve aktif sigara içicilerinde nikotinin en önemli ve en güvenilen biyomarkeri -kötininindir (8).

Çocuklarda pasif sigara içiciliği; yol açtığı diğer sağlık sorunlarının yanı sıra, genotoksisiteye bağlı potansiyel kanserojen etki bakımından da hayati önem taşır (9). Mutajenik etkinin hassas göstergesi olan DNA hasarı, ileride bu kişilerde kanser geliştirme riskinin daha yüksek olması bakımından dikkat çekicidir (10). Sigara içimi veya sekonder maruziyetinin DNA hasarı üzerine çalışmalar yapılmış olup, sigaranın çocuklarda pasif içiciliğine bağlı DNA hasarına yol açtığı kesin olarak gösterilmiştir (11). Sigara içimi veya sekonder maruziyetinin oluşturduğu ağır DNA hasarları hücrenin apoptozis doğal sürecini değiştirebilir. Hücredeki DNA hasarı tamir edilemezse kalıcı mutasyona ve sonuç olarak genomik kararsızlığa, yaşlanmaya ve maligniteye neden olabilir. Hasarlanmış DNA'nın onarım sürecinin tam olarak sağlanamaması, kanser patogenezinde çok önemli bir faktördür (12, 13, 14).

Apoptozis işlevini yitirmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişmiş, DNA'sında hasar oluşmuş ve kontrolsüz çoğalan hücrelerin emniyetli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan ve genetik olarak aktarılan programlanmış hücre ölümüdür. Bununla beraber fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı da denilmektedir. Hücre doğar belli bir süre yaşar ve sonra ölür. Bu son mekanizmaya apoptozis denir (15).

DNA'sında herhangi bir sebep ile hasar oluşan hücresler apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır. Hücrenin DNA'sında meydana gelen mutasyonlar malignite gelişimine potansiyel sebep olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis yolu ile öldürülmesi önemlidir (16,17).Apoptotik veya proliferasyon halindeki hücrelerden sitokeratinler (CK) salgılanırlar (18).CK proteinlerinin kaspazlarla parçalanması hücrede apoptotik cisimciklerin oluşumunu kolaylaştırır ve apoptotik sinyalleri arttırır. İnvitro çalışmalarda CK-18'in apoptozis sırasında kaspaz ile sindirilmesi sonucunda oluşan fragmentlerinin ekstrasellüler sahaya salındığı gösterilmiştir (19).

Apoptozis sırasında CK-18 molekülü kaspazlarla aspartat-238 ve aspartat-396 noktasında bölünebilir. CK-18'in aspartat 396'da bölünmüş fragmanını tanıyan antijene M30 belirteçdenilir ve bu belirteç kantitatif olarak ölçülebilir. Bununla beraber M65 belirteci hem sağlam CK-18'i hemde bölünmüş CK-18'i ölçmektedir. Böylece CK fragmanlarının antijenleri apoptotik sürecin belirteçleri olarak kullanılabilir (20,21).

Bu çalışmada amacımız çevresel tütün dumanına maruziyet derecesini objektif göstergesi olan kotinin düzeyini ölçmek ve çevresel tütün dumanına maruziyet derecesinin apoptozis belirteçleri olan M30 ve M65 arasındaki ilişkiyi belirleyip, böylelikle çevresel tütün dumanına maruz kalmanın apoptozis sürecine etkileyip etkilemediğini ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dünya’da ve Türkiye’de Sigara

Çevresel tütün dumanına maruz kalma; hem yaygınlığı hem de önlenebilir olması bakımından oldukça önemlidir. Çevresel tütün dumanı içerdığı zehirli maddelerin miktar ve çeşitliliği, kullanım sıklığı ve süresinin yol açtığı sorunlarla ilişkisi, bu sorunların halk sağlığını tehdit eden boyutları, yaptığı bağımlılık türü ve tedavi seçenekleri, önlenebilir ölüm nedenlerinin arasında yer alması, sigara kullanıcısı dışındakileri de tehdit eden zararlı etkileri hakkında çok sayıda ayrıntılı incelemeler yapılmış, yorumlarda bulunulmuştur (22, 23). Bununla birlikte sadece sigara içenler hastalanıp ölmemektedir, sigara içmeyenler de çevresel tütün dumanı ile kirlenen havayı soluyarak hastalık ve ölüm riski altında kalmaktadırlar.

Türkiye’de yetişkinler arasında sigara içim oranı son yıllarda önemli ölçüde azalmıştır. The Global Adult Tobacco Survey (GATS) ‘in verilerine göre bu oran 2008 de % 31.2 (16 milyon) iken, 2012 yılına geldiğimizde ise bu oran %27.1 (14.8 milyon)’a gerilemiş. Bu hızlı azalmaya rağmen Türkiye’deki yetişkinlerin %25’den fazlası halen sigara kullanmaya devam etmektedir (24).

Pasif sigara içimi; kişilerin sigara içilen bir ortamda istemsiz olarak tütünün yanma ürünlerini soluyarak maruz kalması olarak tanımlanmaktadır (25). Pasif sigara içimi; çevresel tütün dumanı maruziyeti, ikinci el sigara içimi ya da edilgen sigara içimi olarak da isimlendirilmektedir (26, 27).

Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) erişkinlerin %26,5’i sigara içerken, 2 ay-11 yaş arası çocukların %43’ünün evinde en az bir sigara içicisinin bulunduğu bildirilmektedir. Gelişmiş ülkelerde sigara içimi azalma eğilimindeyken, gelişmekte olan ülkelerde artma eğilimindedir (27).

Türkiye’de 2012 Aralık ayında yapılan Küresel Yetişkin Sigara Araştırmasına göre, 15 yaş ve üstü kişilerin %27’si sigara içmektedir. Sigara kullanımını 25-34 ve 35-44 yaş arası insanlar da daha yaygındır; 25-34 yaş grubunun %34,9’ı ve 35-44 yaş grubunun ise %36,2 si sigara içtiklerini söylemişlerdir (28). Sağlık Bakanlığı Madde Bağımlılığı Şube Müdürlüğü

tarafından yapılan "Türkiye Küresel Gençlik Tütün Araştırması-2003" çalışmasına göre, her 10 öğrencinin 8'inin (%81,6) evde, %85,9'unun toplu bulunulan yerlerde sigaradumanına maruz kaldığı saptanmıştır (29).

Avrupa Tütün Kontrolü Raporuna göre 2008-2010 yılları arasında Türkiye'deki yetişkin yaş grubunda sigara kullanım prevalansı %31'dir (30).

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" hükmüne bağlanmıştır (31).

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 (32).

2.2. Çevresel Tütün Dumanının 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 (7). 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

karsinojenik maddeler ve bu fazdaki iritanlar olmak üzere tütünün toksisitesinde ön plana çıkmaktadır (33).

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 piroolidin halkası ve piridin halkasından oluşur (34, 35).

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(36).

İşlem görme açısından ana akım, biri duman-gaz fazı diğeri de tanecikli madde (katran) olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır (37). 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 (38). 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 (39).

Çevresel tütün dumanında nikotin, nem ve karbonmonoksit hariç geri kalan maddelerin tümünün belirgin karsinojenik etkileri vardır. Çevresel tütün dumanının katran fazı

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 (34, 35, 40).

Çevresel tütün dumanındaki malignitelerle ilişkili maddelerden bazıları şunlardır: Arsenik, Benzen, Krom, Nikel, Vinilklorur, 4-aminobifenil, Benzo(a)piren, Kadmiyum, Formaldehit, Ortotoluidin, N-Nitrozodietilamin, Asetaldehitdibenzopiren, Parakrezol, N-Nitrozometiletilamin, N-Nitrozonornikotin, N-Nitrozopiperidin, N-nitrozopirolidin (40). Çevresel tütün dumanının maligniteefektidışındaki diğer hasarlayıcı etkilerine yol açan maddeler: Nikotin, Karbonmonoksit, Azotoksitler, Amonyak, Hidrojensiyanur, Akroleindir ve diğerleri...

2.3. Pasif Sigara İçiciliği ve Çocuklarda Oluşturduğu Riskler

Sigara içimi yalnız içene değil, aynı ortamda bulunan diğer insanlara da zarar vermesi ve bu durumdan en çok çocukların etkilenmesi bakımından önemli bir halk sağlığı sorunudur. Kendisi sigara içmediği halde işyerinde, insanların toplu olarak buldukları kapalı yerlerde ve evde sigara içen kişilerin dumanına maruz kalarak bu dumanda bulunan tüm zararlı maddelerin solunması “pasif içicilik” olarak tanımlanabilir. Bu tanımlamanın diğer bir şekli de çevresel sigara dumanı (environmental tobacco smoke- ETS) olarak bilinir. Sigara içenin nefesini vermesiyle dışarıya saldığı dumana ve içine çekmeler arası kül tablasında yanık halde duran sigaranın kapalı mekana tüterek saldığı dumana “ikinci el duman” denir. Pasif içicilik, filtreli ya da filtresiz düşük katranlı ya da düşük nikotinli sigara dumanına maruz kalma, dumanın oranı, kapalı yerin boyutu, solunan miktar, maruz kalma süresi gibi çok değişik faktörlerden etkilenmektedir. Pasif içicilik, aktif sigara içene göre daha az şiddette ama, benzer kronik sağlık sorunlarına yol açabilir (22, 34, 42, 43, 44).

Dünyadaki tüm çocukların yaklaşık %40’ı(tahminen 700 milyon çocuk) evde sigara dumanına maruz kalmaktadır (45). Çevresel sigara dumanının dünyada yılda 600 bin erken

ölüme neden olduğu sanılmaktadır (46). ABD’nde her yıl sigarayla ilgili tüm ölümlerin yaklaşık %11’i (takriben 50 bin ölüm) çevresel sigara dumanına bağlanmaktadır (47). Avrupa Birliğinde (AB) işyerinde sigara dumanına maruziyetin yılda 7600 ölüme neden olduğu tahmin edilmekte olup evdeki maruziyetin de ilave edildiğinde 72100 ölüme neden olduğu bildirilmektedir (48).

ABD Sağlık Bakanlığı’na bağlı çalışan Ulusal Toksikoloji Programı Kurumu 2002 yılında yayımlamış olduğu 10. Ulusal Raporunda “ikinci el dumanın da kanserojen olduğunu” bildirmiştir (49).

Çocukların, anne ve babalarının içtikleri sigaranın dumanına maruz kalışı, bazen çocuk daha anne karnında iken başlayabilmektedir. Fetal kayıp olarak tanımlanan,20 haftalık doğum haftasından önce, spontan abortus rölatif riski hamilelik esnasında sigara içenlerde 1/3 oranında fazla kaydedilmiş (50). Annenin sigara içmesi ile birlikte olan riskler preterm doğum, intrauterin gelişme geriliği (İUGG), düşük doğum ağırlığı, perinatal ve neonatal ölüm oranı, ani bebek ölüm sendromu (ABÖS) ve muhtemelen konjenital malformasyonlarıdır (51).

Sigara içenlerde içmeyenlere göre preterm doğum rölatif riski 1,2-1,6 arası fazladır. Hamilelik esnasında sigara içen kadınlardan doğan bebekler tipik olarak içmeyenlerden doğanlardan 200-250 gram az ağırlıkla doğarlar (52). Annenin sigara içmesi durumunda ABÖS riski 2,3 kat, hem annenin hem babanın sigara içmesi durumunda 3,5 kat arttığı saptanmıştır. Bebeğin sigara içen annenin yanında yatması ABÖS riskini arttırmaktadır (39).

Çocukluk çağında çevresel tütün dumanına maruz kalma astım, otitis media, üst solunum yolu enfeksiyonu, azalmış pulmoner fonksiyonlar, nörogelişimsel gecikmeler, davranış problemleri ve okul başarısında azalma riski ile beraberdir (47,48). Çevresel tütün dumanına maruz kaldığı için yılda 300000-1500000 civarında çocuğun alt solunum yolları enfeksiyonu geçirdiği ve 200000-1000000 çocukta da astım ataklarının sıklığının ve şiddetinin arttığı bildirilmiştir (55).

Çevresel tütün dumanına maruziyet ve astım, 0-5 yaşları arasında 4331 çocuğun değerlendirildiği bir çalışmada incelenmiş. Anneleri günde en az yarım paket sigara içen çocuklarda astım görülme riskinin toplam 2,1 kat daha fazla olduğu; ilk yaşta ise bu riskin 2,6 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada sigara kullanımı ve atopi ilişkisi de

gösterilmiştir; anneleri sigara içen çocuklarda cilt testlerinde alerjik durum daha sık saptanmış; ebeveynleri sigara içen erkek çocukların kan IgE ve eozinofil düzeyleri daha yüksek bulunmuştur (56). ABD'nde bebeklerde görülen pnömoninin %50'sinin nedeninin pasif sigara dumanından etkilenme sonucunda geliştiği tespit edilmiştir (57).

Anne-babanın sigara içmesi çocukta otitis media riskini artırmaktadır. Pasif içici olan altı aylık bebekler ortalama 7,1 seröz otitis media atağı geçirirken, yanında sigara içilmeyen bebekler ise 5,8 atak geçirdiği görülmüştür. Seröz otitis media, sigara dumanına maruz kalmayanlarda 19 günde iyileşirken pasif içicilerde ise 28 günde iyileşmektedir (58). Çevresel tütün dumanına maruziyet çocuklarda allerjik rinit belirtilerini artırmakta, allerjik riniti olmayan çocuklarda ise burun tıkanıklığına yol açarak uyku kalitesini bozmaktadır.

Sigara dumanına maruziyet derecesi ile akciğer fonksiyonlarının azalması ilişkili bulunmuştur. 21 çalışmanın yapılan bir meta analizinde FEV1'de %1,4'lük, orta ekspiratuar akım hızında %5'lik ve son ekspiratuar akım hızında %4,3'lük azalmaya neden olduğu görülmüştür (59).

Pasif içici çocuklarda hastaneye yatmayı gerektiren ciddi enfeksiyonlarındaha da sık olduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada 3-59 ay yaş grubu çocuklarda bu enfeksiyonların dört kat fazla görüldüğü gösterilmiştir (60). İngiltere'de her yıl 17000 çocuğun sigara dumanına maruziyetine bağlı olarak hastanelere yatırıldığı bildirilmektedir (61).

Doğum öncesi sigaraya sekonder maruz kalan bebeklerde hiperaktivite, dikkat eksikliği, heceleme, okuma ve matematik öğrenilmesinde zorluklar gibi entelektüel gelişimlerin yetersizlikleri görülebilir (62,63). Çocukların okul performansı ve zekâ test skorları sigara dumanı maruziyetine paralel olarak azalmaktadır. Bazı çalışmalarda sigara içenlerden doğan çocukların diğerlerine göre düşük zekâ skorları olduğu tespit edilmiştir (64,65).

2.4. Çevresel Tütün Dumanı Maruziyetinin Ölçümü

Çevresel tütün dumanına maruziyet 3 yöntemle ölçülebilir:

1- Kişilerin maruz kaldığı havadaki sigara dumanı bileşenlerinin ölçülmesi (çevresel ölçüm),

2- Anket veya görüşmelerde maruz kalmanın kişi tarafından bildirilmesi yoluyla,

3-Maruz kalmış bireylerin vücudunda sigara dumanı bileşenlerinin (biyomarkerlar) konsantrasyon ölçümleri.

Sigara içilmesinin ve/veya çevresel tütün dumanına maruziyetinin kişisel bildirimının değerlendirilmesi ya yazılı (kişinin doldurduğu anket) ya da sözlü iletişim ile (kişisel görüşme) yapılmaktadır, bunların arasında en sık kullanılan yöntem anketlemedir. Anket birçok nedenden dolayı uygundur; maruz kalma bilgileri retrospektif olarak toplanabilir ki bu durum havayı kirleten konsantrasyonlar veya biyomarkerlarla ilgili elde ölçüm olmadığında değerlidir, uzun dönemli maruz kalma ile ilgili bilgiler verebilir, fazla sayıda kişiye uygulanması pahalı değildir ve bu nedenle geniş çaplı çalışmalar yapılabilir. Anketleme yöntemi birçok sigaraya maruz kalma durumlarının araştırılmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır (51).

Bu avantajlarına rağmen anket bilgilerine dayanılarak yapılan kişisel bildirimlerin doğrulukları ile ilgili bazı kaygılar vardır. Bunların en ciddi olanları; doğrulama standartlarının yokluğu, standartize edilmiş anket yokluğu ve maruziyetin yanlış sınıflandırılmış olmasıdır. Anketle toplanan bilgilerde en sık yapılan hatalar; kişinin maruziyetini doğru bir şekilde hatırlayamaması, bilgi eksikliği, kasıtlı olarak yanlış bilgi verme, peşin hükümlü olma ve hafıza yetersizliği olabilir (70). Sosyal cazibenin fazla olduğu durumlarda peşin hükümlülük çok yaygın olabilir (68).

Bebek ve çocuklarda çevresel tütün dumanına maruziyetin taşıdığı risklerin belirlenmesi çoğu zaman anne-babanın kişisel bildirimlerine dayanmaktadır (71). Annelerin veya bakıcıların bebeklerin ya da çocukların sigara tüketimine maruz kaldıklarını inkar etme veya olduğundan düşük gösterme gayretleri çok kuvvetli olabilir (72). Anne-baba tarafından sigara dumanına maruziyetin gerçek olandan az gösterilmesinin kullanılan yöntemle ve anketlenme yapılan nüfusun sosyoekonomik durumuna bağlı olduğu düşünülmektedir.

Risklerini tanımlamak ve sigara maruziyetine karşı müdahalelerin yararlarını belirlemek için pasif sigara içimini yansıtan kesin biyokimyasal ölçümlerine gerek vardır (36). İdeal olarak sigara dumanı maruziyetinin biyomarkerı sigara yanmasına özel olmalı ve vücutta yarı ömrü uzun olmalıdır. Biyomarkerın diğer özellikleri de şunlar olmalıdır; önceki maruziyetle ilişkili olmalıdır, sağlığa etkileri olan bir ajan olmalı veya böyle bir ajanla kuvvetle birlikte olmalıdır, eser miktarlarda bile yüksek doğrulukla tespit edilmelidir, doz bağımlı olmalıdır, noninvazif metodlarla ölçülmelidir ve testi pahalı olmamalıdır (66).

Çevresel tütün dumanı maruziyetinin ölçüm aracı kolay ölçülebilir olmalı ve maruziyetin büyüklüğü, süresi ve sıklığını göstermelidir. İyi bir ölçüm aracı kaynağın gücü ile değişebilmeli ve makul bir sonuç alınması için basit ve doğru bir şekilde ölçülmelidir. Çevresel tütün dumanına özel olmalıdır. Düşük konsantrasyonlarda bile hava veya biyolojik numunelerde tespit edilebilmelidir (66).

Çevresel ölçümler sigara dumanındaki nikotin, partiküller ve bazı gazları içermektedir. Bunlar toplumsal hava örnekleme monitörleri ile veya kişisel örnekleme aletleri ile elde edilebilirler. Bu metodlar suboptimal olup, monitörler sadece kısa periyotlarda kullanılabilir ve maruziyet derecesini tam yansıtmayabilir. Ek olarak yapılan çevresel ölçüm vücuda ulaşan sigara dumanının dozunu tam olarak yansıtmayabilir, sigara dumanından başka bileşiklerin kaynakları ölçüme karışabilir (67).

Biyokimyasal ölçümler ile kişisel bildirimleri doğruladığı çalışmaların yapılan meta analizinde sigara içip içmemenin kişisel bildirimlerinin çalışmaların çoğunda genel olarak doğru olduğu sonucuna varılmıştır (68). Bununla birlikte bu irdelemelerde hamile kadınlarda yapılan çalışmalar hariç tutulmuş, çünkü hamile kadınların sigara içme durumları sosyal nedenlerle kabul edilebilir bulunmadığından kişisel bildirimleri doğru sonuçlar vermeyebilir (69). Kişisel bildirimlerin doğruluğunu güçlendirecek diğer faktörler görüşmecinin uyguladığı anketleme yöntemi, gözlemsel çalışmalar, yetişkinler tarafından yapılacak bildirimler ve özgül bir biyomarker ile biyokimyasal doğrulamadır.

Yapılan çalışmaların çoğunda çocuğun çevresel tütün dumanına maruziyetinin ebeveynlerce bildirimleri ile idrar kotinini düzeyleri arasında iyi uyum bulunamamıştır. Anket verileri ile çevresel tütün dumanı maruziyetinin prevalansı muhtemelen düşük tahmin

edildiğinden çevresel tütün dumanına maruziyetin objektif değerlendirilmesi gereklidir. Bunlara ilaveten ebeveynlerden alınan bilgilere dayalı anketlerin çoğu maruz kalmayan ve hafif derecede maruz kalan çocukları doğru bir şekilde göstermemektedir. Özellikle çocuk nüfusu ve hamile kadınlar için aktif ve pasif sigaraya maruziyetin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesi önemlidir (73).

Çevresel tütün dumanı maruziyetinin biyomarkerları herhangi bir vücut sıvısı veya dokusundan sigara dumanının içerdiği metabolitini ölçen herhangi bir test ile belirlenir (68). Çevresel tütün dumanı maruziyetini ölçen birkaç muhtemel biyomarker öne sürülmüş olup, bunlar; karboksihemoglobin, tiyosiyanat, karbonmonoksit (CO), DNA ve protein metabolitleri, nikotin ve kotinindir (75).

Biyolojik sıvılarda tiyosiyanat ve karboksihemoglobin konsantrasyonları sigara dumanına maruz kalmanın ayrılmasında yeterince spesifik veya sensitif değildir (76). MJ. Jarvis ve çalışma arkadaşlarınınca yapılan bir çalışmada tiyosiyanat ölçümü ile sigara içenlerle içmeyenler arasında ayırım çok zayıf derecede yapılabilmiş olup, en sensitif ve spesifik test ise tüm vücut sıvılarında ölçülebilen kotininle yapılmıştır (77). Ekshale CO sigara dumanına maruziyetin ölçümünde kullanılabilir başka bir biyomarkerıdır çünkü metabolik aktivasyona maruz kalmaz. CO ölçümü ve sigara içmesi hakkındaki kişisel bildirimleri ile idrar kotinin ölçümleri arasında yüksek korelasyonlar olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte çevresel tütün dumanına maruziyetinin markerı olarak CO'in bazı dezavantajları vardır. Çevrede sigara kaynaklı olmayan CO kaynakları da vardır, yarı ömrü 4-5 saat gibi kısadır ki bu durum yakın tarihli maruziyetin biyomarkerı olduğu anlamı taşır, yanlış negatif sınıflandırma şansını artırır, düzensiz sigara içilme kalıplarını tespit hassasiyeti düşük olur, arada sigara içenlerle hiç içmeyenlerin ayrılmasında bu markerın yeteneği azalmış olur (72). Diğer biyomarkerılarda da mevcut olan benzeri problemler nedeniyle nikotin ve onun metaboliti olan kotinin sigara dumanı maruziyetinin geniş oranda kullanılan biyomarkerı olarak öne çıkmıştır.

Nikotin çevresel tütün dumanının primer ve major bileşeni olup, çevresel tütün dumanına yüksek oranda spesifiktir, potansiyel toksinidir (78). Nikotinin kandaki yarı ömrü yaklaşık 2-3 saattir ve idrarda tespit edilebilir (8). Tek bir sigaranın içeriği yaklaşık 1 mg nikotin sağladığı tahmin edilmektedir. Vücutta ölçülen nikotin düzeyi inhalasyon kalıpları ve nikotin metabolizmasındaki bireyler arası farklılıklardan etkilenmektedir (79). İn hale edilen nikotinin yaklaşık %5-10'u idrarla değişmeden atılır; kalanı ise karaciğerde metabolize edilir.

Nikotin metabolizmasının ana şekli kotinine C-oksidadasyondur. Nikotinin yaklaşık %80'i bu yolla kotinine dönüşür. Nikotinin sigara dumanı maruziyet biyomarkerı olarak kullanımı sınırlıdır. Testi pahalıdır ve vücut sıvılarında var olan miktarın düşük olması nedeniyle çok sensitif olmalıdır. Yarı ömrünün kısa olması uzun dönemli maruziyetinin ölçen biyomarkerı olmasını yetersizleştirmektedir (8). Nikotinin alım şekli, metabolizma ve eliminasyonundaki farklılıklar nedeniyle kişiler arası önemli derecede farklılıklar ortaya çıkabilir. Nikotin plazma, tükürük ve idrarda ölçülebilmektedir ve bunların seçimi planlanan çalışmanın özelliklerine bağlıdır.

Nikotinin majör metaboliti olan kotinin hem sigara dumanına maruziyet derecesinin ölçülmesinde hem de sigara içme durumunu aydınlatmada seçilecek biyomarkerıdır. Biyolojik sıvılardaki kotinin değerleri birbiri ile son derece uyumlu olduğundan kan kotinini tükürük ve idrardaki kotininleri ölçülerek de doğru bir şekilde tahmin edilebilir (8). Kotinin; genellikle kan, tükürük, idrar, saç ve semende ölçülür (80). Kotininin kanda yarılanma ömrü yaklaşık 19-40 saattir ve bu nedenle birkaç gün önceki (2-3 gün) sigara dumanı maruziyetini gösterebilir. Kotininin yarı ömrü bebek ve çocuklarda erişkinlere göre daha uzundur. ABD Çevre Koruma Ajansı 18 aydan küçüklerde kotininin yarı ömrü 60 saate kadar olduğu, 18 aydan büyüklerde ise yarı ömrün 40 saate kadar uzadığını bildirmiştir (81).

İdrar pH'sının kotinin itrahi üzerindeki etkisi çok az olduğundan kotinin ölçümleri nikotin ölçümlerinden daha üstündür (82). Çevresel tütün dumanına maruz kalanlarda kotinin seviyeleri tespit yapılabilecek kadar yüksek olabilir. ABD Çevre Sağlığı ve Tehlike Değerlendirme Ofisi aktif sigara içenlerle içmeyenler arasında kotinin konsantrasyonlarında en azından bir kat farkı olması gerektiğini bildirmektedir. Bu ofisin yaptığı çalışmada maruziyeti olmayan ve sigara içmeyenlerde plazma kotinin seviyeleri 0,31 ng/ml iken maruz kalıp sigara içmeyenlerde bu değer ortalama 1,99 ng/ml olarak bulunmuştur (83).

Biyolojik sıvı olarak tükürük ve idrar örneklerini toplanması kişilere acı verici olmadıklarından yaygın kullanılır. Tükürüğün içeriğini etkileyen birçok faktör olduğundan sigara dumanı maruziyetini net temsil edecek standart bir yöntem olması zordur. Ayrıca diyet gibi faktörler, sigara içme zamanı ve sıklığı tükürük kotinin seviyelerini etkileyebilir (84). Tükürükteki kotininin plazma kotinine korelasyon oranı yüksek olup; tükürük ve serum kotinin değerlerinin hemen hemen eşit olduğunu destekleyen çalışmalar yapılmıştır.

Böbrekte kotinin seviyesi yoğunlaştığından plazma ve tükürükteki kotinin konsantrasyonundan idrar kotinin seviyeleri 5-6 kat daha yüksek değerlere çıktığı gösterilmiştir (85).

Çevresel sigara dumanı maruziyetikan, tükürük ve idrarda kotinin referans aralıklarına göre 3 kategoriye ayrılmaktadır; aktif içiciler, pasif içiciler ve hiç maruziyeti olmayanlar. ABD Çevre Koruma Ajansı ile Bramer ve Kallungal'e göre bu kategorilerdeki kotinin referans değerleri maruz kalmayanlarda kanda 0,09-0,7 ng/ml, tükürükte 0-5 ng/ml, idrarda <10 ng/ml; pasif içicilerde ise kanda 2-10 ng/ml, tükürükte 5-10 ng/ml, idrarda 10-100 ng/ml; aktif içicilerde ise kanda >10 ng/ml, tükürükte >10 ng/ml ve idrarda 200 ng/ml üstüdür (85, 86). Birçok araştırmacı, nikotin ve kotinin konsantrasyonları belirlenmesinde plazma ve tükürüğe göre daha kolay elde edildiğinden idrar örneklerini kullanmayı tercih etmektedir (79). İdrardaki kotinin, tamamen sigaraya özel ve yalnızca iç metabolizma ürünü olduğundan, örneklerin toplanması sırasında dış ortam şartlarının etkisi ile kotinin düzeylerinin değişme olasılığı düşüktür (87).

Biyolojik sıvılarda kotinin ölçümü için birçok farklı yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan en sık kullanılanları; kolorimetri, kromatografi, radyoimmünoassay ve enzime bağlı immünosorbant belirlenmesi (ELISA). Bunların içinde kolorimetri spesifik olmaması nedeniyle en az istenen metottur. Çeşitli vücut sıvılarında kotinin belirlenmesinde bu tekniklerden referans standart yöntem içiciler için gaz kromatografi-mass spektrometrisi olup; pasif içiciler için ise - gaz likit kromatografisidir (88). Radyoimmünoassay'da yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip bir yöntemdir; sigara dumanı maruziyetini idrarda ölçmek için uygun bir yöntemdir (89).

2.5. APOPTOZİS

Apoptozis işlevini yitirmiş, fazla üretilmiş, yaşlanmış, düzensiz gelişimi olan veya DNA'sında hasar olan hücrelerin emniyetli bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür. Bununla beraber programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı da denilmektedir. Hücre doğar belli bir süre yaşar ve sonra ölür. Bu son mekanizmaya apoptozis denir (15).

Tıbbi literatürde “Apoptozis” terimi ilk defa Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar tarafından 1972 yılında kullanılmış ve canlı dokularda hücre sayısının azalmalarından sorumlu, kendine özgü olan bir hücre ölüm şekli olarak ifade edilmiştir (90). Endonükleazların yol açtığı DNA kırıklarının jel elektroforezinde Duke ve ark. tarafından 1983 yılında gösterilmesi ile apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtına ulaşılmıştır (90). Bu tarihten itibaren apoptozis ile ilgili çalışmalar hızlanmıştır.

- Apoptozis, nekrozdan ayrı, fizyolojik şartlar altında da oluşabilen ve çoğunlukla doku homeostazisini sağlanmasına katkıda bulunan hücre ölümüdür (15).
- Apoptozis, embriyolojik ve normal dokunun gelişiminin devam etmesinde kilit rolü oynar (16). Hücrenin yaşam siklusu boyunca yapım(mitozis)-yıkım(apoptozis) arasında kontrollü bir denge sağlanır.
- Bu dengenin, apoptozis lehine veya aleyhine bozulması, birçok önemli hastalığın patogeneğinde rol oynar. Mesela, bazı viral enfeksiyonlarda apoptozis engellenir ve virüs ile infekte olan hücrenin ortadan kaldırılmasına engel olur. Oto-reaktif lenfositlerin apoptozis ile ortamdaki uzaklaştırılmaması veya geç uzaklaştırılmaları sonucu otoimmün hastalıklar oluşabilir (16).
- Bağırsak epitel hücrelerinin sürekli yenilenmesi, menstruasyon sırasında uterusun iç duvarındaki epitelyal hücrelerin dökülmesi, deri keratinositlerinden epidermisin stratum korneum’u oluşturması, timusta kişinin kendi dokularına zarar verecek T lenfositlerinin öldürülmesi apoptozis örnekleri olabilir.
- Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Virüsle enfekte hücrelerin bu yolla ortadan kaldırılması buna örnek olabilir.
- DNA’sı hasar görmüş hücreler de apoptozis yolu ile ortadan kaldırılır (16). Hücrenin DNA’sında meydana gelen mutasyonlar kanser gelişimine neden olabilecekleri için bu hasarlı hücrelerin apoptozis ile öldürülmesi önemlidir (16, 17).
- Apoptozis, doku gelişimi esnasında istenmeyen hücrelerin öldürülmesinde de rol üstlenir. Örneğin böcek ve amfibilerin metamorfozu esnasında larva dokusunun öldürülmesine sebep olur. Diğer bir örnek de memelilerde sinir sisteminin gelişimi esnasındaki programlanmış hücre ölümüdür. Fazla sayıda üretilen nöronların %50’den fazlası programlanmış hücre ölümü yoluyla yok edilir. Ayrıca akut hücre hasarı durumunda da apoptozis süreci hızlanabilir (16).

Apoptozis hızının yavaşladığı veya arttığı durumlarda çeşitli hastalıklar meydana gelir. Viral bir enfeksiyon sırasında, normal şartlarda virüsler enfekte ettikleri hücrede, kendi proteinlerini sentezletirler ve hücrenin kendisi için gerekli proteinlerin yapımını da engellerler. Bundan dolayı virüsle enfekte olmuş hücrede apoptozis indüklenir ve hücre ölür. Böylece virüs kendisini de yok etmiş olur. Fakat bazı virüsler, örneğin Ebstein-Barr virüsü (EBV) veya insan papilloma virüsü (HPV), enfekte ettikleri hücrenin apoptozise gitmesini engelleyen yollar geliştirmişlerdir. Örneğin EBV, apoptozis sinyalini kontrol eden regülatörlerden biri olan bcl-2'ye benzer moleküller salgılayarak ve ayrıca enfekte ettiği hücrenin kendi bcl-2 molekülünün üretimini indükleyen moleküller üreterek apoptozisi durdurmaktadır (91). HPV'de, kuvvetli bir apoptozis indükleyicisi olan p53 proteinini etkisizleştirmektedir. Virüslerin bu etkileri sonucunda, bazı hematolojik kanserlerin gelişimine sebep oldukları sanılmaktadır (17). Alzheimer, Hutchinson, Parkinson, Amyotrofik lateral skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklarda, AIDS ve otoimmün hastalıklarda sebebi sonuna kadar tespit edilemeyen bir şekilde apoptozisin rol aldığı düşünülmektedir (91).

Malign hastalıklar, klasik olarak hücre proliferasyonunun fazlaca kontrolsüz olduğu hastalıklar olarak bilinir. Bunun yanında aşırı proliferasyonla beraber azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, genomlarında toplanan mutasyonların sonucu beklendiğinden daha uzun yaşayan hücreler malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar.

2.5.1. APOPTOZİSİN MEKANİZMASI

Apoptotik Hücre Ölümünün Aşamaları

- Apoptozisin başlatılması
- Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- Hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması
- Fagositoz

Apoptozisin Başlatılması (Sinyal Üretici Yollar)

Hücresinin apoptozise gidebilmesi için ilk olarak, ilgili genetik mekanizmayı harekete geçirecek hücre içinden veya dışından bir sinyal ile karşılaşması gerekir (92).

Hücre Dışından Kaynaklanan Sinyaller

1-Çevresel Yaşam Sinyallerinin ve Büyüme Faktörlerinin Yetersizliği: Hücreler çevredeki hücrelerden ve ekstrasellüler matriksden gelen büyüme faktörlerine, yaşam sinyallerine ihtiyaç duyarlar. Bu sinyaller yeterli miktarda değil ve düzensizse hücreler apoptozise giderler (92).

2-Ölüm Reseptörlerinin Aktivasyonu (Reseptör-Ligand Etkileşmesi): Bazı sitokinler hücre membranında bulunan reseptörlere bağlanarak ölüm programını harekete geçiren sinyaller üretebilirler (92). Apoptoziste rol alan membran reseptörleri içinde en önemli grup “Tümör Nekrozis Faktör Reseptör (TNFR)” ailesidir. TNFR içinde apoptozis oluşturan reseptörlerden en önemlileri Fas ve TNFR1’dir. Bu reseptörler uyarıldıklarında, hücrenin sitoplazmasında bulunan “adaptör proteinlere” bağlanırlar. Adaptör proteinlerin ölüm efektör parçaları vardır. Bunlar da apoptozis için başlatıcı olan kaspazlara (örn: prokaspaz 8) bağlanırlar (93).

a) Fas-Fas Ligand Aracılı Apoptozis: Bu tip apoptozis hücre yüzey reseptörü Fas aracılığı ile oluşur. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması ile Fas reseptörünün hücre içinde bulunan parçası, Fas, FADD’la (Fas adapter protein with a death domain) birleşerek ölüm başlatan sinyal kompleksini oluşturur. Bu da prokaspaz 8’in aktifleşmesini sağlar (94).

b) Tümör Nekrozis Faktör (TNF) Aracılı Apoptozis: Bir sitokin olan TNF’nin, TNF reseptörleri ile birleşmesi (örn TNFR1) sonucunda reseptörün hücre içinde bulunan parçası, TRADD’la birleşerek (TNFR adapter protein with a death domain) etki gösterir. Adaptör protein daha sonra prokaspaz 8’i aktifleştirerek apoptozise neden olur (92).

c) Sitotoksik T Lenfosit Aracılı Apoptozis: Sitotoksik T lenfositler (CTL) infekte olmuş olan konakçı hücrelerin yüzeyinde bulunan yabancı antijenleri tanırlar. CTL’lerin ana görevi malign ve/veya virus ile infekte olmuş olan hücrelerin öldürülmesidir (92,95). Yabancı

antijenleri tanıdıklarında yüzeylerinde Fas ligand oluşur. Hedef hücrelerin Fas reseptörlerine tutunurlar. CTL'ler sitoplazmalarında granzim B (serin proteaz) ve perforin adı verilen ve apoptozis oluşmasını sağlayan proteinler içeren sitoplazmik granüllere sahiptirler (95). Perforin, transmembran por oluşturucu bir proteindir. CTL'ler hedef hücrelerin membranlarında perforin ile porlar oluşturarak, onların sitoplazmalarına granzim B salgırlar. Granzim B hedef hücrelere girerek kaspazları aktive eder (91).

d) Hücrelerin maruz kaldığı dış etkenler: Hipoksi, radyasyon, antimetabolik etkili ilaçlar, ısı, gamma ve ultraviyole ışınlar gibi etkenler apoptozise sebep olabilmektedir. Bu etkenler çeşitli yollar ile DNA hasarı oluşturarak apoptozise neden olurlar (91).

Hücre İçinden Kaynaklanan Sinyaller:

DNA hasarı, hücre içi pH'da azalmaya, metabolik ve/veya hücre siklus bozukluklara, hücre içi Ca^{2+} seviyesinde artışına gibi değişiklikler ile hücreyi apoptozise götüren merkezi hücre ölüm sinyallerini başlatabilmektedir (96).

Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

İç ve dış sinyallerle hücre içindeki bir grup proteazlar harekete geçer. Bu proteazlara kaspaz ismi verilmektedir. Ortamdan gelen ölüm reseptörlerini aktive eden sinyaller adaptör proteinleri, iç ortamdan gelen sinyaller ise mitokondrideki başlatıcı kaspazları aktive ederler (92).

Mitokondrinin dış zarında sinyaller geçirgenlik artışına neden olurlar. Mitokondri dış zarının geçirgenliğini bcl-2 gibi bazı proteinler ayarlamaktadır. Antiapoptotik Bcl-2 proteini mitokondri dış membranında bulunan apoptozis proteaz aktive edici faktör 1 (Apaf 1)'e tutulur. Hücrenin içinden kaynaklanan apoptotik sinyaller Apaf 1'in mitokondriden ayrılmasına neden olur. Bu ayrılma dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırır. Geçirgenliğin artması, mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom C'nin sitozole çıkmasına neden olur. Sitokrom C sitoplazmada Apaf 1, kaspaz 9 ve ATP ile birleşir. Bu yeni oluşuma apoptozom denir. Apoptozom sonlandırıcı kaspaz olan kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozisi başlatır (96).

İç veya dış nedenlerle hücre kromozomlarında DNA hasarı oluştuğunda aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genlerden en önemlisi p53 genidir. İnsan tümörlerinin %50'den fazlasında p53 geninin mutasyona uğradığı tespit edilip, kanser oluşumunda bu gen kritik rol oynadığı kabul edilmektedir (89,94). Normalde inaktif durumda bulunan p53 geni, DNA hasarı oluştuğunda aktifleşerek p21 genini harekete geçirir ve hücrenin geç G1 fazında kalarak, S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak DNA'sı hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. p53 geni, DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu sağlar. Bu proteinler DNA hasarını tamir edebilirse, hücre siklusundaki blok kalkar. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa p53 geni bax proteinini (bcl-2 grubu proteinlerden, proapoptotik) aktive ederek mitokondri aracılığı ile hücrenin apoptozise giderek ölmesini sağlar. Böylece DNA hasarlı hücre ortadan kaldırılmış olur (92, 97).

Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler

Biyokimyasal Değişiklikler

Sonlandırıcı kaspazlar aktive olduktan sonra onlar sitoplazmada ve çekirdek içinde hedef proteinlerini yıkarlar.

1-DNA kırıklarının meydana gelmesi

2-Hücre iskeletinin yıkılması

3-Hücre membranının değişiklikleri

Morfolojik Değişiklikler

Apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda meydana gelmektedir. Apoptozis morfolojik olarak kendine özgü bir süreç içerir. Apoptoziste hücre küçülür, hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (kromatin agregasyonu) ve yoğunlaşır (kromatin kondensasyonu) (16, 91, 98). Apoptotik hücre membranı intaktır ve üzerinde ufak cepçikler meydana gelir. Apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotic bodies) bölünür. Apoptotik cisimcikler, membran ile kaplıdır, değişen miktarlarda nükleus veya diğer hücre içi

yapılar içerirler (16). Apoptotik hücre veya cisimcikler parenkim hücreleri veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden, enflamasyon oluşmaz (91,98). Apoptozisin en özgün yönü, hücre DNA'sının nükleozomlar arası bölgelerden yaklaşık 180-200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri de; normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserinin erken evrede membranın dış yüzüne doğru yer değiştirmesidir (phosphatidylserine translocation). Bu değişim, apoptotik hücrelerin parenkim hücreleri ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar (98).

Fagositoz

Apoptotik cisimler ortamdaki parenkim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenirler (91).

2.6. SİTOKERATİNLER

- Sitokeratinler (CK), intermediyat filament protein ailesindedir.
- CK'lerin salgılanması apoptotik veya proliferasyon halindeki hücrelerden gerçekleşir.
- CK'ler, en yaygın olarak basit ve keratinleşmemiş çok katlı epitelden ve epitel kaynaklı dokulardan salgılanır. Sağlıklı kişilerde, skuamöz epitelden CK 1-6 ve 9-17'ler eksprese olur. CK 7, 8, 18-20'ler ise basit epitelden eksprese olur. Malignansilerde sadece CK 8, 18, 19'lar bol miktarda eksprese olur (18).

- Bilinen 20'den fazla CK'ler vardır ve bunlar tip I ve tip II olarak ayrılır. Tip I, sitokeratin 9-20'i içerir ve asidik proteinlerden olup 40-56 kDa ağırlığındadır. Tip II, sitokeratin 1-8'i içerir ve 53-68 kDa ağırlığında, bazik proteinlerden oluşur (99).

- CK-18, embriyogenez esnasında eksprese olan ilk sitokeratindir. Erişkinlerde mesane epiteli, ince barsak ve kolon mukozası, hepatositler, follop tüpleri, ekrin ter bezleri, uterusun serviks ve endometriumdan salgılanır (100).

- CK-8, CK-19, CK-18 aynı zamanda, endometriozis, karaciğer sirozu, malign tümörler (kolon, meme, over, akciğer, endometriyal ve servikal kanser) gibi proliferasyondaki dokularda da aşırı miktarda salgılanmaktadır (101).

- Epitel hücre kanserlerinde tedaviye cevabın hızlı değerlendirilmesinde ve rekürrens

erken saptanmasında CK protein fragmanları vücut sıvılarında saptanabilir.

- CK-18 hızlı büyüyen tümörlerin epitelyal hücrelerinden aşırı derecede salgılanır; artmış düzeyleri hücre proliferasyonu ve yenilenmesi ile ilişkilidir. CK-18 konsantrasyonları tümör kitlesini değil, tümör aktivitesini yansıtır.

- CK'ler, geleneksel radyolojik metodlardan önce hastalığın durumu hakkında doğru bilgi veren, basit, noninvazif, ucuz, güvenilir, tümör markırlarıdır. Hücre iskeletinde, CK'ler çok düşük çözünürlük gösterirler. Normalde CK'lerin dolaşıma çıkabilmeleri için yıkılmaları gerekmektedir (102). Dolaşımdaki CK parçalarının yarı ömrü, parçanın hacmine bağlıdır ve yaklaşık 10-15 saattir. Çözünür CK parçalarının dolaşıma salınım işlemi aydınlatılamamıştır ancak varsayılan yollar şunlardır:

- Ölen hücrelerde CK'lerin proteolitik yıkımında
- Anormal mitozda
- Proliferasyondaki hücrelerden
- Apoptoziste
- Neovaskülarizasyonda

CK'ler tümör hücrelerinden salındığında kan, idrar, kist sıvısı, asit sıvısı, plevral mayide ve BOS'ta saptanabilir. Normalde sağlıklı bireylerde CK'lerin, dolaşımdaki düzeyleri düşüktür. Epitel hücresiyle ilişkili kanserlerde anlamlı düzeyde yükseliş gözlenir (18).

Kırılmış CK-18 içeren apoptotik cisimcikler dalakta birikir. Metastatik kanserli hastaların %80'inde apoptotik cisimciklerin dalağın kırmızı pulpasında biriktiği gösterilmiştir (103).

Total CK-18, proliferasyon halindeki hücrelerde fazla miktarda üretilir. Nekroz sırasında membran bütünlüğü bozulunca dolaşıma salgılanır ve kırılmış CK-18 yalnızca apoptozisle ölen hücrelerde, total CK-18'in kaspazlarla kırılması sonucunda oluşur. Apoptozis sırasında oluşan apoptotik cisimcikler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından fagosite edilirler. Kanser gibi hücre turnoverının ve hücre ölümünün çok yüksek olduğu durumlarda ise apoptozise giden hücrelerin bir kısmı sekonder nekrozise uğrar, böylece hücre içeriğindeki kırılmış CK-18 dolaşıma salınır. Kısaca, total CK-18, hücreler nekrozisle ölünce dolaşıma

salgılanır, kırılmış CK-18 ise apoptozis sırasında oluşur ve hücreler sekonder nekroze giderken dolaşıma salgılanır (104).

CK proteinlerinin kaspazlarla parçalanması apoptotik cisimciklerin oluşumunu kolaylaştırır ve apoptotik sinyalleri artırır. İnvitro çalışmalarda kırılmış CK-18'in apoptozis sürecinde kaspaz sindirimi sonucunda ekstrasellüler sahaya salındığı gösterilmiştir (19).

Apoptozis sırasında CK-18, kaspazlarla aspartat 238 ve aspartat 396 noktasında bölünüp, ortaya CK-18Asp396 neoepitopuna (M30 antijeni) çıkmasına sebep olur. Buna karşı geliştirilen monoklonal M30 belirteci özellikle CK-18'in aspartat 396'da bölünmüş fragmanını tanır ve ölçülmesine yardımcı olur. Bununla beraber monoklonal M65 belirteci hem sağlam CK-18'i hemde bölünmüş CK-18'i ölçmektedir. Böylece monoklonal M30 ve M65 antikoları apoptotik sürecin belirteçleri olarak kullanılabilir (20,21).

Apoptozis sürecindeki değişimleri saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir.

1. Hematoksilen-eozin ve Giemsa ile boyama yardamında apoptotik hücrelerin nukleus morfolojisindeki kromatinin kondanse olması ve nukleus zarının periferinde toplanması, nukleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi tespit edilebilir.

2. Floresan mikroskopi: floresan maddelerin kullanılmasıyla nekrotik, apoptotik ve normal hücre ayırımı yapılabilir.

3. Elektron mikroskopi ile sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir.

4. Faz kontrast mikroskopinde hücre kültürü ortamında apoptoza giden hücrelerin başlangıçta hücre membranları intakt olmasına rağmen ileri dönemlerde sekonder nekrozun başlamasını ve böylece membran bütünlükleri bozulmasının fotoğrafları elde edilebilir.

5. Western blotting bir protein karışımı içindeki belirli bir proteini ve büyüklüğünü saptamak için kullanılan nicel bir metot yardımıyla apoptoza özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması

mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-fraksiyonlama yapılarak hücrenin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptoza gittikleri anlaşılır.

6. Flow sitometri yardımıyla, floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptozda eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozun belirlenmesi açısından kullanışlıdır.

7. Anneksin V yöntemi: floresan madde ve bir protein olan Anneksin-V kompleksinin apoptotik hücre yüzeyindeki fosfatidilserine bağlanma oranı flow sitometri ile ölçülebilmektedir. Bu yöntem ile canlı hücreler, erken apoptotik hücreler ve geç apoptotik veya nekrotik hücrelerin birbirinden ayırt edilebilir.

8. ELISA testi, viral, bakteriyel ve paraziter enfeksiyonların tanısında ve apoptozun belirlenmesinde kullanılan, serolojik tanı yöntemlerinden biridir. M30 yönteminde apoptotik hücreler, sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu açığa çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal ELISA yöntemle boyanması prensibine göre belirlenirler (104).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Aralık 2012-Eylül 2013 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi genel çocuk polikliniğine başvuran kronik hastalığı olmayan, çevresel tütün dumanına maruz kalan 51 çocuk ve çevresel tütün dumanına maruz kalmayan 28 çocuk çalışma için seçildi. Kendisi içmediği halde 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.

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 babaninisi ve ailenin ortalama aylık geliri, annenin gebelikte sigara içip içmediği, babanın sigara içip içmediği, içiyorsa miktarı, evde anne ve babadan başka sigara içen olup olmadığı, içiliyorsa - miktarı, 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 vücut ağırlığı ve boyları ölçüldü.

Tüm çocuklardan idrar örnekleri steril ve kapaklı idrar kaplarına alınmıştır (idrar kotinin düzeyleri için). Aynı sırada heparin ile yıkanmış tüplere alınan 5’cc’lik kan örnekleri apoptozis belirteçleri olan monoklonal M30-M65 antikorları çalışılmak üzere alındı. Alınan kan örnekleri 10 dakika 3000 rpm ’de santrifüj edildi ve ayrılan serumlar çalışma tarihine kadar -80 °C’de saklandı.

İdrar kotinin düzeylerinin tayini, ROCHE HITACHI 912 marka cihaz ile enzimimmünassay (EIA) yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Kotinin düzeyleri ng/ml cinsinden hesaplanmıştır.

3.1. Serum Sitokeratin 18 Belirteçlerinin ELISA Yöntemi ile Ölçülmesi

Serum CK-18 belirteçleri, PEVIVA/ALEXIS Human M30-Apoptosense ELISA kiti (CH 4415 Lausen, Sweden) ve PEVIVA M65 EpiDeath ELISA kiti (CH 4415 Lausen, Sweden) kullanılarak ölçüldü.

3.2. Test Prensipleri

M30 ÖLÇÜMÜ

M30 monoklonal antikor serumdaki ccK-18Asp396 neoepitopuna karşıdır. İnsan CK-18'ine karşı fare monoklonal antikoruyla kaplanmış kuyucukların üzerine numune eklenerek serumdaki CK-18 antijenleri ile bağlanma gerçekleştirildi. Bu kuyucukların üzerine, M30 monoklonal antikoruyla konjuge HRP (Horseradish Peroxidase) eklendi. Solid faz/Antijen/İşaretli antikor kompleksi oluştu. İnkübasyonu takiben yapılan yıkama işlemi ile bağlı olmayan konjugatlar uzaklaştırıldı. Takiben numunedeki M30 antijen miktarı ile doğru orantılı bir şekilde renk oluşturan TMB (tetramethyl-benzidine) substratı ilave edildi. İnkübasyonu takiben oluşan renk reaksiyonu kuyucukların üzerine eklenen asidik çözelti (1M H₂SO₄) ile durdurularak 450 nm'de absorbansı ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri oluşturulan standart eğri grafiği yardımıyla U/L değerlerine dönüştürüldü. Böylece numunedeki M30 antijen miktarı kantitatif olarak belirlendi.

M65 ÖLÇÜMÜ

M65 monoklonal antikor serumdaki ccK-18 epitopuna karşıdır. İnsan CK-18'ine karşı fare monoklonal antikoruyla (clone M6, IgG2a) kaplanmış kuyucukların üzerine numune eklenerek serumdaki ccK-18 antijenleri ile bağlanma gerçekleştirildi. Bu kuyucukların üzerine, ccK18 proteininin farklı bir epitopu olan (clone M5, IgG2b) M65 monoklonal antikoruyla konjuge HRP (Horseradish Peroxidase) eklendi. Solid faz/Antijen/İşaretli antikor kompleksi oluştu. İnkübasyonu takiben yapılan yıkama işlemi ile bağlı olmayan konjugatlar uzaklaştırıldı. Takiben numunedeki M65 antijen miktarı ile doğru orantılı bir şekilde renk oluşturan TMB (tetramethyl-benzidine) substratı ilave edildi. İnkübasyonu takiben oluşan renk reaksiyonu kuyucukların üzerine eklenen asidik çözelti (1M H₂SO₄) ile

durdurularak 450 nm’de absorbansı ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri oluşturulan standart eğri grafiği yardımıyla U/L değerlerine dönüştürüldü. Böylece numunedeki M65 antijen miktarı kantitatif olarak belirlendi.

3.3. İstatistiksel Analizler

SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 18 for Windows, SPSS® Inc, Chicago, IL) istatistik analiz programı kullanıldı. One-sample Kolmogorov–Smirnov testi ile parametrelerin dağılımlarına bakıldı ve dağılımın kotinin sonuçları hariç diğerlerinin normal olduğu görüldü. Parametreler için mean \pm standart sapma (SD) olarak sonuçlar verildi. Hasta ve kontrol grubunda kotinin hariç parametrelerin karşılaştırılmasında *Independent Samples t test* ve *Chi-Square Test* kullanıldı, normal dağılım göstermeyen kotinin için Man Whitney U Testi kullanıldı. İlişki analizinde ise Pearson’s korelasyon testleri kullanıldı. P değeri 0.05’den küçük olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya toplam 79 çocuk dahil edildi. Çocuklar, çevresel tütün dumanı maruziyetine göre iki gruba ayrıldı. Çevresel tütün dumanı maruziyeti olmayan grupta 14'ü kız (%50) ve 14'ü erkek (%50), toplam 28 çocuk, çevresel tütün dumanı maruziyeti olan grupta 26'sı kız (%50,9) ve 25'ierkek (%49,1), toplam 51 çocuk çalışmaya alındı. Gruplar arasındaki çocukların cinsiyet oranları açısından fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,5$) (Tablo1).

Gruplar arasındaki yaş, ağırlık, boy, BMI oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Her iki gruba ait antropometrik veriler Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. Çocukların ortalama yaş, ağırlık, boy ve BMI değerlerinin karşılaştırılması

	ÇTD Maruz Kalan n:51	ÇTD Maruz Kalmayan n:28	<i>p</i>
Cinsiyet	25/26	14/14	0,5
Yaş (yıl)	2,5±1,7 ^a	2,4±1,8 ^a	0,8
Ağırlık (kg)	10,6±3,6 ^a	10,7±4,7 ^a	0,9
Boy (cm)	83,6±14,9 ^a	82,7 ±19,2 ^a	0,8
BMI (kg/m ²)	14,8±0,8 ^a	15±0,5 ^a	0,3

^a Ortalama ± standart sapma (SS) olarak verilmiştir.

Ortalama idrar kotinin düzeyi çevresel tütün dumanına maruz kalan grupta çevresel tütün dumanına maruz kalmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak ölçüldü ($p<0,05$). (Tablo 2)

Çevresel tütün dumanına maruz kalan grupta ortalama M30 antikoru düzeyleri çevresel tütün dumanına maruz kalmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak ölçüldü ($p<0,05$). Ortalama M65 antikoru düzeyleri gruplar arasında anlamlı değildi.(Tablo 2)

Çevresel tütün dumanı maruziyetine göre çocukların ortalama idrar kotinin düzeyi ile M30-M65 değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Grupların idrar kotinin, M30-M65 değerleri

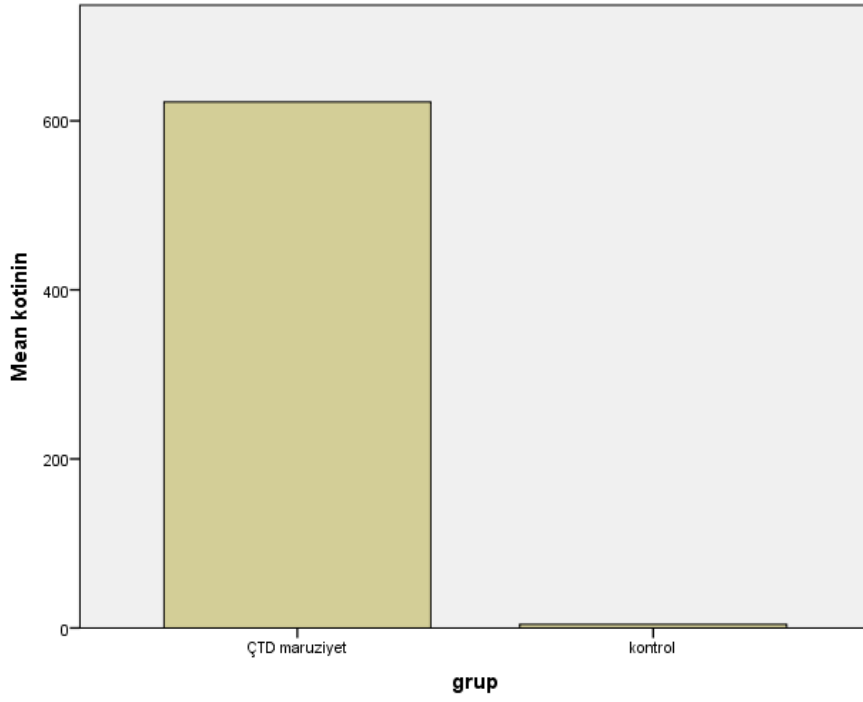
	ÇTD Maruz Kalan n:51	ÇTD Maruz Kalmayan n:28	<i>p</i>
M30 (U/L)	173,4±42,9 ^a	204,5±54,2 ^a	0,01
M65 (U/L)	400,5±135,4 ^a	455,3±158,4 ^a	0,1
Kotinin (ng/ml)	622,27±600,6 ^a	4,25±7,5 ^a	<0,001

^a Ortalama ± SS olarak verilmiştir.

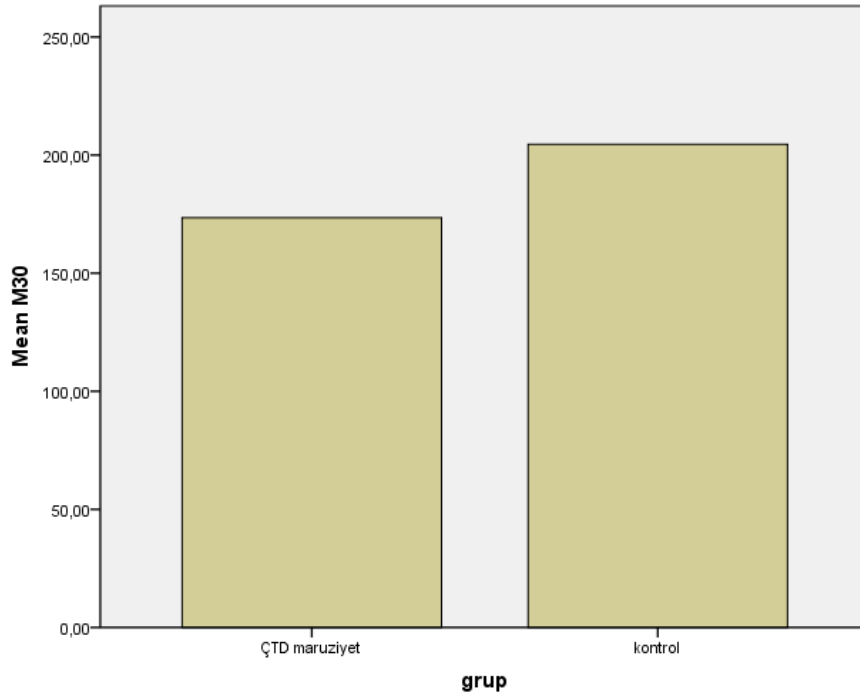
Çevresel tütün dumanına maruz kalan grubun ortalama kotinin düzeyi ile M30 düzeyleri arasında negatif korelasyon mevcuttu ($r = -0,23$ $p = 0,03$).

Çevresel tütün dumanına maruz kalan grubun ortalama kotinin düzeyi ile M65 düzeyleri arasında korelasyon mevcut değildi ($r = -0,11$ $p = 0,29$).

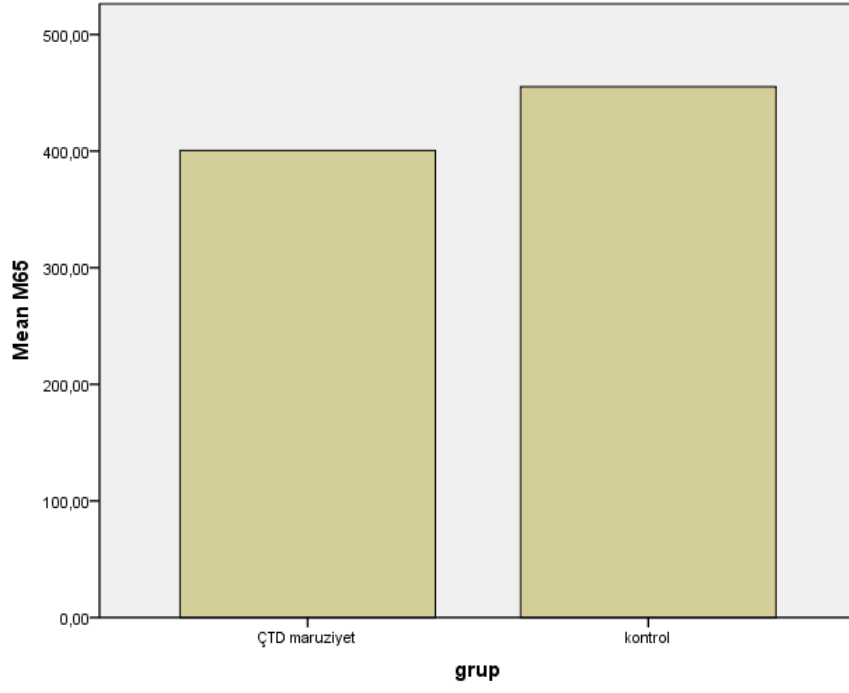
Grupların çevresel tütün dumanına maruziyetine göre idrar kotinin düzey grafiği Şekil 1’de gösterilmiştir. Grupların çevresel tütün dumanına maruziyetine göre M30 ve M65 düzey grafikleri Şekil 2 ve 3’te gösterilmiştir.



Şekil 1.Çevresel tütün dumanına maruz kalmaya göre çocukların idrar kotinin seviyeleri



Şekil 2. Çevresel tütün dumanına maruz kalmaya göre çocukların M30 seviyeleri



Şekil 3. Çevresel tütün dumanına maruz kalmaya göre çocukların M65 seviyeleri

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 oranı, akciğer fonksiyonlarında azalma, bronşit, pnömoni, astım, otitis media, nörogelişimsel gecikmeler, davranış problemleri, okul başarısında azalma ve ani bebek ölümleri gelmektedir (51, 53, 54, 55, 57).

Bununla beraber genel popülasyonda pasif içiciliğin insan kromozomları üzerine olan olumsuz etkisi merakla takip edilmektedir. Sigara içen ve pasif içici erişkin bireylerde yapılmış çok sayıda araştırma, bu kontaminant maddenin hücre DNA'sının yapısını bozarak genotoksik etkilere yol açtığı tartışılmaktadır (10, 12, 14, 106, 107, 108-118). Bu genotoksik etkilerin ileride malignansiye neden olma riskinin ortaya çıkması, 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 etki bakımından da hayati önemdedir (9, 43, 119). Her ne kadar çocuklarda pasif içiciliği azaltmak için ciddi tedbirler alınmaya çalışılsa da yakın bir gelecekte bu maruziyeti ortadan kaldırma imkanı 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 marker'ı olup olmayacağı tartışılmaktadır (10, 23, 120, 121).

Mutajenik etkinin hassas göstergesi olan DNA hasarı, ileride bu kişilerin kanser geliştirme olasılığının daha yüksek olması bakımından klinik önem taşımaktadır ve malignitelere yatkınlık riski olduğuna işaret etmektedir (10). Nitekim bu konuda Avrupa'da 22000 kişiyi kapsayan "kanser risk biyogöstergeleri " adlı projede sigara ve diğer kontaminant faktörlere bağlı DNA hasarının saptanması ve biyogöstergelerle yüksek seviyede

riski gösterilen gruplarda uzun süreli cohort gözlem sonuçları, malignite gelişme riskinin paralel derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (10, 122).

Ortaya koyulan etkene maruziyetin derecesi, genotoksisitenin klinik sonuçların erken tespitinde önem taşımaktadır. Pasif içicilik gibi durumlarda etkene maruziyetinin derecesini çok çeşitli faktörler etkileyebilir.

Çalışmamızda sigara maruziyetini değerlendirmek için anket ve idrar kotinin seviyelerin ölçümü yapılmıştır. Yapılan çeşitli araştırmalarda ebeveynlerin çocukların sigara dumanı maruziyeti konusunda verdikleri bilgilerin, çocukların idrarında ölçülen kotinin düzeyi ile korele olmadığı, bu nedenle bu bilgilerin tek başına yeterli olamayacağı bildirilmiştir (123,124). 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 (125). Bu sonuçlar çocuklarda pasif içicilik oranları belirlenirken ailelerin verdiği bilgilerle birlikte objektif bir kriter olan kotinin seviyesinin çalışılması gerekliliğinin ortaya koymaktadır.

N. Çobanoğlu ve ark.'nın 9-12 yaş 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 yüksektir (126).L. Irvine ve ark. çocuklarda evde içilen sigara sayısı ve evde sigara içen kişi sayısı ile kotinin düzeyleri arasında pozitif korelasyon saptamıştır (127).

Bizim çalışmamızda da sigara dumanına maruz kalan grubun idrardaki kotinin düzeyleri, sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre anlamlı olarak yüksek ölçüldü.

Apoptozis sürecindeki değişimleri saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir: morfolojik görüntüleme, immunohistokimyasal, biyokimyasal, immunolojik ve moleküler biyoloji yöntemleri. Klinikte apoptozis sürecini öğrenmek için en uygun immunolojik yöntemler: ELISA (DNA Fragmentasyonu, M30 ve M65 düzeyi) veya fluorimetrik ölçüm (hücre kültüründe kaspaz aktivasyonu) (104). Fluorimetrik ölçümler teknik nedenlerle gerçekleşmediği için çalışmamızda apoptozis sürecini ELISA yöntemi ile değerlendirdik.

CK'ler tümör hücrelerinden salgılanan ve epitel kaynaklı malignitesi olan hastalarda klinik progresyonu değerlendirmek için kullanılabilen serum markırlarıdır. Kırılmış CK-18, apoptozisle ölen hücrelerde apoptozis sürecine özgü enzimler (proteazlar) olan kaspazlarla kırılması sonucunda oluşur. Apoptozis sırasında oluşan apoptotik cisimcikler, komşu hücreler ve makrofajlar tarafından yutulur. Malignansi gibi hücre ölümünün ve hücre turnoverının çok yüksek olduğu durumlarda ise apoptozise giden hücrelerin bir kısmı sekonder nekroze uğrar, böylece hücre içeriğindeki kırılmış CK-18 (M30 antijeni) dolaşıma salınır (105).

Total CK-18, proliferasyon halindeki hücrelerde bol miktarda üretilir ve nekroz sırasında membran bütünlüğü bozulunca dolaşıma salgılanır. Total CK-18, hücrelerin nekrozu sonucunda dolaşıma salınır, kırılmış CK-18 ise sadece apoptozis sırasında oluşur ve hücreler sekonder nekroze giderken dolaşıma salınır. M30 ELISA antijeni ise yalnızca kaspazlarla Asp396 noktasında parçalanarak ve serumda çözülmüş olarak bulunan CK-18 fragmanını (solubl CK-18) tanır. M65 ELISA antijeni ise hem sağlam CK-18'i hemde bölünmüş CK-18'i tanır (epitelyal hücrelerin ölüm modunu yani apoptozis ve nekrozunu yansıtır). Apoptozis esnasında CK 18, kaspazlarla aspartat 238 ve aspartat 396 noktasında kırılır. M30 monoklonal antikor, özellikle CK-18'in aspartat 396'da kırılan fragmanını (M30 antijeni) tanır. Böylece bu yukarıda anlatılan antijenler apoptotik markır olarak kullanılabilir (20,21).

Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan grupta, apoptozis belirteci olan M30 antikorları sigara dumanına maruz kalmayan gruba göre anlamlı olarak düşüktü. Bizim çalışmamızda sigaraya maruz kalan pasif içici durumundaki çocuklarda apoptozis belirteci olan M30 düzeylerinin sigaraya maruz kalmayan çocuklara göre düşük olması sigaraya maruz kalanlarda apoptozisin inhibisyonu şeklinde yorumlanabilir.

Literatürde birçok çalışmada sigaranın bronşial epitel hücrelerinde, fibroblastlarda, alveolar makrofajlarda, plasentada ve endotel hücrelerinde apoptozis sürecini arttırdığı belirtilmektedir (129-132). Fakat Wickenden J.A et al. tarafından yapılan çalışmada tütün dumanı kaspaz aktivitesinin inhibisyonu ile hücre apoptozis sürecini engellediği bildirilmiştir. Bunu Western-blot yöntemini kullanarak göstermişlerdir (133).

Çalışmamızda idrar kotinin düzeyleri ile M30 antikorların miktarı arasında negatif korelasyon tespit edildi. Bu korelasyon çevresel tütün dumanına maruziyetin apoptozis sürecini değiştirdiğini bir daha teyit etmiştir. Bizim çalışmamızda apoptozis sürecinin

göstergesi olan M30 antikorlarının kontrol grubuna göre maruz kalan çocuklarda daha düşük ölçülmesi apoptozis sürecinin baskılanması olarak yorumlanabilir. Pasif içiciliğin objektif bir göstergesi olan kotinini ölçümü de bu sonuçların güvenilirliğini sağlaması açısından değerlidir.

Sonuç olarak çalışmamız bildiğimiz kadarıyla bugüne kadar sigara dumanına maruz kalan çocuklarda apoptozis sürecini M30 ve M65 belirteçlerini kullanarak değerlendiren ilk çalışmadır. Çevresel tütün dumanına maruziyet ile DNA hasarı derecesi ve M30-M65 apoptozis belirteçleri arasındaki bağlantıyı teknik olarak göstermek ilerde yeni araştırmaların yapılması yararlı olacağını düşünüyoruz. Çocukların çevresel tütün dumanına maruziyetinin objektif bir göstergesi olan kotinin de tespit edilen etkilerin güvenilirliğini sağlaması açısından değerlidir.

Bu çalışma, açıklayıcı olmaktan çok gözlemsel olmuştur; bu yüzden de çeşitli yorumlara açıktır. Sonuçlar, çalışma popülasyonu arasındaki gerçek farklılıklardan ötürü farklı olabilir. Aile durumu ya da ebeveynlerin davranışları çocuklarda farklılık gösterebilir. Mesela, çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklar daha alt sosyal sınıftandırılar. Belirli klinik özellik gösteren çocukları çalışmaya almaya yatkınlık olmuş olabilir. Bu yüzden yanlış farklılıklar tespit edilmiş olabilir. Üstün körü maruziyet değerlendirilmesi verilmesi, karşılaştırılabilir çalışmaların olmayışı ve maruz kalmayan çocuklara karşı çevresel sigara dumanına maruz kalanların sağlık durumlarında geniş farklılıklar olması gibi sonuçlar, oldukça dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır. Çocuklarda kotinin düzeyleri ve kapalı alanda maruz kalınan nikotin düzeyleri arasındaki güçlü korelasyon, çevresel sigara dumanı maruziyeti tayininde bunun iyi bir biyomarker olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla beraber kotinin düzeylerinde aynı sayıda sigara içenlerde bile geniş bir farklılık vardır. Sigara içmeyenlerin idrarında düşük kotinin düzeyinin tespit edilmesi, çevresel sigara dumanını tam önlenmenin hemen hemen imkansız olması kadar şaşırtıcı değildir. Bu bulgu, önceki çalışmalarla uyumluydu.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızda sigara dumanına maruz kalan çocuklarda maruziyet derecesinin objektif bir kriteri olan idrar kotinin düzeyi ile apoptozis belirteci olan M30 ve M65 antikollarının düzeyleri araştırıldı.

Bu çalışmada çevresel tütün dumanına maruz kalan çocuklarda apoptozis belirteci olan M30 düzeylerinin çevresel tütün dumanına maruz kalmayan çocuklara göre düşük olması çevresel tütün dumanına maruz kalanlarda apoptozis sürecinin inhibisyonu (pre malignansi) şeklinde yorumlanabilir. Çalışmamızda her iki grupta M65 düzeylerinin arasındaki farkın olmaması çevresel tütün dumanı etkisi fizyolojik sürecin değiştirdiğini, ama hücrenin nekrotik ve otofajik ölüm moduna etki etmediğini düşünüyoruz. Çalışmamızda idrar kotinin düzeyleri ile M30 antikolların miktarı arasında negatif korelasyon tespit edildi. Çevresel tütün dumanına maruziyet sonucunda apoptozis sürecinin değişmesi arasındaki bu korelasyon bildiğimiz kadarıyla apoptozis belirteci olan M30 vasıtasıyla ilk defa gösterilmiştir.

Ebeveynlerin çocukların çevresel tütün dumanına maruziyeti konusunda verdikleri bilgilerin, çocukların idrarında ölçülen kotinin düzeyi ile korele olmaması, bu bilgilerin tek başına yeterli olamayacağı çalışmamızla desteklenmiştir.

Son olarak, sigara dumanından arındırılmış yaşam alanlarının çocuklar için sağlanması şarttır. Çocukların bu kontaminanta maruz kalmalarının önlenmesi; bu konuda daha uygulanabilir yasal ve idari önlemlerin alınmasına, sorunların tespitine yardımcı ileri laboratuvar tekniklerinin geliştirilmesine /kullanılmasına ve çocukların sağlığı ile uğraşanların bu konuda kamuoyunu yeterince bilgilendirmesine bağlıdır.

7. EKLER

7.1. Anket Formu

Görüşme Yapılanın Araştırmaya Katılacak Çocuğa Yakınlık Derecesi:

Anne Baba Diğer Ebeveyn (ise açıkça belirtiniz:)

Adı ve Soyadı:

Çocuğun Adı ve Soyadı:

Görüşme Tarihi:

Telefon:

Boy:

Kilo:

Akraba evliliği: 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 kullanımı gerektiren bir hastalığı var mı? 1- Yok 2- Var

KAYNAKLAR

1. J. Dejmek, I. Solansk'y, K. Podrazilov'a, R.J. Sr'am, The exposure of nonsmoking and smoking mothers to environmental tobacco smoke during different gestational phases and fetal growth, *Environ. Health Perspect.* 2002; 110: 601–6.
2. M. De Sario, F. Forastiere, G. Viegi, M. Simoni, E. Chellini, P. Piccioni et al. Parental smoking and respiratory disorders in childhood, *Epidemiol. Prevent.* 2005; 29: 52–6.
3. H.R. Anderson, D.G. Cook, Passive smoking and sudden infant death syndrome: review of the epidemiological evidence, *Thorax* 1997; 52: 1003–9.
4. A.G. Mainous W.J. Hueston, Passive smoke and lowbirth weight: evidence for a threshold effect, *Arch. Fam. Med.* 1994; 3: 875–8.
5. W.B. Moskowitz, P.F. Schwartz, R.M. Schieken, Childhood passive smoking, race, and coronary artery disease risk, *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 1999; 153: 446–53.
6. M.M. Youssef, A. Saad, Effects of environmental tobacco smoke on blood lead level and anthropometric status of Egyptian preschool children, *Central Eur. J. Occup. Environ. Med.* 2005; 11: 197–206.
7. 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.
8. Benowitz NL. Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev.* 1996; 18: 188–204.
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): 140-47.
10. 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
11. 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.
12. Akbaş E, Çelik A, Dericci E, Söylemez F. Sigara kullanımının lenfosit yaşam süresi ve genotoksik etkilerinin incelenmesi. *Geriatrici* 2001; 4(1): 15-18.
13. 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.
14. Vineis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis.* 2005; 26(11): 1846-55.

15. Thompson CB. Apoptozis. In: Paul WE (eds). Fundamental immunology. Lippincott-Raven Publishers; 1999;107-38.
16. Cooper GM. Programmed cell death. Cooper GM (ed) The Cell. Chapter 14. 592-96.
17. Perkins AS, Stern DF, Apoptozis. In: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). Cancer Principle and Practice of Oncology. Lippincott-Raven; 1997; 96-100.
18. Sundstrom BE, Stigbrand TI. Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. Int J Biol Markers 1994;9: 102-8.
19. Ku NO, Omary MB. Effect of mutation and phosphorylation of type I keratins on their caspase-mediated degradation. J Biol Chem 2001; 276:26792-8
20. Ueno T, Toi M, Biven K, Bando H, Ogawa T, Linder S. Measurement of an apoptotic product in the sera of breast cancer patient. Eur J Cancer 2003; 39:769-74.
21. <http://www.peviva.se/m30-apoptosense-m65elisa.aspx>
22. Vineis P, Hoek G, Krzyzanowski M, et al. Lung cancers attributable to environmental tobacco smoke and air pollution in non-smokers in different European countries: a prospective study. Environ Health. 2007; 6: 1-7.
23. 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.
24. WHO Report on the global tobacco epidemic, 2013 Enforcing bans on tobacco advertising promotionandsponsorsHip.http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85380/1/9789241505871_eng.pdf
25. Özyardımcı N. Sigara ve Sağlık, Uludag Üniversitesi (Tıp Fakültesi) Basımevi, Bursa, 2002
26. Karlıkaya C, Öztuna F, Solak ZA, Özkan M, Örsel O. Tütün Kontrolü. Toraks Dergisi. 2006; 7(1): 51-64.
27. Edwards R. The problem of tobacco smoking. BMJ. 2004; 328(7433): 217–19.
- 28.2012 Küresel Yetişkin Tütün Araştırması, www.tapdk.gov.tr Sayı: 13142
- 29.http://www.havanikoru.org.tr/dosya/Docs_Tutun_Dumaninin_Zararlari/KYTA_Kitap_Tr.pdf
- 30.http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/en/. The European Tobacco Control Report 2011.
31. T.C. Milli Eğitim Bakanlığı Sağlık İşleri Dairesi Başkanlığı Genelge. 4207 sayılı Kanunun Uygulanması 1996/76.

32. T.C. Resmi Gazete- Kanun. Tütün mamullerinin zararlarının önlenmesine dair kanunda değişiklik yapılması kanunu. Sayı: 26761. 19 Ocak 2008.
33. 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; 977-1046. 2001.
34. Giovino GA. The tobacco epidemic in the United States. Am J Prev Med. 2007; 33(6 Suppl): 318-26.
35. 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.Cilt:106-1016.
36. 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.
37. Benowitz NL. Biomarkers of environmental tobacco smoke. Environ Health Perspect. 1999 May;107 Suppl 2: 349-55.
38. 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.
39. Environmental Tobacco Smoke Air Quality Guidelines -Second Edition WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, 2000 Erişim adresi:www.euro.who.int
40. Karlıkaya C. Sigara ve meslek. Solunum 2004; 6(6): 262-75.
41. Smith CJ, Perfetti TA, Garg R and Hansch C. IARC Carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and the calculated log p values. Food Chem Toxicol. 2003; 41(6): 807-17.
42. Barcala FJG, Takkouche B, Valdes L, Temes E, Leis R, Cabanas R et al. Parenteral smoking and lung function in healthy children and adolescents. Arch. Bronconeumol. 2007; 43(2): 81-5.
43. Hawamdeh A, Kasasbeh FA, Ahmad MA. Effects of passive smoking on children's health: a review. East Mediterr Health J. 2003; (3): 441-7.
44. Fracasso ME, Doria D, Franceschetti P, Perbellini L, Romeo L. DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. Toxicol Lett. 2006;167(2): 131-41.
45. International Consultation on Environmental Tobacco Smoke (ETS) and Child Health. Geneva, World Health Organization, Division of Noncommunicable Disease, Tobacco Free Initiative, 1999.Erişim adresi:http://www.who.int/ tobacco/research/en/ets_report.

46. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Medicine*, 2006; 3(11): 2011-29
47. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Smoking-attributable mortality, years of potential life lost, and productivity losses – United States, 2000–2004. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2008, 57: 1226–8.
48. Lifting the smokescreen: 10 reasons for a smoke free Europe. Brussels, The Smoke Free Partnership, 2006
49. National Toxicology Program. 10th Report on Carcinogens. Washington DC: USA Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 2002.
50. Walsh RA. Effects of maternal smoking on adverse pregnancy outcomes: examination of the criteria of causation. *Hum Biol.* 1994; 66: 1059–92.
51. 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
52. DHHS US. Women and smoking: a report of the surgeon general. *Mayo Clin Womens Healthsource*. 2001; 5: 3.
53. Jinot J, Bayard S. Respiratory health effects of exposure to environmental tobacco smoke. *Rev Environ Health*. 1996; 11: 89–100.
54. 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.
55. Murphy TD. Passive Smoking and Lung Disease. 2009 Erişim adresi: www.emedicine.com/ped/GeneralMedicine/Pulmonology
56. Murin S, Bilello KS, Matthay R. Other smoking-affected pulmonary diseases. *Clin Chest Med* 2000; 21: 121-37.
57. Mackay J, Eriksen M. Tobacco Atlas. <http://www.who.int/tobacco/en/atlas10>.
58. Hammaren-Malmi S, Tarkkanen J, Mattila PS. Analysis of risk factors for childhood persistent middle ear effusion. *Acta Otolaryngol* 2005; 125(10): 1051-4
59. Cook DG, Strachan DP, Carey IM. Health effects of passive smoking. 9. Parental smoking and spirometric indices in children. *Thorax*. 1998; 53: 884–93.
60. www.epa.gov/smokefree/pubs/etsfs.
61. Fagerstrom K. The epidemiology of smoking: health consequences and benefits of cessation. *Drugs* 2002; 62 Suppl 2: 1-9.

62. Gray RF, Indurkha A, McCormick MC. Prevalence, stability, and predictors of clinically significant behavior problems in low birth weight children at 3, 5, and 8 years of age. *Pediatrics*. 2004; 114: 736-43.
63. Goel P, Radotra A, Singh I, Aggarwal A, Dua D. Effects of passive smoking on outcome in pregnancy. *J Postgrad Med*. 2004; 50(1): 12-6.
64. Fergusson DM, Horwood LJ, Lynskey MT. Maternal smoking before and after pregnancy: effects on behavioral outcomes in middle childhood. *Pediatrics*. 1993; 92: 815-22.
65. Fergusson DM, Woodward LJ, Horwood LJ. Maternal smoking during pregnancy and psychiatric adjustment in late adolescence. *Arch Gen Psychiatry*. 1998; 55: 721-7.
66. Jaakkola MS, Jaakkola JJ. Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. *Eur Respir J*. 1997; 10: 2384-97.
67. Woodward A, al-Delaimy W. Measures of exposure to environmental tobacco smoke. Validity, precision, and relevance. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; 895: 156-72.
68. Patrick DL, Cheadle A, Thompson DC, et al. The validity of self reported smoking: a review and meta-analysis. *Am J Public Health*. 1994; 84: 1086-93.
69. McBride CM, Curry SJ, Lando HA, et al. Prevention of relapse in women who quit smoking during pregnancy. *Am J Public Health*. 1999; 89: 706-11.
70. Chen R, Tavendale R, Tunstall-Pedoe H. Measurement of passive smoking in adults: self-reported questionnaire or serum cotinine? *J Cancer Epidemiol Prev*. 2002; 7: 85-95.
71. Britton GR, Brinthaup J, Stehle JM, et al. Comparison of self-reported smoking and urinary cotinine levels in a rural pregnant population. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs*. 2004; 33: 306-11.
72. Webb DA, Boyd NR, Messina D, et al. The discrepancy between self reported smoking status and urine cotinine levels among women enrolled in prenatal care at four publicly funded clinical sites. *J Public Health Manag Pract*. 2003; 9: 322-5.
73. Callais F, Momas I, Roche D, et al. Questionnaire or objective assessment for studying exposure to tobacco smoke among asthmatic and healthy children: The French VESTA Study. *Prev Med*. 2003; 36: 108-13.
74. Shields PG. Tobacco smoking, harm reduction, and biomarkers. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1435-44.
75. Hatsukami DK, Hecht SS, Hennrikus DJ, et al. Biomarkers of tobacco exposure or harm: application to clinical and epidemiological studies. 25-26 October 2001, Minneapolis, Minnesota. *Nicotine Tob Res*. 2003; 5: 387-96.
76. Leaderer BP, Lioy PJ, Spengler JD. Assessing exposures to inhaled complex mixtures. *Environ Health Perspect*. 1993; 101(Suppl 4): 167-77.

77. Jarvis MJ, Tunstall-Pedoe H, Feyerabend C, et al. Comparison of tests used to distinguish smokers from non smokers. *Am J Public Health*. 1987; 77: 1435–8.
78. Stevens KR, Munoz LR. Cigarette smoking: evidence to guide measurement. *Res Nurs Health*. 2004; 27: 281–92.
79. Benowitz NL. Nicotine addiction. *Prim Care*. 1999; 26: 611–31.
80. Wong G.C., Berman B.A., Hoang T., Bernaards C., et al.: Children’s exposure to environmental tobacco smoke in the home: Comparison of urine cotinine and parental reports. *Archives of Environmental Health*, 2002; 57(6): 584-90.
81. US Environmental Protection Agency. Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders. Washington, DC: EPA, 1992. (Publication EPA/600/6-90/006F.) Erişim adresi: <http://www.epa.gov/smokefree/publications>.
82. Benowitz NL. Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med*. 1988; 319: 1318–30.
83. OEHHA. Health effects of exposure to environmental tobacco smoke. California Environmental Protection Agency. *Tob Control*. 1997; 6: 346–53.
84. Kuo H.-W., Yang J.-S., Chiu –C.: Determination of urinary and salivary cotinine using gas and liquid chromatography and enzyme-linked immunoabsorbent assay. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2002; 768(2): 297-303.
85. EPA California. Proposed Identification of Environmental Tobacco Smoke as a Toxic Air Contaminant. 2005 Erişim adresi: <http://ash.org/CAEPAProposal>.
86. Bramer SL, Kallungal BA. Clinical considerations in study designs that use cotinine as a biomarker. *Biomarkers*. 2003; 8: 187–203.
87. Matt G.E., Wahlgren D.R., Hovell M.F., et al.: Measuring environmental tobacco smoke exposure in infants and young children through urine cotinine and memory-based parental reports: Empirical findings and discussion. *Tob. Control*. 1999;8: 282-9.
88. Florescu A, Ferrence R, Einarson TR, et al. Reference values for hair cotinine as a biomarker of active and passive smoking in women of reproductive age, pregnant women, children, and neonates: systematic review and meta-analysis. *Ther Drug Monit*. 2007; 29: 437–46.
89. Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2004; 35: 155–68.
90. Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In: McGee JO’D, Issacson PGR, Wright N (eds). *Oxford Textbook of Patology*, vol 1. USA: Oxford University pres; 1992, 142-7.

91. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
92. Hirose Y, Yoshimi N, Suzui M, et al. Expression of bcl-2, bax, and bcl-XL proteins in azoxymethane-induced rat colonic adenocarcinomas. *Mol Carcinog* 1997;19: 25-30.
93. Sanders EJ, Torkkeli PH, French AS. Patterns of cell death during gastrulation in chick and mouse embryos. *Anat Embryol.* 1997; 195: 147-54.
94. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. *J Urol* 2002;167:269-71.
95. Aral H. Apoptosis. *Sendrom* 1996; 33-7.
96. Afford S, Randhawa S. Apoptosis. *Mol Pathol* 2000; 53:55-63.
97. Rodenburg RJT, Raats JMH, Pruijn GJM, van Venrooij WJ. Cell death: a trigger of autoimmunity? *Bioessays* 2000; 22:627-36.35.
98. Behnia M, Robertson KA, Martin WJ. Lung infections: role of apoptosis in host defense and pathogenesis of disease. *Chest* 2000; 117: 1771-1777.
99. Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31: 11-24.
100. Quinlan RA, Schiller DL, Hatzfeld M, et al. Patterns of expression and organization of cytokeratin intermediate filaments. *Ann NY Acad Sci* 1985; 455: 282-306.
101. Starzinski-Powitz A, Gaetje R, Zeitvogel A, et al. Tracing cellular and molecular mechanisms involved in endometriosis. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 724-9.
102. Rylander L, Ziegler E, Bergman T, et al. Molecular characterization of a tissue-polypeptide-specific-antigen epitope and its relationship to human cytokeratin 18. *Eur J Biochem* 1996; 241:309-14.
103. Leers MP, Bjorklund V, Bjorklund B, Jornvall H, Nap M. An immunohistochemical study of the clearance of apoptotic cellular fragments. *Cell Mol Life Sci.* 2002; 59:1358-65.
104. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008; 2: 73-8
105. G.Kramer, H.Erdal, H.J.Mertens, M.Nap, J.Maurmann, G.Steiner. et al. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18, *Cancer Res* 2004; 64: 1751-6.
106. D.H. Phillips, Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues, *Carcinogenesis* 2002; 25: 1979–2004.

107. Debeleş-Bütüner B, Kantarcı G. Mutasyon, DNA hasarı, onarım mekanizmaları ve kanserle ilişkisi. *Ankara Ecz. Fak.Derg.* 2006; 35(2): 149-70.
108. Sardas S, Karahalil B, Akyol D, Kukner S, Karakaya AE.: The effect of smoking on sister chromatid exchange rate of newborn infants born to smoking mothers. *Mutat Res.* 1995; 341(4): 249-53.
109. Palma S, Cornetta T, Padua L, Cozzi R, Appolloni M, Ievoli E, et al. Influence of glutathione S-transferase polymorphisms on genotoxic effects induced by tobacco smoke. *Mutat Res.* 2007; 633(1): 1-12.
110. Obe G, Vogt HJ, Madle S, Fahning A, Heller WD. Double-blind study on the effect of cigarette smoking on the chromosomes of human peripheral blood lymphocytes in vivo. *Mutat Res.* 1982; 92(1-2): 309-19.
111. Rowland RE, Harding KM. Increased sister chromatid exchange in the peripheral blood lymphocytes of young women who smoke cigarettes. *Hereditas.* 1999; 131(2): 143-6.
112. Boyacı H, Büyükgöze B, Başıyigit İ, Yıldız F, Ilgazlı A, Duman C. Fetustaki sigara dumanı maruziyetinin kord kanı kotinin düzeyi ile değerlendirilmesi. *Toraks Dergisi* 2006; 7(2): 115-9.
113. Salonen K, Lahdetie J. No effect of maternal smoking in early pregnancy observed on chromosome aberrations in chorionic villus samples. *Mutat Res.* 1993; 298(4): 285-9.
114. Chica RA, Ribas I, Giraldo J, Egozcue J, Fuster C. Chromosomal instability in amniocytes from fetuses of mothers who smoke. *JAMA.* 2005; 293(10): 1212-22.
115. Sasikala K, Rosalin FR, Jude ALC, Kumar RA, Sudha S, Devi MV, Balachandar N, Beegam KAS, Meenakshi NM, Begum A. Active and passive smokers – a haematobiochemical and cytogenetic study. *Int J Hum Genet.* 2003; 3(1): 29-32.
116. Pluth JM, Ramsey MJ, Tucker JD. Role of maternal exposures and newborn genotypes on newborn chromosome aberration frequencies. *Mutat Res.* 2000; 465(1-2): 101-11.
117. Sardas S., Gok S., Karakaya A.E.: Increased frequency of sister chromatid exchanges in the peripheral lymphocytes of cigarette smokers. *Toxicol. In Vitro*, 1991; 5: 263-5.
118. Sardas S, Walker D, Akyol D, Karakaya AE.: Assessment of smoking-induced DNA damage in lymphocytes of smoking mothers of newborn infants using the alkaline single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res.* 1995; 335(3): 213-7.
119. Dabson R. Passive smoking increases children's risk of nasal cancer. *BMJ* 2005; 331: 534-535.
120. 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.

121. 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, 12-21.2000.
122. Rossner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(5): 517-20.
123. 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.
124. 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.
125. 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.
126. Cobanoglu N, Kiper N, Dilber E, et al. Environmental tobacco smoke exposure and respiratory morbidity in children. *Inhal Toxicol*. 2007; 19: 779-85
127. Irvine L, Crombie IK, Clark RA, Slane PW, Goodman KE, Feyerabend C, et al. What determines levels of passive smoking in children with asthma? *Thorax* 1997; 52: 766-9.
128. S. Willers, R. Attewell, I. Bensryd, A. Schütz, G. Skarping, M. Vahter, Exposure to environmental tobacco smoke in the household and urinary cotinine excretion, heavy metals retention, and lung function, *Arch. Environ. Health* 1992; 47: 357-63.
129. 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.
130. 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.
131. 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.
132. Vogt Isaksen C. Maternal smoking, intrauterine growth restriction, and placental apoptosis. *Pediatr Dev Pathol* 2004; 7: 433-42.
133. Wickenden JA, Clarke MC, Rossi AG, Rahman I, Faux SP, Donaldson K, MacNee W. Cigarette smoke prevents apoptosis through inhibition of caspase activation and induces necrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003 Nov;29(5):562-70.