



**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli 3. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVARI**

**ERİTROSİT İÇİ OKSİDE, REDÜKTE VE TOPLAM GLUTATYON
MİKTARINI ÖLÇEN YENİ KOLORİMETRİK BİR YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Murat ALIŞIK

Ankara, 2017

**T.C.SAĞLIK BAKANLIğI
ATATÜRK EğİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVARI**

**ERİTROSİT İÇİ OKSİDE, REDÜKTE VE TOPLAM GLUTATYON
MİKTARINI ÖLÇEN YENİ KOLORİMETRİK BİR YÖNTEM
GELİŞTİRİLMESİ**

Uzmanlık Tezi
Dr. Murat ALIŞIK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özcan EREL

Ankara, 2017

ÖNSÖZ

Asistan olarak eğitime başladığım ilk günden itibaren hem bilimsel ve inovatif kişiliğini hem de insani ve ahlaki değerlerini örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve bu tezin hazırlanması sürecinde olduğu gibi tüm uzmanlık eğitimim süresi boyunca da sürekli yol gösteren, cesaretlendiren, maddi veya manevi bütün sıkıntılarımı içtenlikle ilgilenen değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Özcan EREL'e; bilgi ve deneyimlerinden faydalanırken göstermiş olduğu emek, sabır ve anlayıştan dolayı teşekkürü borç bilirim.

Birlikte olduğumuz süreç boyunca bilgilerini ve desteklerini hiç esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI, Prof. Dr. Gülsen YILMAZ, Doç. Dr. Cemile BİÇER, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN ve Yrd. Doç. Dr. Ceylan BAL'a teşekkür ederim.

Asistanlığımın ilk gününden itibaren arkadaş, kardeş, abi ve abla olarak iyi ve kötü zamanlarımda sürekli yanımda olan, bir aile sıcaklığı ile yakın ilgilerini gördüğüm, yardımlarını ve bildiklerini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan her zaman mutluluk duyduğum Yrd. Doç. Dr. Salim NEŞELİOĞLU, Uzm. Dr. Orhan ŞEN, Uzm. Dr. Pervin BARAN, Uzm. Dr. Funda EREN ve Uzm. Dr. Merve ERGİN'e teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, beni içtenlikle destekleyen, yardım ve ilgilerini samimiyetle paylaşan sevgili asistan arkadaşlarıma, tüm laboratuvar çalışanlarına ve dualarını esirgemeyen değerli büyüklerim Gülüzar EREL, Kadime GÜRSOY, halam Nevin KUŞÇU'ya teşekkür ederim.

Beni bugünlere getiren, evlatları olduğum için şükrettiğim canım annem Gülgüle ALIŞIK'a, babam Celal ALIŞIK'a; babaanneme, dedeme ve kardeşlerime; her zaman ve her koşulda yanımda olan başta Mehmed Uğur IŞIK olmak üzere tüm dostlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezi en büyük hayalimin onunla yaşlanmak olduğu, hayatımı paylaşmaktan mutluluk duyduğum, geç saatlere kadar çalışmalarım da sabır ve anlayış gösteren, biricik eşim Tuğba ALIŞIK'a ithaf ediyorum.

Murat ALIŞIK

Ankara, 2017

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Serbest radikaller.....	1
1.1.1. Reaktif oksijen türleri.....	2
1.1.1.1. Süperoksit radikali	3
1.1.1.2. Hidrojen perosit.....	4
1.1.1.3. Hidroksil radikali	4
1.2. Serbest radikallerin etkileri	5
1.2.1. Serbest radikallerin lipitlere etkisi	5
1.2.2. Serbest radikallerin proteinlere etkisi.....	5
1.2.3. Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri	6
1.2.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi	6
1.3. Antioksidan sistem.....	7
1.3.1. Antioksidanlar	7
1.3.2. Antioksidanların sınıflandırılması.....	7
1.3.2.1. Enzimatik antioksidanlar.....	9
1.3.2.1.1. Süperoksit dismutaz	9
1.3.2.1.2. Katalaz.....	9

1.3.2.1.3. Glutasyon peroksidaz	10
1.3.2.1.4. Glutasyon redüktaz	10
1.3.2.1.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)	10
1.3.2.2. Glutasyon haricindeki bazı enzimatik olmayan antioksidanlar	11
1.3.2.2.1. E vitamini (α - tokoferol)	11
1.3.2.2.2. C vitamini	11
1.3.2.2.3. Peroksiredoksin	11
1.3.2.2.4. Karotenoidler (β -Karoten)	12
1.3.2.2.5. Lipoik asit	12
1.3.2.2.6. Ürik asit	12
1.3.2.2.7. Melatonin	12
1.4. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP)	12
1.5. Glutasyon	13
1.5.1. Glutasyon ölçüm yöntemleri	17
1.5.1.1. Spektrofotometrik yöntemler	18
1.5.1.2. Fluorometrik yöntemler	21
1.5.1.3. Biyoluminesans analizi	21
1.5.1.3. Kapiller elektroforez yöntemleri	21
1.5.1.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri	22
1.5.1.4.1. HPLC ultraviyole ölçümü	22
1.5.1.4.2. HPLC elektrokimyasal ölçümü	23
1.5.1.4.3. HPLC fluorometrik ölçümü	23
1.5.1.5. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi	23
1.5.1.6. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi	24
1.5.1.7. Nükleer manyetik rezonans spektroskopi yöntemleri	24
1.6. Oksidatif stres	25

1.7. Eritrosit içi oksidan durumlar ve antioksidan savunma	25
1.7.1. Eritrositlerdeki antioksidan sistemler.....	25
1.7.2. Eritrosit içi oksidatif stres mekanizması	27
1.8. Diyabetes Mellitus ve eritrosit oksidasyonu	28
1.9. Amaç ve kapsam	29
2. MATERYAL VE METOD	30
2.1. Materyaller	30
2.1.1. Kullanılan ekipmanlar	30
2.1.2. Kullanılan kimyasallar	30
2.1.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler.....	31
2.1.3. Numuneler.....	32
2.1.4. Etik kurul onayı.....	33
2.2. Metodlar	34
2.2.1. Eritrosit lisat (hemolizat) süpernatantı eldesi.....	34
2.2.2. Nativ tiyol ve glutatyon (GSH) tayini	34
2.2.3. Toplam glutatyon tayini	35
2.2.4. GSSG miktarının hesaplanması:	35
2.2.5. Hemoglobin ölçümü.....	35
2.2.6. HbA1c ölçümü	36
2.2.7. Ticari kitle toplam GSH, nativ GSH ve GSSG ölçümü	36
2.2.8. Optimizasyon Çalışmaları	38
2.2.8.1. Tiyol ölçümünde kullanılan reaktif 1'in içerisindeki Tris tamponunu optimize etme çalışmaları	38
2.2.8.2. Sodyum borohidrat (NaBH ₄) miktarının optimizasyonu	38
2.2.8.3. Sodyum hidroksit (NaOH) miktarının optimizasyonu	38
2.2.8.4. Reaksiyon ortamında kalan fazla sodyum borohidratın (NaBH ₄) süpürülmesi için gerekli HCl miktarının optimizasyonu.....	39

2.2.8.5. Sodyum borohidratın (NaBH_4)'ün süpürülmesi için eklenen HCl'in eklenme zamanının optimizasyonu.....	39
2.2.9. Asidifikasyonun oksidasyonu önlediğinin gösterilmesi	39
2.2.10. Oksidasyon ile GSH ve GSSG değişiminin izlenmesi çalışmaları	39
2.2.11. Geliştirilen yöntemlerin performans değerlendirmeleri.....	40
2.2.11.1. Doğrusallık (linearite) çalışması	40
2.2.11.2. Analitik sensitivite çalışması.....	40
2.2.11.3. Geri kazanım (recovery) çalışması.....	40
2.2.11.4. Gözlenebilirlik sınırı çalışması (limit of detection, LoD).....	41
2.2.11.5. Tekrarlanabilirlik çalışması.....	41
2.2.12. Ticari yöntemle yeni yöntemin karşılaştırma çalışmaları	41
2.2.15. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi	42
3. BULGULAR.....	43
3.1. DTNB molekülünün spektral absorbanası	43
3.2. Çeşitli örneklerinin ve reaktif körünün reaksiyon kinetikleri	43
3.3. Optimizasyon Çalışmaları	45
3.3.1. Tiyol ölçümünde kullanılan reaktif 1'in içerisindeki Tris tamponunu optimize etme çalışmaları	45
3.3.2. Sodyum borohidrat (NaBH_4) konsantrasyonunun optimizasyonu	46
3.3.3. Sodyum hidroksit (NaOH) konsantrasyonunun optimizasyonu	49
3.3.4. Reaksiyon ortamında kalan fazla sodyum borohidratın (NaBH_4) süpürülmesi için gerekli HCl miktarının optimizasyonu.....	51
3.3.5. Sodyum borohidratın (NaBH_4) süpürülmesi için eklenen HCl'nin eklenme zamanının optimizasyonu.....	52
3.4. Asidifikasyonun oksidasyonu önlediğinin gösterilmesi	53
3.5. Oksidasyon ile GSH GSSG değişiminin izlenmesi çalışmaları.....	54
3.5.1. Tam kan üzerine H_2O_2 eklenmesi ile toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişimin takibi.....	54

3.5.2. Hemolizat süpernatant havuzuna H ₂ O ₂ eklenmesi ile toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişimin takibi	55
3.5.3. Tam kan örneklerinden yapılan numune havuzunun 38 °C’de oto-oksidasyona bırakılması sonucu toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişimin takibi.....	58
3.6. Geliştirilen yöntemlerin performans değerlendirmeleri.....	59
3.6.1. Doğrusallığın (linearite) gösterilmesi	59
3.6.1.1. Artan GSSG çözeltisi ile doğrusallığın (linearite) belirlenmesi	59
3.6.1.2. Hemolizatın süpernatant havuzu ile doğrusallığın (linearite) belirlenmesi	61
3.6.2. Yöntemlerin gözlenebilirlik sınırları (limit of detection).....	62
3.6.3. Analitik sensitivite çalışması.....	63
3.6.4. Yöntemlerin analitik geri kazanımları	63
3.6.4.1. Toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları.....	63
3.6.4.2. Nativ ve toplam GSH yöntemlerinin GSH geri kazanımları	67
3.6.5. Yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri	69
3.6.5.1. GSSG çözeltisinin kullanıldığı tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçları.....	69
3.6.5.2. Hemolizat süpernatant havuzunun kullanıldığı tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçları	76
3.6.6. Ticari (enzimatik geri dönüştürme yöntemli) ürün ile yeni geliştirilen yöntemin karşılaştırması	85
3.6.6.1. Çeşitli okside glutatyon (GSSG) çözeltileri kullanılarak ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemin doğrusallıklarının karşılaştırılması.....	85
3.6.6.2. Oto-oksidasyona bırakılan örnekler ile ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemin karşılaştırılması	85
3.6.6.3. Ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemin korelasyonu.....	88
3.6.6.4. İki yöntem ile diyabet ve sağlıklı bireylerin sonuçlarının karşılaştırması	89
4. TARTIŞMA	92
5. SONUÇ	99
6. KAYNAKLAR	100
ÖZGEÇMİŞ	116

ÖZET

Oksijen taşıyan hücreler olması ve hemoglobin içermeleri nedeniyle eritrositler diğer somatik hücrelere kıyasla daha fazla oksidatif strese maruz kalırlar. Bunun yanında eritrositler güçlü antioksidan sistemle donatılmıştır. Eritrosit için en önemli antioksidanı bir tripeptit olan glutatyondur ve yapısında bulunan sistein aminoasidi sayesinde tiyol grubu içerir. Okside glutasyon seviyesi oksidatif durumu gösterirken, redükte glutasyon seviyesi antioksidan kapasiteyi göstermektedir. Okside ve redükte glutasyon düzeylerini belirlemek için günümüze kadar birçok yöntem tariflenmiştir. Tariflenmiş spektrofotometrik yöntemler reaktiflerinde enzim ve koenzim kullanan pahalı yöntemlerdir. Bu tez çalışmasında eritrosit içi okside ve redükte glutasyon düzeylerini ölçen, yeni, ucuz, kolay uygulanabilir, yüksek doğruluğu, tekrarlanabilirliği ve kesinliği olan bir spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir.

Yeni geliştirilen yöntem iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada ortamdaki redükte glutasyon düzeyleri belirlenmiş ve nativ glutasyon olarak ifade edilmiştir. Sonrasında ise okside glutasyonlar sodyum borohidrat ile GSH'a indirgenerek toplam glutasyon düzeyi belirlenmiştir. Toplam glutasyon ile nativ glutasyonun farkının yarısı okside glutasyon olarak verilmiştir.

Yeni geliştirilen yöntemin 0 ile 3000 $\mu\text{mol/L}$ arasında doğrusal olduğu görüldü ($r^2=0,999$). Geliştirilen yöntemde bulunan parametrelerin geri kazanım yüzdeleri %93,1 ile 105,9 arasındaydı. Toplam presizyonlar toplam glutasyon, nativ glutasyon ve okside glutasyon için sırasıyla %2,70, %1,02 ve %6,65'ti. Ticari spektrofotometrik yöntem ile yeni geliştirilen yöntemdeki toplam glutasyon, nativ glutasyon ve okside glutasyon parametreleri için korelasyonlar sırası ile 0,901 ($p<0,001$), 0,913 ($p<0,001$) ve 0,603 ($p<0,001$) idi. Diyabetik hasta grubunda ölçülen nativ glutasyon düzeyleri anlamlı olarak düşük iken, okside glutasyon düzeyleri anlamlı olarak yüksekti ($p<0,05$). HbA1c düzeyleri ile nativ glutasyon düzeyleri arasında negatif korelasyon var iken okside glutasyon ile pozitif korelasyon vardı ($p<0,05$).

Sonuç olarak, yüksek doğruluk, kesinlik ve tekrarlanabilirlik niteliklerine sahip olan bu yöntemin daha kolay uygulanabilir olması nedeniyle, eritrosit için oksidan ve antioksidan düzeylerindeki değişimler kolaylıkla belirlenebilir.

Anahtar kelimeler: antioksidan, eritrosit, oksidasyon, GSH, GSSG

SUMMARY

Due to its oxygen carrying function and hemoglobin ingredient, erythrocytes are exposed to oxidative stress more than other somatic cells. However, erythrocytes are covered with a powerful antioxidant system. The most important antioxidant for erythrocytes is glutathione, which is a tripeptide containing thiol group comes from its cysteine moiety. While oxidized glutathione levels show oxidative state, reduced glutathione levels present antioxidant capacity. So far, various methods have been described to determine the levels of oxidized and reduced glutathione. All of the described spectrophotometric methods are using enzymes and coenzymes, and they are expensive methods. In this thesis; a new, inexpensive, easily applicable, spectrophotometric method with high accuracy, reproducibility and precision was developed to measure intra-erythrocyte oxidized and reduced glutathione levels.

The newly developed method consists of two steps. In the first step, the levels of reduced glutathione in the sample were determined and expressed as native glutathione. Subsequently, the total glutathione levels were determined by reducing the oxidized glutathione with sodium borohydride. Half of the difference between total glutathione and native glutathione is given as an oxidized glutathione.

New method was linear between 0 and 3000 $\mu\text{mol/L}$ ($r^2 = 0.999$). The percentages of recovery of the parameters of developed method were between 93.1% and 105.9%. The total precisions of the total glutathione, native glutathione and oxidized glutathione were 2.70%, 1.02%, and 6.65%; respectively. The correlations of total glutathione, native glutathione and oxidized glutathione between commercial spectrophotometric method and the newly developed method were 0.901 ($p < 0.001$), 0.913 ($p < 0.001$) and 0.603 ($p < 0.001$); respectively. Native glutathione levels were significantly lower in the diabetic patients, while oxidized glutathione levels were significantly higher ($p < 0.05$). There was a negative correlation between HbA1c levels and native glutathione levels, while there was a positive correlation with oxidative glutathione ($p < 0.05$).

In conclusion, because of easy to apply of this method with high accuracy, precision and reproducibility, it is expected that changes in oxidant antioxidant levels of intra-erythrocytes will be readily detectable.

Key words: antioxidant, erythrocyte, oxidation, GSH, GSSG

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
Şekil 1.1. Oksijen molekülünün diradikal doğal yapısı	2
Şekil 1.2. Moleküler oksijenin 4 elektron ile indirgenme şeması	2
Şekil 1.3. Enzimatik antioksidanların reaksiyonları	9
Şekil 1.4. Glutatyonun kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.5. Reaktif oksijen türleri oluşumu ve glutatyonun antioksidasyon indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları.....	15
Şekil 1.6. Eritrositlerde glutatyon sentezi ve döngüsü.....	17
Şekil 1.7. DTNB bileşiğinin kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.8. TNB, 4-TP ve 4-DPS'nin pH'a karşı molar ekstinksiyon katsayıları.....	19
Şekil 1.9. DTNB ve TNB moleküllerinin absorbands spektrumları	20
Şekil 3.1. DTNB molekülünün absorbands spektrumu.....	43
Şekil 3.2. Çeşitli numunelerin native GSH reaksiyon kinetikleri. A: 500 mM tampon kullanılan yöntem B: 1000 mM tampon kullanılan yöntem	44
Şekil 3.3. Çeşitli numunelerin Toplam GSH reaksiyon kinetikleri	44
Şekil 3.4. Orijinal yöntem ile modifiye edilmiş yöntemlerin korelasyonlarının ve doğrusallıklarının gösterilmesi.....	46
Şekil 3.5. Orijinal yöntem ile modifiye edilmiş yöntemlerinin Blant-Altman fark grafikleri ile karşılaştırılması	46
Şekil 3.6. 500 µM GSSG ve suyun artan konsantrasyonlarda NaBH ₄ içeren A reaktifi ile indirgenmesi sonrası ölçülen Toplam GSH düzeyleri	47
Şekil 3.7. Hemolizat süpernatant havuzu ve suyun Nativ GSH ve artan konsantrasyonlarda NaBH ₄ içeren A reaktifi ile indirgenmesi sonrası ölçülen Toplam GSH ve GSSG düzeyleri	48
Şekil 3.8. Hemolizat süpernatant havuzunun nativ GSH düzeyinin ve hemolizat süpernatant havuzu, 500 µM GSSG ve suyun artan konsantrasyonlarda NaBH ₄ içeren A reaktifi ile indirgenmesi sonrası ölçülen toplam GSH düzeyleri	48
Şekil 3.9. Reaksiyon ortamının A reaktifi eklenmeden tampon ile pH'sının artırılması	49

Şekil 3.10. Reaktif A içerisindeki NaOH konsantrasyonunun artırılması ile farklı örneklerdeki toplam GSH düzeyleri.....	50
Şekil 3.11. Fazla NaBH ₄ 'ü süpürmek için kullanılacak HCl miktarının belirlenmesi...	52
Şekil 3.12. NaBH ₄ 'ü süpürmek için HCl eklenme zamanının belirlenmesi.....	53
Şekil 3.14. Hemolizat süpernatant havuzu üzerine artan konsantrasyonlarda H ₂ O ₂ eklenmesi sonucu toplam GSH, nativ GSH ve GSSG düzeylerindeki değişim.....	57
Şekil 3.15. Tam kan örneklerinden yapılan havuzun 38 °C'de oto-oksidasyona bırakılması sonucu zamana karşı toplam GSH, Nativ GSH ve GSSG düzeylerindeki değişimin takibi.....	59
Şekil 3.16. GSSG solüsyonunu seri dilüsyonu ile yeni yöntemin doğrusallığının gösterilmesi	61
Şekil 3.17-A. Hemolizat süpernatant havuzunun seri dilüsyonu ile Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemin doğrusallığının gösterilmesi.....	62
Şekil 3.17-B. Hemolizat süpernatant havuzunun seri dilüsyonu ile Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemin doğrusallığının gösterilmesi.....	62
Şekil 3.18-A. 500 µM GSSG'nin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	71
Şekil 3.18-B. 500 µM GSSG'nin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	72
Şekil 3.19-A. 100 µM GSSG'nin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	74
Şekil 3.19-B. 100 µM GSSG'nin Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	75
Şekil 3.20-A. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	77
Şekil 3.20-B. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi	78
Şekil 3.21-A. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	80
Şekil 3.21-B. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	81

Şekil 3.22-A. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	83
Şekil 3.22-B. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	84
Şekil 3.23. Ticari yöntem ve yeni geliştirilen yöntemin doğrusallıkları.....	85
Şekil 3.24. Oto-oksidasyona bırakılan numunelerde zamana karşı ticari ve yeni geliştirilen yöntem ile ölçülen nativ GSH, toplam GSH ve GSSG düzeylerindeki değişimleri.....	87
Şekil 3.25. Yeni geliştirilen yöntem ile ticari yöntemin korelasyonu.....	88
Şekil 3.26. Yeni geliştirilen yöntem ile ticari yöntemin Blant-Altman fark grafiği ile karşılaştırması	88
Şekil 3.27. Hasta ile kontrollerin toplam GSH, nativ GSH ve GSSG düzeylerinin karşılaştırması	91

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa No
Tablo 1.1. Serbest oksijen radikallerinin sınıflandırılması ve bazı karakteristik özellikleri.....	3
Tablo 1.2. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırması	8
Tablo 1.3. Glutasyonun fonksiyonları	14
Tablo 1.4. Diyabetes mellitus tanı kriterleri	28
Tablo 3.1. Yeni geliştirilen yöntemin GSSG solüsyonunun seri dilüsyonu ile yapılan doğrusallık performansı verileri	60
Tablo 3.2-A. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG ortalama geri kazanımları	64
Tablo 3.2-B. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG ortalama geri kazanımları	64
Tablo 3.2-C. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları	65
Tablo 3.2-D. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları	66
Tablo 3.3-A. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları	67
Tablo 3.3-B. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları	68
Tablo 3.3-C. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları	68
Tablo 3.3-D. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları	69
Tablo 3.4-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 500 µM GSSG ile CV sonuçları	70
Tablo 3.4-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 500 µM GSSG ile CV sonuçları	70
Tablo 3.4-A2. 500 µM GSSG'nin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	71

Tablo 3.4-B2. 500 μ M GSSG'nin Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	72
Tablo 3.5.A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 100 μ M GSSG ile CV sonuçları	73
Tablo 3.5.B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 100 μ M GSSG ile CV sonuçları	73
Tablo 3.5-A2. 100 μ M GSSG'nin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	74
Tablo 3.5-B2. 100 μ M GSSG'nin Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	75
Tablo 3.6-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yönteminin hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları	76
Tablo 3.6-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yönteminin Hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları	76
Tablo 3.6-A2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	77
Tablo 3.6-B2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	78
Tablo 3.7-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin Hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları	79
Tablo 3.7-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin Hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları	79
Tablo 3.7-A2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	80
Tablo 3.7-B2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları	81
Tablo 3.8-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan hemolizat süpernatant havuzu GSSG düzeylerinin CV sonuçları	82
Tablo 3.8-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan hemolizat süpernatant havuzu GSSG düzeylerinin CV sonuçları	82
Tablo 3.8-A2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçları	83
Tablo 3.8-B2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçları	84

Tablo 3.9. Hasta ve kontrol gruplarının demografik bilgileri ve tam kan örneklerinden ölçülen parametrelerin sonuçları90

Tablo 3.10. HbA1c ile ölçülen parametreler arasındaki korelasyon90



SİMGELER VE KISALTMALAR

2-VP	2-vinilpiridin
4-DPS	4,4'-Dithiodipiridine
4-TP	4-tiyopirodin
ATP	Adenozin trifosfat
CAT	Katalaz
CV	Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)
DM	Diyabetes mellitus
DNA	Deoksi ibonükleik asit
DTNB	5,5'-ditiyobis- (2-nitrobenzoik) –asit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
G6PDH	Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GCS	γ -glutamil sistein sentetaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Glutasyon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
GST	Glutasyon-S-transferaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HbA1c	Hemoglobin A1c
HCl	Hidroklorik asit
HO•	Hidroksil radikali
HPLC	Yüksek perfofmans sıvı kromatografisi
KMnO ₄	Potasyum permanganat
LC-MS	Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi
MS	Kütle spektrometresi
NaBH ₄	Sodyum borohidrat
NaCL	Sodyum klorür
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
NEM	N-etilmaleimid
NO	Nitrik oksit
O ₂ • ⁻	Süperoksit radikaline
OH ⁻	Hidroksil anyonu
OPA	<i>o</i> -fitalaldehit

pH	Hidrojen potansiyeli
Prx	Peroksiredoksin
RNA	Ribonükleik asit
ROO•	Peroksil radikali
ROS	Reaktif oksijen türleri
SBD-F	Amonyum-7-floro-2,1,3-benzoksadiazol-4-sülfonatın
SOD	Superoksit Dismutaz
TBP	Tributilfosfin
TCA	Trichloroacetic acid
TCEP	Tris-(2-karboksietil)fosfin
TINIA	Türbidimetrik inhibisyon immünassay
TNB	5-tiyo-2-nitrobenzoik acit
TPP	Trifenilfosfin
Trx	Tiyoredoksin
UPLC	Ultra performans sıvı kromatografisi
UV	Ultraviyole

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Serbest radikaller

Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kararsız, kısa ömürlü atom ya da moleküllerdir [1]. İlk defa Moses Gomberg tarafından tanımlanmıştır [2]. Kararsız yapılarından dolayı etrafındaki moleküllerle reaksiyona girme ve elektron alarak kararlı hale ulaşma eğilimindedirler [1]. Kimyasal ve biyokimyasal tepkimeler her zaman atomların dış orbitallerindeki elektronlar ile gerçekleşir. Dış orbitalde bulunan bu çiftlenmemiş elektronlar serbest radikallere yüksek kimyasal aktiflik kazandırarak protein, lipid, DNA ve nükleotidler gibi birçok biyolojik yapıda hasara yol açarlar [3, 4]. Bu hasarlar sonucu diyabetik nefropati [5], Parkinson hastalığı [6], Alzheimer hastalığı [4], kalp-damar hastalıkları [7], yaşlanma [3, 8, 9], kanser [10, 11], eriptoz [12, 13] gibi birçok hastalığın patofizyolojisinde rol oynadığına dair bilgiler bulunmaktadır.

Serbest radikallerin başlıca 3 yolla meydana geldiği kabul edilmektedir[14].

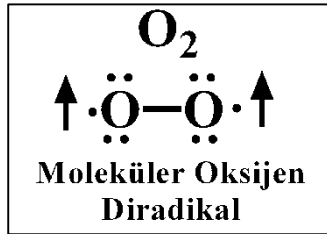
1. Kovalent bağlı normal bir molekülün homolitik bölünmesi= $X : Y \rightarrow X^{\bullet} + Y^{\bullet}$
2. Normal bir molekülün bir elektronun kaybetmesi= $A - e^{-} \rightarrow A^{\bullet} + e^{-}$
3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi= $A + e^{-} \rightarrow A^{\bullet-}$

Serbest radikal denildiğinde, yapısı gereği radikal olma eğilimi yüksek olan oksijenden türeyen reaktif oksijen türleri (süperoksit, hidroksiperoksit, hidroksil radikali, alkoksil, peroksil radikali vb.) [1] akla gelmekle birlikte; reaktif karbonil türleri (metil glioksal, glioksal vb.) [15], reaktif nitrogen türleri (nitröz oksit, nitrojen dioksit, nitril klorid, peroxynitrite vb.) [16-18], reaktif karbon türleri (triklorometil vb.) [17, 19] ve reaktif sülfür türleri de (tiyil, vb.) mevcuttur [20]. Organizmada sürekli olarak serbest radikaller ve serbest oksijen reaktifleri oluşmaktadır ve en sık elektron transferi sonucu oluşurlar [1]. Serbest radikaller endojen kaynaklı indirgenme yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondrilerde solunum zincirinde, hücre membranında prostaglandin sentezinde, sitokrom P450 sistemi ile detoksifikasyon sırasında, aktif lökositlerde, normal metabolizma sırasında üretilirler [1]. Ayrıca bu moleküller ultraviyole ışınları, hava kirliliği, sigara dumanı, parasetamol, nitrofurantoin gibi ilaç kullanımı gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler

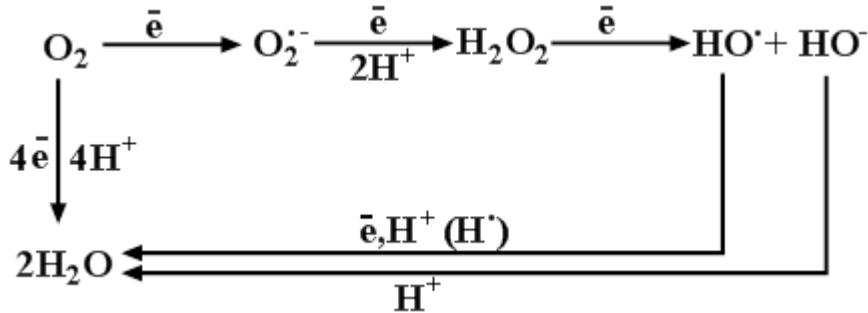
[21]. Radikaller radikal olmayan moleküller ile reaksiyona girdiğinde yeni radikaller oluşur [22]. Bundan dolayı reaktif türlerinin oluşumu serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlatılması gibidir.

1.1.1. Reaktif oksijen türleri

Aerobik canlılarda hayati öneme sahip olan O_2 iki eşleşmemiş elektrona sahip olduğu için diradikaldir (Şekil 1.1). Alınan oksijenin büyük çoğunluğu elektron transport zincirinde 4 elektron mekanizması ile reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmadan suya dönüşmektedir [23, 24]. Bununla birlikte vücuda alınan oksijenin bir kısmı tek elektron alarak süperoksit anyon radikaline ($O_2^{\bullet-}$) indirgenir, bunu bir elektron indirgenmesi ve iki proton kabulü ile hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. Sonrasında H_2O_2 bir elektron daha alarak hidroksil radikaline (HO^{\bullet}) ve hidroksil anyonuna (OH^-) dönüşür. Son olarak HO^{\bullet} 'i bir elektron ve proton alarak suya dönüşür (Şekil 1.2) [25, 26]. Sonuçta oksijenin suya dönüşümünde tek elektron transfer adımlarında ROS oluşmaktadır ve vücuda alınan toplam oksijenin %1-3'ü ROS'a dönüşmektedir [27].



Şekil 1.1. Oksijen molekülünün diradikal doğal yapısı



Şekil 1.2. Moleküler oksijenin 4 elektron ile indirgenme şeması

ROS, serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır (Tablo 1.1).

Tablo 1.1. Serbest oksijen radikallerinin sınıflandırılması ve bazı karakteristik özellikleri [28, 29]

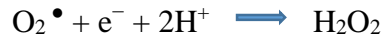
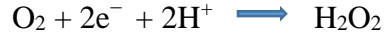
Grup	İsim	Sembol	Yarı ömür, sn	Özellik
Serbest Radikaller	Süperoksit anyon radikali	$O_2^{\bullet-}$	1×10^{-6}	Zayıf oksidan, güçlü redüktan
	Hidroksil radikali	OH^{\bullet}	1×10^{-9}	Aşırı reaktif
	Perhidroksil	HO_2^{\bullet}		Süperoksitten güçlü oksidandır, lipid peroksidasyonunu başlatabilir
	Alkoksil radikali	RO^{\bullet}	1×10^{-6}	Reaktivitesi peroksil ve hidroksil radikali arasındadır.
	Peroksil radikali	ROO^{\bullet}	1×10^{-2}	Hidroksile göre düşük oksitleyicidir
Radikal Olmayan Bileşikler	Hidrojen peroksit	H_2O_2	1×10^{-5}	Oksidandır fakat organik substratlarla reaksiyonu yavaştır. Yüksek difüzyon yeteneği vardır.
	Singlet oksijen	1O_2	1×10^{-6}	Güçlü oksitleyici ajan

1.1.1.1. Süperoksit radikali

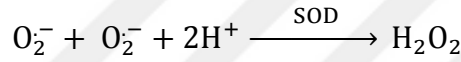
Oksijenin bir elektron ile redüklenmesi sonucu oluşan $O_2^{\bullet-}$ ilk kez 1969 yılında McCord ve Fridovich tarafından keşfedilmiştir [30]. Diğer ROS'ların oluşum kaskadının başlangıcı olması nedeniyle oksijen toksisitesinin ana nedenidir [31, 32]. Tiyoller [33], hemoglobin [34], tetrahidropterinler [35], katekolaminler [36] gibi moleküllerin ve redüklenmiş geçiş metallerinin [37] oto-oksidasyonu sırasında $O_2^{\bullet-}$ oluşmaktadır.

1.1.1.2. Hidrojen perosit

H₂O₂ yapısında eşleşmemiş elektron içermediği için radikal değildir [38]. Oksijenin iki elektron ile enzimatik olarak redüksiyonu ya da süperoksitlerin enzimatik veya enzimatik olmayan tepkimeler ile bir elektron eklenmesi sonucunda üretilir [39, 40].



Süperoksit radikalinden H₂O₂'ye dönüşümü dismutasyon olarak isimlendirilir. Bu reaksiyon ya spontan olarak ya da katalitik aktivitesi çok yüksek ($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) [41] olan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile gerçekleşir [42].



H₂O₂'nin radikal olmadığı halde yükseltgen olarak kabul edilmesinin nedeni, demir gibi metal iyonlarının varlığında Fenton reaksiyonu ile HO[•]'ine ve yüksek oksidan özellikli demir radikallerine dönüşür [43-45].



H₂O₂, Haber Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan tepkime ile direkt O₂^{•-} ile reaksiyona girerek de HO[•] oluşturur [46, 47].



1.1.1.3. Hidroksil radikali

Hidroksil radikali en aktif ve toksik reaktif oksijen türüdür [48]. Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları sonucunda oluşur [44, 47]. Çok kısa yarılanma ömrüne sahip

olmasına [49] rağmen proteinlerle, lipitlerle, karbonhidratlarla ve DNA'yla ciddi reaksiyona girerek ciddi hasarlar oluşturur [48]. Aynı zamanda poliansatüre yağ asitlerinden bir proton alarak lipit peroksidasyonunu da başlatır [48].

1.2. Serbest radikallerin etkileri

1.2.1. Serbest radikallerin lipidlere etkisi

Serbest radikallerin etkisine en duyarlı biyomolekül lipitlerdir. Lipit peroksidasyonu hücre membranında bulunan ya da serbest poliansatüre yağ asitlerinin serbest radikaller ile reaksiyona girmesi sonucu peroksil, aldehid, hidroksil yağ asitleri gibi ürünlerin oluşması olarak bilinir ve bu peroksidasyon ile meydana gelen membran hasarı geri dönüşümsüzdür [48, 50]. Serbest radikallerin yağ asitlerinden bir hidrojen atomunu uzaklaştırması ile karbon atomunda eşleşmemiş bir elektron bırakır. Bu oluşan karbon radikali molekül içi bağların pozisyonların değişmesiyle daha kararlı olan dien konjugatlarına dönüşür. Konjuge dienler moleküler oksijenle reaksiyona girerek lipit peroksil radikali oluşturur. Lipit peroksil radikalleri diğer lipitlerdeki doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni radikallerin oluşumuna sebep olurken, kendileri de ortaya çıkan H atomunu alarak lipit hidroperoksitlerine dönüşürler. Böylece kendi kendine katalizleyen bir reaksiyon olarak devam eder [51]. Vitamin E gibi zincir kırıcı antioksidanlar peroksil radikalının bu zincirleme reaksiyonunu ve fosfolipithidroperoksitleri yok ederken, glutasyon peroksidaz ise membrandaki peroksitleri ortadan kaldırır. Normal membran döngüsü de hasar görmüş lipitleri temizler [47].

1.2.2. Serbest radikallerin proteinlere etkisi

Proteinler oksidatif olarak üç şekilde etkilenirler:

- Spesifik amino asitlerin oksidatif modifikasyonu
- Serbest radikal aracılı peptit bölünmesi
- Lipid peroksidasyon ürünleri ile reaksiyona girerek protein çapraz bağ oluşumu.

Methionin, sistein, arginin ve histidin gibi amino asitleri içeren proteinler serbest radikallerden daha kolay etkilenirler [52]. Genellikle peroksil radikali proteinlerin oksidasyonu için serbest radikali türü olarak düşünülür. ROS, proteinlerle reaksiyona girerek metiyonin sülfoksit ve protein karbonillerin oluşumuna sebep olur. Oluşan metiyonin sülfoksit ve protein peroksitler diğer amino asitlerin modifikasyonu, daha fazla disülfid bağı oluşumu gibi etkilerle proteinlerin yapısının bozulmasına neden olurlar. Proteinlerin oksidasyonu sonucu ya aşırı reaktif gruplar içeren proteinler membrana ve hücrel fonksiyonlara ciddi zararlar verir ya da yapıları bozulmuş proteinlerden dolayı enzimlerin, reseptörlerin aktiviteleri ve membran protein aracılı taşıma etkilenir. Oksidasyon sonrası proteinlerde oluşan metiyonin sülfoksit grupları, metiyonin sülfoksit redüktaz enzimi ile onarılabılırken, diğer hasar görmüş proteinler ya onarılır ya da proteolize uğrar [53].

1.2.3. Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri

Serbest radikaller farklı mekanizmalar ile DNA içeriğinde bulunan baz ve şekerlerde modifikasyonlara, tek ve çift zincir kırıklarına, abazik bölgeler oluşumuna, DNA-protein çapraz bağ oluşumuna sebep olarak hasara yol açarlar. Hidroksil radikali pürin ve pirimidin bazlarla reaksiyona girerek 8-hidroksi guanin, 5-hidroksi sitozin, timin glikol, 8-hidroksi adenin, 5-hidroksimethyl urasil, sitozin glikol gibi yeni ürünler ortaya çıkar [54].

1.2.4. Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi

Monosakkaritlerin oto-oksidasyonu ile H₂O₂, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar diyabet gibi kronik hastalıkların patolojik süreçlerinde önemli rol oynarlar. Okzoaldehitler DNA, RNA ve proteinlere bağlanabilmeleri ve aralarında çapraz bağlar oluşturma özelliklerinden dolayı antimitotik etki gösterirler [55].

1.3. Antioksidan sistem

1.3.1. Antioksidanlar

Antioksidan savunma; canlılarda bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte görev alan maddelere 'antioksidanlar' denir [56]. Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara kıyasla daha düşük konsantrasyonlarda bulunan, substaratın prooksidanlar tarafından başlatılan oksidasyonunu engelleyen ya da geciktiren maddelerdir ve doku hasarlarını önleyebilirler. Antioksidanlar oksidatif sistemde farklı şekillerde etki gösterebilir [50, 57, 58]:

- Oksijen konsantrasyonunu düşürebilirler
- Metal iyonlarını şelatlayarak radikal oluşumunu engelleyebilirler
- Hidroksil radikali, süperoksit radikali gibi serbest radikalleri sönmeye uğrattırır ya da daha zayıf yeni moleküle çevirirler (süpürme etkisi). SOD, katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi enzimler bu şekilde etki gösterirler.
- Serbest radikaller ile etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltabilirler veya inaktive edebilirler (söndürme etkisi). Askorbik asit, α - tokoferol, flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu şekilde etki gösterirler.
- Radikalleri bağlayarak nötralize edebilirler (zincir kırıcı). Seruloplazmin gibi bileşikler bu şekilde etki gösterirler.
- Serbest radikallerce oluşturulmuş hasarı onarabilirler (onarıcı etki).

1.3.2. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar; yapılarına (enzimatik ve enzimatik olmayanlar), lokalizasyonuna (intraselüler ve ekstraselüler), kaynağına (endojen ve ekzojen kaynaklı), çözünürlüklerine (yağda çözünenler ve suda çözünenler) ya da süpürücü eylemlerine göre (primer savunma: direkt direkt $O_2^{\bullet-}$ den türeyen serbest radikallerle etkileşenler, sekonder savunma: $O_2^{\bullet-}$ nin dismutasyonu ile oluşan radikalleri yakalayanlar) sınıflandırılabilirler. Tablo 1.2'de antioksidanların yapılarına göre enzimatik ve enzimatik olmayanlar olmak üzere 2 ana grupta sınıflandırılmıştır. Enzimatik olmayan

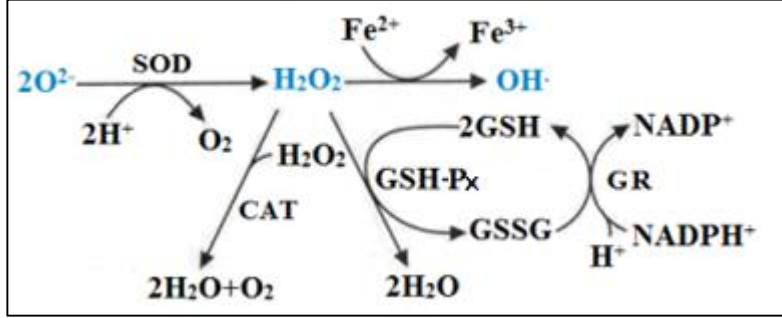
antioksidanlara; glutatyon, askorbik asit, α -tokoferol, β -karoten, koenzim Q10, lutein, β -karoten, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşikler gibi birçok örnek verilebilir. Enzimatik olan antioksidanlar ise GSH-Px, SOD, Glutatyon redüktaz (GR) ve CAT gibi enzimlerdir [48, 59].

Tablo 1.2. Antioksidanların yapılarına göre sınıflandırması

Enzimatik Antioksidanlar	Birincil Enzimler	SOD, Katalaz, GSH-Px		
	İkincil Enzimler	Glutatyon Redüktaz		
	Mineraller	Çinko, Selenyum		
	Vitaminler	Vitamin A, C, E		
Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	Karotenoidler	β -Karoten, Likopen, Lutein, Zeoksantin		
	Organosülfür Bileşikleri	Allium, Alilsülfid, İndoller		
	Düşük Mol Ağırlıklı Antioksidanlar	Glutatyon, Ürik Asit		
	Antioksidan Kofaktörler	Koenzim Q10		
	Polifenoller	İzoflavanoidler	Genistein	
			Kuersetin, Kaemferol	
		Flavonoidler	Antosiyanidinler	Sivanidin, Delfinidin
			Flavanoller	Kateşin
			Flavonlar	Krisin
		Fenolik Asitler	Flavanonlar	Hesperidin
Hidroksisinnamik Asitler			Ferulik Asit, p-Kumarik Asit	
Hidroksibenzoik Asitler			Gallik Asit, Ellagik Asit	

1.3.2.1. Enzimatik antioksidanlar

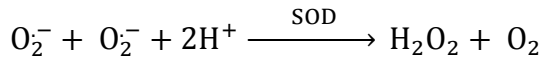
Enzimatik antioksidanların reaksiyonları Şekil 1.3'te özetlenmiştir.



Şekil 1.3. Enzimatik antioksidanların reaksiyonları

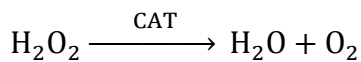
1.3.2.1.1. Süperoksit dismutaz

İlk kez McCord ve Fridovich tarafından katalitik fonksiyonu ortaya konulan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi süperoksit radikalinin ($O_2^{\bullet-}$), H_2O_2 ve moleküler oksijene (O_2) dismutasyonunu katalizleyen bir antioksidan enzimdir [60]. Ekstraselüler aktivitesi çok düşük olan SOD enziminin 3 izoenzimi bulunmaktadır. Ekstraselüler matrikste EC-SOD, sitozolde CuZn-SOD ve mitokondri matriksinde Mn-SOD izoenzimleri bulunur. Tepkime sonucu oluşan H_2O_2 'nin ortadan kaldırılması için GSH peroksidaz ve katalaz (CAT) ile birlikte çalışır [48].



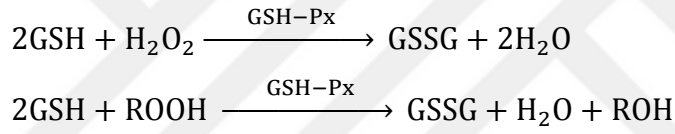
1.3.2.1.2. Katalaz

Esas olarak peroksisom ve mitokondride bulunan, primer antioksidan savunma komponenti olan hemoproteindir. CAT enzimi H_2O_2 'yi suya ve oksijene parçalamaktadır. Karaciğer, böbrek ve kırmızı kan hücreleri yüksek miktarda katalaza sahiptir [61].



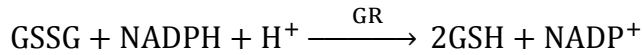
1.3.2.1.3. Glutasyon peroksidaz

Glutasyon peroksidaz sitozolde ve mitokondri matriksinde bulunan H_2O_2 ve organik peroksitlerin redüksiyonunundan sorumlu enzimdir [62]. GSH-Px'ı 1957 yılında ilk kez kırmızı kan hücrelerinde tanımlayan Mills, GSH-Px'in hemoglobini oksidatif hasara karşı koruduğunu göstermiştir [63]. İki tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan, hem H_2O_2 'i, hem de lipit hidroperoksitleri; selenyumdan bağımsız olan, sadece lipit hidroperoksitleri indirger [64]. Ayrıca membranda bulunan fosfolipid hidroksiperoksitlerinin alkole indirgenmesinden sorumlu olan sitozolik fosfolipid hidroperoksit glutasyon peroksidaz enzimi de vardır. Reaksiyon sonucu okside glutasyon (GSSG) oluşur. Antioksidan savunmanın sürdürülebilmesi için okside glutasyonun tekrar indirgenmesi gerekir. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesi olarak kabul edilir [48].



1.3.2.1.4. Glutasyon redüktaz

Hücre içinde sitozol ve mitokondride bulunan glutasyon redüktaz (GR) Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) varlığında oksitlenmiş glutasyonun tekrar indirgenmiş glutatyona (GSH) dönüştürerek dolaylı antioksidan etki gösterir [65].



1.3.2.1.5. Glutasyon-S-transferaz (GST)

Bir başka antioksidan enzim ailesi olan GST'ler; doymamış aldehytleri, epoksitler ve hidroperoksitleri inaktive eder [48].

1.3.2.2. Glutasyon haricindeki bazı enzimatik olmayan antioksidanlar

1.3.2.2.1. E vitamini (α - tokoferol)

Lipofilik olan E vitamini, hücre zarının hidrofobik iç bölgesinde yoğunlaşır ve oksidan kaynaklı zar hasarına karşı temel savunmayı oluşturur. Yapısında bulunan fenolik hidrojen atomunu lipid peroksil radikaline transfer ederek lipit zincir reaksiyonunu kırar. En aktif formu α -tokoferoldür [48].

1.3.2.2.2. C vitamini

Redüktan ve antioksidan ajan olarak süperoksit, HO^\bullet ve çeşitli lipit hidroperoksitlerle direkt reaksiyona girerler[66, 67]. Oksitlenmiş tokoferolün antioksidan özelliklerini tekrar geri kazanmasını sağlarlar[68]. Diğer suda çözünen antioksidanlara göre C vitamini plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili koruma sağlar[69]. C vitamini hem antioksidan hem prooksidandır [70]. Askorbatın lipit peroksidasyonunu arttıran prooksidan aktivitesinin, onun Fe^{+3} 'ü Fe^{+2} 'ye indirgeyebilmesine bağlı olduğu gösterilmiştir [71].

1.3.2.2.3. Peroksiredoksin

Peroksiredoksin (Prx), H_2O_2 ve alkil hidroperoksitleri suya ve alkole indirgeyen antioksidanlardır. Peroksit redüksiyonunu sistein rezidüleri sayesinde katalize ederler. Memelilerde bilinen 6 izoformu (1-6) vardır [72]. Antioksidasyon özelliklerini sistein grupları arasında oluşturduğu disülfid bağları ile sağlarlar. Oluşan disülfid bağları da tiyoredoksin (Trx) ile indirgenerek tekrar Prx oluşturulur ve döngü tamamlanır [73]. Trx ise NADPH'ı koenzim olarak kullanan tiyoredoksin redüktaz enzimi tarafından tekrar rejenere edilir [74].

1.3.2.2.4. Karotenoidler (β -Karoten)

Karotenoidler bitkilerde bulunan pigmentlerdir. B-karotenin peroksil (ROO^\bullet), OH^\bullet ve $\text{O}_2^{\bullet-}$ radikalleriyle reaksiyona girdiği bulunmuştur [75]. Karotenoidler, düşük oksijen kısmi basıncında antioksidan etki gösterirken, yüksek oksijen konsantrasyonlarında pro-oksidan etkilere sahip olabilirler [76].

1.3.2.2.5. Lipoik asit

Alfa lipoik asit hem yağda hem de suda çözünebilmesi ile diğer antioksidanlardan ayrılır. Bazı yiyeceklerde bulunduğu gibi vücutta da sentezlenebilirler [77].

1.3.2.2.6. Ürik asit

Pürin metabolizmasında son ürün olan ürik asit, biyolojik antioksidan fonksiyonu görür. OH^\bullet radikalini yakalaması ile oksidan hasara karşı antioksidan aktivite gösterir [78, 79]. Ürik asidin plazmada bulunan askorbik asidi stabilize etmesi, direkt antioksidan aktivitesinden daha önemli görülmektedir [80].

1.3.2.2.7. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) epifizinden salgılanır. Biyolojik ritmi düzenleyici, uyku indükleyici ve immun sistem stimülasyonu gibi görevleri vardır. Bunun yanında melatoninin OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ ve NO^\bullet gibi serbest radikalleri süpüren bir antioksidan olduğu da gösterilmiştir [81, 82]. Ekzojen olarak melatonin verilmesinin; DNA'yı, membran lipitlerini ve sitozolik proteinleri oksidatif hasardan koruduğu gösterilmiştir [83].

1.4. Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP)

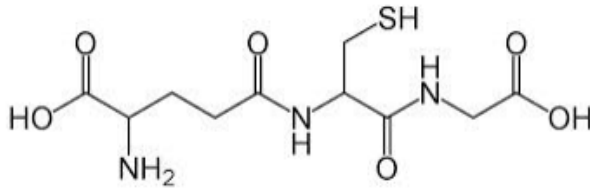
İnsanlarda NADPH'nin ana kaynağı pentoz fosfat yolağıdır [84]. Bununla birlikte malik enzim, izositrat dehidrojenaz, glutamat dehidrojenaz ve nikotinamid nükleotid

transhidrojenaz gibi enzimlerce de üretilir [85] . NADPH, oksidatif hasara karşı korunmada gereken indirgeme potansiyelini sağlar ve GSSG'lerin tekrar GSH'a dönüşmesinde rol alır. NADPH ayrıca anabolik yollarda lipit sentezi, nükleik asit sentezi, kolesterol sentezi ve yağ asidi zinciri uzamasında da kullanılır [84].

1.5. Glutasyon

Genel bilgiler:

Glutasyon (L-gama-glutamil-L-sisteinil glisin); antioksidan hücresel savunmada yer alan, tiyol grubu içeren, protein olmayan, hücre içinde en fazla bulunan antioksidandır. Sistein, glutamik asit ve glisinden oluşan bir tripeptittir ve aktif grubunu sisteinin içerdiği tiyol (-SH) grubu temsil etmektedir. Glutasyonun kimyasal yapısı Şekil 1.4'te görülmektedir. Glutasyon (GSH); tüm organlarda bulunan, özellikle karaciğerde üretilen, bir moleküldür. Hemen hemen tüm memeli dokularında bulunur. Hücre içi konsantrasyonu genelde ~0,5 mM'dır, ancak bazen 10 mM'a kadar ulaştığı olur [86]. Glutasyonun hücre içi seviyesi sistein ve sistinden daha yüksektir; dolayısıyla glutasyon, sistein komponentinin bir saklanma şekli olarak da işlev görmektedir [87]. Glutasyonun antioksidasyon fonksiyonu yanında hücre içi redoks potansiyelini belirleyerek hücrenin apoptozise ya da proliferasyona girmesini belirlemek, prostoglandin ve sitokin sentezi, sinyal iletimi, detoksifikasyon, protein ve DNA sentezi gibi birçok işlevi vardır [1]. Tablo 1.3'te glutasyonun fonksiyonları özetlenmiştir.



Şekil 1.4. Glutasyonun kimyasal yapısı

Tablo 1.3. Glutatyonun fonksiyonları

Antioksidan savunma

- Serbest radikalleri ve diğer reaktif türlerini temizleme
- Hidrojen ve lipid peroksitleri uzaklaştırma
- Biyomolekülleri oksidasyondan koruma

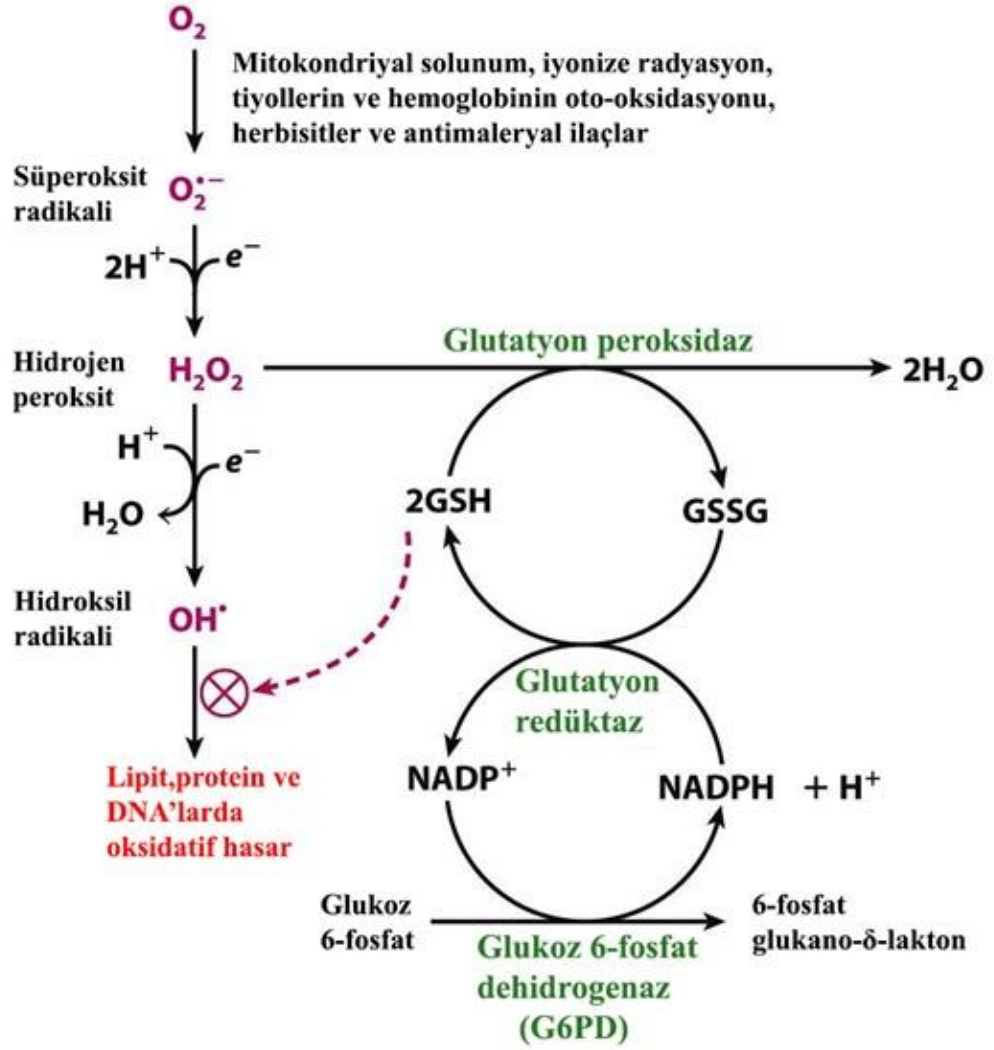
Metabolizma

- Lökotrien ve prostoglandin sentezi
- Formaldehidin formata dönüşümü
- Methylglyoxal'dan D-laktat üretimi
- Elektrofillerden merkapturat oluşumu
- Glutatyon-NO bileşiği oluşumu
- Sistein depolanması ve transportu

Düzenleme

- İntraselüler redoks potansiyeli
 - Sinyal iletimi ve gen ekspresyonu
 - Hücre çoğalması ve apoptozisi
 - Sitokin üretimi ve immun cevap
 - Protein glutatyonilizasyon
 - Mitokondriyal fonksiyon ve bütünlüğü
-

Hücrelerde toplam glutatyon serbest veya proteinlere bağlı olabilir. Serbest glutatyon, çoğunlukla oksidatif stres sırasında oksitlenmiş forma dönüştürülebilen indirgenmiş formda bulunur ve oksitlenmiş glutatyonlar, glutatyon redüktazın etkisi ile indirgenmiş şekle geri döndürülebilir (Şekil 1.5). Redoks durumu, redüklenmiş ve oksitlenmiş glutatyon formlarının (GSH / GSSG) oransal miktarlarına bağlıdır ve hücre içinde oksidatif stresin kritik bir belirteci gibi görünmektedir. Normal koşullar altında, indirgenmiş GSH'nin oksitlenmiş form üzerinde baskın olmasıyla, GSH memeli hücrelerinde 0,5 ile 10 mM arasındaki konsantrasyonlarda bulunur. Dinlenen hücrelerde GSH/GSSG oranı 100'ü aşarken, oksidatif stresin çeşitli modellerinde bu oranın 10 ile 1 arasında değiştiği bildirilmiştir [88]. Ayrıca, glutatyon proteinlere bağlanabilir ve bu da glutatyonillenmiş proteinlerin oluşumuna yol açar.



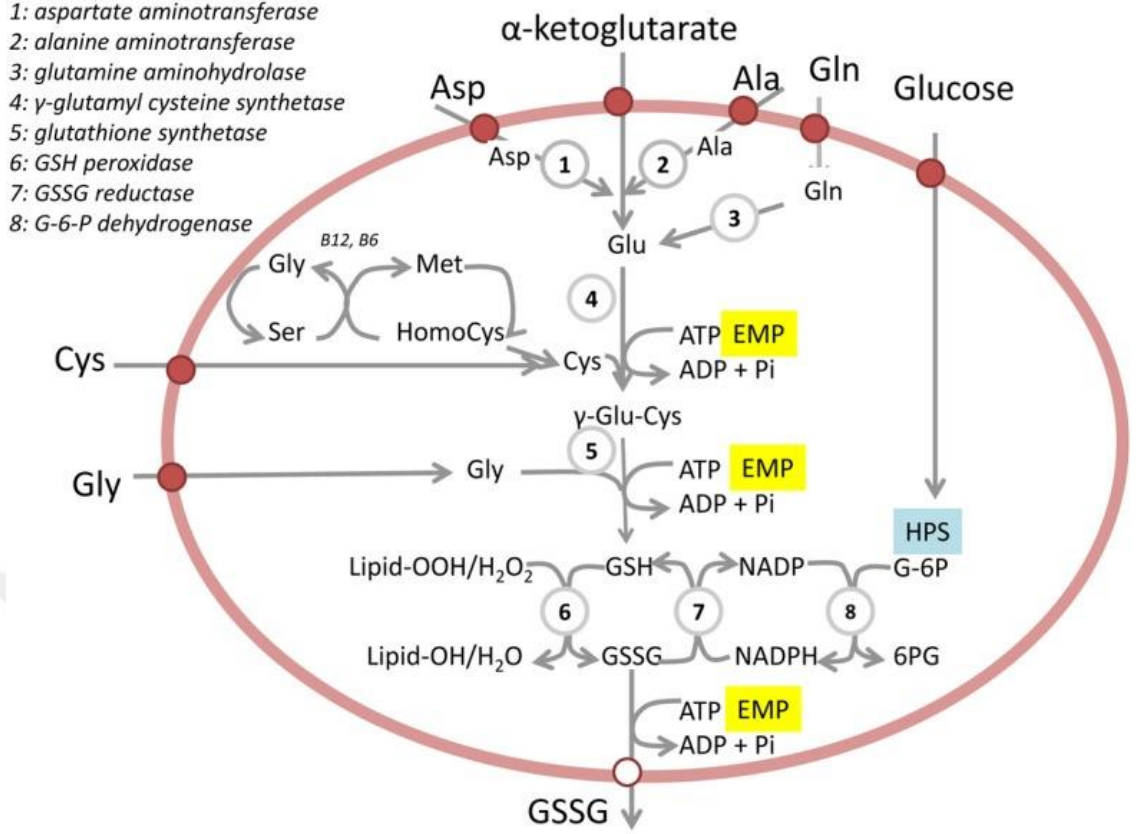
Şekil 1.5. Reaktif oksijen türleri oluşumu ve glutatyonun antioksidasyon indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları

Glutatyonun iki karakteristik yapısal özelliği vardır: bir γ -glutamil bağ ve bir sülfidril grubu. Tripeptidin bu kısımları glutatyonun görev aldığı fonksiyonda rol alırlar. Glutatyon; koenzim A, çeşitli enzim ve proteinler gibi sülfidril grubu içeren moleküllerin sülfidril gruplarının oluşumu ve redükte halde tutulmasında rol oynayan transhidrojenasyon reaksiyonlarına katılır. Redükte glutatyonu peptidaz ataklarına karşı dirençli yapan tiyol grupları ve γ - glutamil bağlarıdır. Hücre zarını oksidatif hasardan korur. H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, $ONOO^-$, RO_2^{\bullet} ve OH^{\bullet} radikali gibi çeşitli elektrofilik ve okside edici bileşiklerle etkileşimle hem nükleofil hem de etkili indirgeyici olarak işlev görür [89]. Redükte glutatyon hidrojen atomu vererek serbest radikallerle, özellikle hidroksil ve

karbon radikalleriyle, etkileşime girer. Bu reaksiyonlar serbest radikal hasarında temel radikal olarak bilinen HO•'ni nötralize ederek koruma sağlayabilir [90]. Aynı zamanda, glutatyon ile etkileşime giren ve nihayetinde idrar veya dışkılarda merkaptürik asitler şeklinde atılan çeşitli ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda da rol oynar. Glutatyonun γ -glutamil kısmının amino asitlerin (özellikle sistin ve diğer bazı nötr amino asitler), peptitlerin ve aminlerin taşınmasında işlev gördüğüne dair kanıt vardır [87].

Glutatyonun sentezi ve yıkılımı γ -glutamil döngüsünün reaksiyonları ile gerçekleşir. γ -glutamil döngüsü; γ -glutamil sistein sentetaz (GCS) ve glutatyon sentetaz enzimlerinin de yer aldığı altı enzimli bir dizi reaksiyonu içeren döngüdür (Şekil 1.6) [91, 92]. GCS enziminin katalizlediği reaksiyon hız kısıtlayıcı basamağı oluşturmaktadır. Oksidatif stres, inflamasyon sitokinleri, kanser, kemoterapi, iyonize radyasyon, ısı şoku, prostoglandin A2, ağır metaller ve insülin GCS aktivitesinin ya da sentezini arttırmaktadır [93, 94]. Buna karşın protein eksikliği, deksametazon, eritropoetin, tümör büyüme faktörü ve hiperglisemi GCS aktivitesini düşürmektedir [93, 94]. Glutatyon sentezinin gerçekleşmesi nedeniyle bu döngü glutatyanonun birçok işlevi ile yakından ilişkilidir. Örneğin γ -glutamil döngüsünün kusurlu olduğu birçok hastanın zihinsel engelli olduğu görülmüştür [87].

Glutatyon, bazı hücrelerin dış yüzeylerine bağlanmış bir enzim olan γ -glutamil transpeptidaz tarafından taşınır. γ -glutamil transpeptidaz aktivitesi γ -glutamil-amino asit ve sisteinil-glisin oluşumuna yol açar. Daha sonra sisteinil-glisin, sistein ve glisin oluşturmak üzere dipeptidaz ile ayrılır. Transpeptidasyon reaksiyonunda oluşan γ -glutamil-amino asitler hücre içi enzim olan γ -glutamil siklotransferaz ile serbest amino asitler ve 5-oksoprolin dönüştürülür. 5-oksoprolin, glutamat elde etmek üzere döngüye tekrar girebilir [87, 95].



Şekil 1.6. Eritrositlerde glutatyon sentezi ve döngüsü

EMP: Embden-Meyerhof yolağı (anaerobik glikoliz), HPS: heksoz monofosfat yolu (pentoz fosfat yolu), G-6P: Glukoz 6-fosfat, 6 PG: 6-fosfoglukonolakton, Glu: glutamat, Gln: glutamin, Gly: glisin, Cys: sistein, Ala: alanin ve Asp: Aspartat yerine kullanılmıştır [96]

Geri dönüşümsüz hücre hasarı, hücre GSH içeriğini devam ettiremediğinde gözlemlenir [97]. Genel olarak, bir hücrenin glutatyon düzeyinde artış olması bazı antitümör ajanlara karşı daha dirençli ve aynı zamanda radyasyon ve oksidatif etkilere karşı daha dirençli olmasını sağlar. Dolayısıyla, glutatyon metabolizmasının modülasyonunun, hücreleri seçici olarak yok etme veya koruma vasıtası oluşturabileceği öngörülmektedir [98].

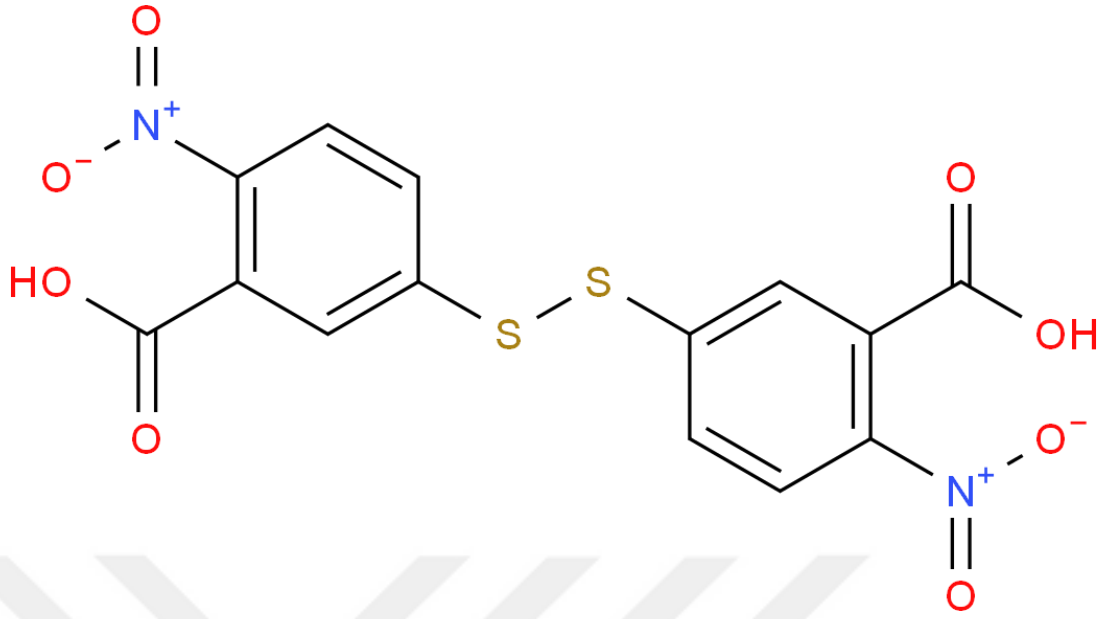
1.5.1. Glutatyon ölçüm yöntemleri

Okside ve redükte glutatyon miktarının tayininde ilk basamak genellikle örnekteki proteinlerin asidifikasyon (trikloroasetik asit (TCA), perklorik asit, trifloroasetik asit, monofosforik asit (MPA) veya sülfosalisilik asit) ile çöktürülmesi ve santrifüj edilerek berrak, protein içermeyen supernatant elde edilmesidir. Daha sonrasında ise GSSG'lerin

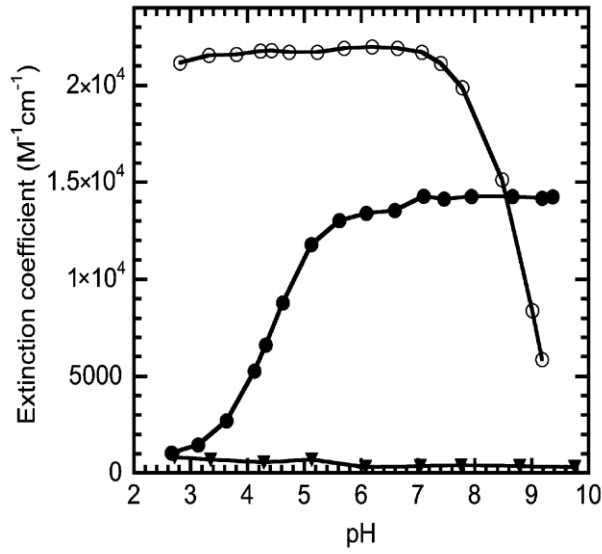
indirgenmesi gerekmektedir. İndirgeyici olarak sülfidril grubu içeren redükthanlar (ditiyoeritol, ditiyotreitil (DTT) veya 2-merkaptotanol), sodyum ve potasyum borohidrit, trialkilfosfinler (tributilfosfin (TBP), trifenilfosfin (TPP), tris-(2-karboksietil)fosfin (TCEP), trimetil-TCEP) ve ditiyonit kullanılabilir. Ayrıca ölçüm yöntemlerinde karşılaşılan başka bir problemde GSH'ların kendi kendine oksitlenmesi ve GSSG'lerin yüksek okunmasıdır. GSH'ların oto-oksidasyonunu engellemek için N-etilmaleimid (NEM) [99], 2-vinilpiridin (2-VP) [100], 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene [101], iodoacetic acid (IAA), bis (3-karboksi-4-nitrofenil) disülfid, 1-methyl-2-vinylpyridinium trifluoromethane sulfonate (M2VP), 1-methyl-4-vinylpyridinium trifluoromethane sulfonate (M4VP) [102] gibi tiyol maskeleyici ajanların kullanılması ya da ortamı asidik yapmak [103] gerekmektedir. Sonrasında, GSH ve GSSG'ler spektrofotometre, fluorometre, HPLC, biyoluminisans, kapiller elektroforez, LC-MS ya da GC-MS kullanılarak ölçülür [104].

1.5.1.1. Spektrofotometrik yöntemler

Spektrofotometrik ölçüm yöntemlerinde en sık kullanılan moleküller Ellman reaktifi ((5,5'-ditiyobis- (2-nitrobenzoik) –asit) (DTNB)) (Şekil 1.7), 4-DPS 4-tiyopirodin (4-TP)'dir. Bu moleküller farklı pH aralıklarında çalışılabilmektedir. Şekil 1.8'de de görüldüğü gibi DTNB ile ölçüm yapan yöntemlerde pH'ın en az 7 olması gerekmektedir [105].



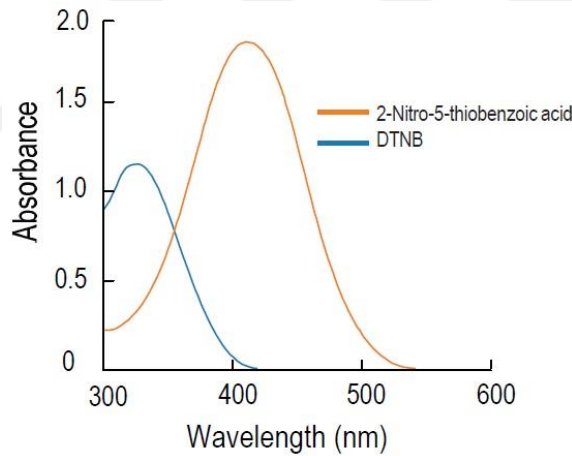
Şekil 1.7. DTNB bileşiğinin kimyasal yapısı



Şekil 1.8. TNB, 4-TP ve 4-DPS'nin pH'a karşı molar ekstinksiyon katsayıları
●: TNB, ○: 4-TP ve ▼: 4-DPS (Hansen, 2007)

1959'da Ellman tarafından ilk defa biyolojik numunelerin sulfidril gruplarının ve glutasyon düzeyinin belirlenmesi ile ilgili makale yayınlanmıştır [106]. Sonrasında Owens ve Belcher [107] tarafından keşfedilen, Tietze [108] tarafından geliştirilen ve Adams ve arkadaşları tarafından modifiye edilen [109] enzimatik geri dönüştürme

reaksiyonuna dayanan yöntem ortaya konulmuştur. Bu yöntemde; GR enzimi ile GSSG'ler GSH'a indirgenirken NADPH'lar ise oksitlenir. Ortaya çıkan GSH'lar ise DTNB ile oksitlenerek ortaya 5-tiyo-2-nitrobenzoik acit (TNB) ve GSTNB çıkarılırlar. Ortaya çıkan TNB 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür (Şekil 1.9). TNB miktarı örnekteki toplam GSSG ve GSH miktarları ile doğru orantılıdır. NEM, bis (3-karboksi-4-nitrofenil) disülfid ve IAA gibi tiyol blokerleri ile ön işleme sokulması ile GSSG ve GSH düzeylerinin ayrı ayrı ölçülebileceğini ortaya koymuşlardır [87, 109]. Daha sonraları 2-VP'nin de bu amaçla kullanılabileceği ve NEM'in aksine glutasyon redüktaz üzerinde anlamlı bir inhibisyon etkisinin olmadığı bu nedenle uzaklaştırılmasının gerekmediğini rapor edilmiştir [100]. Rossi ve arkadaşları ise asidifikasyon işleminin GSH'ın zaman bağımlı oksidasyonunu engellediğini ve bu nedenle NEM gibi moleküllerin sadece protein çöktürme işlemine kadar geçen sürede işe yarayacağını ortaya koymuşlardır [103].



Şekil 1.9. DTNB ve TNB moleküllerinin absorbans spektrumları

Sıkça kullanılan bir diğer spektrofotometrik yöntem ise Brigelius ve ark. tarafından bildirilen sadece GSH'yi ölçen, GST enziminin varlığında 1-kloro-2,4-dinitrobenzen ile GSH'ın reaksiyonu sonucu oluşan S- (2,4-dinitrofenil) –glutasyonun son nokta ölçümüne dayanan metottur [110]. Bir başka yöntem ise Güntherberg ve Rost tarafından 1966'da tanımlanan, eritrositlerde GSSG tayini için geliştirilen GR enziminin NADPH tüketmesine dayanan GSSG-son nokta metodudur [111].

1.5.1.2. Fluorometrik yöntemler

Cohn ve Lyle [112] tarafından, *o*-fitaldehit (OPA) ve amino asitler arasındaki reaksiyona dayanan, biyolojik dokularda indirgenmiş glutatyon tayininde kullanılacak fluorometrik test tarif edilmiştir. Hissin ve Hilf [113] bu yöntemi, indirgenmiş ve oksitlenmiş glutatyonun belirlenmesine olanak tanıyacak şekilde değiştirmişlerdir. Bu yöntemde glutatyonun serbest tiyol grubuna bağlanarak son derece floresan bir türevini üreten OPA, floresan reaktifi olarak kullanılır. Bu yöntemde GSSG tayini için numunenin içinde bulunan GSH'ın uzaklaştırılması gerekir. Bu amaçla GSSG tayini için numunelere NEM ile muamele edilir. Wang ve ark. floresan Zn (II)-8-hidroksikuinolin-5-sülfonik asit sistemini kullanarak GSH düzeylerini ölçmüşlerdir [114]. OPA ile 1-pyrenemethylamine'nin birlikte kullanılmasının OPA'nın tek başına kullanılmasından daha üstün olduğunu gösteren yayınlar mevcuttur [115].

1.5.1.3. Biyoluminesans analizi

GSH ölçümünde biyoluminesansın kullanıldığı ilk yöntem Hinze tarafından 1984 yılında geliştirilmiştir [116], ancak deteksiyon limiti değeri Ellman reaktifinin uygulandığı spektrofotometrik yöntemlerinkinden daha yüksektir. 1998'de Romero ve Mueller-Klieser tarafından DTNB-GSH redüktaz geri dönüşüm testi (NADPH düşüşünü artırmak için) ile oldukça hassas luminesans özelliği olan FMN oksidoredüktaz / bakteriyel lüsiferaz reaksiyonunu (NADPH tüketimini saptamak için) birleştirilerek toplam GSH tespit edilmiştir [117]. 2000 yılında ise Mourad ve arkadaşları tarafından tariflenen GSSG tayini için ilk biyoluminesansın testi; aynı prensiplere dayanmaktadır, ancak GSH'yi maskeleyerek için 4-kloro-7-triflorometil-1-metilkuinolinium kullanılmıştır [118]. O zamandan beri, luminol-NaIO₄ [119, 120], luminol-H₂O₂ [121], kinin-Ce (IV) [122], Ru (phen)₃²⁺-KmnO₄ [123] gibi birçok yöntem tariflenmiştir.

1.5.1.3. Kapiller elektroforez yöntemleri

Piccoli ve ark. [124] basit bir Microcon-10 membran ekstraksiyon prosedürüyle GSH ve GSSG düzeylerini femtomol düzeyinde tespit edilmesine olanak tanıyan

yüksek performanslı kapiller elektroforez metodu tanımladılar. Carru ve ark. tarafından tarif edilen kapiller elektroforetik yöntem [125], 90 saniyeden daha kısa bir sürede, kırmızı kan hücrelerinde GSH ve GSSG'nin doğrudan ölçülmesine izin vermektedir. Gradient elüsyon hareketli sınır elektroforezi [126, 127], degrade elüsyon izotakoforezi [126] ve yeşil (515nm) lazerle indüklenmiş floresans detektörlü ile kapiller elektroforez [128] gibi yeni yöntemler de tariflenmiştir.

1.5.1.4. Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleri

HPLC ve iki ultra-performans sıvı kromatografisi (UPLC) yöntemi ile GSH ve GSSG ölçen birçok yöntem tanımlanmıştır. Bunlarla birlikte kullanılan tayin sistemleri arasında UV absorbans, floresan detektör, elektrokimyasal detektör, kütle spektrometresi (MS), MS / MS ve atomik floresans spektrometresi bulunur [104]. Birçok sistem ters fazlı (reverse phase) olmasına rağmen anyon-değişim (anion-exchange) HPLC yöntemleri de bulunmaktadır [129, 130]. Ayrıca elektrokimyasal olarak modüle edilmiş likit kromatografisinde tanımlanmıştır [131]. HPLC yöntemlerinin ortak özellikleri, eluentlerin asidik pH'da tamponlanması (GSH'ların oto-oksidasyonunun önlenememesi ve sabit faz ile etkileşiminin artırılması) ve eluentlere trifloroasetik asit eklenmesidir.

1.5.1.4.1. HPLC ultraviyole ölçümü

İlk HPLC-UV saptama yöntemi, Reeve ve Kuhlenskamp [132] tarafından tariflenen ve glutasyonun DTNB ile kolon öncesi işlenmesine dayanan yöntemdir. Daha sonra, bu yöntem ditiyotreitole eklenmesi ile modifiye edilerek okside glutasyonların da ölçülmesine olanak sağlamıştır [130]. Reed ve ark. tarafından tarif edilen Sander reaktifi (2,4-dinitroflorobenzen) ile pre-kolon derivatizasyonu kullanılarak ortaya konan yöntemde GSH ve GSSG aynı anda ölçülebilmıştır [101]. Bu yöntem Yoshida [133] tarafından, protein çöktürme işlemi için metafosforik asit kullanılarak ve GSH'ların oto-oksidasyonunu engellemek için de iyodoasetik asit kullanılarak modifiye edilmiştir. Daha sonraları ise derivatizasyon için 4-DPS, OPA ve başka derivasyon yapan maddelerin kullanıldığı farklı yöntemler tarif edilmiştir [105, 134, 135].

1.5.1.4.2. HPLC elektrokimyasal ölçümü

Elektrokimyasal tayin yöntemi olarak tiyollerin saptanmasında ilk olarak Hg havuz elektrotları kullanılmıştır [136]. Daha sonraları ise hem tiyol hem de disülfidlerin eşzamanlı olarak çalışılmasına olanak tanıyan Au/Hg amalgam ince tabaka elektrotunun geliştirilmesi ile daha da iyileştirilmiştir [137]. Bu yöntemlerde metafosforik asit ile proteinlerin çöktürülmesi ve mobil faz ile 20 kat seyreltme yapılmaktadır [138].

1.5.1.4.3. HPLC fluorometrik ölçümü

Glutasyon için tariflenen ilk fluorometrik HPLC yöntemi amonyum-7-floro-2,1,3-benzoksadiazol-4-sülfonatın (SBD-F) kullanıldığı yöntemdir [139]. İlk yöntemler çok uzun elüsyon süresine sahipken bu yöntemin Abukhalaf ve ark. [140] tarafından modifiye edilmiş hali elüsyon süresini kısaltmıştır. SBD-F, hassas ve spesifik olmasına rağmen düşük tepkime kabiliyeti, uzun reaksiyon süresi ve yüksek sıcaklık (60 ° C) gerektirmesi gibi dezavantajları bulunur.

Daha sonraları ise N- (1-pirenil) maleimid [141], OPA [142, 143], monobromobimane [143, 144], 5-metil-2- (*m*-iyodoasetilaminofenil) benzoksazol) [145, 146], 3, 9-acetoxy-2-(4-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1H-pyrrol-1-yl)phenyl)-3-oxo-3H-naphtho[2,1-*b*]pyran (ThioGlo™3) [147], ThioGlo1 [148], 4- (*N*, *N*-dimetilaminosülfonil) -7-floro-2,1,3-benzoksadiazol [149], 1,3,5,7-tetramethyl-8-bromomethyl-difluoroboradiaza-s-indacene [150] ve *N*- (2-akridonil) maleimid [151] gibi birçok florofor kullanılmıştır. Bazı yöntemlerde tiyol blokeri olarak NEM kullanılmışken [142], bazılarında ise 2-vinylpyridine kullanılmıştır [147].

1.5.1.5. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi

Alev fotometre detektörü kullanılarak yapılmış bir yöntem [152] dışında, glutasyon tayininde kullanılan neredeyse tüm GC yöntemlerinde detektör olarak kütle spektrometresi (MS) kullanılmıştır [153-159].

1.5.1.6. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi

Kütle spektrometresi (MS), GSH ve S-nitrozotiyoller de dahil olmak üzere düşük molekül ağırlıklı tiyollerin analizi için yararlı bir tekniktir [160]. Son zamanlarda, kan mononükleer hücrelerinde[161] ve karaciğerde [162] GSH ve GSSG'nin aynı anda saptanması için elektrosprey kütle spektrometresi ile birleştirilmiş iki sıvı kromatografisi (LC) yöntemi tarif edilmiştir.

1.5.1.7. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi yöntemleri

Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi, in vivo ve in vitro sağlam hücrelerde GSH ve GSSG'nin saptanmasına izin veren bir tekniktir. Trabesinger ve ark. 1999'da insan beynine uygulanabilir bir yöntemi ortaya koydular [163].

1.6. Oksidatif stres

Organizmada oksidanlar ve antioksidanlar denge halindedir. Dengenin oksidanlar tarafına kaymasına oksidatif stres meydana gelir [164]. Genellikle hafif oksidatif stres tolere edilebilirken, ciddi oksidatif stres hücre hasarına ve hücre ölümüne neden olabilir [165]. Oksidatif stres hücre içinde protein hasarına yol açar ve serbest kalsiyum ve demir miktarını artırır [166]. Hücre içi serbest kalsiyum artışı hücrelerde iyon kanallarını etkiler, endonükleazları aktive eder ve DNA fragmantasyonuna neden olur [167, 168]. Demir iyonu ise HO• üretimine neden olur. Sonuç olarak oksidatif stres lipitleri, karbonhidratları, proteinleri ve DNA'yı etkileyerek hücre hasarına yol açar [169].

1.7. Eritrosit içi oksidan durumlar ve antioksidan savunma

Eritrositler, diğer somatik hücrelerle kıyaslandığında çok çeşitli kaynaklardan oksidatif strese maruz kalırlar. O₂ taşıyan hücreler olmaları ve hemoglobin (Hb) içermeleri nedeniyle sürekli otooksidasyon ile O₂•⁻ ve H₂O₂ üretirler [170]. Ayrıca bir dizi serbest radikal reaksiyonunu başlatabilme potansiyeli olan çoklu doymamış yağ asidi içeren bir membran ve Hb hem grubu içerirler [1, 171]. Aynı zamanda nükleus içermeyen hücreler olmaları nedeniyle bozulan proteinlerin yerine yenisini sentezleyemezler. Bu nedenle, oksidatif stres eritrosit hasarının ana nedenidir [172, 173]. Bunun yanında, eritrositler güçlü antioksidan savunma ile donatılmıştır [170]. Çeşitli ksenobiyotikler tarafından uyarılan eritrositler [174-182]; metabolik sendrom [183], diyabet [184-186], böbrek yetmezliği [187, 188], Hemolitik üremik sendrom [189], sepsis [190], sıtma [191, 192], orak hücreli anemi [193], talasemi [193], glukoz 6-fosfat dehidrogenaz eksikliği [193], Wilson hastalığı [194], fosfat tükenmesi [195] ve maligniteler [196] gibi çeşitli klinik bozuklukların patofizyolojisine katkıda bulunur.

1.7.1. Eritrositlerdeki antioksidan sistemler

Eritrositlerde; glutatyon [197], vitamin C [198], E vitamini [198] gibi enzimatik olmayan ve süperoksit dismutaz [199], katalaz [199], glutatyon peroksidaz [200] ve

peroksiredoksin 2 gibi enzimatik antoksidan mekanizmalar rol almaktadır [201]. Glutasyon, indirgenmiş formu (GSH) ve okside formu (GSSG) olan bir tripeptittir (γ -glutamil-sisteinil-glisin). Glutasyon, glutamat-sistein ligaz (glutasyon sistein sentetaz) enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzimin katalitik ve modifikatör altbirimleri bulunmaktadır [197]. Eritrosit içi GSH konsantrasyonu GSSG konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında genellikle GSSG konsantrasyonunun on mislinden fazladır (örneğin 0,3 mM GSSG ve 3 mM GSH) [186]. Oksitlenmiş glutasyon, indirgeyici madde olarak NADPH gerektiren glutasyon redüktaz enzimi ile hızla redüklenir. Eritrositlerde, NADPH için tek kaynak pentoz fosfat yoludur. Pentoz fosfat yolunun ana enzimi olan glikoz-6-fosfat dehidrojenazın (G6PDH) X kromozomuna bağlı eksikliği, eritrositleri oksidatif stres için duyarlı hale getirir ve böylece hemolize yol açar [193].

Glutasyon sistein sentetazın modifikatör alt birimini içermeyen farelerde eritrosit glutasyon seviyeleri normal değerlerin sadece % 10'u kadardır [197]. Vitamin C majör ROS süpürücülerindedir. İn vitro ortamda, eritrositleri organofosfatlar gibi ksenobiyotiklerin oksidatif etkisinden korumaktadır [202]. Ayrıca, C vitamini depolanmış eritrositleri koruyabilmektedir [203]. Ancak in vivo olarak hem C vitamini hem de E vitamini takviyesi, eritrositlerde oksidatif stresin artması ile ilişkili bir hastalık olan orak hücreli anemide hemolizi artırmıştır [204].

Eritrositler, $O_2^{\bullet-}$ 'nin H_2O_2 'ye dismutasyonunu katalizleyen Cu, Zn-süperoksit dismutaz 1 (SOD1) [205] enzimini eksprese eder. SOD1 eksikliği olan farelerde; hemolitik anemi, artmış oksidatif stres görülür ve bu fareler hem lipid peroksidasyon ürünlerine karşı hem de eritrositlere karşı antikorlar üretirler [205-207]. SOD1 eksikliği bulunan eritrositler, muhtemelen GSH'nin rejenerasyonunu hızlandırmak için pentoz fosfat yolunun aktivitesini arttırırlar [205]. Katalaz tarafından katalize edilen ana reaksiyon, H_2O_2 'nin H_2O ve O_2 oluşturmak üzere parçalanmasıdır. Eritrositler büyük miktarlarda katalaz eksprese eder [208]. Bununla birlikte, NADPH eksikliğinin H_2O_2 'nin parçalanmasını büyük oranda bozuyor olması nedeniyle H_2O_2 'nin çoğunun NADPH'ye bağlı glutasyon peroksidaz / redüktaz yolu ile uzaklaştırıldığı uzun zamandır düşünülmekteydi [209]. Katalazın da NADPH'a [210] bağlandığının keşfinden sonra, katalazında eritrositlerdeki H_2O_2 'in parçalanmasında en az glutasyon peroksidaz / redüktaz yolu kadar önemli olduğu anlaşıldı [201, 208, 211]. Katalaz

aktivitesinden dolayı eritrositlerin diğer hücre tiplerini oksidatif hasardan koruyan mobil ROS temizleyicileri olarak işlev gördüğü öne sürülmüştür [212].

Glutasyon peroksidaz; lipid peroksidleri azaltan [213], hücre zarına yakın olarak üretilen H₂O₂'yi ortadan kaldıran [214] ve selenyum içeren bir eritrosit enzimidir [200].

Prx2, H₂O₂ ve diğer hidroperoksidleri uzaklaştıran tiyol bağımlı bir moleküldür [201]. Süpürme işlevini disülfid bağı oluşturarak sağlar [215] ve tekrar redükte edilebilmesi için tioredoksin redüktaz enzimi gerekmektedir. Eritrositlerde bu enzim çok düşük miktarlarda bulunduğundan dolayı Prx 2'nin ROS'u enzimatik olmayan yollarla uzaklaştırdığı düşünülmektedir [73].

1.7.2. Eritrosit içi oksidatif stres mekanizması

Oksidatif stres veya antioksidan savunma defekti [197, 216-218] katyon kanallarının açılmasına neden olarak hücre içine Ca²⁺ girişini artırır ve böylece eritrozu (suicidal erythrocyte death) uyarır [12, 219]. Oksidatif stresin iyonize kalsiyum miktarını arttırması sonucu eritrositlerde Ca²⁺ 'a duyarlı K⁺ kanallarının [220, 221] aktivasyonu, hücre zarının hiperpolarizasyonu, Cl⁻ çıkışı için elektriksel itici gücün artışı, osmotik dengeyi sağlayan suyun ve potasyum klorürün hücresel kaybı [168] ve eritrositlerin büzülmesi gibi birçok olayı başlatır. Oksidatif stres eritrosit büzülmesi için gerekli olan eritrosit Cl kanallarını da aktifleştirir [222, 223] ve böylece eritrozu pekiştirir [224]. Oksidatif stres, Ca²⁺ girişini arttırması ve iyon kanalları aktiviteleri üzerindeki etkilerinin yanı sıra aspartil ve sisteinil proteazlar gibi enzimleri de aktive eder [225]. Bunların sonucunda eritrositlerde eksprese edilen kaspazlar [226, 227] anyon değiştirici 1 (Band 3)'i parçalarlar [226] ve eritrositlerin fosfatidilserin maruziyetini uyarırlar [228]. Bununla birlikte, Ca²⁺ girişi ve Ca²⁺ 'a bağlı hücre membranı hasarı, kaspazların aktivasyonunu gerektirmez [229-231].

Katyon kanallarının açılması glutasyon [232], N-asetilsistein [233, 234] ve E vitamini [235-237] gibi redüktanlarla geri çevrilebilir. Ayrıca eritropoietininde Ca²⁺'a geçirgen katyon kanallarını inhibe ettiği ve oksidatif strese karşı eritrositleri koruduğu gösterilmiştir [187, 234].

1.8. Diyabetes Mellitus ve eritrosit oksidasyonu

Diyabetes mellitus (DM); pankreas insülin sekresyonunun tamamen ya da göreceli yetersizliği veya insülin etkisizliği ya da insülin yapısında meydana gelen yapısal bozukluklar sonucu gelişen, hiperglisemi ile karakterize, karbonhidrat, protein ve lipid metabolizmalarının bozukluğu ile seyreden, akut metabolik ve kronik dejeneratif komplikasyonlara neden olan bir sendromdur [238]. Tanı kriterleri Tablo 1.4'te görülmektedir [238].

Tablo 1.4. Diyabetes mellitus tanı kriterleri

	Aşikar DM	İzole IFG(**)	İzole IGT	IFG + IGT	DM Riski Yüksek
APG (≥8 st açlıkta)	≥126 mg/dl	100-125 mg/dl	<100 mg/dl	100-125 mg/dl	-
OGTT 2.st PG (75 g glukoz)	≥200 mg/dl	<140 mg/dl	140-199 mg/dl	140-199 mg/dl	-
Rastgele PG	≥200 mg/dl + Diyabet semptomları	-	-	-	-
A1C(***)	≥%6,5 (≥48 mmol/mol)	-	-	-	%5,7-6,4 (39-46 mmol/mol)

(*) Glisemi venöz plazmada glukoz oksidaz yöntemi ile 'mg/dl' olarak ölçülür. 'Aşikar DM' tanısı için dört tanı kriterinden herhangi birisi yeterli iken 'İzole IFG', 'İzole IGT' ve 'IFG + IGT' için her iki kriterin bulunması şarttır. (**) 2006 yılı WHO/IDF Raporunda normal APG kesim noktasının 110 mg/dl ve IFG 110-125 mg/dl olarak korunması benimsenmiştir. (***) Standardize metotlarla ölçülmelidir. DM: Diabetes mellitus, APG: Açlık plazma glukozu, 2.st PG: 2. saat plazma glukozu, OGTT: Oral glukoz tolerans testi, A1C: Glikozillenmiş hemoglobin A1c, IFG: Bozulmuş açlık glukozu (impaired fasting glucose), IGT: Bozulmuş glukoz toleransı (impaired glucose tolerance), WHO: Dünya Sağlık Örgütü, IDF: Uluslararası Diyabet Federasyonu.

Hiperglisemide yükselmiş bir asiklik α -oksoaldehit olan metilglüksal reaktif birikimi eritrozu uyarmaktadır [186, 239]. Metilglüksal eritrositlerde fosfatidilserin translokasyonunu uyarır; buna paralel olarak glikolitik akımı bozarak ATP ve GSH

konsantrasyonlarını azaltır [186]. Sonuç olarak metilglükoksal enerji üretimine ve antioksidan savunmaya etki ederek oksidan etki oluşturur [186] . Eritrositleri de etkileyen diyabetle ilişkili oksidatif stres, GSH düzeylerinin azalması, ROS belirteci olan malondialdehitin [240] birikimi ve artmış SOD aktivitesi [241] ile ortaya konulmaktadır. Diyabetin kardiyovasküler komplikasyonlarının, eritrosit ROS maruziyeti ile korelasyon gösterdiği [240] ve ayrıca tip II diyabette artmış eritrozun eritrositlerdeki lipid peroksidasyonu ile pozitif yönde ilişkili olduğu gösterilmiştir [184].

1.9. Amaç ve kapsam

Oksidatif stres birçok hastalığın patofizyolojisinde ya da hastalıkların komplikasyon mekanizmasında rol oynamaktadır. Eritrositler; diradikal olan ve serbest oksijen radikallerinin oluşumuna yol açan oksijeni taşımaları ve hemoglobin içermeleri nedeniyle diğer hücrelerden daha fazla oksidatif durumla karşılaşmaktadır. Günümüze kadar eritrosit içerisinde en önemli oksidatif durum belirteçleri olan GSH ve GSSG düzeylerini ölçmek için HPLC, fluorometre, LC-MS, GC-MS gibi sofistike cihazlarla ölçüm yapan yöntemler tanımlanmıştır. Bunun yanında her laboratuvarında bulunma potansiyeli daha yüksek olan spektrofotometre ile ölçüm yapan yöntemler de tanımlanmış; ancak bu yöntemler enzimatik reaksiyonlarla ölçüm yapmalarından dolayı pahalı olan yöntemlerdir. Bu tez çalışmamızda spektrofotometre gibi her laboratuvarında bulunabilen ve sofistike olmayan, mevcut spektrofotometrik yöntemlerden daha ucuz ve kolay uygulanabilir eritrosit içi okside, redükte ve toplam glutatyon miktarını ölçmeye olanak sağlayan bir kolorimetrik ölçüm yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

2.1. Materyaller

2.1.1. Kullanılan ekipmanlar

- Soğutmalı santrifüj : Nüve NF800R (Türkiye)
- Otomatik analizör : Roche Hitachi cobas c501 (Almanya)
- Vorteks : Genie 2 (Amerika)
- -80° C derin dondurucu : Sanyo (Japonya)
- Hassas terazi : Mettler Toledo ML204-a (Amerika)
- pH metre : Inolab WTW pH 730 (Almanya)
- Spektrofotometre : Shimadzu UV 1800 (Japonya)
- Otomatik pipetler : Socorex (İsviçre), Nichipet (Japonya)
- Benmari : Lab Companion BS-21 (Güney Kore)
- Elisa okuyucu: KHB ST-360 microplate okuyucu (Çin Halk Cumhuriyeti)
- Çalkalayıcı: Biosan TS-100 thermo-shaker (Litvanya)

2.1.2. Kullanılan kimyasallar

Çalışmalarda kullanılan kimyasallar analitik reaktif ayar (Analytical reagent grade- ACS) saflıkta olup, Sigma -Aldrich'den temin edilmiştir. Çalışmalarda Tip 1 ultrasaf su kullanılmıştır.

Tiyol ölçümü için kullanılan kimyasallar:

- 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic) acid (DTNB, Ellman reaktifi)
- Metanol
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- Tris
- Hidroklorik asit (HCl)

Protein çöktürme işlemi için kullanılan kimyasal:

- Trichloroacetic acid (TCA)

Okside glutatyonun redüksiyonunda kullanılan kimyasallar:

- Sodyum borohidrat (NaBH_4)
- Sodyum hidroksit (NaOH)
- HCl
- Methanol

Kullanılan diğer kimyasallar:

- Redükte glutatyon (GSH)
- Okside Glutatyon (GSSG)
- 2-Merkaptoetanol
- Dithiothreitol (DTT)
- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Sodyum klorür (NaCl)

2.1.3. Kullanılan kimyasal çözeltiler

Tiyol tayini için kullanılan kimyasal çözeltiler:

- **Reaktif 1:** 10 mM EDTA (3,8 g) tartılarak 1000 ml 100 mM Tris tamponunda (pH: 8,2) çözüldü.
- **Reaktif 2:** 10 mM (3,963 g) DTNB 1000 ml metanolde çözüldü. Reaktif taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

Modifiye tiyol ölçüm yönteminde kullanılan kimyasal çözeltiler:

Tiyol tayini için kullanılan reaktif 1'in içerisindeki 100 mM olan Tris tamponu 500 mM ve 1000 mM olacak şekilde iki ayrı modifikasyonu yapıldı.

Eritrosit paketi yıkamak için kullanılan kimyasal çözeltiler:

%0,9'luk NaCl solüsyonu hazırlandı.

Protein çöktürme için kullanılan kimyasal çözeltiler:

%20'lik TCA solüsyonu: 200 g TCA 800 mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Son hacim deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. %20 w/v'lik TCA çözeltisi hazırlandı.

Dilüsyon işlemleri için kullanılan kimyasal çözeltiler:

%5'lik TCA solüsyonu: 50 g TCA 800 mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Son hacim deiyonize su ile 1000 mL'ye tamamlandı. %5 w/v'lik TCA çözeltisi hazırlandı.

Okside Glutasyon redüksiyonu ve TCA'nın asiditesini ortadan kaldırmak için kullanılan kimyasal çözeltiler:

25 mM (0,94575 g) ile 5 M (189,15 g) arasında değişen konsantrasyonlarda NaBH_4 ve 0,1 (4 g) M ile 5 M (200 g) arasında değişen konsantrasyonlarda NaOH tartılarak 600 ml içerisinde çözüldü. Son hacim methanol-su solüsyonu (%50, v/v) ile 1000 ml'ye tamamlandı. Reaktif taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

- A reaktifi: 3,5 M NaBH_4 ve 1,5 M NaOH içeren çözelti hazırlandı.

Reaksiyon ortamında kalan fazla NaBH_4 'ü ortadan kaldırmak için kullanılan kimyasal çözeltiler:

Stok HCl asit çözeltisi (12 M) kullanıldı.

Sonuçların karşılaştırılması için kullanılan kit:

Oxford Bimedical Research (Amerika Birleşik Devletleri) GT40 GSH/GSSG mikroplate ticari ölçüm kiti kullanıldı.

2.1.3. Numuneler

Tam kan sayımında kullanılmak üzere; EDTA'lı tüplere alınarak analizleri sonlandırılmış, biyokimya analizleri yapılmak üzere sarı kapaklı serum ayırma tüplerine alınmış ve santrifüj edilerek ölçümleri tamamlanmış imha aşamasındaki numuneler barkotları sökülerek çalışmalarda kullanılmıştır.

Diyabetik ve sağlıklı gönüllülerden alınan EDTA'lı numuneler Hemoglobın A1c (HbA1c) ile korelasyon çalışmasında ve diyabet-sağlıklı kontrol karşılaştırma çalışmasında kullanıldı.

2.1.4. Etik kurul onayı

Bu alışma, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakóltesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 03/09/2014 tarih ve 139 sayılı kurul kararı konu başlıklı ve 26379996/144 sayı numaralı kararı ile etik ve bilimsel açıdan uygun bulunmuştur.



2.2. Metodlar

2.2.1. Eritrosit lisat (hemolizat) süpernatantı eldesi

EDTA içeren kan toplama tüplerine alınan kanlar 900 g'de +4 °C'de soğutmalı santrifüj ile 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan sarı plazma kısmın üst seviyesi belirlenerek uzaklaştırıldı. Altta kalan eritrosit paketleri 3 defa izotonik NaCl solüsyonu ile yıkandı. Son yıkamadan sonra plazma atılmadan önce belirlenen seviyeye kadar soğuk distile su eklenerek eritrositler patlatıldı. Elde edilen eritrosit lisatından 3 hacim alınarak üzerine 1 hacim %20'lik TCA solüsyonu eklenerek proteinler presipite edildi. Bu işlem sonrası tekrar 1500 g'de santrifüj edildi ve üstte kalan süpernatant alınarak ölçümlerde kullanıldı.

2.2.2. Nativ tiyol ve glutatyon (GSH) tayini

Hu tarafından modifiye edilen Ellman yöntemi ile ölçülür [242, 243]. Yöntem DTNB molekülünün serbest tiyoller tarafından redüklenerek disülfid ve bir molekül 5-tiyonitrobenzoik asit oluşturması prensibine dayanır. Bu yöntemin tamponu modifiye edilerek örneklerdeki nativ GSH miktarları belirlenmiştir.

Otomatik analizör için ölçüm prosedürü:

- Numune hacmi: 10 µl numune
- Reaktif 1 hacmi: 110 µl (Tris tamponu (100 mM, pH: 8,2) içerisinde 10 mM EDTA)
- Reaktif 2 hacmi: 10 µl (Metanol içerisinde 10 mM DTNB çözeltisi)
- Dalga boyu: Birincil dalga boyu = 415 nm, ikincil dalga boyu = 700 nm (opsiyonel)
- Okuma noktası: İlk absorbans R1 ve R2 karışımından hemen önce, son absorbans reaksiyon trasesi platoya eriştiğinde alındı (toplam analiz süresi yaklaşık 10 dk).

- Kalibrasyon tipi: Linear (reaksiyon 2-merkaptoetanol ile kalibre edildi).
Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ olarak verildi.

Modifiye Tiyol yöntemlerinde reaktif 1'in içerisindeki Tris tamponu 500 mM ya da 1000 mM olarak değiştirildi. Ölçümler tiyol tayini ile aynı prosedür kullanılarak yapıldı.

2.2.3. Toplam glutatyon tayini

Hemolizat süpernatantları ve 3 hacim GSSG çözeltisi-1 hacim %20'lik TCA solüsyonu (3/1 v/v) içeren örnekler kullanıldı.

GSSG'lerin redüksiyonu:

600 μL örnek üzerine 150 μL 3,5 M NaBH_4 ve 1,5 M NaOH içeren solüsyon (A reaktifi) 10 cm uzunluğundaki şeffaf sekonder tüplere eklendi. Böylece NaBH_4 'ın köpük oluşturan reaksiyonundan kaynaklanabilecek örnek kaybı engellendi. Reaksiyon ortamında kalan fazla NaBH_4 'ü süpürmek için 70 μL 12 M HCl (B reaktifi) kullanıldı.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra Nativ GSH prosedürü ile tekrar GSH'lar ölçüldü ve toplam GSH miktarı belirlendi. Sonuçlar dilüsyon katsayısı ile çarpılarak $\mu\text{mol/L}$ şeklinde verildi.

2.2.4. GSSG miktarının hesaplanması:

Ölçülen Toplam GSH düzeylerinden Nativ GSH düzeyleri çıkarılarak ikiye bölündü ve GSSG hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{mol/L}$ şeklinde verildi.

$$\text{GSSG} = (\text{Toplam GSH} - \text{Native GSH})/2$$

2.2.5. Hemoglobin ölçümü

Sysmex XE-2100 (Japonya) otomatik tam kan sayma cihazı ile ölçüldü.

2.2.6. HbA1c ölçümü

Roche-Hitachi Cobas 8000 modüler otoanalizöründe (Almanya) Roche Ticari kitleri (Almanya) kullanılarak ölçüldü. Yöntem türbidimetrik inhibisyon immünassay (TINIA) prensibiyle HbA1c tayinine dayanmaktadır.

2.2.7. Ticari kitle toplam GSH, nativ GSH ve GSSG ölçümü

Ticari olarak mümkün olan bu yöntem Tietze [108] tarafından tariflenen enzimatik geri dönüştürme reaksiyonuna dayanmaktadır. Bu yöntemde; GR enzimi ile GSSG'ler GSH'a indirgenirken NADPH₂'lar ise oksitlenir. Ortaya çıkan GSH'lar ise Ellman reaktifi (DTNB) ile oksitlenerek TNB ve GSTNB çıkarılır. Ortaya çıkan TNB 412 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Reaksiyon hızı ile örnekteki toplam GSSG ve GSH miktarları doğru orantılıdır. Kalibratör olarak kullanılan GSSG'lerin reaksiyon hızları ile oranlayarak örnekteki Toplam GSH miktarı belirlenmektedir.

GSSG miktarının tayini ise, Griffith[100] tarafından kullanılan GSH'ları bağlayan ancak GR enzimini inhibe etmeyen 2-VP kullanılarak ölçülmektedir. Örnekler 2-VP eklenmesi sonucu GSH'lar bağlanmakta daha sonra ise yukarıda tarif edilen enzimatik geri dönüştürme yöntemiyle örnekteki GSSG miktarı belirlenmektedir.

Ticari Yöntem Çalışma Prensibi:

A. Örneklerin Hazırlanması:

➤ GSSG Örneklerinin hazırlanması:

- 30 µL tiyol süpürücü (2-VP) mikrosantrifüj tüpüne eklenir
- 100 µL tam kan örneği bu tüpün dibine dikkatlice eklenir ve nazikçe karıştırılır
- Örnekler -70 °C'de dondurulur (30 gün boyunca stabildir) ve böylece eritrositlerin patlaması sağlanır
- Örnekler çözülür, hemen karıştırılır ve oda ısısında 5-10 dk inkübe edilir
- 270 µL buz soğukluğunda %5'lik Metafosforik asit eklenir ve iyice vortekslenir

- 1000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edilir
- Üstte kalan süpernatanttan 50 µL alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpünde 700 µL çalışma tamponu (assay buffer; kit içerisinde, kullanıma hazır) ile karıştırılır (Toplam Dilüsyon katsayısı= 60)
- Örnekler ölçüme kadar buz üzerinde bekletilir

➤ **GSH örneklerinin hazırlanması:**

- 50 µL tam kan mikrosantrifüj tüpünün dibine dikkatlice eklenir
- Örnekler -70 °C'de dondurulur (30 gün boyunca stabildir) ve böylece eritrositlerin patlaması sağlanır
- Örnekler çözülür, hemen karıştırılır
- 350 µL buz soğukluğunda %5'lik metafosforik asit eklenir ve iyice vortekslenir
- 1000 g'de 10 dk +4 °C'de santrifüj edilir
- Üstte kalan süpernatanttan 25 µL alınarak yeni bir mikrosantrifüj tüpünde 1,5 mL çalışma tamponu (assay buffer; kit içerisinde, kullanıma hazır) ile karıştırılır (Toplam Dilüsyon katsayısı= 488)
- Örnekler, ölçüme kadar buz üzerinde bekletilir

B. Ölçüm prosedürü:

- Standart, örnek ya da kör mikropalakada belirlenen kuyucuklarına eklenir
- Tüm kuyucuklara 50 µL DTNB Solüsyonu eklenir
- Tüm kuyucuklara 50 µL Redüktaz Solüsyonu eklenir
- 5 dk boyunca orbital çalkalayıcı üzerinde oda ısısında karıştırılarak inkübe edilir
- Tüm kuyucuklara 50 µL NADPH Solüsyonu eklenir
- Kinetik mikropalaka okuyucusunda 10 dakika boyunca her dakika 412 nm (olmadığı durumlarda 405 nm'de) ölçüm yapılır
 - Standartlardan ve örneklerden elde edilen reaksiyon hızlarından körün reaksiyon hızı çıkarılarak net reaksiyon hızı elde edilir. Standartların net reaksiyon hızları y eksenine ve bilinen değerleri ise x eksenine konularak

oluşturulan kalibratör eğrisinden eğim (slope) ve kesim (intercept) elde edilir. Örneklerdeki toplam GSH ya da GSSG miktarları şu formülle hesaplanır:

- $GSH = ((\text{Net Reaksiyon Hızı} - \text{Kesim}) / \text{Eğim}) \times \text{Toplam Dilüsyon Katsayısı}$

2.2.8. Optimizasyon Çalışmaları

2.2.8.1. Tiyol ölçümünde kullanılan reaktif 1'in içerisindeki Tris tamponunu optimize etme çalışmaları

Örnekler içerisinde bulunan TCA'nın ve NaBH_4 'ü süpürmek için kullanılan HCl'in asiditesine karşılık Tiyol ölçüm yöntemi içerisinde bulunan Reaktif 1'in tamponlama kapasitesini arttırmak için Reaktif 1 içerisinde 100 mM olan Tris Tamponunun molaritesi 500 mM ve 1000 mM olacak şekilde modifiye edildi. Sonrasında orijinal metod ile serum örnekleri kullanılarak karşılaştırıldı. Korelasyon ve linearite analizleri yapıldı ve ayrıca regresyon ve Blant-Altman grafikleri çizildi.

2.2.8.2. Sodyum borohidrat (NaBH_4) miktarının optimizasyonu

500 mM GSSG çözeltisi ve hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz kullanıldı. Diğer kimyasalların konsantrasyonları sabit tutulurken artan konsantrasyonlarda NaBH_4 eklenerek ölçümler yapıldı.

2.2.8.3. Sodyum hidroksit (NaOH) miktarının optimizasyonu

500 mM GSSG çözeltisi ve hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz kullanıldı. Diğer kimyasalların konsantrasyonları sabit tutulurken artan konsantrasyonlarda NaOH eklenerek ölçümler yapıldı.

2.2.8.4. Reaksiyon ortamında kalan fazla sodyum borohidratın (NaBH₄) süpürülmesi için gerekli HCl miktarının optimizasyonu

500 mM GSSG çözeltisi ve hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz kullanıldı. Diğer kimyasalların konsantrasyonları sabit tutulurken artan miktarlarda HCl eklenerek ölçümler yapıldı.

2.2.8.5. Sodyum borohidratın (NaBH₄)'ün süpürülmesi için eklenen HCl'in eklenme zamanının optimizasyonu

500 mM GSSG çözeltisi ve hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz kullanıldı. A reaktifi eklendikten sonra değişen zamanlarda 70 µL HCl eklendi ve ölçümler yapıldı.

2.2.9. Asidifikasyonun oksidasyonu önlediğinin gösterilmesi

TCA içeren hemolizat süpernatant havuzu örnekleri oda ısısında ve 4 °C'de bekletilerek aralıklarla ölçüm yapıldı.

2.2.10. Oksidasyon ile GSH ve GSSG değişiminin izlenmesi çalışmaları

Tam kan ya da hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz örnekleri içerisindeki GSH'ların oksitlenmesi için üzerine artan konsantrasyonlarda H₂O₂ eklenmiş ve aynı koşullarda ikişer saat beklenmiştir ve ölçümler yapılmıştır. Ayrıca tam kan örneklerinden yapılmış havuz örnekleri 38 °C'ye ayarlanmış benmaride bekletilerek otooksidasyon bırakılmış ve belirli aralıklarla ölçüm yapılmıştır.

2.2.11. Geliştirilen yöntemlerin performans değerlendirmeleri

2.2.11.1. Doğrusallık (linearite) çalışması

Toplam Tiyol yönteminin doğrusallık çalışması GSSG'nin ve hemolizat süpernatant havuzunun seri dilüsyonlarıyla yapıldı. X eksenine beklenen değerler y eksenine bulunan değerlerin girilmesiyle dağılım grafiği çizildi. Regresyon analizi yapıldı ve regresyon denklemi bulundu. Korelasyon katsayısı, lineerite katsayısı, eğim (slope), kesim (intercept) ve standart hataları gösterildi.

2.2.11.2. Analitik sensitivite çalışması

Sensitivitenin göstergesi olan kalibrasyon eğrisinin eğimine göre yöntemin analitik sensitivitesi tanımlandı.

2.2.11.3. Geri kazanım (recovery) çalışması

Nativ Tiyol yönteminde %20'lik TCA solüsyonu içerisinde 3300 ve 660 µmol GSH stokları kullanıldı. Bazal numune için 1 ml hemolizat süpernatant havuzu üzerine 0,1 ml %5'lik TCA solüsyonu eklendi. Test numunesi için 1 ml hemolizat süpernatant havuzuna 0,1 ml hazırlanan GSH stoklarından eklendi. Numune içerisine eklenen GSH konsantrasyonları sırasıyla 300 ve 60 µmol/L olarak hesaplandı. Yine aynı örneklerde Toplam Tiyol de çalışıldı. Nativ Tiyol ve Toplam Tiyol yöntemlerinde GSH geri kazanımları hesaplandı.

Toplam Tiyol yönteminde ayrıca %20'lik TCA içerisinde hazırlanan 3300, 660 ve 330 µmol/L GSSG stokları kullanıldı. Bazal numune için süpernatant havuzu üzerine 0,1 ml %5'lik TCA solüsyonu eklendi. Test numunesi için 1 ml hemolizat süpernatant havuzuna 0,1 ml hazırlanan GSSG stoklarından eklendi. Numune içerisine eklenen GSSG konsantrasyonları sırasıyla 300, 60 ve 30 µmol/L olarak hesaplandı.

Geri kazanımın hesaplanmasında aşağıdaki formüller kullanıldı:

- Eklenen konsantrasyon = standart konsantrasyonu x [standart ml'si / (standart ml + serum ml)]
- Geri elde konsantrasyonu = Konsantrasyon test- konsantrasyon bazal
- % geri elde = (Geri elde konsantrasyonu / eklenen konsantrasyonu) x 100
- % bağıl standart sapma= (% geri eldenin standart sapması / % geri eldenin ortalaması) x 100

2.2.11.4. Gözlenebilirlik sınırı çalışması (limit of detection, LoD)

0 kalibratör (kör) 20 kez ölçüldü. Körün ortalaması ve standart sapması hesaplandı. Yöntemlerin gözlenebilirlik sınırları aşağıdaki formülle belirlendi:

- Gözlenebilirlik sınırı = kör ölçümlerinin ortalaması + 3 x kör ölçümlerinin standart sapması

2.2.11.5. Tekrarlanabilirlik çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışması için hemolizat süpernatant havuzu, 100 ve 500 µmol GSSG çözeltileri kullanıldı. Gün içerisinde iki çalışma her çalışmada iki tekrar olacak şekilde 20 gün boyunca ölçüldü. Elde edilen değerlerden her bir yöntemin çalışma içi, günler arası, çalışmalar arası ve toplam %CV'leri CLSI-EP05-A2 [244] kriterlerine uygun olarak hesaplandı.

2.2.12. Ticari yöntemle yeni yöntemin karşılaştırma çalışmaları

Enzimatik geri dönüştürme reaksiyonuna dayanan ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemi karşılaştırmak için çeşitli deneyler yapıldı. İlk olarak GSSG çözeltisi yöntemlerin kendi ölçüm limitlerinde olacak şekilde dilüe edilerek çalışıldı ve lineariteleri karşılaştırıldı. Daha sonra tam kan havuzu hazırlandı ve 38 °C'de bekletilerek otooksidasyona bırakıldı ve belirli aralıklarla her iki yöntem ile aynı anda çalışıldı. Toplam GSH % CV'leri ve nativ GSH düzeylerindeki düşüş ile GSSG düzeylerindeki artışı gösterebilme (oksidasyonu belirleyebilme) limitleri karşılaştırıldı.

Sonrasında ise barkotları çıkarılmış tam kan örnekleri kullanılarak iki yöntemin korelasyonuna bakıldı. Ayrıca diyabetik hasta ve sağlıklı gönüllülerden alınan tam kan örneklerinde hem yeni geliştirilen hem de ticari yöntem ile toplam GSH, nativ GSH ve GSSG düzeyleri çalışıldı ve bu örneklerin hemoglobinin düzeyleri ölçüldü. Toplam GSH, nativ GSH ve GSSG parametrelerinin hem direkt tam kan düzeyleri hem de bu parametrelerin gram hemoglobin başına değerleri hesaplandı. Çalışma sonuçları bir ön çalışma olarak sunuldu. Ayrıca her iki yöntemde yer alan parametrelerin HbA1c düzeyleri ile korelasyonlarına bakıldı.

2.2.15. Verilerin istatistiksel değerlendirilmesi

Verilerin analizi ve şekillerin çizilmesi IBM SPSS Statistic for Windows versiyon 22 (IBM Corp., NY, USA) paket programı, Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft, USA), MedCalc for Windows, version 15.0 (MedCalc Software, Ostend, Belçika) ve GraphPad Prism version 6.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) programları kullanılarak yapıldı.

Verilerin normal dağılıp dağılmadığı Kolmogorov Smirnov testi referans alınarak değerlendirildi. Parametrik dağılım gösteren veriler ortalama \pm standart sapma ; parametrik olmayan dağılım gösteren veriler ise ortanca ve çeyrekler arası açıklık olarak gösterildi. Gaussian dağılımlı örnekler için gruplar arasında ortalama değerler yönünden farkın önemliliği Student's t testiyle, gaussian dağılımına uymayan örnekler için gruplar arasındaki istatistiksel fark Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. Kategorik değişkenler Pearson'un Ki-Kare testi ile değerlendirildi.

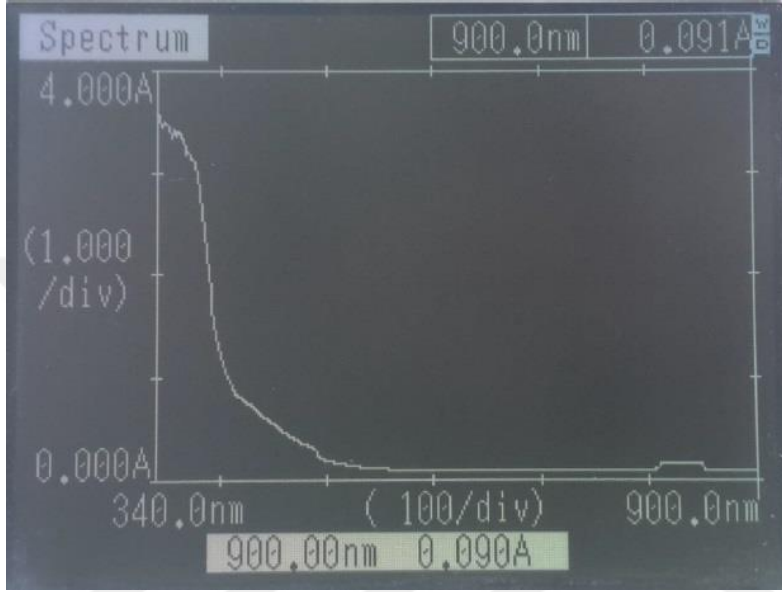
Testler arasındaki ilişkinin araştırılmasında parametrik veriler için Spearman'ın Korelasyon testi, non-parametrik veriler için Pearson'ın korelasyon testi ve regresyon analizleri kullanılarak araştırıldı.

$p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. DTNB molekülünün spektral absorbanası

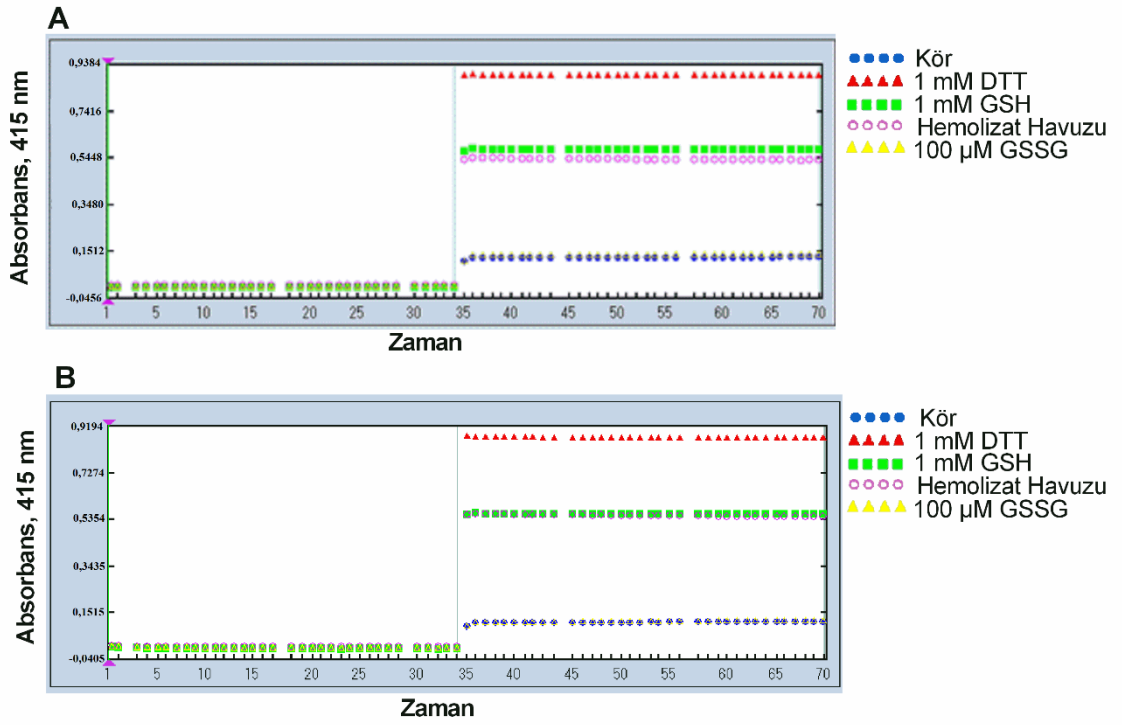
DTNB molekülünün spektral absorbanası şekil 3.1'te görülmektedir.



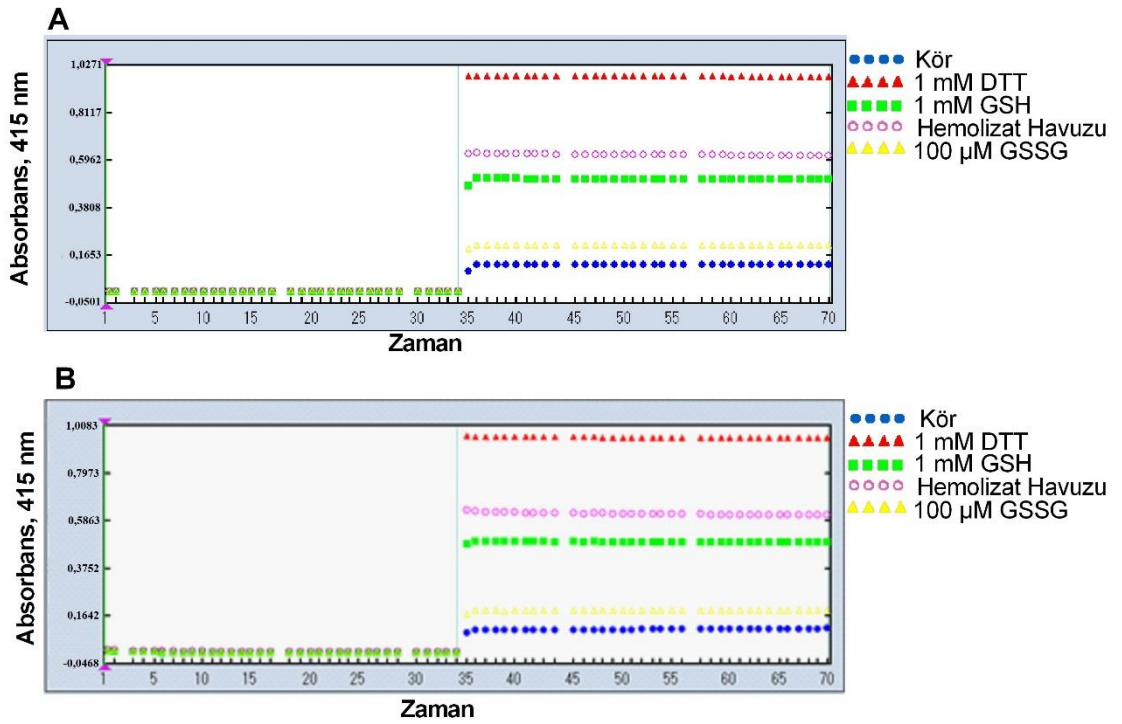
Şekil 3.1. DTNB molekülünün absorbanans spektrumu

3.2. Çeşitli örneklerinin ve reaktif körünün reaksiyon kinetikleri

100 μ M GSSG, 1 mM GSH, 1 mM DTT, hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz ve körün otomatik analizördeki native GSH (Şekil 3.2) ve Toplam GSH (Şekil 3.3) ölçümlerinin reaksiyon kinetikleri gösterildi.



Şekil 3.2. Çeşitli numunelerin native GSH reaksiyon kinetikleri. A: 500 mM tampon kullanılan yöntem B: 1000 mM tampon kullanılan yöntem

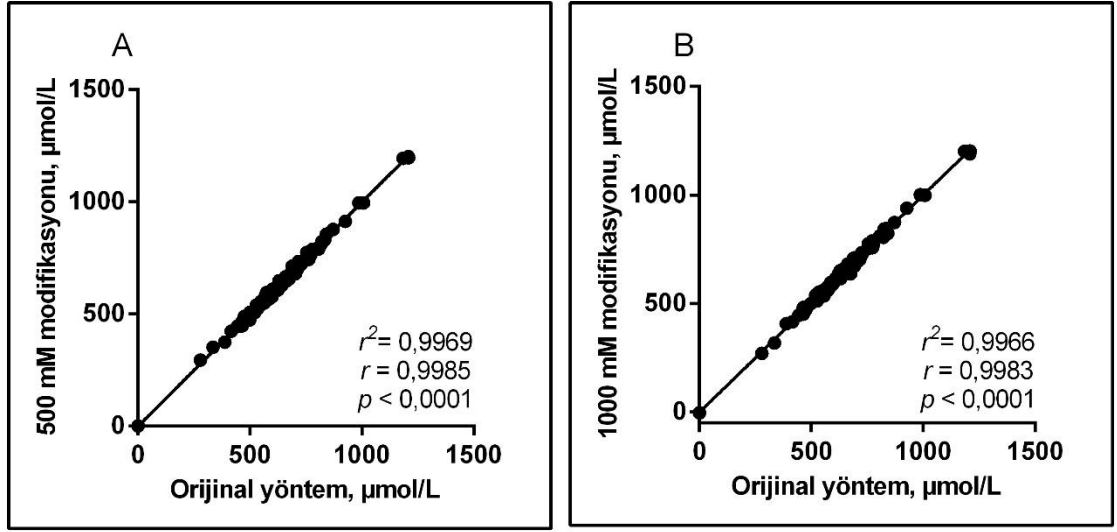


Şekil 3.3. Çeşitli numunelerin Toplam GSH reaksiyon kinetikleri (A: 500 mM tampon kullanılan yöntem B: 1000 mM tampon kullanılan yöntem)

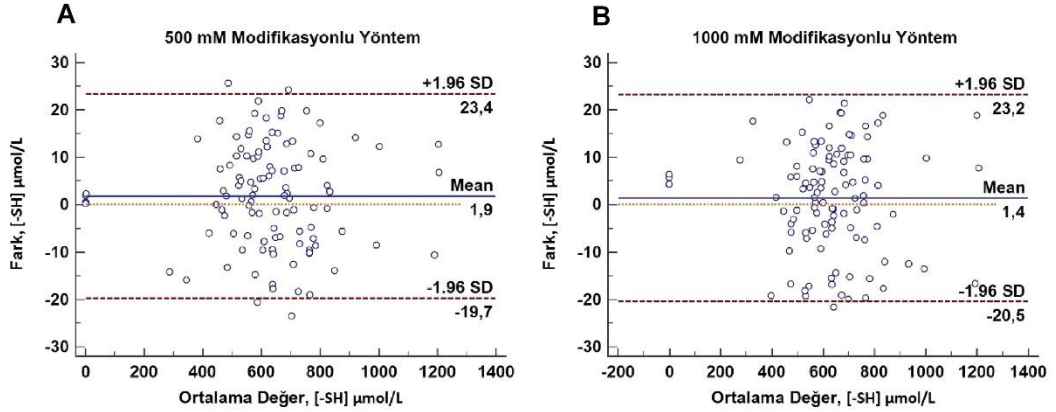
3.3. Optimizasyon Çalışmaları

3.3.1. Tiyol ölçümünde kullanılan reaktif 1'in içerisindeki Tris tamponunu optimize etme çalışmaları

Hemolizat örneklerindeki proteinlerin presipitasyon aşamasında TCA solüsyonu kullanılmaktadır. %20'lik TCA solüsyonu örneğe eklendiğinde toplam ağırlık yüzdesi 5 olmaktadır. Kullanılan bu asidik solüsyonun örnek içerisindeki molaritesi hesaplandığında yaklaşık olarak 306 mM'dır. Bu nativ GSH düzeyi ölçümlerinde sorun oluşturmaktadır. Ayrıca reaksiyon ortamında kalan fazla NaBH_4 'ün de uzaklaştırılması için HCl kullanılmaktadır. Bu da toplam GSH ölçümlerinde sorun yaratmaktadır. Ölçümlerde kullanılan DTNB molekülünün pH 7'in altına düştüğünde absorbanasının düştüğü bilinmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmek için ölçümlerde kullanılan tiyol tamponunun molaritesi 500 mM ve 1000 mM olacak şekilde gücü artırılmıştır. Ek olarak reaksiyon ortamının pH'larının her iki yöntemde 8,2'de sabit kaldığı ancak orijinal yöntemde 7,5 ile 7,7 arasında değişen değerlere düştüğü görülmüştür. 500 mM ve 1000 mM olarak modifiye edilmiş tampon içeren yöntemler ile orijinal yöntemin yapılan doğrusal regresyon analizinde sırasıyla $y = 0,9996x - 1,617$ ve $y = 1,001x - 2,130$ olarak bulunmuştur. Bu iki 500 mM ve 1000 mM olarak modifiye edilmiş tampon içeren yöntemlerle orijinal yöntem arasında Şekil 3.4'te de görüldüğü gibi önemli bir korelasyon ve doğrusallık görülmüştür (sırasıyla $r=0,9985$, $r^2=0,9969$, $p<0,0001$; $r=0,9983$, $r^2=0,9966$, $p<0,0001$). İki yöntem arasında anlamlı fark olmadığı gösterilmiştir (Şekil 3.5). Çalışmalarda bu iki yöntem kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Orijinal yöntem ile modifiye edilmiş yöntemlerin korelasyonlarının ve doğrusallıklarının gösterilmesi (A: Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

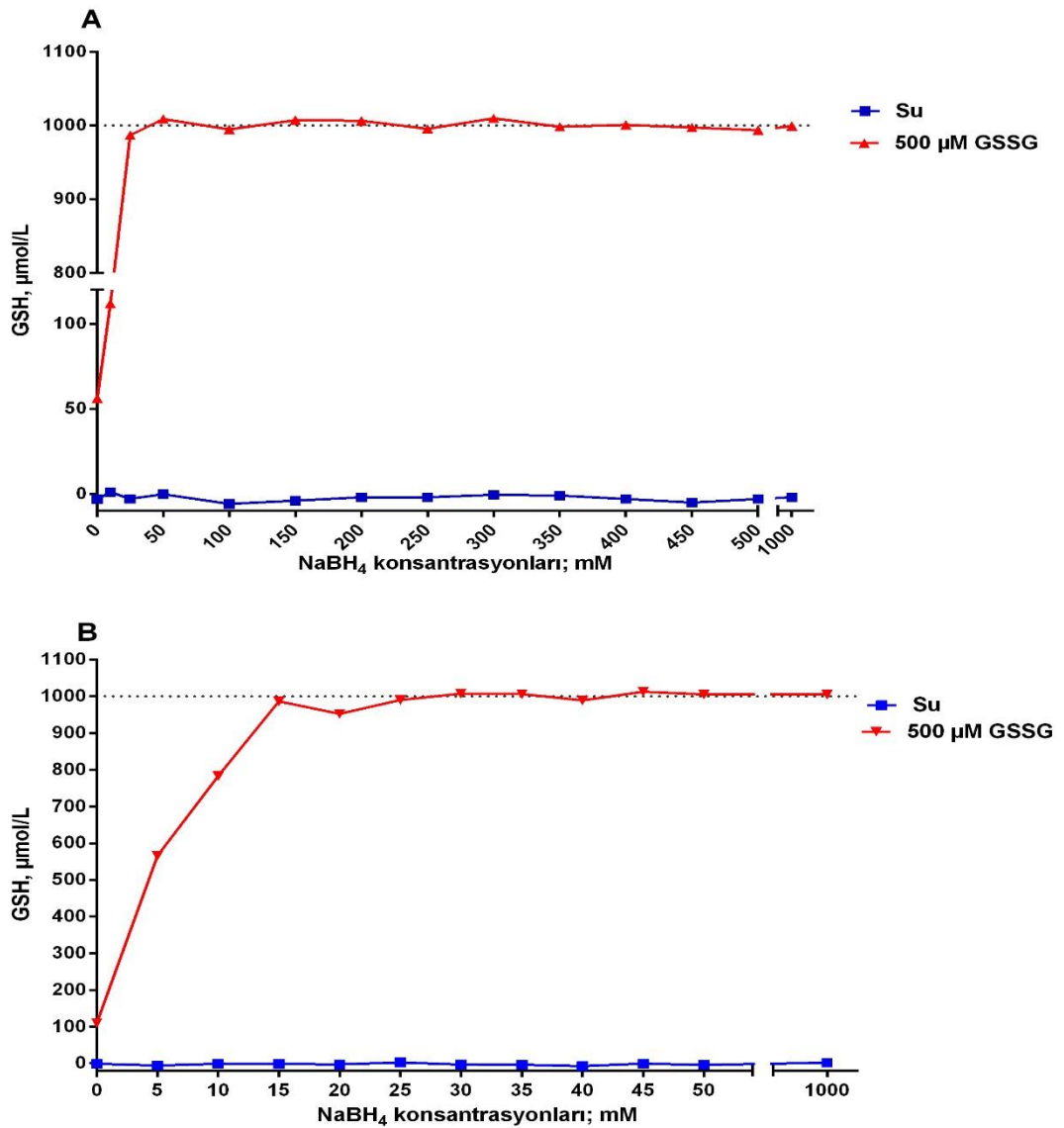


Şekil 3.5. Orijinal yöntem ile modifiye edilmiş yöntemlerinin Blant-Altman fark grafikleri ile karşılaştırılması (X ekseninde orijinal ve modifiye yöntemin ortalama değeri, y eksenine ise orijinal yöntem ile modifiye edilmiş yöntemin fark değerleri koonulmuştur. A: Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

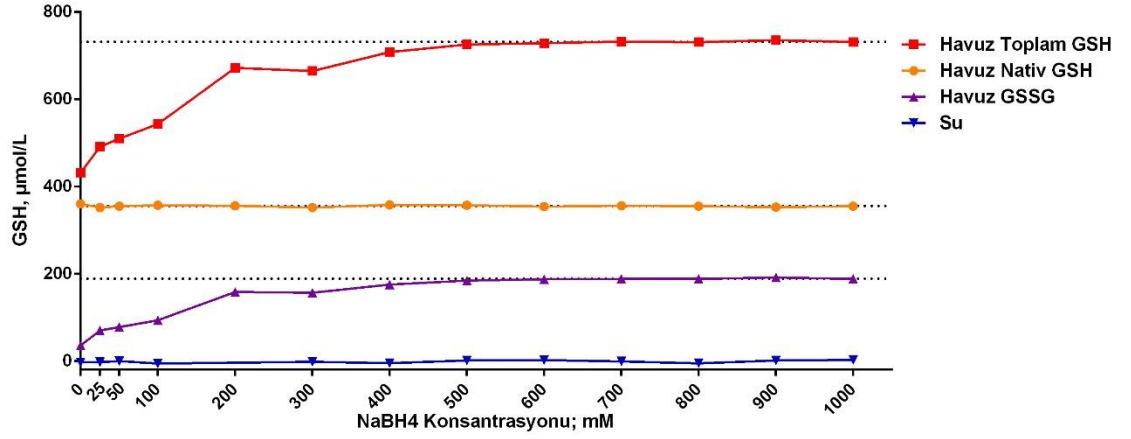
3.3.2. Sodyum borohidrat (NaBH_4) konsantrasyonunun optimizasyonu

NaBH_4 yeni ortaya konan yöntemde GSSG'lerin GSH'lara indirgenmesinde kullanılmaktadır. Ancak NaBH_4 konsantrasyonunun düşük olması durumunda yetersiz redüksiyon görülmektedir; fazla olması durumunda ise ortamdan uzaklaştırmak için daha fazla asit kullanılması gerekmektedir. Optimal NaBH_4 konsantrasyonunu

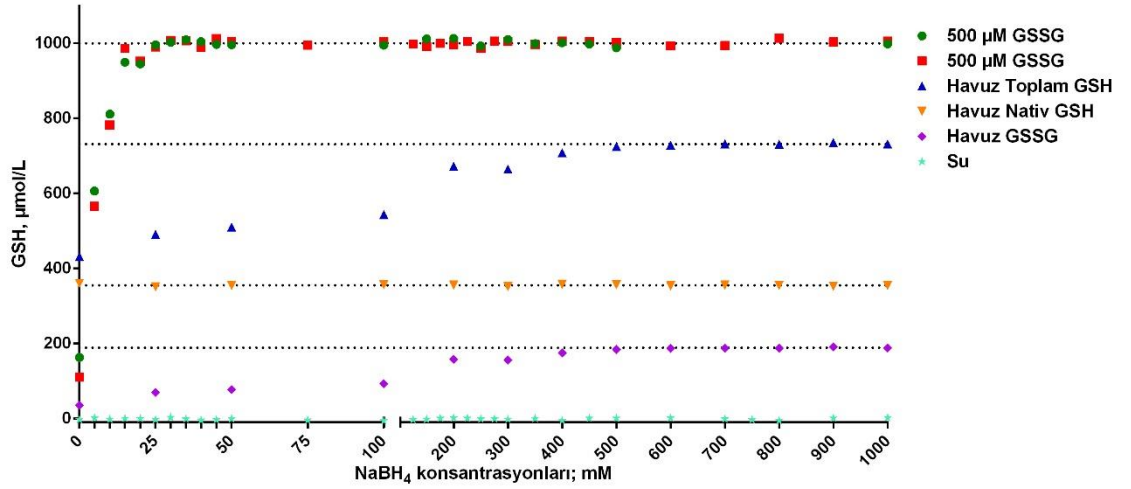
belirmek için hem GSSG çözeltisi hem de hemolizat süpernatant havuzu kullanılmış ve diğer kimyasalların konsantrasyonları sabit tutulurken NaBH_4 konsantrasyonları değiştirilmiştir. GSSG çözeltisi kullanılarak yapılan deneylerde reaksiyon ortamındaki 35 mM gibi düşük düzeylerde NaBH_4 'ün yeterli olduğu gösterilmiştir (Şekil 3.6). Ancak bu konsantrasyon ile hemolizat süpernatantlarından elde edilen havuz örneklerinde yeterli redüksiyon sağlanamamıştır (Şekil 3.7). Bu nedenle her iki matrikste de yeterli indirgemeyi sağlayan ve yeterli güven aralığı oluşturan 700 mM konsantrasyonu optimal NaBH_4 konsantrasyonu olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8).



Şekil 3.6. 500 µM GSSG ve suyun artan konsantrasyonlarda NaBH_4 içeren A reaktifi ile indirgenmesi sonrası ölçülen Toplam GSH düzeyleri

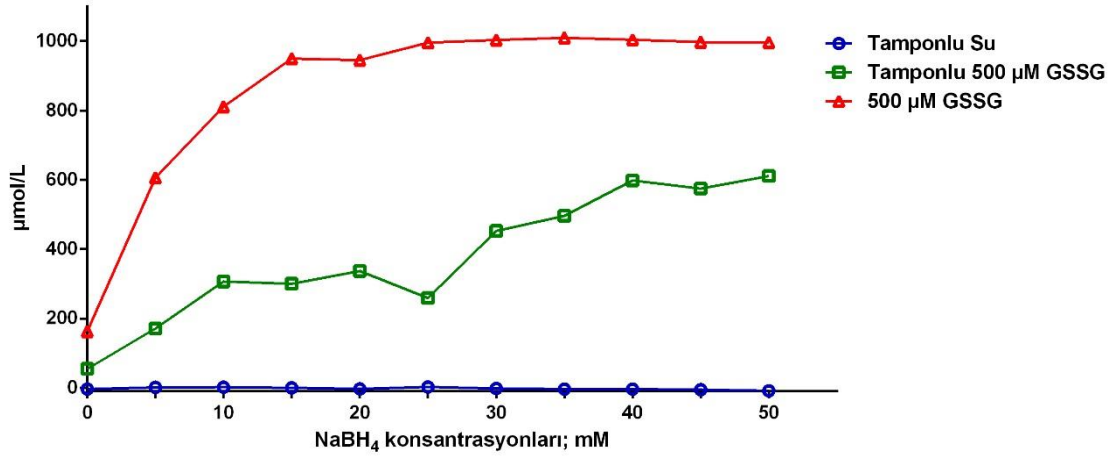


Şekil 3.7. Hemolizat süpernatant havuzu ve suyun Nativ GSH ve artan konsantrasyonlarda NaBH₄ içeren A reaktifi ile indirgenmesi sonrası ölçülen Toplam GSH ve GSSG düzeyleri



Şekil 3.8. Hemolizat süpernatant havuzunun nativ GSH düzeyinin ve hemolizat süpernatant havuzu, 500 µM GSSG ve suyun artan konsantrasyonlarda NaBH₄ içeren A reaktifi ile indirgenmesi sonrası ölçülen toplam GSH düzeyleri

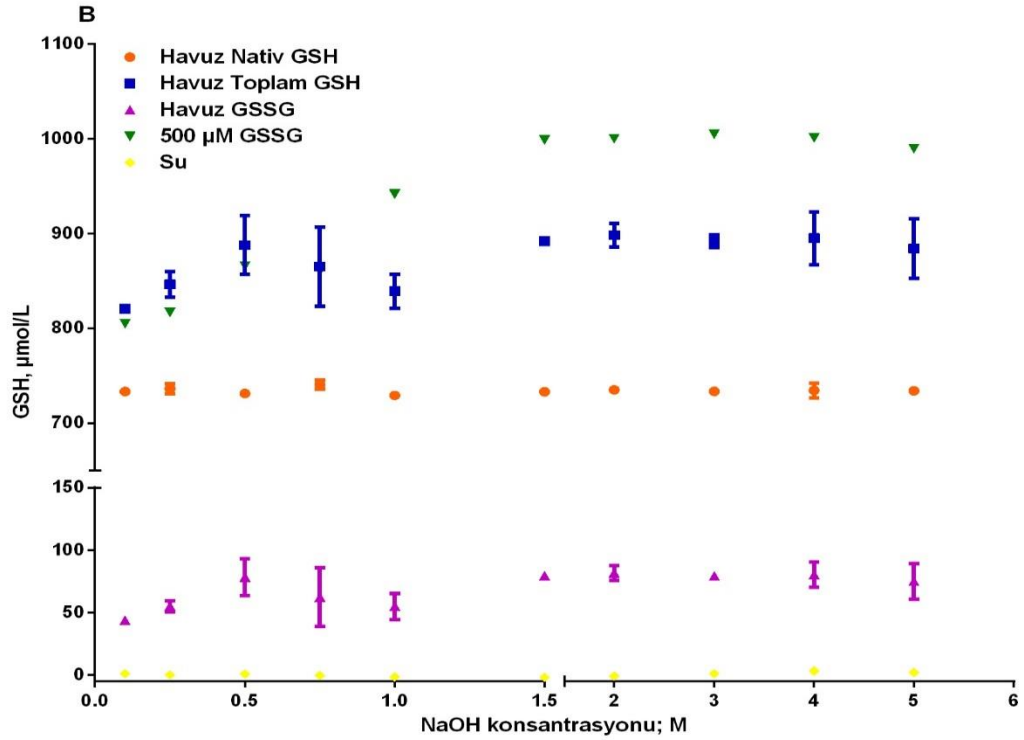
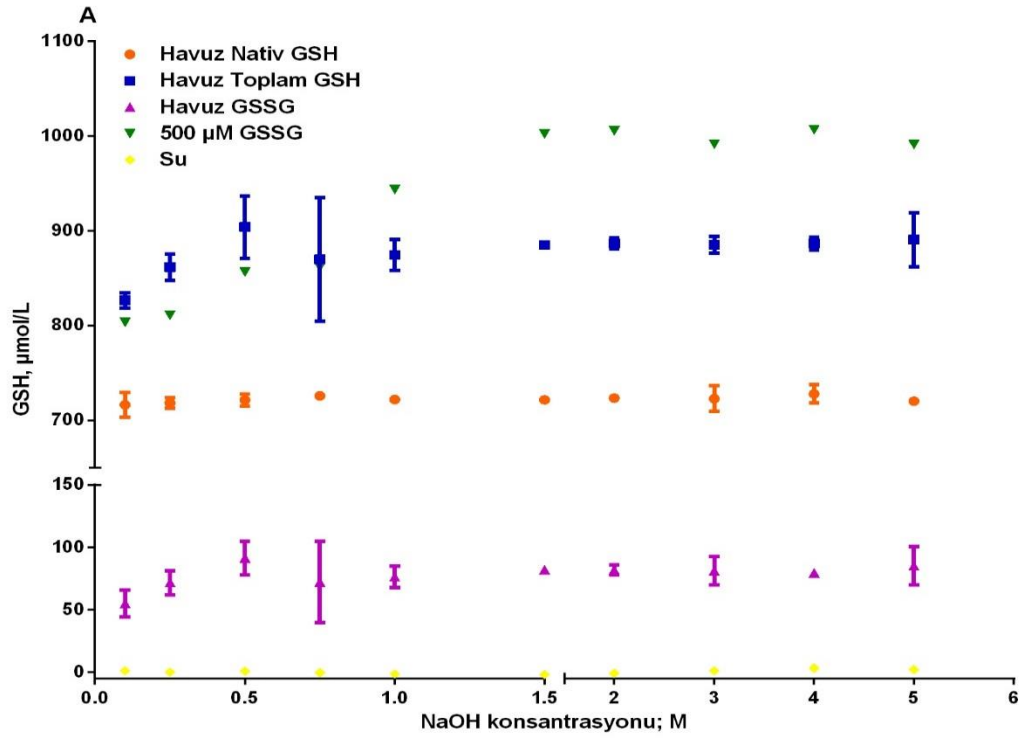
%20'lik TCA solüsyonu ile hazırlanan örnekler NaBH₄ eklenmeden önce reaksiyon ortamının 1 M Tris tamponu (pH: 8,2) ile pH'ı artırılarak A reaktifi eklenmiş ancak bu işlemin redüksiyonu olumsuz etkilediği görülmüştür (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Reaksiyon ortamının A reaktifi eklenmeden tampon ile pH'sının artırılması

3.3.3. Sodyum hidroksit (NaOH) konsantrasyonunun optimizasyonu

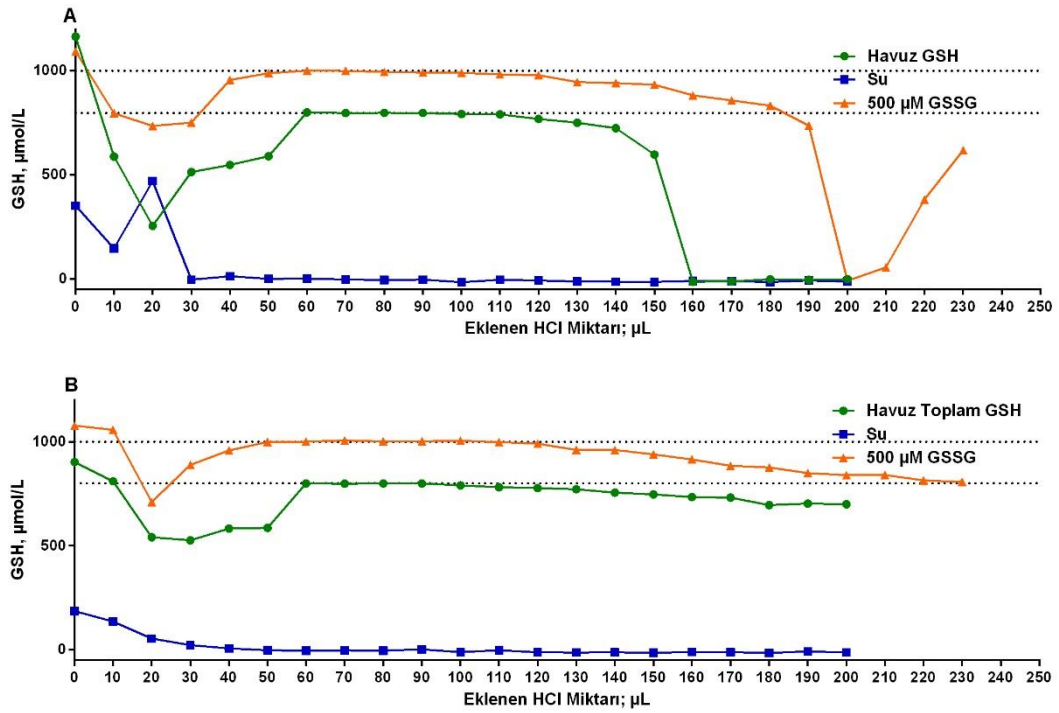
Deproteinizasyon aşamasında kullanılan TCA nedeniyle örnekler aşırı asidik ortamda bulunmaktadır. Bu asiditenin ortadan kaldırılması için A reaktifi içerisine NaOH eklenmiştir. Eklenen NaOH miktarının az olması asidik ortamın pH'sını yeteri kadar yükseltmeyeceği gibi fazla olması da ortamı aşırı alkali yapacaktır. Diğer kimyasalların konsantrasyonları sabit tutularak NaOH konsantrasyonu artırılmış ve hemolizat süpernatant havuzu ve GSSH çözeltisinde optimal olduğu konsantrasyon 1,5 M olarak bulunmuştur (Şekil 3.10). Ayrıca bu konsantrasyonda NaOH eklenmesi ile reaksiyon ortamındaki TCA konsantrasyonları yaklaşık olarak eşit ve 300 mM düzeylerindedir.



Şekil 3.10. Reaktif A içerisindeki NaOH konsantrasyonunun artırılması ile farklı örneklerdeki toplam GSH düzeyleri (Standart hatalar en az 3 farklı ölçümden elde edilmiştir. A: Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem. B: Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

3.3.4. Reaksiyon ortamında kalan fazla sodyum borohidratın (NaBH₄) süpürülmesi için gerekli HCl miktarının optimizasyonu

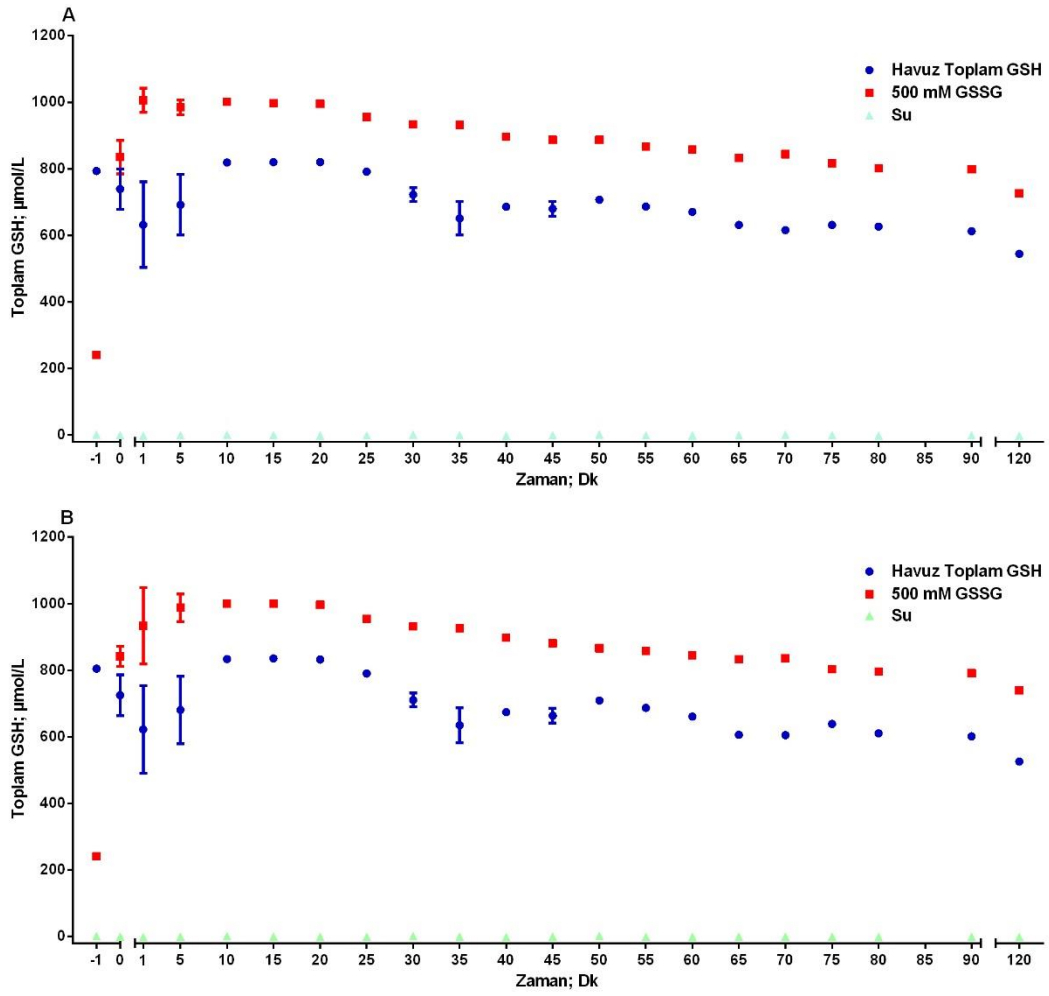
NaBH₄ DTNB'yi TNB'ye indirgemektedir. Bu da yanlış yüksek sonuçlara neden olarak yöntemi olumsuz etkilemektedir. Ayrıca DTNB'nin GSH ile reaksiyona girmesi sonucu TNB molekülünün oluştuğu reaksiyonda oluşan disülfid bağlarını da redüklemektedir. Bu kısır döngü NaBH₄ tamamen tükeninceye kadar devam etmektedir. Bu nedenle GSSG moleküllerinin tamamı indirgendikten sonra ortamda kalan fazla NaBH₄ uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca HCl ile ortamın tekrar asidik yapılması, GSH'a indirgenmiş GSSG'lerin tekrar oksitlenmesi engellenmektedir. Bu amaçla kullanılan HCl'in ortamda kalan tüm NaBH₄'leri uzaklaştırdığından emin olunmalı, kullanılan miktarın da ölçümü etkilemediği ve yeniden oksidasyonu engellediği gösterilmelidir. Şekil 3.11'de de görüldüğü gibi kullanılacak HCl miktarı suyun grafiğine bakılarak en az 30 µL olarak belirlenmiş, ancak bu düzeyin yeniden oksidasyonu engellemediği izlenmiştir. Bu nedenle kullanılması gereken minimum miktar 60 µL olarak belirlenmiştir. Sistemi etkileyen maksimum miktarın ise ölçümde kullanılan Tris tamponu konsantrasyonuna göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir. Ölçümlerde 70 µL, optimal HCl miktarı olarak kabul edilmiştir (kullanılabilecek en az miktarın güvenli bir üst noktası) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Fazla NaBH₄'ü süpürmek için kullanılacak HCl miktarının belirlenmesi (A: Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

3.3.5. Sodyum borohidratın (NaBH₄) süpürülmesi için eklenen HCl'nin eklenme zamanının optimizasyonu

Sodyum borohidratın GSSG'leri GSH'a indirgemektedir. Bu reaksiyonda tüm GSSG'lerin GSH'lara indirgenmesi için belirli bir süre gerekmektedir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra ortamda kalan fazla NaBH₄ HCl ile uzaklaştırılmalıdır. Hidroklorik asitin erken eklenmesi indirgenme reaksiyonunun tamamlanmamasına, geç eklenmesi ise zaman içerisinde NaBH₄'ün kendiliğinden tükenmesi sonucu, GSH'ların tekrar GSSG'ye oksitlenmesine neden olacaktır. Ayrıca asidik ortamın GSH'ları oksitlenmekten koruduğu bilinmektedir. Bu nedenle HCl'nin eklenme zamanı önemlidir. Şekil 3.12'de de görüldüğü gibi HCl'nin eklenme zamanı NaBH₄ eklendikten sonraki 10 ile 20. dakikalar arasında olmalıdır. Ayrıca örneklere HCl'nin erken eklenmesi sonrasında yapılan ölçüm sonuçlarında tutarsızlık görülmüştür (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. NaBH_4 'ü süpürmek için HCl eklenme zamanının belirlenmesi (Standart hatalar 3 farklı örneğin ölçümlerinden elde edilmiştir; A: Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

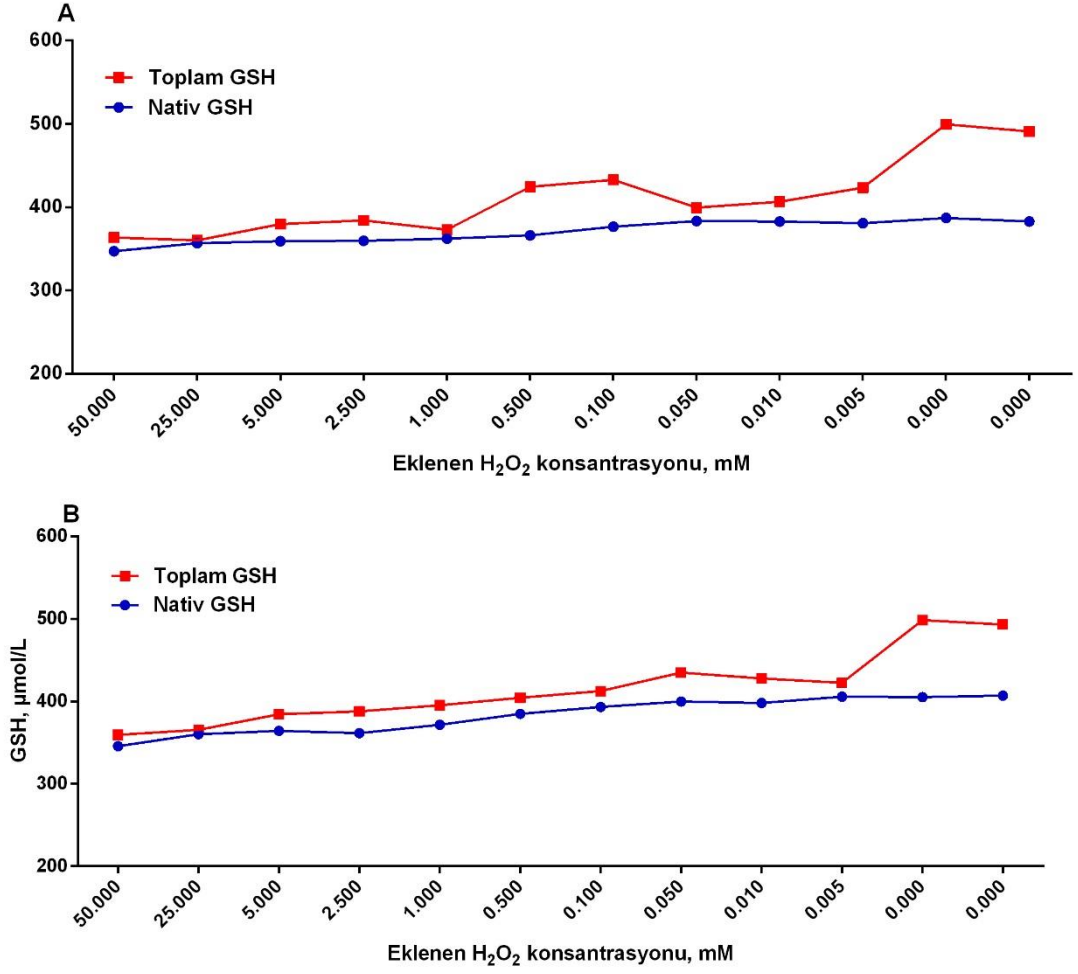
3.4. Asidifikasyonun oksidasyonu önlediğinin gösterilmesi

TCA solüsyonu kullanarak hazırlanan hemolizat süpernatant havuzunun $+4\text{ }^\circ\text{C}$ 'de en az 3 gün, oda ısısında en az 24 saat stabil kaldığı görüldü.

3.5. Oksidasyon ile GSH GSSG değişiminin izlenmesi alışmaları

3.5.1. Tam kan üzerine H₂O₂ eklenmesi ile toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişimin takibi

Tam kan örneklerinden yapılan havuz eşit miktarlarda porsiyonlara ayrıldı. Üzerlerine farklı konsantrasyonlarda eşit miktarda H₂O₂ eklendi ve 3'er saat inkübe edildi. Bu işlem sonucunda toplam GSH düzeylerinin sabit kalması beklenirken nativ GSH düzeylerinin azalması beklendi. Ancak H₂O₂'nin tam kan örnekleri üzerinde Şekil 3.13'te de görüldüğü gibi dozdan bağımsız bir etkisi olmuştur. Bu dozdan bağımsız etkinin, tam kan örnekleri içerisinde bulunan birçok antioksidan molekülden kaynaklandığı dşnld.



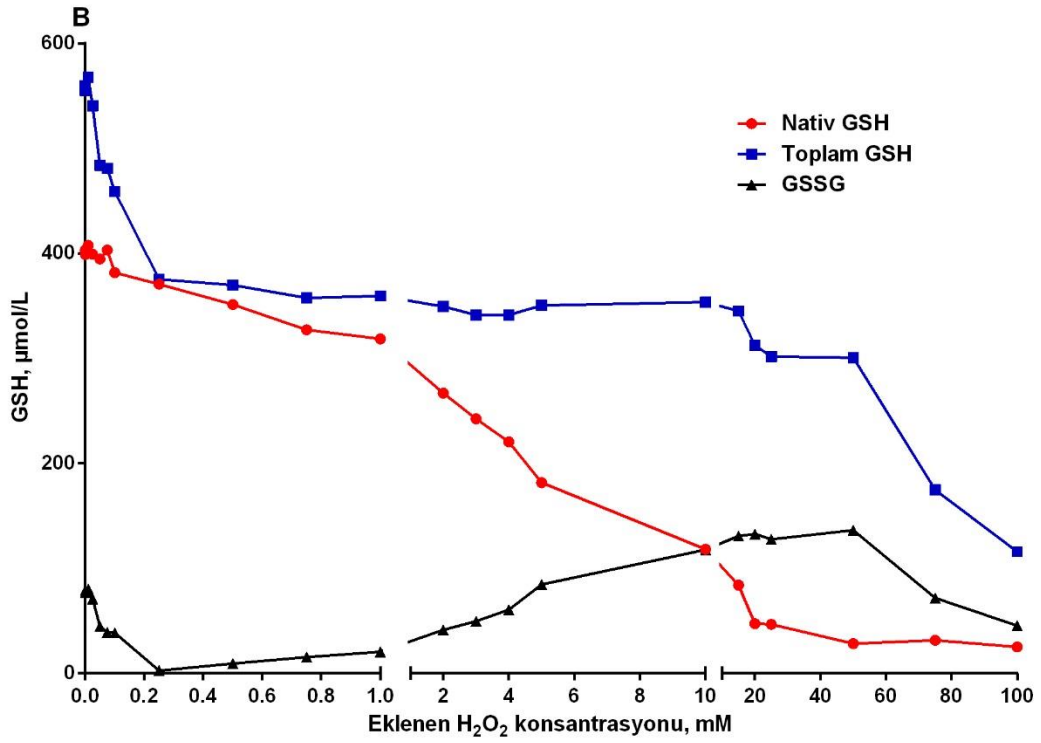
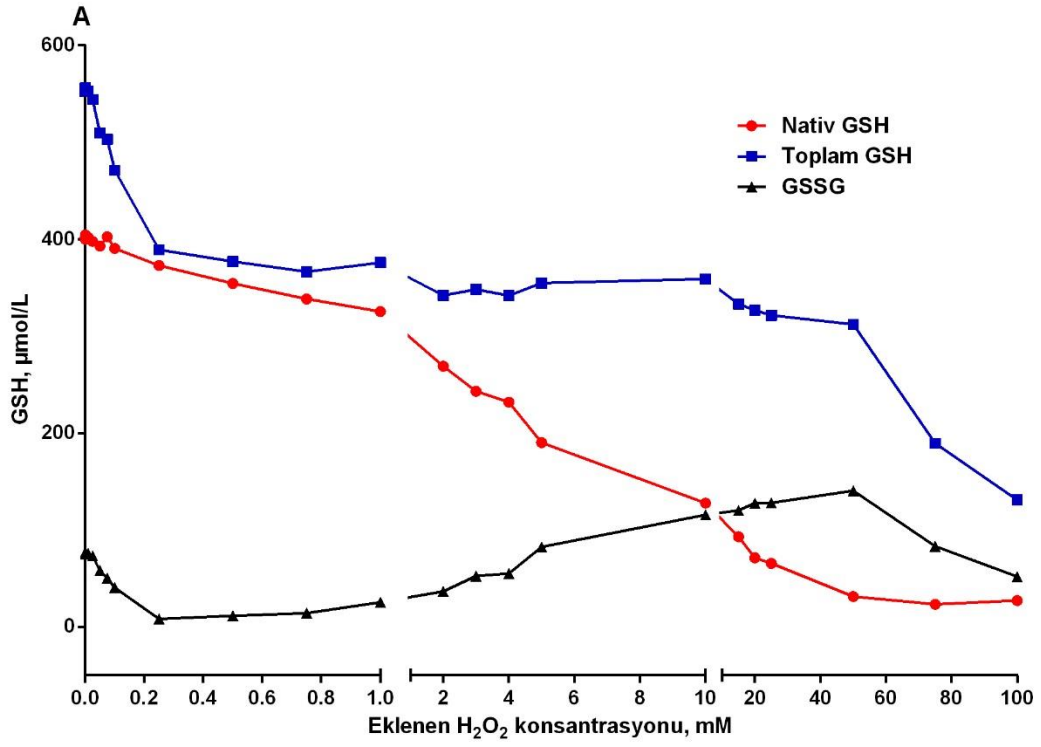
Şekil 3.13. Tam kan üzerine artan konsantrasyonlarda H₂O₂ eklenmesi sonucu toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişim (A: Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

3.5.2. Hemolizat süpernatant havuzuna H₂O₂ eklenmesi ile toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişimin takibi

Hemolizat süpernatantlarından yapılan havuz eşit miktarlarda porsiyonlara ayrıldı. Üzerlerine farklı konsantrasyonlarda eşit miktarda H₂O₂ eklendi ve 3'er saat inkübe edildi. Bu işlem sonucunda toplam GSH düzeylerinin sabit kalması beklenirken, nativ GSH düzeylerinin azalması beklendi. Ancak H₂O₂'nin hemolizat süpernatant örnekleri üzerinde Şekil 3.14'te de görüldüğü gibi 0,25 mM düzeyine kadar dozdan bağımsız bir

etkisinin olduğu görüldü. Bu durumun hemolizat süpernatant içerisinde bulunan TCA solüsyonunun, örneği asidik yapması ve GSH'ların oksidasyonunu engellemesi sonucu olduğu düşünöldü. Ortamda bulunan düşük konsantrasyonlardaki H₂O₂'nin; GSH'ları oksitleyemediği, GSSG'leri sulfoksit, sülfon gibi ileri oksidasyon ürünlerine çevirdiği düşünöldü. 0,25 mM ile 50 mM arasında beklenildiği gibi toplam GSH seviyeleri sabit kalırken, nativ GSH seviyeleri düştü. 50 mM üzerindeki konsantrasyonlarda ise hem GSH'ları hem de GSSG'leri ileri oksidasyon ürünlerine çevirdiği düşünöldü (Şekil 3.14).

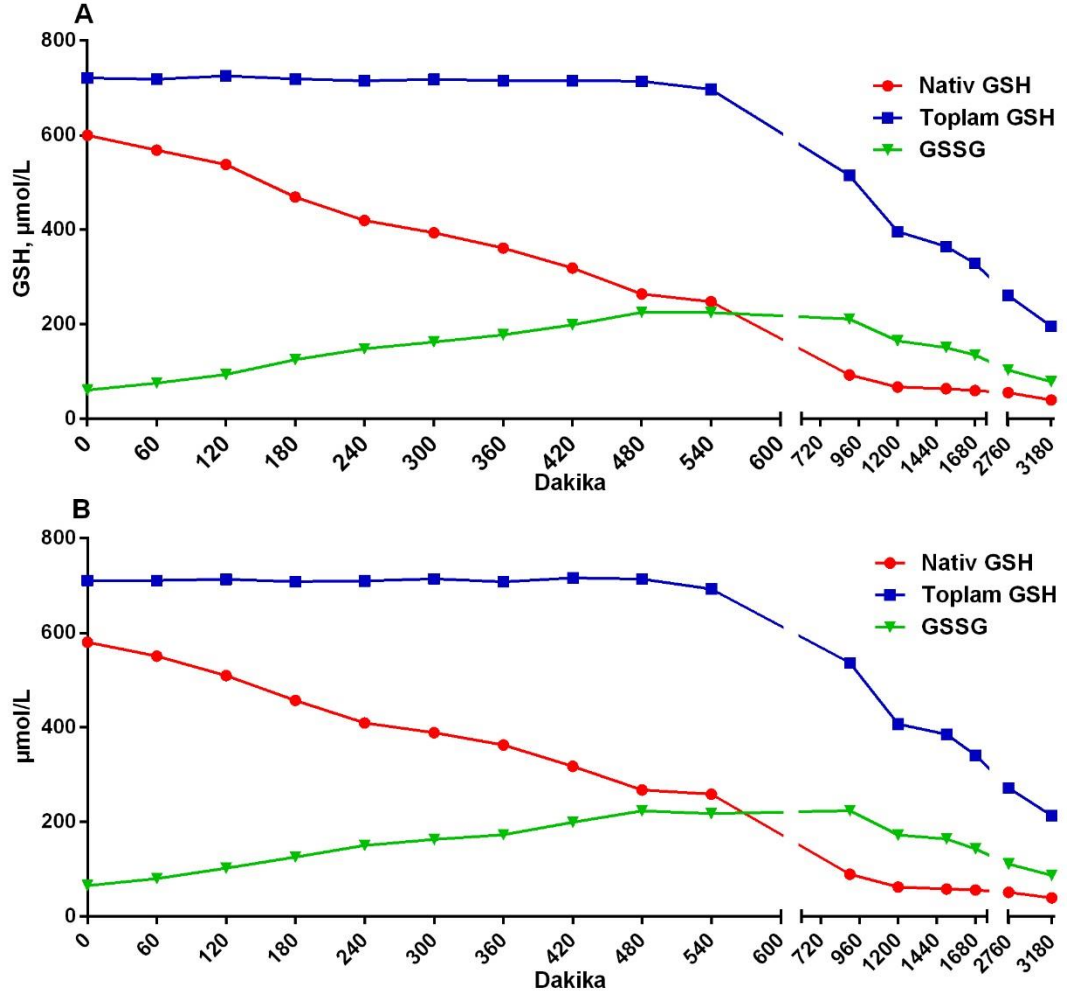




Şekil 3.14. Hemolizat süpernatant havuzu üzerine artan konsantrasyonlarda H_2O_2 eklenmesi sonucu toplam GSH, nativ GSH ve GSSG düzeylerindeki değişim (A: Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

3.5.3. Tam kan örneklerinden yapılan numune havuzunun 38 °C’de oto-oksidasyona bırakılması sonucu toplam GSH ve nativ GSH düzeylerindeki değişimin takibi

Tam kan örneklerinden yapılan havuz eşit miktarlarda porsiyonlara ayrıldı ve önceden 38 °C’ye ısıtılmış benmariye konuldu. 0. dk örneği benmariye konulmadan ölçüldü. Diğer örnekler Şekil 3.15’de görüldüğü gibi farklı zamanlarda çıkarılarak ölçüm yapıldı. 38 °C’de kendi kendine okside olması beklenen örneklerde toplam GSH düzeylerinin sabit kalması beklenirken, nativ GSH düzeylerinin azalması sonucu GSSG düzeylerinde artış beklendi. Şekil 3.15’te de görüldüğü gibi, 540. dk’ya kadar beklendiği gibi toplam GSH düzeyleri sabit kalırken nativ GSH düzeylerinde azalma ve GSSG miktarlarında artış görüldü. 540. dk sonrasında hem toplam GSH hem de nativ GSH düzeylerinde düşüş gözlemlendi. GSSG düzeyleri bir süre daha sabit seyretti ancak sonrasında GSSG düzeyleri de düştü. Bu durumun 540. dk itibarıyla toplam GSH düzeylerindeki düşüş nedeniyle, artık irreversible oksidasyon ürünlerinin oluşması nedeniyle olduğu söylenebilir. Irreversible oksidasyon evresi ise; GSSG düzeylerinin artması nedeniyle GSH’tan GSSG oluşumunun ileri oksidasyon ürünlerinin oluşumundan daha fazla olduğu dönem (540. dk ile 960. dk arası) ve sonrasında GSSG düzeylerindeki düşüş nedeniyle ileri oksidasyon ürünlerinin ağır bastığı dönem (960. dk sonrası) olmak üzere iki aşamalı bir evre olduğu görülmüştür (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. Tam kan örneklerinden yapılan havuzun 38 °C’de oto-oksidasyona bırakılması sonucu zamana karşı toplam GSH, Nativ GSH ve GSSG düzeylerindeki değişimin takibi (A: Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntem, B: Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntem)

3.6. Geliştirilen yöntemlerin performans değerlendirmeleri

3.6.1. Doğrusallığın (linearite) gösterilmesi

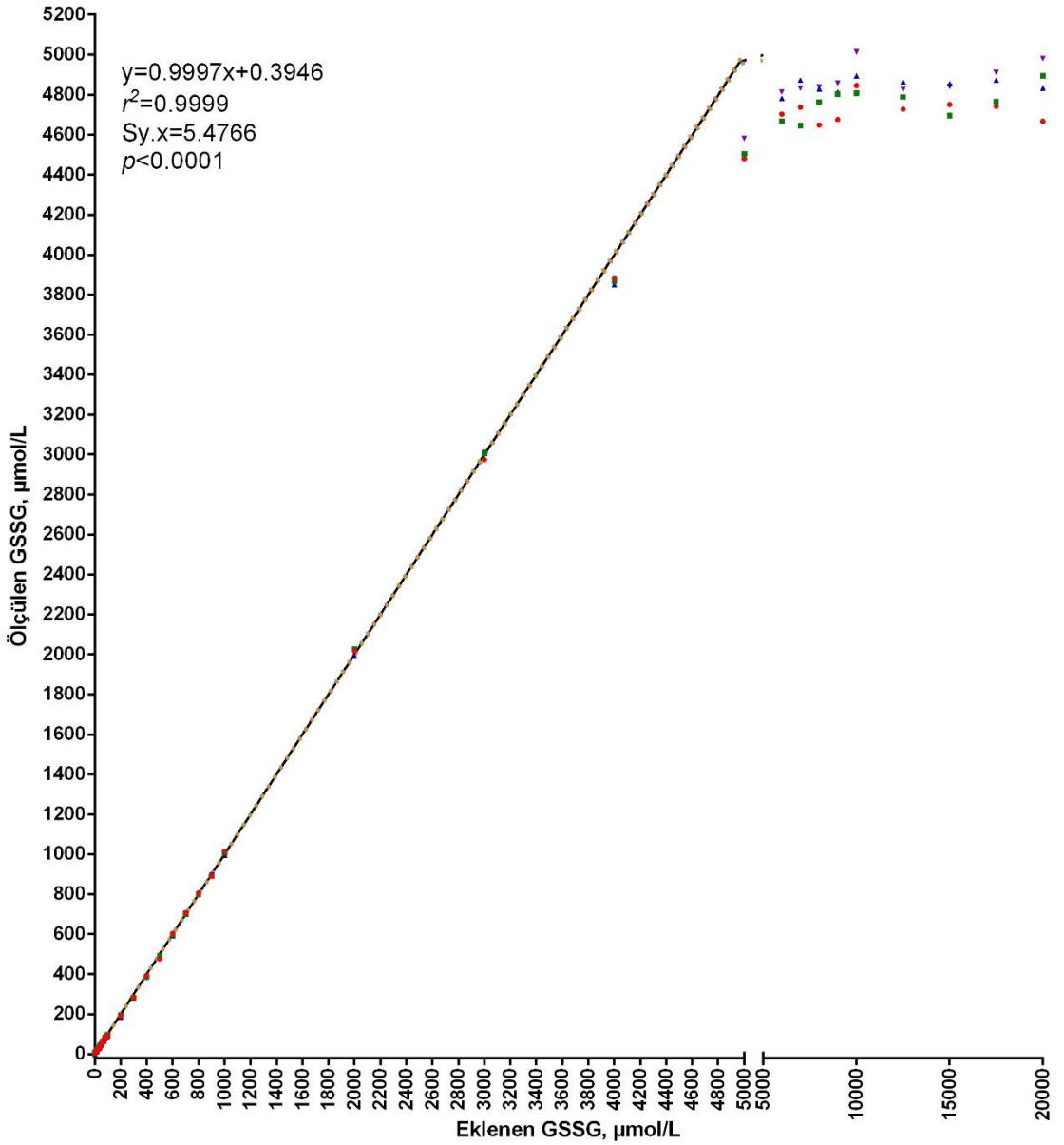
3.6.1.1. Artan GSSG çözeltisi ile doğrusallığın (linearite) belirlenmesi

GSSG solüsyonun seri dilüsyonuyla yapıldı. Toplam GSH yönteminde linearitenin üst limiti 3 mmol/L GSSG (6 mmol/L GSH) olarak bulundu (Şekil 3.16). Regresyon analizinin doğru denklemi $y = 0,3946 + 0,9997x$ olarak hesaplandı.

Korelasyon r değeri 0,9999 ($p < 0,001$) idi. Tablo 3.1’de yöntemin doğrusallık verileri görülmektedir.

Tablo 3.1. Yeni geliştirilen yöntemin GSSG solüsyonunun seri dilüsyonu ile yapılan doğrusallık performansı verileri

Parametre		P değeri
Regresyon Formülü	$y = 0,3946 + 0,9997x$	
Kesim (Intercept, a)	$0,3946 \pm 0,8483$	0,6440
Eğim (Slope, b) \pm Eğimin standart hatası (S_b)	$0,9997 \pm 0,001445$	<0,0001
Korelasyon katsayısı (correlation coefficient, r)	0,9999	<0,0001
Determinasyon katsayısı (Coefficient of determination, r^2)	0,9999	<0,0001
Residuallerin standart sapması (Residual standart deviation, $S_{y.x}$)	5,4766	

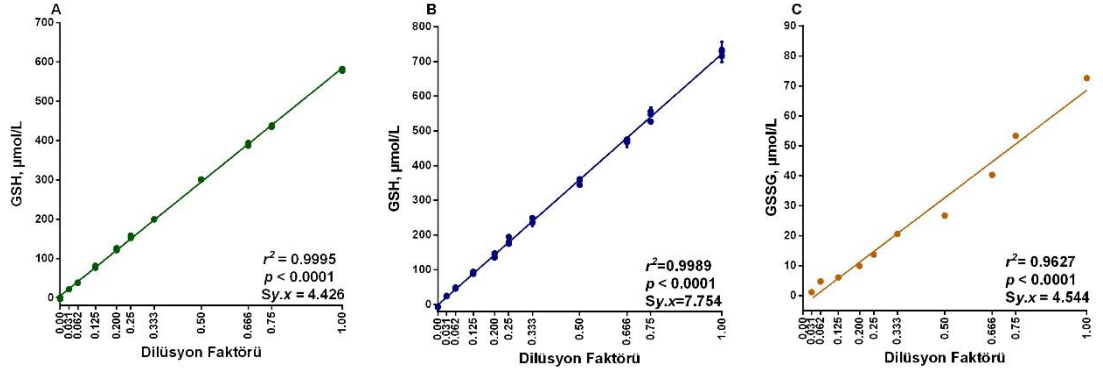


Şekil 3.16. GSSG solüsyonunu seri dilüsyonu ile yeni yöntemin doğrusallığının gösterilmesi

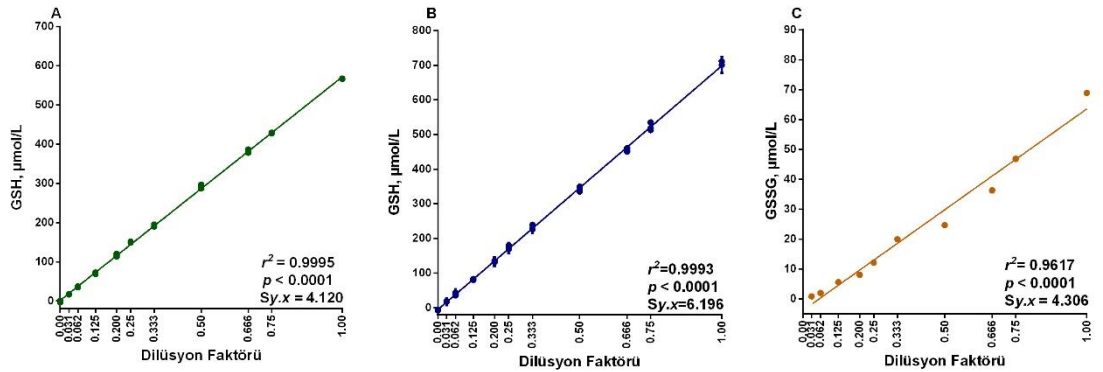
3.6.1.2. Hemolizatın süpernatant havuzu ile doğrusallığın (linearite) belirlenmesi

Hemolizat süpernatant havuzunun seri dilüsyonuyla yapıldı. Toplam GSH ve nativ GSH düzeylerinin r^2 değerleri Tris tamponun 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde 0,99'un üzerindeyken GSSG sonuçlarının r^2 değerleri ise her iki

yöntemde de 0,96'ın üzerindedir ve tüm veriler için p değerleri 0,0001 düzeyinin altında olduğu görüldü (Şekil 3.17-A).



Şekil 3.17-A. Hemolizat süpernatant havuzunun seri dilüsyonu ile Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemin doğrusallığının gösterilmesi (A. Nativ GSH, B. Toplam GSH, C. GSSG düzeylerini göstermektedir)



Şekil 3.17-B. Hemolizat süpernatant havuzunun seri dilüsyonu ile Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemin doğrusallığının gösterilmesi (A. Nativ GSH, B. Toplam GSH, C. GSSG düzeylerini göstermektedir)

3.6.2. Yöntemlerin gözlemlenebilirlik sınırları (limit of detection)

Sıfır kalibratör değerlerinin 25 ölçüm ortalaması + 3 standart sapma şeklinde tanımlanan deteksiyon limiti Toplam GSH yöntemleri için Tris Tamponunun 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde sırasıyla 3,14 ve 4,26 $\mu\text{mol/L}$ 'ydi. Nativ GSH yöntemi için de yine sırasıyla 2,96 ve 3,67 $\mu\text{mol/L}$ idi.

3.6.3. Analitik sensitivite çalışması

Kalibrasyon eğrisinin eğiminden yararlanılarak hesaplanan tiyol yönteminin sensitivitesi Tris Tamponun 500 olarak modifiye edildiği yöntemde $10,12 \times 10^{-4}$ Absorbans / Miktar, $[A \times (\mu\text{M})^{-1}]$ iken; Tris Tamponun 1000 olarak modifiye edildiği yöntemde $10,29 \times 10^{-4}$ Absorbans / Miktar, $[A \times (\mu\text{M})^{-1}]$ olarak bulunmuştur.

3.6.4. Yöntemlerin analitik geri kazanımları

3.6.4.1. Toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları

Toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları hemolizat süpernatant havuz örnekleri üzerine içerisinde sırasıyla 300, 60 ve 30 $\mu\text{mol/L}$ GSSG olacak şekilde GSSG stok çözeltilerinden eklenerek Tris tamponun 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde hesaplandı. 300 $\mu\text{mol/L}$ GSSG düzeyinin ortalama % geri kazanımları; sırasıyla $105,9 \pm 5,3$ ve $105,5 \pm 5,7$, 60 $\mu\text{mol/L}$ GSSG düzeyinin ortalama % geri kazanımları; sırasıyla $103,8 \pm 2,9$ ve $100,2 \pm 2,4$ ve 30 $\mu\text{mol/L}$ GSSG düzeyinin ortalama % geri kazanımları ise; sırasıyla $95,4 \pm 7,4$ ve $93,1 \pm 4,5$ idi (Tablo 3.2-A, B, C, D).

Tablo 3.2-A. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG ortalama geri kazanımları

Havuz Toplam GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım	% Bağlı Standart Sapma
454,3	300	317,7 \pm 15,8	105,9 \pm 5,3	5,0
454,3	60	62,3 \pm 1,8	103,8 \pm 2,9	2,8
454,3	30	28,6 \pm 2,2	95,4 \pm 7,4	7,7

Tablo 3.2-B. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG ortalama geri kazanımları

Havuz Toplam GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım	% Bağlı Standart Sapma
459,8	300	316,4 \pm 17,2	105,5 \pm 5,7	5,4
459,8	60	60,1 \pm 1,5	100,2 \pm 2,4	2,4
459,8	30	27,9 \pm 1,4	93,1 \pm 4,5	4,9

Tablo 3.2-C. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları

	Havuz Toplam GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen Miktar - GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	Toplam Ölçülen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım
1.Örnek 1.ölçüm	461,7	300,0	1144,5	341,4	113,8
1.Örnek 2.ölçüm	461,7	300,0	1121,3	329,8	109,9
1.Örnek 3.ölçüm	461,7	300,0	1112,5	325,4	108,5
2.Örnek 1.ölçüm	451,2	300,0	1099,8	324,3	108,1
2.Örnek 2.ölçüm	451,2	300,0	1105,1	327,0	109,0
2.Örnek 3.ölçüm	451,2	300,0	1080,1	314,5	104,8
3.Örnek 1.ölçüm	450,0	300,0	1057,5	303,8	101,3
3.Örnek 2.ölçüm	450,0	300,0	1044,4	297,2	99,1
3.Örnek 3.ölçüm	450,0	300,0	1041,5	295,8	98,6
Ortalama	454,3	300,0	1089,6	317,7	105,9
Standart Sapma	5,6		36,0	15,8	5,3
% Bağlı Standart Sapma					5,0
1.Örnek 1.ölçüm	461,7	60,0	588,1	63,2	105,3
1.Örnek 2.ölçüm	461,7	60,0	586,9	62,6	104,3
1.Örnek 3.ölçüm	461,7	60,0	582,1	60,2	100,3
2.Örnek 1.ölçüm	451,2	60,0	578,7	63,8	106,3
2.Örnek 2.ölçüm	451,2	60,0	582,6	65,7	109,5
2.Örnek 3.ölçüm	451,2	60,0	575,2	62,0	103,4
3.Örnek 1.ölçüm	450,0	60,0	571,7	60,9	101,4
3.Örnek 2.ölçüm	450,0	60,0	571,9	61,0	101,6
3.Örnek 3.ölçüm	450,0	60,0	571,9	61,0	101,6
Ortalama	454,3	60,0	578,8	62,3	103,8
Standart Sapma	5,6		6,5	1,8	2,9
% Bağlı Standart Sapma					2,8
1.Örnek 1.ölçüm	461,7	30,0	512,5	25,4	84,6
1.Örnek 2.ölçüm	461,7	30,0	516,7	27,5	91,6
1.Örnek 3.ölçüm	461,7	30,0	516,5	27,4	91,3
2.Örnek 1.ölçüm	451,2	30,0	515,3	32,1	106,9
2.Örnek 2.ölçüm	451,2	30,0	512,0	30,4	101,4
2.Örnek 3.ölçüm	451,2	30,0	513,4	31,1	103,7
3.Örnek 1.ölçüm	450,0	30,0	508,0	29,0	96,7
3.Örnek 2.ölçüm	450,0	30,0	505,8	27,9	93,1
3.Örnek 3.ölçüm	450,0	30,0	503,3	26,7	88,9
Ortalama	454,3	30,0	511,5	28,6	95,4
Standart Sapma	5,6		4,8	2,2	7,4
% Bağlı Standart Sapma					7,7

Tablo 3.2-D. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları

	Havuz Toplam GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklene n Miktar - GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	Toplam Ölçülen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSSG ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım
1.Örnek 1.ölçüm	464,7	300,0	1140,4	337,9	112,6
1.Örnek 2.ölçüm	464,7	300,0	1141,6	338,5	112,8
1.Örnek 3.ölçüm	464,7	300,0	1124,2	329,8	109,9
2.Örnek 1.ölçüm	458,1	300,0	1101,0	321,5	107,2
2.Örnek 2.ölçüm	458,1	300,0	1092,6	317,3	105,8
2.Örnek 3.ölçüm	458,1	300,0	1083,4	312,7	104,2
3.Örnek 1.ölçüm	456,6	300,0	1055,3	299,4	99,8
3.Örnek 2.ölçüm	456,6	300,0	1049,0	296,2	98,7
3.Örnek 3.ölçüm	456,6	300,0	1045,0	294,2	98,1
Ortalama	459,8	300,0	1092,5	316,4	105,5
Standart Sapma	3,7	0,0	37,7	17,2	5,7
% Bağlı Standart Sapma					5,4
1.Örnek 1.ölçüm	464,7	60,0	586,7	61,0	101,7
1.Örnek 2.ölçüm	464,7	60,0	586,3	60,8	101,4
1.Örnek 3.ölçüm	464,7	60,0	583,6	59,5	99,1
2.Örnek 1.ölçüm	458,1	60,0	583,1	62,5	104,2
2.Örnek 2.ölçüm	458,1	60,0	580,0	61,0	101,6
2.Örnek 3.ölçüm	458,1	60,0	577,7	59,8	99,7
3.Örnek 1.ölçüm	456,6	60,0	571,0	57,2	95,3
3.Örnek 2.ölçüm	456,6	60,0	576,4	59,9	99,8
3.Örnek 3.ölçüm	456,6	60,0	575,9	59,7	99,4
Ortalama	459,8	60,0	580,1	60,1	100,2
Standart Sapma	3,7	0,0	5,3	1,5	2,4
% Bağlı Standart Sapma					2,4
1.Örnek 1.ölçüm	464,7	30,0	518,1	26,7	89,1
1.Örnek 2.ölçüm	464,7	30,0	519,9	27,6	92,1
1.Örnek 3.ölçüm	464,7	30,0	517,9	26,6	88,7
2.Örnek 1.ölçüm	458,1	30,0	518,8	30,4	101,2
2.Örnek 2.ölçüm	458,1	30,0	516,6	29,3	97,5
2.Örnek 3.ölçüm	458,1	30,0	515,3	28,6	95,3
3.Örnek 1.ölçüm	456,6	30,0	508,9	26,2	87,2
3.Örnek 2.ölçüm	456,6	30,0	512,1	27,8	92,5
3.Örnek 3.ölçüm	456,6	30,0	513,3	28,4	94,5
Ortalama	459,8	30,0	515,7	27,9	93,1
Standart Sapma	3,7	0,0	3,6	1,4	4,5
% Bağlı Standart Sapma					4,9

3.6.4.2. Nativ ve toplam GSH yöntemlerinin GSH geri kazanımları

Toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH geri kazanımları hemolizat süpernatant havuz örnekleri üzerine içerisinde sırasıyla 300 ve 60 $\mu\text{mol/L}$ GSH olacak şekilde GSH stok çözeltilerinden eklenerek Tris tamponun 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde hesaplandı.

Toplam GSH yönteminin GSSG geri kazanımları hemolizat süpernatant havuz örnekleri üzerine içerisinde sırasıyla 300, 60 ve 30 $\mu\text{mol/L}$ GSSG olacak şekilde GSSG stok çözeltilerinden eklenerek Tris tamponun 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde hesaplandı.

Toplam GSH yöntemlerinin 300 $\mu\text{mol/L}$ GSH düzeyinin ortalama % geri kazanımları; tris tamponunu 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde sırasıyla $95,9 \pm 2,6$ ve $97,4 \pm 1,0$ iken, 60 $\mu\text{mol/L}$ GSH düzeyinde; sırasıyla $98,7 \pm 2,2$ ve $101,1 \pm 6,0$ idi (Tablo 3.3-A, B, C, D).

Nativ GSH yöntemlerinin 300 $\mu\text{mol/L}$ GSH düzeyinin ortalama % geri kazanımları; Tris tamponunu 500 ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde sırasıyla $95,9 \pm 0,9$ ve $99,9 \pm 0,7$ iken, 60 $\mu\text{mol/L}$ GSH düzeyinde; sırasıyla $97,2 \pm 6,2$ ve $100,5 \pm 1,7$ idi (Tablo 3.3-A, B, C, D).

Tablo 3.3-A. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları

	Havuz GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSH ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım	% Bağlı Standart Sapma
Nativ GSH	474,2	300	$287,8 \pm 2,6$	$95,9 \pm 0,9$	0,9
Nativ GSH	474,2	60	$55,0 \pm 2,7$	$97,2 \pm 6,2$	6,4
Toplam GSH	583,4	300	$287,6 \pm 7,7$	$95,9 \pm 2,6$	2,7
Toplam GSH	583,4	60	$69,2 \pm 1,3$	$98,7 \pm 2,2$	2,2

Tablo 3.3-B. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları

	Havuz GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSH ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım	% Bağlı Standart Sapma
Nativ GSH	502,0	300	299,7 \pm 2,0	99,9 \pm 0,7	0,7
Nativ GSH	502,0	60	60,3 \pm 1,0	100,5 \pm 1,7	1,7
Toplam GSH	572,8	300	272,2 \pm 3,0	97,4 \pm 1,0	1,0
Toplam GSH	572,8	60	62,0 \pm 7,5	101,1 \pm 6,0	5,9

Tablo 3.3-C. Tris tamponun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları

	Havuz GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Toplam Ölçülen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSH ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım
Nativ GSH 1.Örnek	474,2	300,0	764,4	290,2	96,7
Nativ GSH 2.Örnek	474,2	300,0	762,4	288,2	96,1
Nativ GSH 3. Örnek	474,2	300,0	759,2	285,0	95,0
Ortalama	474,2	300,0	762,0	287,8	95,9
Standart Sapma	0,0	0,0	2,6	2,6	0,9
% Bağlı Standart Sapma					0,9
Nativ 1.Örnek	474,2	60,0	536,5	62,3	103,8
Nativ 2.Örnek	474,2	60,0	529,1	54,9	91,5
Nativ 3. Örnek	474,2	60,0	531,9	57,7	96,2
Ortalama	474,2	60,0	532,5	58,3	97,2
Standart Sapma	0,0	0,0	3,7	3,7	6,2
% Bağlı Standart Sapma					6,4
Toplam 1.Örnek	583,4	300,0	866,8	283,5	94,5
Toplam 2.Örnek	583,4	300,0	866,2	282,8	94,3
Toplam 3. Örnek	583,4	300,0	879,8	296,5	98,8
Ortalama	583,4	300,0	871,0	287,6	95,9
Standart Sapma	0,0	0,0	7,7	7,7	2,6
% Bağlı Standart Sapma					2,7
Toplam 1.Örnek	583,4	60,0	644,0	60,7	101,1
Toplam 2.Örnek	583,4	60,0	642,2	58,9	98,1
Toplam 3. Örnek	583,4	60,0	641,6	58,2	97,0
Ortalama	583,4	60,0	642,6	59,2	98,7
Standart Sapma	0,0	0,0	1,3	1,3	2,2
% Bağlı Standart Sapma					2,2

Tablo 3.3-D. Tris tamponun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam ve nativ GSH yöntemlerinin GSH ortalama geri kazanımları

	Havuz GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Eklenen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Toplam Ölçülen GSH ($\mu\text{mol/L}$)	Geri Kazanılan GSH ($\mu\text{mol/L}$)	% Geri Kazanım
Nativ GSH 1.Örnek	502,0	300,0	801,0	299,1	99,7
Nativ GSH 2.Örnek	502,0	300,0	804,0	302,0	100,7
Nativ GSH 3. Örnek	502,0	300,0	800,1	298,2	99,4
Ortalama	502,0	300,0	801,7	299,7	99,9
Standart Sapma	0,0	0,0	2,0	2,0	0,7
% Bağıl Standart Sapma					0,7
Nativ 1.Örnek	502,0	60,0	561,8	59,8	99,6
Nativ 2.Örnek	502,0	60,0	561,6	59,6	99,4
Nativ 3. Örnek	502,0	60,0	563,4	61,4	102,4
Ortalama	502,0	60,0	562,3	60,3	100,5
Standart Sapma	0,0	0,0	1,0	1,0	1,7
% Bağıl Standart Sapma					1,7
Toplam 1.Örnek	572,8	300,0	865,1	292,3	97,4
Toplam 2.Örnek	572,8	300,0	862,0	289,2	96,4
Toplam 3. Örnek	572,8	300,0	868,0	295,2	98,4
Ortalama	572,8	300,0	865,0	292,2	97,4
Standart Sapma	0,0	0,0	3,0	3,0	1,0
% Bağıl Standart Sapma					1,0
Toplam 1.Örnek	572,8	60,0	634,2	61,4	102,4
Toplam 2.Örnek	572,8	60,0	636,6	63,8	106,3
Toplam 3. Örnek	572,8	60,0	629,6	56,7	94,6
Ortalama	572,8	60,0	633,5	60,6	101,1
Standart Sapma	0,0	0,0	3,6	3,6	6,0
% Bağıl Standart Sapma					5,9

3.6.5. Yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri

3.6.5.1. GSSG çözeltisinin kullanıldığı tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçları

100 μM ve 500 μM GSSG solüsyonları iki düzey yapılmıştır.

A. 500 µM GSSG çözeltisi ile yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri

500 µM GSSG ile yöntemlerin 20 gün boyunca ölçülen GSSG sonuçları Tablo 3.4-A2, B2’de ve Şekil 3.18-A, B’de görülmektedir. 500 µM GSSG düzeyinin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde çalışma içi CV’si 0,57, günler arası CV’si 0,70, çalışmalar arası CV’si 1,16 ve toplam CV’si 1,47 olarak bulundu (Tablo 3.4-A1). 500 µM GSSG düzeyinin Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde ise çalışma içi CV’si 0,80, günler arası CV’si 0,83, çalışmalar arası CV’si 0,49 ve toplam CV’si 1,25 olarak bulundu (Tablo 3.4-B1).

Tablo 3.4-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 500 µM GSSG ile CV sonuçları

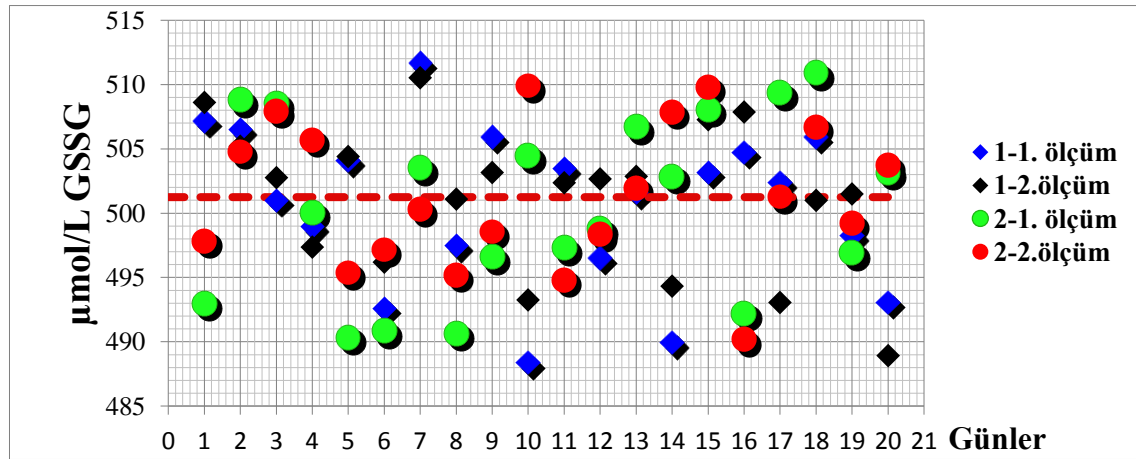
Çalışma içi %CV	0,57
Günler arası %CV	0,70
Çalışmalar arası %CV	1,16
Toplam %CV	1,47

Tablo 3.4-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 500 µM GSSG ile CV sonuçları

Çalışma içi %CV	0,80
Günler arası %CV	0,83
Çalışmalar arası %CV	0,49
Toplam %CV	1,25

Tablo 3.4-A2. 500 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

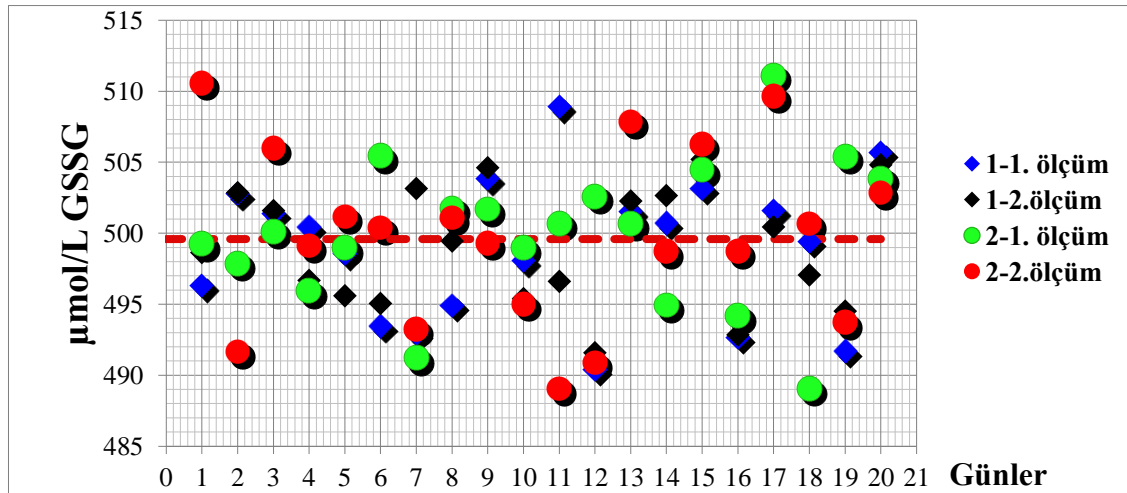
Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2. ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	507,14	508,60	507,87	492,98	497,84	495,41	498,53
2	506,51	505,20	505,85	508,80	504,78	506,79	505,78
3	501,01	502,75	501,88	508,56	507,95	508,25	508,10
4	498,96	497,35	498,15	500,03	505,69	502,86	504,28
5	504,09	504,40	504,24	490,33	495,39	492,86	494,13
6	492,59	496,18	494,38	490,82	497,16	493,99	495,57
7	511,69	510,51	511,10	503,53	500,30	501,91	501,10
8	497,49	501,08	499,28	490,63	495,20	492,91	494,05
9	505,91	503,14	504,53	496,60	498,56	497,58	498,07
10	488,38	493,23	490,80	504,44	509,91	507,17	508,54
11	503,46	502,36	502,91	497,29	494,80	496,05	495,43
12	496,51	502,65	499,58	498,76	498,33	498,55	498,44
13	501,60	502,85	502,22	506,70	501,96	504,33	503,15
14	489,93	494,31	492,12	502,85	507,85	505,35	506,60
15	503,17	507,26	505,21	508,07	509,81	508,94	509,37
16	504,74	507,85	506,29	492,20	490,19	491,19	490,69
17	502,38	493,04	497,71	509,34	501,28	505,31	503,29
18	505,91	500,98	503,45	510,91	506,70	508,80	507,75
19	498,27	501,47	499,87	496,90	499,22	498,06	498,64
20	493,06	488,92	490,99	503,17	503,73	503,45	503,59
Ortalama	500,64	501,21	500,92	500,65	501,33	500,99	501,26
SS	6,18	5,76	5,64	6,94	5,57	5,92	5,58
%CV	1,23	1,15	1,13	1,39	1,11	1,18	1,11



Şekil 3.18-A. 500 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Tablo 3.4-B2. 500 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2. ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	496,30	498,63	497,47	499,23	510,57	504,90	503,04
2	502,78	502,85	502,81	497,88	491,66	494,77	493,22
3	501,41	501,57	501,49	500,13	505,98	503,06	504,52
4	500,43	496,67	498,55	495,92	499,12	497,52	498,32
5	498,56	495,59	497,08	498,96	501,18	500,07	500,62
6	493,47	495,04	494,25	505,43	500,39	502,91	501,65
7	492,98	503,14	498,06	491,22	493,23	492,23	492,73
8	494,94	499,45	497,19	501,77	501,08	501,42	501,25
9	503,85	504,61	504,23	501,70	499,32	500,51	499,91
10	498,07	495,39	496,73	498,96	495,00	496,98	495,99
11	508,92	496,60	502,76	500,69	489,04	494,87	491,96
12	490,43	491,57	491,00	502,58	490,88	496,73	493,81
13	501,50	502,26	501,88	500,69	507,85	504,27	506,06
14	500,72	502,65	501,68	494,94	498,73	496,83	497,78
15	503,17	505,20	504,18	504,44	506,28	505,36	505,82
16	492,69	492,84	492,76	494,16	498,73	496,44	497,58
17	501,61	500,43	501,02	511,12	509,66	510,39	510,02
18	499,45	497,06	498,25	489,04	500,69	494,87	497,78
19	491,71	494,51	493,11	505,42	493,72	499,57	496,65
20	505,72	504,81	505,26	503,85	502,85	503,35	503,10
Ortalama	498,93	499,04	498,99	499,91	499,80	499,85	499,59
SS	5,03	4,21	4,13	5,19	6,24	4,58	4,92
%CV	1,01	0,84	0,83	1,04	1,25	0,92	0,98



Şekil 3.18-B. 500 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

B. 100 µM GSSG çözeltisi ile yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri

100 µM GSSG solüsyonları ile yöntemlerin 20 gün boyunca ölçülen GSSG sonuçları Tablo 3.5.A2, B2'de ve Şekil 3.19-A, B'de görülmektedir. 100 µM GSSG düzeyinin Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde çalışma içi CV'si 1,42, günler arası CV'si 1,76, çalışmalar arası CV'si 1,48 ve toplam CV'si 2,70 olarak bulundu (Tablo 3.5-A1). 100 µM GSSG düzeyinin Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde ise çalışma içi CV'si 1,18, günler arası CV'si 1,42, çalışmalar arası CV'si 1,81 ve toplam CV'si 2,58 olarak bulundu (Tablo 3.5-B1).

Tablo 3.5.A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 100 µM GSSG ile CV sonuçları

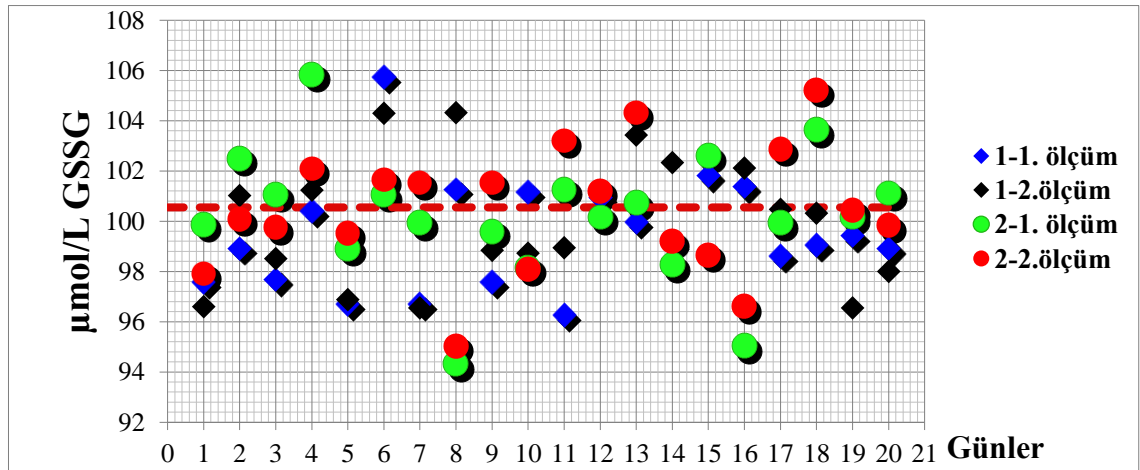
Çalışma içi	1,42
Günler arası %CV	1,76
Çalışmalar arası %CV	1,48
Toplam %CV	2,70

Tablo 3.5.B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin 100 µM GSSG ile CV sonuçları

Çalışma içi	1,18
Günler arası %CV	1,42
Çalışmalar arası %CV	1,81
Toplam %CV	2,58

Tablo 3.5-A2. 100 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

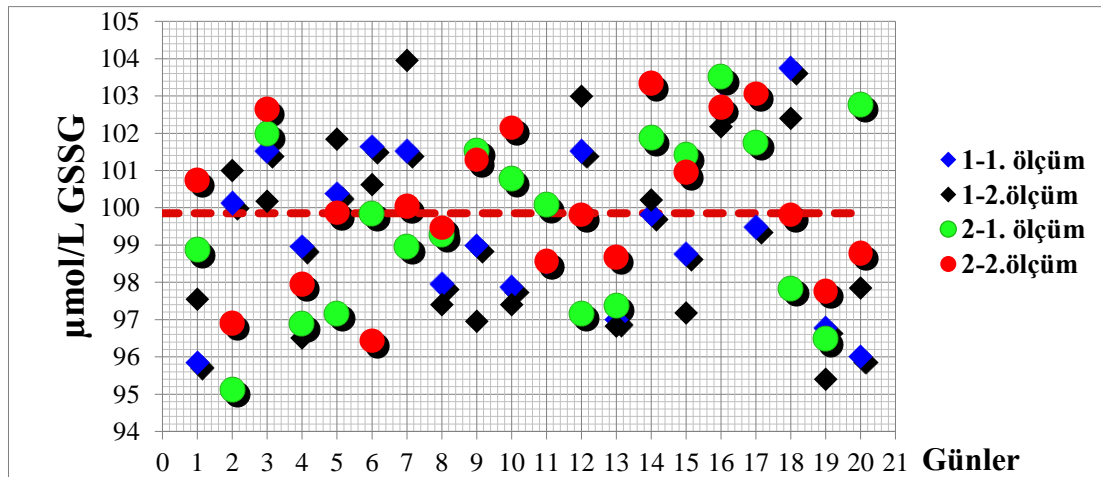
Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	97,57	96,59	97,08	99,87	97,91	98,89	98,43
2	98,93	101,01	99,97	102,50	100,09	101,30	100,69
3	97,68	98,51	98,09	101,05	99,76	100,40	100,08
4	100,40	101,24	100,82	105,85	102,09	103,97	103,03
5	96,70	96,87	96,79	98,93	99,54	99,23	99,38
6	105,74	104,30	105,02	101,05	101,65	101,35	101,50
7	96,70	96,54	96,62	99,94	101,54	100,74	101,14
8	101,27	104,31	95,82	94,31	95,05	94,68	94,86
9	97,57	98,83	98,20	99,60	101,54	100,57	101,05
10	101,16	98,73	99,94	98,15	98,09	98,12	98,11
11	96,27	98,94	97,61	101,27	103,20	102,24	102,72
12	100,95	100,04	100,49	100,16	101,20	100,68	100,94
13	99,97	103,42	101,69	100,72	104,31	102,51	103,41
14	99,10	102,33	100,71	98,26	99,20	98,73	98,97
15	101,82	98,62	100,22	102,61	98,66	100,63	99,65
16	101,38	102,11	102,79	95,04	96,60	101,75	99,66
17	98,62	100,47	99,54	99,94	102,87	101,40	102,14
18	99,05	100,31	99,68	103,63	105,20	104,42	104,81
19	99,42	96,54	97,98	100,16	100,42	100,29	100,36
20	98,91	98,00	98,45	101,12	99,83	100,48	100,15
Ortalama	99,46	99,89	99,38	100,21	100,44	100,62	100,55
SS	2,24	2,50	2,25	2,62	2,52	2,11	2,18
%CV	2,25	2,50	2,27	2,61	2,51	2,10	2,17



Şekil 3.19-A. 100 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Tablo 3.5-B2. 100 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	95,84	97,55	96,69	98,87	100,74	99,81	99,03
2	100,13	101,00	100,56	95,12	96,90	96,01	96,46
3	101,52	100,18	100,85	101,98	102,65	102,32	102,49
4	98,95	96,51	97,73	96,88	97,96	97,42	97,69
5	100,38	101,84	101,11	97,16	99,87	98,51	99,19
6	101,63	100,62	101,13	99,85	96,44	98,15	97,29
7	101,52	103,95	102,74	98,95	100,04	99,50	99,77
8	97,96	97,40	97,68	99,29	99,47	99,38	99,43
9	98,98	96,96	97,97	101,54	101,29	101,41	101,35
10	97,88	97,40	97,64	100,78	102,15	101,47	101,81
11	98,54	99,96	99,25	100,08	98,56	99,32	98,94
12	101,52	102,99	102,26	97,16	99,81	98,49	99,15
13	96,99	96,82	96,91	97,38	98,67	98,03	98,35
14	99,82	100,21	100,01	101,87	103,33	102,60	102,97
15	98,76	97,18	97,97	101,42	100,95	101,19	101,07
16	102,74	102,18	102,46	103,51	102,70	103,10	102,90
17	99,49	101,74	100,62	101,76	103,06	102,41	102,74
18	103,75	102,40	103,07	97,83	99,81	98,82	99,32
19	96,77	95,40	96,09	96,49	97,76	97,13	97,45
20	96,00	97,85	96,92	102,77	98,79	100,78	99,78
Ortalama	99,46	99,51	99,48	99,54	100,05	99,79	99,86
SS	2,21	2,54	2,26	2,38	2,05	2,03	1,99
%CV	2,22	2,56	2,27	2,39	2,05	2,03	2,00



Şekil 3.19-B. 100 μ M GSSG'nin Tris tamponununun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

3.6.5.2. Hemolizat süpernatant havuzunun kullanıldığı tekrarlanabilirlik çalışmaları sonuçları

A. Nativ GSH yönteminin tekrarlanabilirliği

Hemolizat süpernatant havuzu ile 20 gün boyunca Tris tamponunun 500 mM ve 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemlerinin ölçülen sonuçları Tablo 3.6-A2, B2’de ve Şekil 3.20-A, B’de görülmektedir. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yönteminde çalışma içi CV’si 0,49, günler arası CV’si 0,88, çalışmalar arası CV’si 0,15 ve toplam CV’si 1,02 olarak bulundu (Tablo 3.6-A1). Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yönteminde ise çalışma içi CV’si 0,73, günler arası CV’si 0,79, çalışmalar arası CV’si 0,35 ve toplam CV’si 1,02 olarak bulundu (Tablo 3.6-B1).

Tablo 3.6-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yönteminin hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları

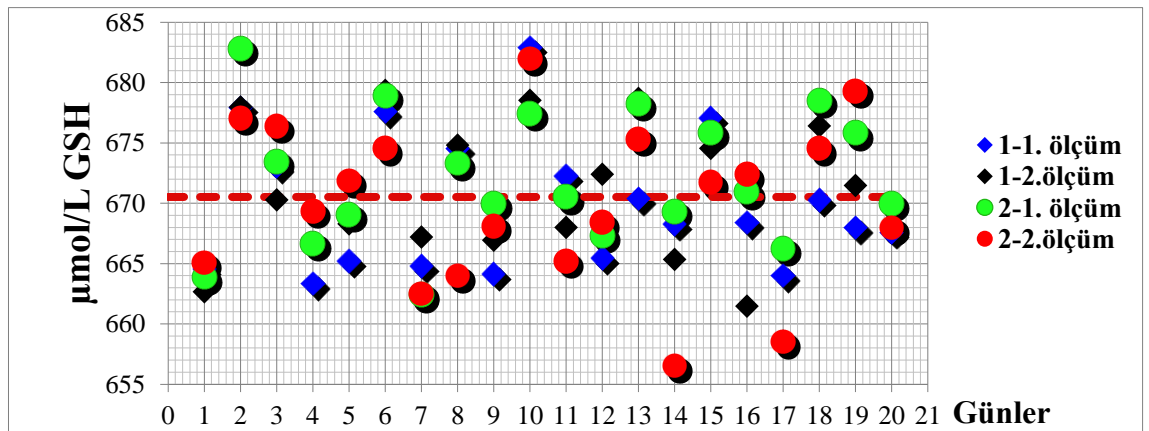
Çalışma içi	0,49
Günler arası %CV	0,88
Çalışmalar arası %CV	0,15
Toplam %CV	1,02

Tablo 3.6-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yönteminin Hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları

Çalışma içi	0,73
Günler arası %CV	0,79
Çalışmalar arası %CV	0,35
Toplam %CV	1,02

Tablo 3.6-A2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

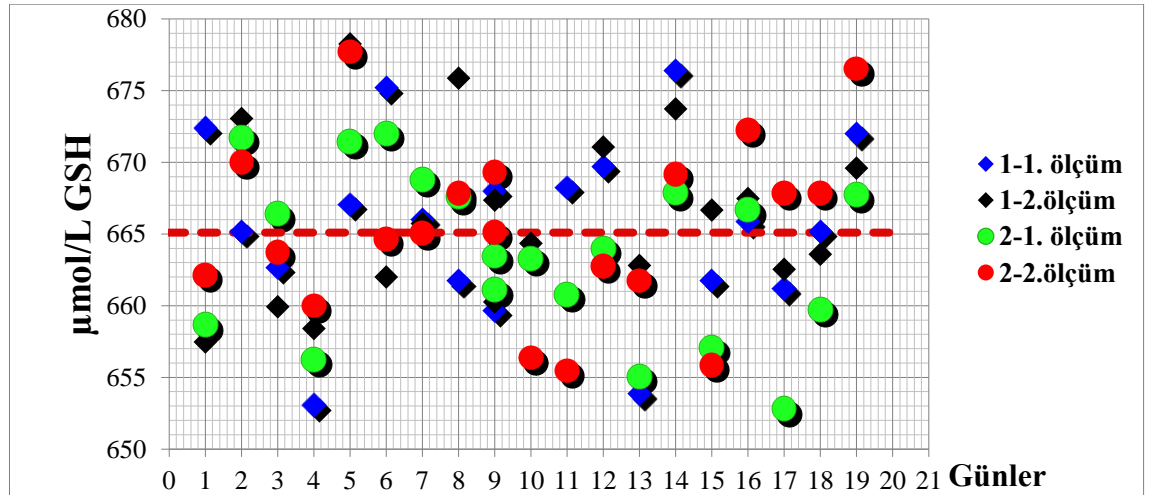
Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2. ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	664,53	662,67	663,60	663,87	665,07	664,47	664,25
2	677,97	677,97	677,97	682,81	677,06	679,93	678,50
3	673,07	670,27	671,67	673,47	676,40	674,93	675,67
4	663,33	666,40	664,87	666,67	669,33	668,00	668,67
5	665,20	668,27	666,73	669,07	671,87	670,47	671,17
6	677,60	679,33	678,47	678,93	674,53	676,73	675,63
7	664,80	667,20	666,00	662,40	662,53	662,47	662,50
8	674,53	674,80	674,67	673,33	664,00	668,67	666,33
9	664,13	666,93	665,53	670,00	668,13	669,07	668,60
10	682,93	678,53	680,73	677,47	682,00	679,73	680,87
11	672,27	668,00	670,13	670,53	665,20	667,87	666,53
12	665,47	672,40	668,93	667,33	668,40	667,87	668,13
13	670,40	678,67	674,53	678,27	675,33	676,80	676,07
14	668,27	665,33	666,80	669,33	656,53	662,93	659,73
15	677,07	674,53	675,80	675,87	671,73	673,80	672,77
16	668,40	661,47	664,93	670,93	672,40	671,67	672,03
17	664,00	658,53	661,27	666,27	658,53	662,40	660,47
18	670,27	676,40	673,33	678,53	674,53	676,53	675,53
19	667,99	671,46	669,73	675,85	679,33	677,59	678,46
20	667,60	669,73	668,67	670,00	668,00	669,00	668,50
Ortalama	669,99	670,44	670,22	672,05	670,05	671,05	670,52
SS	5,64	6,09	5,47	5,52	6,75	5,70	6,16
%CV	0,84	0,91	0,82	0,82	1,01	0,85	0,92



Şekil 3.20-A. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Tablo 3.6-B2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2. ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	672,40	657,47	664,93	658,67	662,13	660,40	661,53
2	665,20	673,07	669,13	671,73	670,00	670,87	670,43
3	662,67	659,93	661,30	666,40	663,73	665,07	664,40
4	653,07	658,40	655,73	656,27	660,00	658,13	659,07
5	667,07	678,27	672,67	671,47	677,73	674,60	676,17
6	675,20	662,00	668,60	672,00	664,67	668,33	666,50
7	666,00	665,73	665,87	668,80	665,07	666,93	666,00
8	661,73	675,87	668,80	667,60	667,87	667,73	667,80
9	659,69	667,36	663,52	661,10	665,12	663,11	664,11
10	656,38	664,35	660,37	663,30	656,38	659,84	658,11
11	668,27	660,40	664,33	660,80	655,47	658,13	656,80
12	669,73	671,07	670,40	664,00	662,73	663,37	663,05
13	653,87	662,80	658,33	655,07	661,73	658,40	660,07
14	676,40	673,73	675,07	667,87	669,20	668,53	668,87
15	661,73	666,67	664,20	657,07	655,87	656,47	656,17
16	665,87	667,47	666,67	666,67	672,27	669,47	670,87
17	661,20	662,53	661,87	652,80	667,87	660,33	664,10
18	665,20	663,60	664,40	659,73	667,87	663,80	665,83
19	672,00	669,60	670,80	667,73	676,53	672,13	674,33
20	668,00	660,27	664,13	663,47	669,33	666,40	667,87
Ortalama	665,08	666,03	665,56	663,63	665,58	664,60	665,10
SS	6,47	5,98	4,84	5,78	6,18	5,23	5,53
%CV	0,97	0,90	0,73	0,87	0,93	0,79	0,83



Şekil 3.20-B. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği nativ GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

B. Toplam GSH yönteminin tekrarlanabilirliği

Hemolizat süpernatant havuzu ile 20 gün boyunca Tris tamponunun 500 mM ve 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemlerinin ölçülen sonuçları Tablo 3.7-A2, B2’de ve Şekil 3.21-A, B’de görülmektedir. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminde çalışma içi CV’si 0,48, günler arası CV’si 1,11, çalışmalar arası CV’si 0,34 ve toplam CV’si 1,26 olarak bulundu (Tablo 3.7-A1). Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği Toplam GSH yönteminde ise çalışma içi CV’si 0,60, günler arası CV’si 0,46, çalışmalar arası CV’si 0,54 ve toplam CV’si 0,93 olarak bulundu (Tablo 3.7-B1).

Tablo 3.7-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin Hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları

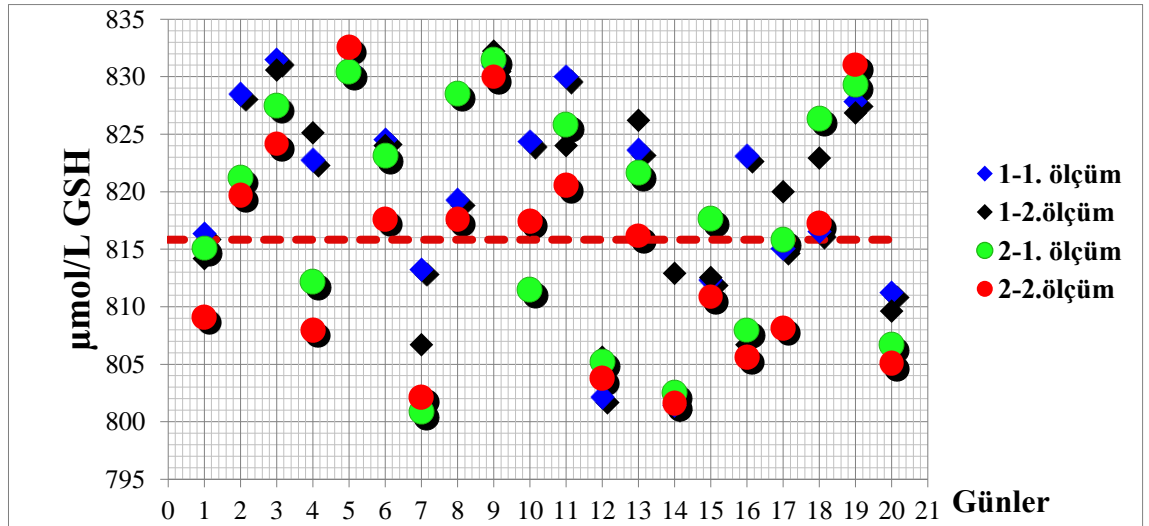
Çalışma içi	0,48
Günler arası %CV	1,11
Çalışmalar arası %CV	0,34
Toplam %CV	1,26

Tablo 3.7-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yönteminin Hemolizat süpernatant havuzu ile CV sonuçları

Çalışma içi	0,60
Günler arası %CV	0,46
Çalışmalar arası %CV	0,54
Toplam %CV	0,93

Tablo 3.7-A2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

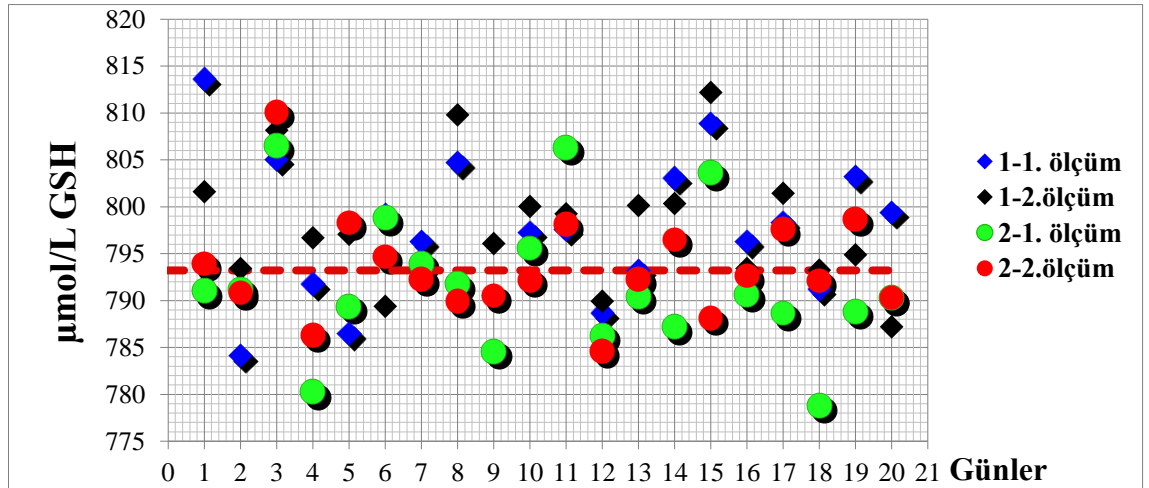
Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	816,36	814,17	815,26	815,08	809,07	812,07	812,87
2	828,51	821,15	824,83	821,22	819,68	820,45	820,06
3	831,48	830,57	831,02	827,47	824,19	825,83	825,01
4	822,73	825,10	823,92	812,16	807,97	810,07	809,02
5	830,75	830,39	830,57	830,39	832,57	831,48	832,03
6	824,56	824,01	824,28	823,10	817,63	820,36	819,00
7	813,26	806,70	809,98	800,87	802,14	801,50	801,82
8	819,27	817,27	818,27	828,56	817,63	823,10	820,36
9	830,93	832,21	831,57	831,48	830,02	830,75	830,39
10	824,37	817,08	820,73	811,44	817,45	814,44	815,95
11	830,02	824,01	827,02	825,83	820,55	823,19	821,87
12	802,14	805,60	803,87	805,24	803,78	804,51	804,15
13	823,64	826,20	824,92	821,64	816,17	818,91	817,54
14	801,41	812,89	807,15	802,51	801,60	802,05	801,82
15	812,35	812,53	812,44	817,63	810,89	814,26	812,57
16	823,10	806,70	814,90	807,97	805,60	806,79	806,20
17	815,08	820,00	817,54	815,81	808,16	811,98	810,07
18	816,54	822,92	819,73	826,38	817,27	821,82	819,54
19	827,88	826,83	827,35	829,35	831,03	830,19	830,61
20	811,25	809,61	810,43	806,70	805,06	805,88	805,47
Ortalama	820,28	819,30	819,79	818,04	814,92	816,48	815,82
SS	9,08	8,39	8,22	9,90	9,63	9,54	9,48
%CV	1,11	1,02	1,00	1,21	1,18	1,17	1,16



Şekil 3.21-A. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

Tablo 3.7-B2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	813,62	801,60	807,61	791,03	793,94	792,48	796,27
2	784,10	793,40	788,75	791,21	790,84	791,03	790,94
3	805,07	808,16	806,62	806,52	810,08	808,30	809,19
4	791,76	796,68	794,22	780,28	786,29	783,28	784,79
5	786,47	797,04	791,76	789,39	798,32	793,85	796,08
6	799,21	789,37	794,29	798,84	794,65	796,74	795,70
7	796,31	793,40	794,85	793,94	792,30	793,12	792,71
8	804,69	809,80	807,24	791,76	789,93	790,84	790,39
9	790,53	796,08	793,30	784,59	790,53	787,56	789,04
10	797,28	800,03	798,66	795,59	792,21	793,90	793,06
11	797,59	799,23	798,41	806,33	798,13	802,23	800,18
12	788,66	789,93	789,30	786,28	784,64	785,46	785,05
13	793,21	800,14	796,68	790,48	792,30	791,39	791,85
14	803,05	800,32	801,69	787,20	796,49	791,85	794,17
15	808,88	812,16	810,52	803,60	788,11	795,86	791,98
16	796,31	793,40	794,85	790,66	792,67	791,66	792,17
17	798,32	801,41	799,86	788,66	797,59	793,12	795,35
18	791,21	793,21	792,21	778,82	792,12	785,47	788,79
19	803,24	794,85	799,04	788,84	798,68	793,76	796,22
20	799,41	787,20	793,30	790,30	790,30	790,30	790,30
Ortalama	797,45	797,87	797,66	791,72	793,51	792,61	793,21
SS	7,58	6,66	6,30	7,51	5,52	5,62	5,35
%CV	0,95	0,83	0,79	0,95	0,70	0,71	0,67



Şekil 3.21-B. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği toplam GSH yöntemiyle günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

C. GSSG yönteminin tekrarlanabilirliği

Hemolizat süpernatant havuzu ile 20 gün boyunca Tris tamponunun 500 mM ve 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemlerde hesaplanan GSSG sonuçları Tablo 3.8-A2, B2'de ve Şekil 3.22-A, B'de görülmektedir. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG'lerin çalışma içi CV'si 2,48, günler arası CV'si 5,14, çalışmalar arası CV'si 3,01 ve toplam CV'si 6,45 olarak bulundu (Tablo 3.8-A1). Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG'lerin ise çalışma içi CV'si 2,57, günler arası CV'si 5,13, çalışmalar arası CV'si 3,37 ve toplam CV'si 6,65 olarak bulundu (Tablo 3.8-B1).

Tablo 3.8-A1. Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan hemolizat süpernatant havuzu GSSG düzeylerinin CV sonuçları

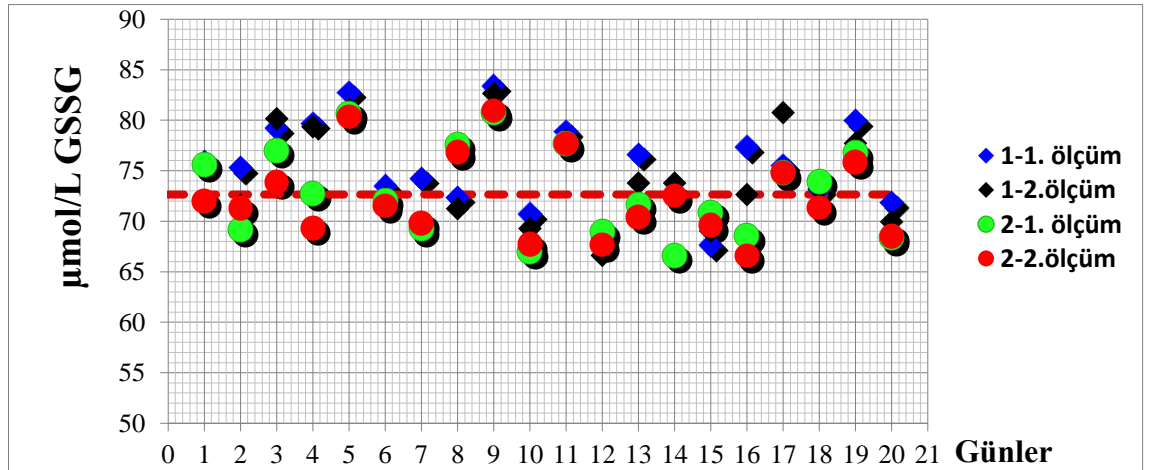
Çalışma içi	2,48
Günler arası %CV	5,14
Çalışmalar arası %CV	3,01
Toplam %CV	6,45

Tablo 3.8-B1. Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan hemolizat süpernatant havuzu GSSG düzeylerinin CV sonuçları

Çalışma içi	2,57
Günler arası %CV	5,13
Çalışmalar arası %CV	3,37
Toplam %CV	6,65

Tablo 3.8-A2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçları

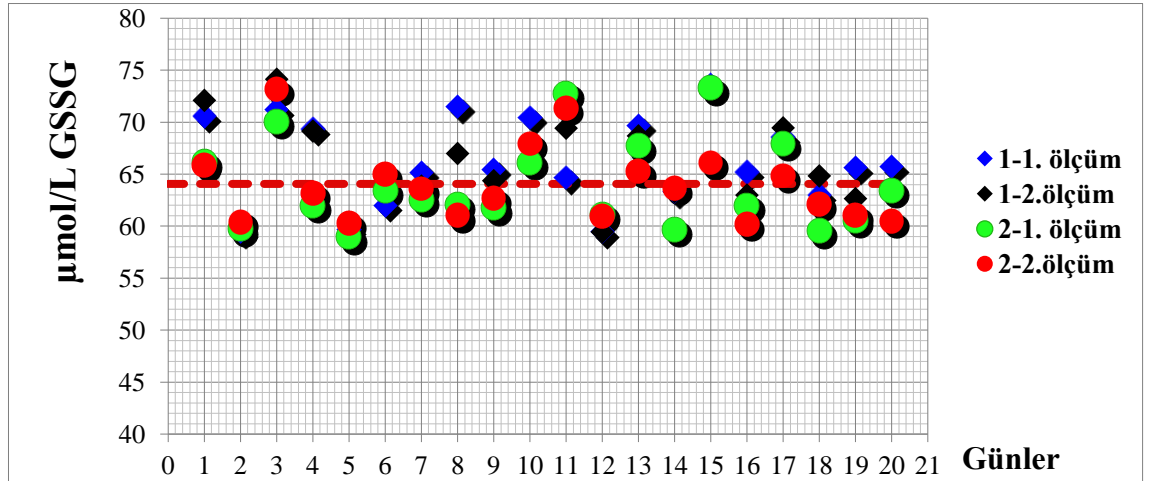
Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2.ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	75,91	75,75	75,83	75,61	72,00	73,80	74,31
2	75,27	71,59	73,43	69,20	71,31	70,26	70,78
3	79,21	80,15	79,68	77,00	73,90	75,45	74,67
4	79,70	79,35	79,53	72,75	69,32	71,03	70,18
5	82,78	81,06	81,92	80,66	80,35	80,51	80,43
6	73,48	72,34	72,91	72,08	71,55	71,82	71,68
7	74,23	69,75	71,99	69,23	69,80	69,52	69,66
8	72,37	71,23	71,80	77,62	76,82	77,22	77,02
9	83,40	82,64	83,02	80,74	80,94	80,84	80,89
10	70,72	69,28	70,00	66,98	67,72	67,35	67,54
11	78,88	78,00	78,44	77,65	77,67	77,66	77,67
12	68,34	66,60	67,47	68,95	67,69	68,32	68,01
13	76,62	73,76	75,19	71,69	70,42	71,05	70,74
14	66,57	73,78	70,18	66,59	72,53	69,56	71,05
15	67,64	69,00	68,32	70,88	69,58	70,23	69,90
16	77,35	72,62	74,98	68,52	66,60	67,56	67,08
17	75,54	80,73	78,14	74,77	74,81	74,79	74,80
18	73,14	73,26	73,20	73,92	71,37	72,64	72,01
19	79,95	77,68	78,81	76,75	75,85	76,30	76,08
20	71,83	69,94	70,88	68,35	68,53	68,44	68,48
Ortalama	75,15	74,43	74,79	73,00	72,44	72,72	72,65
SS	4,76	4,71	4,51	4,43	4,15	4,16	4,14
%CV	6,33	6,32	6,03	6,07	5,73	5,72	5,70



Şekil 3.22-A. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 500 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçlarının grafiksel gösterimi

Tablo 3.8.B2. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	1-1. ölçüm	1-2. ölçüm	Ortalama	2-1. ölçüm	2-2. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	70,61	72,06	71,34	66,18	65,90	66,04	67,37
2	59,45	60,16	59,81	59,74	60,42	60,08	60,25
3	71,20	74,11	72,66	70,06	73,17	71,61	72,39
4	69,34	69,14	69,24	62,00	63,14	62,57	62,86
5	59,70	59,39	59,54	58,96	60,29	59,63	59,96
6	62,01	63,68	62,85	63,42	64,99	64,21	64,60
7	65,16	63,83	64,49	62,57	63,62	63,09	63,36
8	71,48	66,96	69,22	62,08	61,03	61,56	61,29
9	65,42	64,36	64,89	61,74	62,70	62,22	62,46
10	70,45	67,84	69,14	66,15	67,92	67,03	67,47
11	64,66	69,41	67,04	72,77	71,33	72,05	71,69
12	59,46	59,43	59,45	61,14	60,96	61,05	61,00
13	69,67	68,67	69,17	67,71	65,28	66,50	65,89
14	63,33	63,29	63,31	59,67	63,65	61,66	62,65
15	73,58	72,75	73,16	73,27	66,12	69,69	67,91
16	65,22	62,96	64,09	62,00	60,20	61,10	60,65
17	68,56	69,44	69,00	67,93	64,86	66,39	65,63
18	63,00	64,81	63,91	59,54	62,13	60,83	61,48
19	65,62	62,63	64,12	60,55	61,07	60,81	60,94
20	65,70	63,47	64,59	63,42	60,48	61,95	61,22
Ortalama	66,18	65,92	66,05	64,04	63,96	64,00	64,05
SS	4,27	4,37	4,18	4,35	3,63	3,80	3,71
%CV	6,46	6,62	6,33	6,79	5,68	5,93	5,80

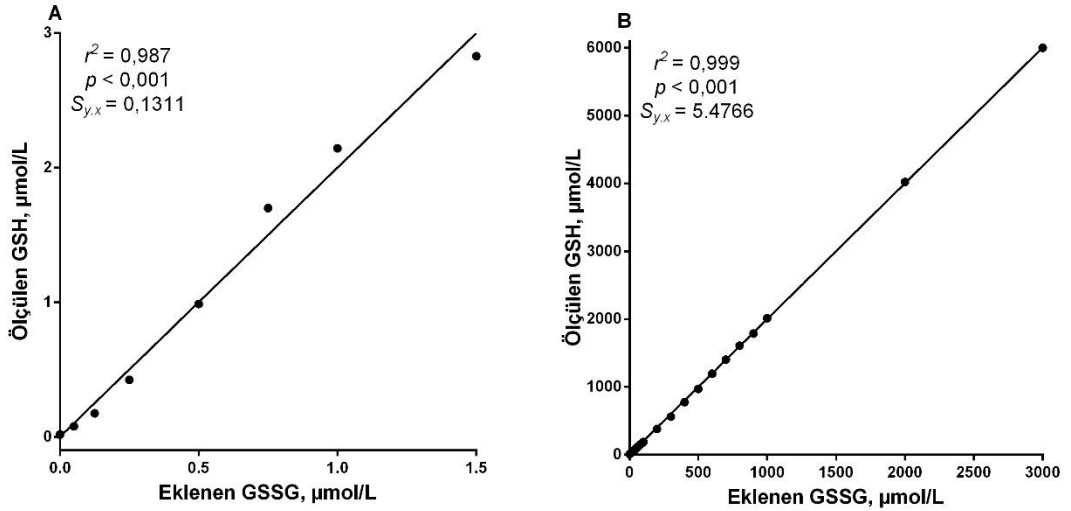


Şekil 3.22-B. Hemolizat süpernatant havuzunun Tris tamponunun 1000 mM olarak modifiye edildiği yöntemde hesaplanan GSSG düzeylerinin 20 günlük sonuçlarının grafiksel gösterimi

3.6.6. Ticari (enzimatik geri dönüştürme yöntemi) ürün ile yeni geliştirilen yöntemin karşılaştırması

3.6.6.1. Çeşitli okside glutatyon (GSSG) çözeltileri kullanılarak ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemin doğrusallıklarının karşılaştırılması

İki yöntemin doğrusallıkları (linearite) Şekil 3.23’de gösterilmektedir. Ticari yöntemin determinasyon katsayısı (r^2) = 0,987 ($p < 0,001$) iken yeni geliştirilen yöntemde 0,999 ($p < 0,001$) olarak hesaplandı. Her iki yöntemin de GSSG çözeltisi ile bakılan doğrusallığı 1’e yakındır ve her iki yöntemde yüksek doğrusallıkla ölçüm yapılabilmektedir.



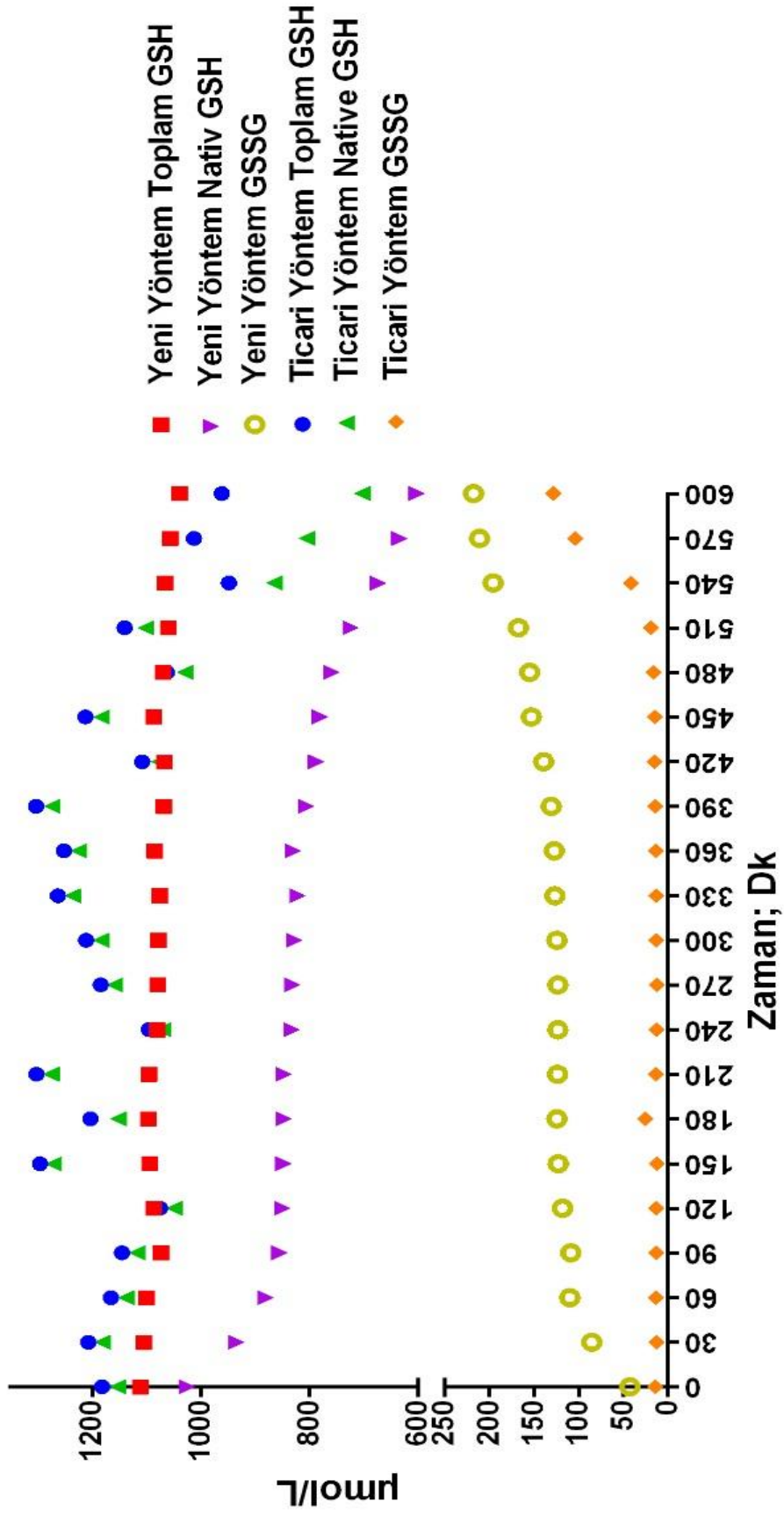
Şekil 3.23. Ticari yöntem ve yeni geliştirilen yöntemin doğrusallıkları (A. Ticari yöntem, B. Yeni geliştirilen yöntem)

3.6.6.2. Oto-oksidasyona bırakılan örnekler ile ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemin karşılaştırılması

Enzimatik geri dönüştürme yöntemine dayalı ticari kitle yeni geliştirilen yöntem tam kan örneklerinden yapılan havuzun porsiyonlara ayrılarak ve 38 °C’de kendi kendine oksitlenmesi beklenerek aralıklı ölçümlerle karşılaştırıldı. Ölçümlerde geri dönüşümsüz oksidasyon oluncaya kadar toplam GSH düzeylerinin sabit kalması beklenirken; zamanla nativ GSH düzeylerinde düşme ve GSSG düzeylerinde artış beklendi. Şekil 3.24’te de görüldüğü gibi ticari yöntemin GSSG düzeylerindeki artışı

ancak 540. dk itibariyle yakalayabilmekteyken, yeni geliştirilen yöntem baştan itibaren oksidasyonu gösterebildi. Ticari kit ile ölçülen Toplam GSH düzeyinin 540. dakikasındaki değerinde büyük bir düşüş görülmüştür (Şekil 3.24). Bu nedenle 510. dakikaya kadar ölçülen toplam GSH düzeylerinin her iki yöntemde de sabit kalması beklenmiş ve bu süre sonuna kadar ölçülmüş toplam GSH düzeylerinin her iki yöntemde ortalama \pm standart sapma ve % CV'leri hesaplanmıştır. Toplam GSH düzeylerinin ticari kitle ölçülen düzeyleri ile yeni geliştirilen yöntemle ölçülen değerlerinin ortalama \pm standart sapma ve % CV'leri ise sırasıyla $1189,3 \pm 75,7$, % 6,36 ve $1084,27 \pm 14,3$, % 1,32 idi. Yeni geliştirilen yöntemde ölçümler arası farklılığının daha düşük olduğu görülmüştür.



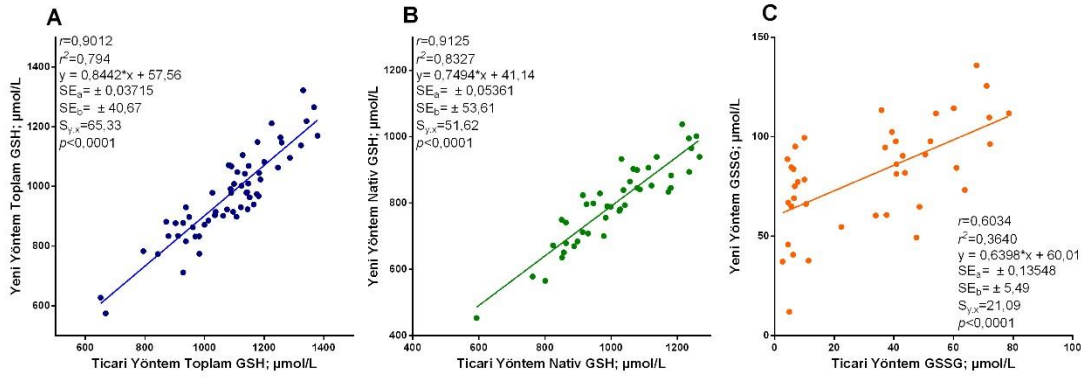


Şekil 3.24. Oto-oksidasyona bırakılan numunelerde zamana karşı ticari ve yeni geliştirilen yöntem ile ölçülen nativ GSH, toplam GSH ve GSSG düzeylerindeki değişimleri

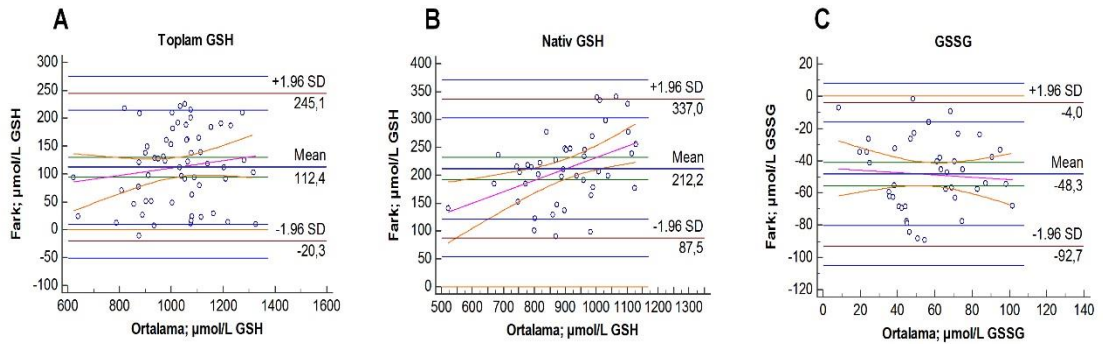
3.6.6.3. Ticari yöntemle yeni geliştirilen yöntemin korelasyonu

Enzimatik geri dönüştürme metoduna dayalı ticari kit ile yeni geliştirilen yöntemin, 60 tam kan numunesi kullanılarak korelasyonu ve ölçüm farklılıkları değerlendirildi. İki yöntemdeki toplam GSH, nativ GSH ve GSSG korelasyonları sırasıyla 0,901 ($p<0,001$), 0,913 ($p<0,001$) ve 0,603 ($p<0,001$) idi (Şekil 3.25). Toplam GSH ve nativ GSH parametrelerinde güçlü bir korelasyon varken, GSSG parametresinde orta seviye bir korelasyon vardı.

İki yöntem parametreleri arasındaki farklar ise Şekil 3.26'da gösterilmiştir.



Şekil 3.25. Yeni geliştirilen yöntem ile ticari yöntemin korelasyonu (A. Toplam GSH ölçümleri B. Nativ GSH ölçümleri C. GSSG ölçümleri)



Şekil 3.26. Yeni geliştirilen yöntem ile ticari yöntemin Blant-Altman fark grafiği ile karşılaştırması (x ekseninde iki yöntemin ortalaması, y ekseninde ticari yöntemden yeni geliştirilen yöntemin farkı; A. Toplam GSH ölçümleri, B. Nativ GSH ölçümleri, C. GSSG ölçümleri)

3.6.6.4. İki yöntem ile diyabet ve sağlıklı bireylerin sonuçlarının karşılaştırması

Diyabetli hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının numunelerinde toplam GSH, nativ GSH ve GSSG düzeyleri karşılaştırıldı. Gruplar arasında yaş ve cinsiyet parametrelerinde anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$; Tablo 3.9). Tablo 3.9'da da görüldüğü gibi her iki yöntemde de diyabetli hasta grubunda nativ GSH düşükken, GSSG düzeyleri daha yüksekti ($p<0,05$) (Şekil 3.27-A, B). Toplam GSH düzeylerine bakıldığında ise her iki yöntemde de gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$, Tablo 3.9, Şekil 3.27-A, B). Ancak sonuçlar hemoglobin başına değerlendirildiğinde gruplar arasında sadece GSSG parametresinde her iki yöntemde de anlamlı fark görüldü ($p<0,05$; Tablo 3.9, Şekil 3.27-C, D)

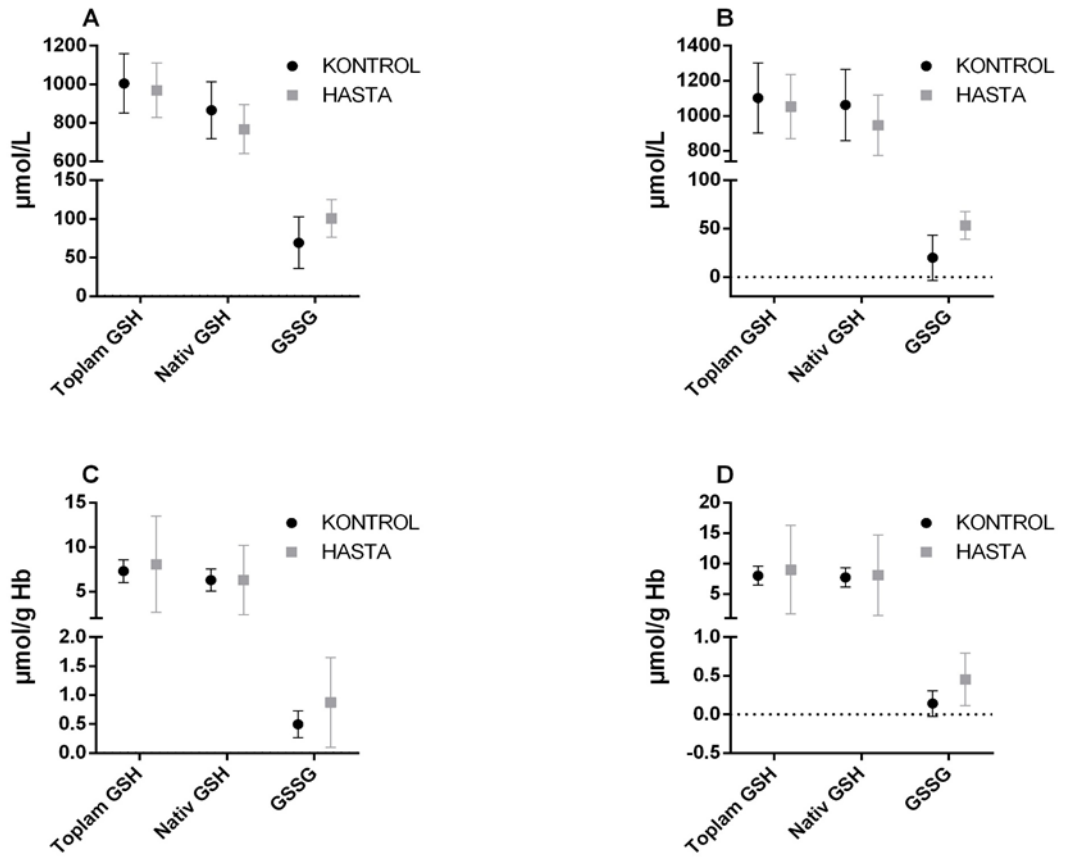
Hasta grubunu HbA1c, % ve HbA1c, mmol/mol sonuçları ile yeni yöntem ile ölçülen nativ GSH parametresi arasında negatif bir ilişki (sırasıyla $r=-0,313$, $p=0,049$ ve $r=-0,343$, $p=0,036$) varken; GSSG parametresi ile pozitif korelasyon (sırasıyla $r=0,357$, $p=0,024$ ve $r=0,359$, $p=0,023$) vardı. HbA1c, % ve HbA1c, mmol/mol sonuçları ile ticari yöntemle ölçülen GSSG parametresi arasında negatif bir ilişki (sırasıyla $r=-0,349$, $p=0,027$ ve $r=-0,351$, $p=0,026$) vardı (Tablo 3.10).

Tablo 3.9. Hasta ve kontrol gruplarının demografik bilgileri ve tam kan örneklerinden ölçülen parametrelerin sonuçları

	Kontrol (n=25)	Hasta (n=25)	<i>p</i> değeri
Yaş; yıl	50,92 ± 9,16	56,72 ± 11,93	0,060
Cinsiyet; Kadın/Erkek	11/14	13/12	0,571
Ticari yöntem Toplam GSH; µmol/L	1101,38 ± 200,06	1052,72 ± 182,38	0,373
Ticari yöntem Nativ GSH; µmol/L	1061,79 ± 203,8	946,21 ± 172,67	0,036
Ticari yöntem GSSG; µmol/L	19,8 ± 23,41	53,25 ± 14,24	<0,001
Yeni geliştirilen yöntem Toplam GSH; µmol/L	1004,04 ± 154,02	969,21 ± 140,71	0,408
Yeni geliştirilen yöntem Nativ GSH; µmol/L	865,57 ± 147,75	767,85 ± 127,27	0,016
Yeni geliştirilen yöntem GSSG; µmol/L	69,24 ± 33,38	100,68 ± 24,11	<0,001
Hb başına Ticari yöntem Toplam GSH; µmol/g Hb	7,99 ± 1,57	8,97 ± 7,28	0,512
Hb başına Ticari yöntem Nativ GSH; µmol/g Hb	7,71 ± 1,59	8,07 ± 6,63	0,793
Hb başına Ticari yöntem GSSG; µmol/g Hb	0,14 ± 0,17	0,45 ± 0,34	<0,001
Hb başına Yeni geliştirilen yöntem Toplam GSH; µmol/g Hb	7,30 ± 1,28	8,06 ± 5,41	0,495
Hb başına Yeni geliştirilen yöntem Nativ GSH; µmol/g Hb	6,30 ± 1,24	6,31 ± 3,90	0,988
Hb başına yeni geliştirilen yöntem GSSG; µmol/g Hb	0,50 ± 0,23	0,88 ± 0,77	0,024
Hemoglobin; gr/dL	13,9 ± 1,46	13,58 ± 3,03	0,641
HgA1c; mmol/mol		73,8 ± 18,98	
HgA1c; %		8,9 ± 1,74	

Tablo 3.10. HbA1c ile ölçülen parametreler arasındaki korelasyon

	HbA1c; %		HbA1c; mmol/mol	
	<i>r</i> değeri	<i>p</i> değeri	<i>r</i> değeri	<i>p</i> değeri
Ticari yöntem Nativ GSH; µmol/L	0,050	0,759	0,041	0,799
Ticari yöntem GSSG; µmol/L	-0,349	0,027	-0,351	0,026
Yeni geliştirilen yöntem Nativ GSH; µmol/L	-0,313	0,049	-0,332	0,036
Yeni geliştirilen yöntem GSSG; µmol/L	0,357	0,024	0,359	0,023



Şekil 3.27. Hasta ile kontrollerin toplam GSH, nativ GSH ve GSSG düzeylerinin karşılaştırması (A. Yeni geliştirilen yöntem direkt sonuçlar, B. Ticari kit yöntemi direkt sonuçlar, C. Yeni geliştirilen yöntem hemogloblin başına sonuçlar, D Ticari kit yöntemi hemogloblin başına sonuçlar)

4. TARTIŞMA

Glutasyon birçok biyolojik olayda rol alan önemli bir moleküldür. Hücre için en önemli antioksidanı olmasının [1] yanında; östrojen, melanin, prostaglandinler, lökotrienler ve ksenobiyotikler (ör. bromobenzen, asetaminofen gibi) gibi merkaptürik asit şeklinde atılan moleküllerin detoksifikasyonunda [87, 245], NO ile birlikte insülin sensitive edici ajan olarak lipid, karbonhidrat ve protein metabolizmasında [246], proteinlerin glutatyonilasyonunda [93], sitokin sentezinde rol oynayarak immün yanıtta [93], hücre içi redoks potansiyelinin korunmasında [93], sinyal iletimi ve gen ekspresyonunda [247], DNA ve protein sentezi ve proteolizde [248], hücre proliferasyonu ve apoptozisin uyarılmasında [247, 249], sperm üretimi ve maturasyonunda [250], mitokondriyal fonksiyonun ve bütünlüğünün korunmasında [1, 93], beyin bilişsel fonksiyonlarında ve nörodejenerasyonda [251] rol oynamaktadır. Glutasyonun bilinen bu fonksiyonlarından dolayı enflamasyon, kanser, AIDS, DM, karaciğer hastalıkları, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, akut miyokart enfarktüsü, kronik obstruktif akciğer hastalığı ve inme gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli rolü olabileceği düşünülmüştür [1, 93]. Bu nedenlerle 1959'da Ellman [106] tarafından ilk defa biyolojik numunelerin sulfidril gruplarının tayini ile ilgili yöntemin yayınlanması vesilesiyle tiyol biyokimyası sürekli ilgi gören bir alan olmuştur. O zamandan günümüze kadar sürekli plazmada, dokuda ve hücre içinde okside ve redükte glutasyon tayini için yeni yöntemler geliştirilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen yöntemlerin bir çoğu HPLC yöntemleri [101, 129-151], fluorometrik yöntemler [112-115, 139-151], biyoluminisans yöntemleri [116-123], nano sensör yöntemleri [252, 253], LC-MS [160-162, 254], GC-MS [152-158, 255] yöntemleri gibi sofistike analizörlere ihtiyaç duyan pahalı yöntemlerdir. Şimdiye kadar ortaya konulmuş spektrofotometrik yöntemler ise reaktif olarak enzim kullanan yöntemlerdir [108, 110, 111]. Bu kitler yüksek maliyetlidir [241]. Bu nedenle eritrosit içi okside ve redükte glutasyon düzeylerini ölçen ucuz ve spektrofotometre gibi daha kolay ulaşılabilir bir analizörde çalışılabilecek bir yöntem ihtiyacı olduğu düşünülmüştür. Bu çalışmada temel olarak eritrosit içi toplam ve nativ GSH düzeyleri ölçülmüştür. GSSG ise hesaplanarak elde edilmiştir.

Şimdiye kadarki eritrosit içi GSSG/GSH ölçen yöntemlerde GSSG'leri indirgemek için ditiyoeritol, DTT, 2-merkaptolanol, sodyum ve potasyum borohidrat, TBP, TPP, TCEP, trimetil-TCEP ve ditiyonat gibi birçok redüktan ajan kullanılmıştır [104]. Ancak DTNB, 4-DPS gibi moleküllerin kullanıldığı kolorimetrik yöntemlerde indirgeyici ajanlar bu molekülleri de indirgeyerek ölçümleri etkilemektedir ve ayrıca özellikle sülfidril grubu içeren indirgeyici ajanlar ise (ör. DTT, 2-merkaptolanol vb.) fluorometrik ölçümleri de etkilemektedir [104, 256]. Bu nedenle bu moleküllerin tüm GSSG'ler indirgendikten sonra ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bizim de kullandığımız NaBH₄'ün ortamdan uzaklaştırılması için şimdiye kadar dializ sistemi [257], ortama asit ekleme [258] ya da formaldehit kullanılması [259] gibi birçok yöntem kullanılmıştır. Yeni geliştirilen yöntemde de NaBH₄'ün uzaklaştırılması için HCl kullanılmıştır. Örnek olarak suyun kullanıldığı ölçümlerde eklenen HCl miktarına göre ölçülen GSH düzeyi grafiğinde (Bkz. Şekil 3.11) de görüleceği gibi; uzaklaştırılmamış NaBH₄ DTNB molekülünü indirgeyerek yanlış pozitif sonuçlar vermekteyken, HCl ile uzaklaştırıldığında ölçülen GSH düzeyi beklendiği gibi 0'a düşmektedir. Sodyum borohidratın asitle reaksiyonun köpük ve gaz oluşturması ise başka bir sorun oluşturmaktadır [256]. Bu sorun ise işlemlerin uzun tüplerde yapılması ile çözülmüştür.

Ölçümde kullanılan Ellman reaktifinin (DTNB) pH'nın 7'nin altında olduğu durumlarda kullanılamayacağı ve pH değişimlerinden etkilendiği bilinmektedir [105]. Yeni geliştirilen yöntemde; TCA ile proteinleri çöktürülmüş nativ GSH düzeyi ölçümünde ve NaBH₄'ü uzaklaştırmak için HCl eklenmiş toplam GSH ölçümünde numunelerin içerdiği asidik solüsyonlardan dolayı pH'nın etkilenebileceği ve DTNB ile ölçümlerin yanlış düşük olabileceği öngörülmüştür. Bu sorunun çözülmesi için klasik tiyol ölçüm yönteminde kullanılan Tris tamponunun tamponlama gücü artırılmıştır. Klasik yöntemde tamponun molaritesi 100 mM iken, yeni geliştirilen yöntemde 500 ve 1000 mM olmak üzere iki modifikasyon yapılmıştır. Her iki modifikasyonun da orijinal yöntemle yaklaşık 1 olan korelasyonu mevcuttu (sırasıyla $r^2=0,9969$, $p<0,0001$ ve $r^2=0,9966$, $p<0,0001$). Örnek üzerine modifiye tamponlar kullanılarak yapılan pH ölçümlerinde de pH'nın değişmediği görülmüştür. Bu bulgular eşliğinde her iki modifikasyonun da orijinal yöntem yerine kullanılabilmesi görülmüştür.

Sodyum borohidratın redüksiyon kabiliyeti; kullanılan konsantrasyonu, uygulandığı süre ve uygulanan örneğe göre değişiklik göstermektedir. Erel ve

Neşelioğlu [259] serum örneğinde disülfid tayinini tarifledikleri yöntemde 10 mM NaBH₄'ü örnek ile yaklaşık 2 dakika süre ile inkübe etmişlerken; Hansen ve ark. [105] protein çözeltisi kullanarak tarifledikleri HPLC yönteminde 7,9 M NaBH₄ (reaksiyon ortamında 0,93 M) ile örneği 30 dakika boyunca inkübe etmişlerdir. Yeni geliştirilen yöntemde ise GSSG solüsyonu için kullanılması gereken minimum NaBH₄ konsantrasyonu daha düşükken (reaksiyon ortamında yaklaşık 35 mM) (Bkz. Şekil 3.8), hemolizat süpernatant havuzu için daha yüksek düzeylerde (reaksiyon ortamında 500 mM) NaBH₄ gerekmiştir. Bu durumun saf su ve GSSG kullanılarak hazırlanan GSSG solüsyonu ile hemolizat süpernatant havuzunun farklı matrislere sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Yeni geliştirilen yöntemde de kullanılan NaBH₄'ün redüksiyon reaksiyonunu yüksek konsantrasyonlarda dakikalar düzeyinde tamamladığı, düşük konsantrasyonlarda (40-100 mM) tamamlaması ise ya ısıtma işlemi süresi kadar ya da 30 dakikadan daha uzun süreler beklenmesi gerektiği söylenmektedir [104, 105]. Yeni geliştirilen yöntemde kullanılan 3,5 M NaBH₄ (reaksiyon ortamında 700 mM) solüsyonunun eklendikten sonra tüm GSSG'leri indirgediğinden emin olunduktan sonra HCl ile ortamda kalan fazla NaBH₄ uzaklaştırılmıştır. Hidroklorik asitin eklenme zamanı 10-20 dakikalar arasında olduğunda sonuçlarda tutarlılık olduğu gösterilmiştir (Bkz. Şekil 3.12). Şekil 3.12'de de görüldüğü gibi HCl'nin erken eklenmesi ölçümler arasında farklılıklara neden olmaktadır. Bu farklılığın NaBH₄'ün tüm numunelerde yeterli redüksiyonu sağlamadan önce ortamdan uzaklaştırılmasından ötürü kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca HCl'nin daha geç eklenmesi de sonuçların düşük okunmasına neden olmaktadır. Bu düşüklüğün sebebinin, GSH'ların tekrar oksitlenmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Asidik ortamda GSH'ların tekrar oksitlenmediği bilinmektedir [103]. Bu nedenle redüksiyon işlemi tamamlandıktan sonra reaksiyon ortamı tekrar asidik yapılmalıdır.

Okside glutatyon ölçüm yöntemlerinde örneklerde bulunan diğer tiyol grubu içeren proteinlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla TCA, MPA gibi asitler kullanılmaktadır [87, 260, 261]. Eklenen bu asitlerden dolayı örnekler asidik olmaktadır. Sodyum borohidrat, asidik ortamda asitle reaksiyonu nedeniyle daha çabuk tükenecektir. Bu tükenmenin gerçekleşmemesi için ortamın pH'sı NaOH ile arttırılmıştır. Eklenmesi gereken optimal NaOH miktarı Şekil 3.10'da da görüldüğü gibi

1,5 M düzeyindedir ve bu konsantrasyon reaksiyon ortamında TCA ile aynı konsantrasyona denk gelmektedir. Daha düşük miktarda NaOH eklenmesi ölçümlerde farklılıklara neden olmuştur. Bu farklılıkların NaBH₄'ün erken tükenmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Daha fazla NaOH eklenmesi ise NaBH₄'ün reaksiyona girmesini güçleştirerek ölçüm farklılıklarına neden olduğu düşündürmektedir. Ayrıca önce örneğin pH'sını Tris tamponu ile yükseltip daha sonra NaBH₄ eklenmesi ile yapılan deneyde ise; yeterli redüksiyonunun olmaması nedeniyle NaBH₄ ile NaOH'nın aynı anda eklenmesi gerektiği düşünülmüş ve ikisi tek reaktif olarak kullanılmıştır (Bkz. Şekil 3.9).

Redükte glutatyon ve okside glutatyon ölçüm yöntemlerinde karşılaşılan başka bir sorun ise GSH'ların kendi kendine oksitlenerek yanlış yüksek GSSG sonuçlarına sebep olmasıdır [87, 104]. Bu durumun engellenmesi için günümüze kadar NEM, 2-VP (M2VP), (M4VP) gibi tiyol maskeleyici ajanlar [99, 100, 102, 262] ya da ortamın asidik yapılması [103] gibi önlemler alınmıştır. Yeni geliştirilen yöntemde ise bu durumun engellenmesi için ortam asidik yapılmıştır. Asidifikasyon işleminin GSH'ları oda ısısında en az 24 saat, 4 °C'de ise en az 72 saat stabil kaldığı görülmüştür.

Hücre içinin en önemli antioksidanı olan GSH ortamda oksidan madde bulunması durumunda oksitlenerek GSSG'ye döner [263]. Bu dönüşümün izlenmesi için tam kan örnekleri ve hemolizat süpernatant havuzu üzerine H₂O₂ eklenmiş ve GSH'ların azalması ile birlikte GSSG'lerin artması beklenmiştir. Şekil 3.13'te de görüldüğü gibi tam kan örneklerinde GSH düzeylerinde bir düşüşe rastlanmadı. Bu durumun tam kan örneği içerisinde bulunan albümin, bilirubin gibi birçok antioksidan molekülün H₂O₂ eritrosit içine girmeden H₂O₂ ile reaksiyona girmesinden kaynaklandığı düşündürmektedir. Ayrıca Şekil 3.14'te de görüldüğü gibi hemolizat süpernatant havuzu üzerine direkt H₂O₂ eklenmesi düşük seviyelerde toplam GSH düzeylerinde bir düşüşe neden olmuştur. 0,2 mM ile 10 mM arasında ise beklenildiği gibi GSH'lar düşerken GSSG'ler artmıştır. 10 mM ve daha üstü gibi çok yüksek seviyelerde ise hem toplam GSH hem de nativ GSH seviyelerinde düşüş gözlenmiştir. 50 mM seviyesinden sonra ise hem toplam GSH hem nativ GSH ve hem de GSSG düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. GSH ve GSSG birbirine reversible olarak dönebilen moleküllerdir [1]. Tiyol grupları içeren moleküllerin ileri oksidasyon durumunda; tiyol gruplarının geri dönüşümsüz ileri oksidasyon ürünleri olan sülfenik, sülfirik, sülfonik asik gibi

sülfoksitler oluşabileceği; ya da daha ileri oksidasyonda sülfonlara dönebileceği bilinmektedir [264-266]. Hemolizat süpernatant havuzunda düşük düzeylerde H_2O_2 'nin toplam GSH'ları düşürürken aynı zamanda GSSG'lerde düşüş gözlenmesi örnekler içerisinde bulunan TCA'nın GSH'ları oksidasyondan korumak için yeterli seviyede olduğunu ancak GSSG'lerin irreversible oksidasyona girdiğini düşündürmüştür. 0,2 ile 10 mM arasında toplam GSH'nın yaklaşık aynı seviyelerde seyretmesi; TCA'nın GSH'ları belli bir düzeye kadar koruduğu ve bu düzeyden sonra reversible olarak GSH'ların GSSG'lere döndüğü düşünülmüştür. 10 mM ile 50 mM konsantrasyonları arasında uygulanan H_2O_2 'nin toplam ve nativ GSH'ları düşürürken GSSG'leri arttırması, hem GSH'tan GSSG dönüşümünün hem de irreversible tiyol oksidasyon ürünlerinin oluşumunun gerçekleştiğini; ancak GSSG oluşumunun daha fazla olduğunu düşündürmektedir. 50 mM düzeyinin üzerinde H_2O_2 uygulanması ise geri dönüşümsüz oksidasyon ürünlerinin daha fazla oluşmasına yol açtığı düşünülmüştür.

Tam kan örneklerinde yapılan H_2O_2 ile oksitleme deneylerinin, örnek içerisinde bulunan diğer antioksidanlar nedeniyle beklenildiği gibi çıkmaması nedeniyle; oksidasyon deneyleri örneklerin zaman içerisinde kendi kendine 38 °C'de okside olması beklenerek deney tekrarlanmıştır (Bkz. Şekil 3.15). Oto-oksidasyona bırakılan bu tam kan örneklerinde ise tam beklenildiği gibi toplam GSH düzeyleri sabit kalırken, nativ GSH düzeyinin düşüşü ile GSSG'lerin yükseldiği görülmüştür. Ancak 9 saatlik süre sonunda toplam GSH'lardaki düşüşle irreversible oksidasyonun başladığı görülmüştür. Onaltı saate kadar olan GSSG oluşum hızının irreversible oksidasyon ürünlerinin oluşumundan daha hızlı olduğu, bu süreden sonra ise irreversible oksidasyonunun ağır bastığı görülmüştür. Ayrıca bu oto-oksidasyon çalışması enzimatik geri dönüştürme yöntemiyle karşılaştırma ile de tekrarlanmıştır (Bkz. Şekil 3.24). Yeni geliştirilen yöntemin ilk zamandan itibaren oksidasyonu gösterdiği görülürken, enzimatik geri dönüştürme yöntemi irreversible oksidasyon gerçekleşinceye kadar oksidasyonu gösteremedi. Ayrıca toplam GSH'nın sabit kalması gereken süreler içerisindeki %CV'leri karşılaştırıldığında; enzimatik geri dönüştürme yönteminin %CV'si 6,36 iken, yeni geliştirilen yöntemin 1,32'ydi. Bu durumun enzimatik geri dönüştürme yönteminin üst ölçüm limitinin 6 $\mu\text{mol/L}$ GSH olması nedeniyle örneklerin yaklaşık 500 kat gibi çok yüksek bir dilüsyon oranı ile dilüe edilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Ticari olarak mevcut spektrofotometrik yöntemler Tietze tarafından tariflenen [108] enzimatik geri dönüştürme yöntemine dayanmaktadır [267, 268] . Tiyol bloke edici ajan olarak M2VP'nin kullanıldığı ticari olarak mümkün olan enzimatik geri dönüştürme metodunun tam kan örneklerinde toplam GSH ve GSSG için total imprecizyonları sırasıyla (%CV) %3,18 ve %8,86'dır. Bu yöntemin toplam GSH geri kazanımları ise 349 µmol/L seviyesinde %98 iken, 16,3 µmol/L seviyesinde ise %96 olduğu gösterilmiştir [266]. Yeni geliştirilen yöntemin ise toplam %CV'leri ticari yöntemle kıyaslandığında daha iyi olmakla beraber, toplam GSH için %1,26 ve GSSG için % 6,65 gibi benzer sonuçları vermiştir. Yeni geliştirilen yöntemin toplam GSH geri kazanımları ise 300 µmol/L ve 30 µmol/L düzeyleri için sırasıyla %105,5 ve % 93,1 seviyelerindeydi. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde yeni geliştirilen yöntemin yeterli performans niteliklerine sahip olduğu görülmüştür.

Literatürde şimdiye kadar birçok hastalıkta GSH ve GSSG düzeyleri çalışılmıştır. Delmas-Beauvieux ve ark. [269] AIDS'li hastaların tam kanlarından çalıştıkları GSH ve GSSG düzeylerini sırasıyla 180 ve 520 µmol/L bulmuşken; sağlıklı gönüllülerde bu parametreleri sırasıyla 1100 ve 90 µmol/L olarak ölçmüşlerdir. Akciğer ve meme kanserli hastaların sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığı Navarro ve ark.'ının [270] yaptığı çalışmada; akciğer kanserinde GSH ve GSSG düzeyleri sırasıyla 1037 ve 26 µmol/L, meme kanserinde 995 ve 26 µmol/L ve kontrol grubunda 930 ve 26 olarak ölçülmüş. Spickett ve ark. [271] preeklampsi grubunda GSH ve GSSG düzeylerini sırasıyla 562 ve 344 µmol/L olarak ölçmüşlerken; kontrol grubunda sırasıyla 756 ve 322 µmol/L olarak ölçmüşlerdir. Samiec ve ark. [272] ise DM grubunda yaptıkları çalışmada hasta grubunda GSH ve GSSG düzeylerini sırasıyla 713 ve 135 µmol/L bulmuşlarken; kontrol grubunda sırasıyla 962 ve 84 µmol/L olarak ölçmüşlerdir. Başka diyabet grubu çalışmasında ise DM grubunda GSH düzeylerini (5.14 ± 0.17 µmol/g Hb) kontrol grubuna göre (6.22 ± 0.13 µmol/g Hb) anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Yine bu çalışmada HbA1c ile GSH düzeyleri arasında anlamlı negatif korelasyon bildirmişlerdir ($r = -0,42, p < 0,001$) [273]. De Mattia ve ark. diyabetik hastalarla kontrol grubunu karşılaştırdıkları çalışmalarında; kontrol grubuna göre eritrosit GSH konsantrasyonlarını düşük bulmuşlarken (diyabetik hastalar: $6,0 \pm 0,7$ µmol/g Hb; kontrol grubu: $7,1 \pm 0,5$ µmol/g Hb, $p = 0,0001$), GSSG düzeylerini de yüksek bulmuşlardır (diyabetik hastalar: $0,618 \pm 0,185$ µmol/g Hb; kontrol grubu: $0,352 \pm 0,04$ µmol/g Hb, $p = 0,0002$) [274].

Yeni geliştirilen yöntemle de ön çalışma olarak diyabetik hastalar ile sağlıklı gönüllüleri karşılaştırıldı. Literatürdeki değerlere benzer şekilde diyabetik grupta GSH düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı olarak düşüktü (diyabetik hastalar: $767,85 \pm 127,27$ $\mu\text{mol/L}$; kontrol grubu: $865,57 \pm 147,75$ $\mu\text{mol/L}$, $p = 0,016$) ve GSSG düzeyleri ise anlamlı olarak yüksekti (diyabetik hastalar: $100,68 \pm 24,11$ $\mu\text{mol/L}$; kontrol grubu: $69,24 \pm 33,38$ $\mu\text{mol/L}$, $p < 0,001$) (Bkz. Tablo 3.9). Ancak yeni geliştirilen yöntemde parametreler gram hemoglobin başına değerlendirildiğinde GSH düzeylerinde De Mattia ve ark. [274] bildirdiklerin aksine anlamlı bir fark yok iken ($p=0,988$); GSSG düzeyleri benzer şekilde anlamlı olarak yüksekti ($p=0,024$). Aynı örnekler ticari kit kullanılarak da çalışıldı. Enzimatik geri dönüştürme prensibine dayalı bu yöntem ile yeni geliştirdiğimiz yöntemdeki parametreler karşılaştırıldığında; benzer şekilde diyabetik hastalarda nativ GSH düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük ölçülmüş ($p<0,05$) ve GSSG düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Gram hemoglobin başına GSH ve GSSG düzeylerine bakıldığında ise her iki yöntemde de GSSG düzeyleri anlamlı olarak yüksek bulunmuşken ($p<0,05$), GSH düzeylerinde anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$). Ayrıca HbA1c düzeyleri ile yeni geliştirdiğimiz yöntem ve ticari kit ile ölçülen GSH ve GSSG düzeyleri arasında bir ilişki olup olmadığı değerlendirilmiştir. Literatürde bildirilen değerlere benzer şekilde yeni geliştirdiğimiz yöntem ile ölçülen nativ GSH düzeyleri ile HbA1c değerleri arasında negatif bir korelasyon mevcutken ($p<0,05$) (Bkz. Tablo 3.10), literatürün aksine ticari yöntem ile ölçülen GSH değerleri arasında korelasyon yoktu. Aynı zamanda HbA1c düzeyleri yeni geliştirilen yöntemle ölçülen GSSG düzeyleri ile pozitif bir korelasyon mevcutken ($p<0,05$), ticari kitle ölçülen GSSG düzeyleri ile negatif bir korelasyon göstermiştir ($p<0,05$). Oksidatif stresin diyabette arttığı bilinmektedir. Bu nedenle yeni geliştirilen yöntemde de görüldüğü gibi diyabette glisemik kontrolü gösteren HbA1c ile GSH'nın negatif; GSSG'nin ise pozitif korelasyon göstermesi beklenmektedir.

Özetle mevcut GSH ve GSSG ölçen yöntemlerin çoğu HPLC, fluorometre, GC-MS, LC-MS gibi sofistike cihazlara ihtiyaç duyarken; spektrofotometrik yöntemler ise yöntemler reaktif olarak kullanılan enzim ve koenzimlerden dolayı pahalı olan yöntemlerdir. Geliştirdiğimiz yöntem; mevcut spektrofotometrik yöntem ile benzer doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik değerleri olan, kolay uygulanabilir ve daha ucuz, yeni bir spektrofotometrik yöntemdir.

5. SONUÇ

Eritrositlerdeki en önemli oksidan-antioksidan sistem belirteçleri olan GSH ve GSSG düzeylerini ölçen birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu sofistike cihazlara ihtiyaç duyan yöntemlerdir. Bütün laboratuvarlarda kolaylıkla bulunabilen spektrofotometre ile ölçüm yapan yöntemlerin çoğu tamamı ise enzimatik geri dönüşürme prensibine dayanmakta iken, tamamı reaktif olarak enzim kullanan yöntemlerdir. Bu yöntemlerde kullanılan enzimler ve koenzimler ölçüm yöntemlerini oldukça pahalı hale getirmektedir. Geliştirilen bu yeni GSH ve GSSG tayin yöntemi; spektrofotometrik olması ile kolay uygulanabilir, kullanılan reaktiflerin düşük maliyetleri nedeniyle ucuz bir yöntemdir. Kolay uygulanabilirliği ve ucuz olması nedeniyle bu yöntemin kullanımı; özellikle tıp, biyokimya ve analitik kimya alanlarında eritrosit içi oksidan antioksidan düzeylerindeki değişimlerin kolaylıkla belirlenebileceği ve bu sayede birçok hastalığın oksidatif stres temelli hasarlarının ve oksidatif stres kökenli hastalıkların tespiti ile teşhis ve tedavisini kolaylaştıracağı öngörülebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, Free radicals in biology and medicine. 2015: Oxford University Press, USA.
2. Gomberg, M., An instance of trivalent carbon: Triphenylmethyl. Journal of the American Chemical Society, 1900. 22(11): p. 757-771.
3. Du, C., A. Anderson, M. Lortie, R. Parsons, and A. Bodnar, Oxidative damage and cellular defense mechanisms in sea urchin models of aging. Free Radic Biol Med, 2013. 63: p. 254-63.
4. Jiang, T., Q. Sun, and S. Chen, Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Progress in Neurobiology, 2016. 147: p. 1-19.
5. Aghadavod, E., S. Khodadadi, A. Baradaran, P. Nasri, M. Bahmani, and M. Rafieian-Kopaei, Role of Oxidative Stress and Inflammatory Factors in Diabetic Kidney Disease. 2016. 2016.
6. Perfeito, R., T. Cunha-Oliveira, and A.C. Rego, Reprint of: Revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease—resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. Free Radical Biology and Medicine, 2013. 62: p. 186-201.
7. Panth, N., K.R. Paudel, and K. Parajuli, Reactive Oxygen Species: A Key Hallmark of Cardiovascular Disease. Advances in Medicine, 2016. 2016: p. 9152732.
8. Aghaei, S., M.A. Nilforoushzadeh, and M. Aghaei, The role of peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator-1 gene in skin aging. J Res Med Sci, 2016. 21.
9. Holliday, R., Somatic mutations and ageing. Mutat Res, 2000. 463(3): p. 173-8.
10. Hendrich, A.B., Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. Acta Pharmacol Sin, 2006. 27(1): p. 27-40.
11. Strugała, P., S. Cyboran-Mikołajczyk, A. Dudra, P. Mizgier, A.Z. Kucharska, T. Olejniczak, et al., Biological Activity of Japanese Quince Extract and Its Interactions with Lipids, Erythrocyte Membrane, and Human Albumin. The Journal of Membrane Biology, 2016. 249: p. 393-410.
12. Lang, F., K.S. Lang, P.A. Lang, S.M. Huber, and T. Wieder, Mechanisms and significance of eryptosis. Antioxid Redox Signal, 2006. 8(7-8): p. 1183-92.
13. Silva, D.G.H., E. Belini Junior, E.A. de Almeida, and C.R. Bonini-Domingos, Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. Free Radical Biology and Medicine, 2013. 65: p. 1101-1109.
14. Kilinc, K. and A. Kilinc, Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri] de, Hacettepe. Medical Journal, 2002. 33: p. 110-118.
15. Semchyshyn, H.M. and L.M. Lozinska, Fructose protects baker's yeast against peroxide stress: potential role of catalase and superoxide dismutase. FEMS Yeast Res, 2012. 12(7): p. 761-73.
16. Ferrari, C.K., P.C. Souto, E.L. Franca, and A.C. Honorio-Franca, Oxidative and nitrosative stress on phagocytes' function: from effective defense to immunity evasion mechanisms. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2011. 59(6): p. 441-8.
17. Bild, W., A. Ciobica, M. Padurariu, and V. Bild, The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen, and carbon. J Physiol Biochem, 2013. 69(1): p. 147-54.
18. Radi, R., Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant. J Biol Chem, 2013. 288(37): p. 26464-72.
19. Vesela, A. and J. Wilhelm, The role of carbon dioxide in free radical reactions of the organism. Physiol Res, 2002. 51(4): p. 335-9.

20. Jacob, C., A scent of therapy: pharmacological implications of natural products containing redox-active sulfur atoms. *Nat Prod Rep*, 2006. 23(6): p. 851-63.
21. Trachootham, D., W. Lu, M.A. Ogasawara, R.D. Nilsa, and P. Huang, Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal*, 2008. 10(8): p. 1343-74.
22. Comporti, M., Lipid peroxidation and cellular damage in toxic liver injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 1985. 53(6): p. 599-623.
23. Ott, M., V. Gogvadze, S. Orrenius, and B. Zhivotovsky, Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, 2007. 12(5): p. 913-922.
24. Skulachev, V.P., Mitochondria-targeted antioxidants as promising drugs for treatment of age-related brain diseases. *J Alzheimers Dis*, 2012. 28(2): p. 283-9.
25. Turrens, J.F., Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 2003. 552(Pt 2): p. 335-44.
26. Naqui, A., B. Chance, and E. Cadenas, Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem*, 1986. 55: p. 137-66.
27. Sohal, R.S. and R. Weindruch, Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science (New York, NY)*, 1996. 273(5271): p. 59.
28. Giorgio, M., M. Trinei, E. Migliaccio, and P.G. Pelicci, Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007. 8(9): p. 722-728.
29. Florence, T. Free radicals, antioxidants and cancer prevention. in *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*. 1990.
30. McCord, J.M. and I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969. 244(22): p. 6049-55.
31. Grisham, M.B., *Reactive metabolites of oxygen and nitrogen in biology and medicine*. 1992: Taylor & Francis.
32. Zhang, Y., O. Marcillat, C. Giulivi, L. Ernster, and K. Davies, The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 1990. 265(27): p. 16330-16336.
33. Misra, H.P., Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. 249(7): p. 2151-2155.
34. Misra, H.P. and I. Fridovich, The generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, 1972. 247(21): p. 6960-6962.
35. Fridovich, I., Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1983. 23(1): p. 239-257.
36. Cohen, G. and R.E. Heikkila, The generation of hydrogen peroxide, superoxide radical, and hydroxyl radical by 6-hydroxydopamine, dialuric acid, and related cytotoxic agents. *Journal of Biological Chemistry*, 1974. 249(8): p. 2447-2452.
37. Sloan, J., C. Cameron, R. Maxwell, D. McCluskey, and J. Collins, Colitis complicating chronic granulomatous disease. A clinicopathological case report. *Gut*, 1996. 38(4): p. 619-622.
38. Yu, B.P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological reviews*, 1994. 74(1): p. 139-162.
39. Halliwell, B. and J. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical journal*, 1984. 219(1): p. 1.
40. Nicklas, B.J. and T.E. Brinkley, Exercise training as a treatment for chronic inflammation in the elderly. *Exercise and sport sciences reviews*, 2009. 37(4): p. 165.
41. Fridovich, I., Superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*, 1975. 44(1): p. 147-159.
42. Miller, A.-F., Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters*, 2012. 586(5): p. 585-595.

43. Winterbourn, C.C., Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters*, 1995. 82: p. 969-974.
44. He, J., X. Yang, B. Men, and D. Wang, Interfacial mechanisms of heterogeneous Fenton reactions catalyzed by iron-based materials: A review. *Journal of Environmental Sciences*, 2016. 39: p. 97-109.
45. Pham, A.L.-T., C. Lee, F.M. Doyle, and D.L. Sedlak, A Silica-Supported Iron Oxide Catalyst Capable of Activating Hydrogen Peroxide at Neutral pH Values. *Environmental Science & Technology*, 2009. 43(23): p. 8930-8935.
46. Kehrer, J.P., The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 2000. 149(1): p. 43-50.
47. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological reviews*, 1979. 59(3): p. 527-605.
48. Birben, E., U.M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, and O. Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J*, 2012. 5(1): p. 9-19.
49. Pastor, N., H. Weinstein, E. Jamison, and M. Brenowitz, A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding1. *Journal of Molecular Biology*, 2000. 304(1): p. 55-68.
50. Gutteridge, J., Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 1995. 41(12): p. 1819-1828.
51. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in enzymology*, 1990. 186: p. 1-85.
52. Freeman, B.A. and J.D. Crapo, Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 1982. 47(5): p. 412-26.
53. Lobo, V., A. Patil, A. Phatak, and N. Chandra, Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010. 4(8): p. 118-26.
54. Dizdaroglu, M. and P. Jaruga, Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radic Res*, 2012. 46(4): p. 382-419.
55. Wolff, S.P., M. Crabbe, and P. Thornalley, The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Experientia*, 1984. 40(3): p. 244-246.
56. Blokhina, O., E. Virolainen, and K.V. Fagerstedt, Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, 2003. 91(2): p. 179-194.
57. Rice-Evans, C., 15 Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity. *Antioxidant food supplements in human health*, 1999: p. 239.
58. Halliwell, B. and O.I. Aruoma, DNA damage by oxygen- derived species Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS letters*, 1991. 281(1-2): p. 9-19.
59. Sroka, Z. and W. Cisowski, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 2003. 41(6): p. 753-758.
60. McCord, J.M. and I. Fridovich, Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological chemistry*, 1969. 244(22): p. 6049-6055.
61. Feierabend, J. and S. Engel, Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1986. 251(2): p. 567-576.
62. Wendel, A. and P. Cikryt, The level and half-life of glutathione in human plasma. *FEBS letters*, 1980. 120(2): p. 209-211.
63. Mills, G.C., Hemoglobin catabolism I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *Journal of Biological Chemistry*, 1957. 229(1): p. 189-197.

64. Ursini, F., M. Maiorino, and C. Gregolin, The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1985. 839(1): p. 62-70.
65. Lushchak, V.I., Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*, 2014. 224: p. 164-175.
66. Frei, B., Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *The American journal of clinical nutrition*, 1991. 54(6 Suppl): p. 1113S-1118S.
67. Frei, B., R. Stocker, L. England, and B.N. Ames, Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma, in *Antioxidants in therapy and preventive medicine*. 1990, Springer. p. 155-163.
68. Witting, L. and M. Horwitt, Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria. *Journal of Nutrition*, 1964. 82: p. 19-33.
69. Jialal, I., G.L. Vega, and S.M. Grundy, Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 1990. 82(3): p. 185-191.
70. Bendich, A., L. Machlin, O. Scandurra, G. Burton, and D. Wayner, The antioxidant role of vitamin C. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 1986. 2(2): p. 419-444.
71. Aust, S.D., L.A. Morehouse, and C.E. Thomas, Role of metals in oxygen radical reactions. *Journal of free radicals in biology & medicine*, 1985. 1(1): p. 3-25.
72. Wood, Z.A., E. Schröder, J.R. Harris, and L.B. Poole, Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in biochemical sciences*, 2003. 28(1): p. 32-40.
73. Low, F.M., M.B. Hampton, A.V. Peskin, and C.C. Winterbourn, Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte. *Blood*, 2007. 109(6): p. 2611-2617.
74. Chae, H.Z., S.J. Chung, and S.G. Rhee, Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *Journal of Biological Chemistry*, 1994. 269(44): p. 27670-27678.
75. El-Agamey, A., G.M. Lowe, D.J. McGarvey, A. Mortensen, D.M. Phillip, T.G. Truscott, et al., Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. *Arch Biochem Biophys*, 2004. 430(1): p. 37-48.
76. Rice-Evans, C.A., J. Sampson, P.M. Bramley, and D.E. Holloway, Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? *Free Radic Res*, 1997. 26(4): p. 381-98.
77. Cadenas, E. and L. Packer, *Handbook of antioxidants*. 1996: Marcel Dekker Inc.
78. Howell, R.R. and J.B. Wyngaarden, On the mechanism of peroxidation of uric acids by hemoproteins. *J Biol Chem*, 1960. 235: p. 3544-3550.
79. Ames, B.N., R. Cathcart, E. Schwiers, and P. Hochstein, Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant-and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981. 78(11): p. 6858-6862.
80. Cutler, R.G., Antioxidants and longevity of mammalian species, in *Molecular biology of aging*. 1985, Springer. p. 15-73.
81. Poeggeler, B., S. Saarela, R.J. Reiter, D.X. Tan, L.D. Chen, L.C. Manchester, et al., Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann N Y Acad Sci*, 1994. 738: p. 419-20.
82. Arnao, M.B. and J. Hernandez-Ruiz, The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav*, 2006. 1(3): p. 89-95.
83. Tan, D.X., L.C. Manchester, M.P. Terron, L.J. Flores, and R.J. Reiter, One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*, 2007. 42(1): p. 28-42.

84. Patra, K.C. and N. Hay, The pentose phosphate pathway and cancer. *Trends Biochem Sci*, 2014. 39(8): p. 347-54.
85. Hanukoglu, I. and R. Rapoport, Routes and regulation of NADPH production in steroidogenic mitochondria. *Endocr Res*, 1995. 21(1-2): p. 231-41.
86. Al-Turk, W., S. Stohs, F. El-Rashidy, S. Othman, and O. Shaheen, Changes in glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age. *Pharmacology*, 1987. 34(1): p. 1-8.
87. Pastore, A., G. Federici, E. Bertini, and F. Piemonte, Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 2003. 333(1): p. 19-39.
88. Chai, Y.-C., S.S. Ashraf, K. Rokutan, R. Johnston, and J.A. Thomas, S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1994. 310(1): p. 273-281.
89. Ames, B.N., Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science*, 1983. 221(4617): p. 1256.
90. Gibson, D.D., J. Hawrylko, and P.B. McCay, GSH-dependent inhibition of lipid peroxidation: properties of a potent cytosolic system which protects cell membranes. *Lipids*, 1985. 20(10): p. 704-711.
91. Meister, A., On the cycles of glutathione metabolism and transport. *Current topics in cellular regulation*, 1981. 18: p. 21-58.
92. Meister, A. and M.E. Anderson, Glutathione. *Annual review of biochemistry*, 1983. 52(1): p. 711-760.
93. Townsend, D.M., K.D. Tew, and H. Tapiero, The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2003. 57(3): p. 145-155.
94. Lu, S.C., Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*, 2009. 30(1): p. 42-59.
95. Meister, A. and M.W. Bukenberger, Enzymatic conversion of D-glutamic acid to D-pyrrolidone carboxylic acid by mammalian tissues. *Nature*, 1962. 194: p. 557-9.
96. Lutz, H.U. and A. Bogdanova, Mechanisms tagging senescent red blood cells for clearance in healthy humans. *Regulation of red cell life-span, erythropoiesis, senescence and clearance*, 2007: p. 45.
97. Reed, D.J. and M.W. Fariss, Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol Rev*, 1984. 36(2 Suppl): p. 25s-33s.
98. Meister, A., Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem*, 1988. 263(33): p. 17205-8.
99. Asensi, M., J. Sastre, F.V. Pallardo, J.G. Delaasuncion, J.M. Estrela, and J. Viña, A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Analytical biochemistry*, 1994. 217(2): p. 323-328.
100. Griffith, O.W., Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*, 1980. 106(1): p. 207-212.
101. Reed, D.J., J.R. Babson, P.W. Beatty, A.E. Brodie, W.W. Ellis, and D.W. Potter, High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry*, 1980. 106(1): p. 55-62.
102. Shaik, I.H. and R. Mehvar, Rapid determination of reduced and oxidized glutathione levels using a new thiol-masking reagent and the enzymatic recycling method: application to the rat liver and bile samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2006. 385(1): p. 105-113.
103. Rossi, R., A. Milzani, I. Dalle-Donne, D. Giustarini, L. Lusini, R. Colombo, et al., Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem*, 2002. 48(5): p. 742-53.

104. Monostori, P., G. Wittmann, E. Karg, and S. Túri, Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: an in-depth review. *Journal of Chromatography B*, 2009. 877(28): p. 3331-3346.
105. Hansen, R.E., H. Østergaard, P. Nørgaard, and J.R. Winther, Quantification of protein thiols and dithiols in the picomolar range using sodium borohydride and 4, 4'-dithiodipyridine. *Analytical biochemistry*, 2007. 363(1): p. 77-82.
106. Ellman, G.L., Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959. 82(1): p. 70-7.
107. Owens, C. and R. Belcher, A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochemical Journal*, 1965. 94(3): p. 705.
108. Tietze, F., Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Analytical biochemistry*, 1969. 27(3): p. 502-522.
109. Adams, J.D., Jr., B.H. Lauterburg, and J.R. Mitchell, Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 1983. 227(3): p. 749-54.
110. Brigelius, R., C. Muckel, T.P. Akerboom, and H. Sies, Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol*, 1983. 32(17): p. 2529-34.
111. Guntherberg, H. and J. Rost, The true oxidized glutathione content of red blood cells obtained by new enzymic and paper chromatographic methods. *Anal Biochem*, 1966. 15(2): p. 205-10.
112. Cohn, V.H. and J. Lyle, A fluorometric assay for glutathione. *Analytical biochemistry*, 1966. 14(3): p. 434-440.
113. Hissin, P.J. and R. Hilf, A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*, 1976. 74(1): p. 214-226.
114. Wang, H., W.-S. Wang, and H.-S. Zhang, A spectrofluorimetric method for cysteine and glutathione using the fluorescence system of Zn (II)-8-hydroxyquinoline-5-sulphonic acid complex. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2001. 57(12): p. 2403-2407.
115. Wang, L., L. Wang, T. Xia, G. Bian, L. Dong, Z. Tang, et al., A highly sensitive assay for spectrofluorimetric determination of reduced glutathione using organic nano-probes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2005. 61(11): p. 2533-2538.
116. Hinze, W.L., T.E. Reihl, H. Singh, and Y. Baba, Micelle-enhanced chemiluminescence and application to the determination of biological reductants using lucigenin. *Analytical chemistry*, 1984. 56(12): p. 2180-2191.
117. Romero, F.J. and W. Mueller-Klieser, Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence*, 1998. 13(5): p. 263-266.
118. Mourad, T., K.-L. Min, and J.-P. Steghens, Measurement of oxidized glutathione by enzymatic recycling coupled to bioluminescent detection. *Analytical biochemistry*, 2000. 283(2): p. 146-152.
119. Lau, C., X. Qin, J. Liang, and J. Lu, Determination of cysteine in a pharmaceutical formulation by flow injection analysis with a chemiluminescence detector. *Analytica chimica acta*, 2004. 514(1): p. 45-49.
120. Ensafi, A.A., T. Khayamian, and F. Hasanpour, Determination of glutathione in hemolysed erythrocyte by flow injection analysis with chemiluminescence detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2008. 48(1): p. 140-144.
121. Du, J., Y. Li, and J. Lu, Investigation on the chemiluminescence reaction of luminol-H₂O₂-S²⁻/R-SH system. *Analytica chimica acta*, 2001. 448(1): p. 79-83.

122. Wang, S., H. Ma, J. Li, X. Chen, Z. Bao, and S. Sun, Direct determination of reduced glutathione in biological fluids by Ce (IV)–quinine chemiluminescence. *Talanta*, 2006. 70(3): p. 518-521.
123. Han, H.-Y., Z.-K. He, and Y.-E. Zeng, Chemiluminescence method for the determination of glutathione in human serum using the Ru (phen) 3 2+–KMnO4 system. *Microchimica Acta*, 2006. 155(3-4): p. 431-434.
124. Piccoli, G., M. Fiorani, B. Biagiarelli, F. Palma, L. Potenza, A. Amicucci, et al., Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. *Journal of Chromatography A*, 1994. 676(1): p. 239-246.
125. Carru, C., A. Zinellu, G. Mario Pes, G. Marongiu, B. Tadolini, and L. Deiana, Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. *Electrophoresis*, 2002. 23(11): p. 1716-1721.
126. Shackman, J.G. and D. Ross, Gradient elution isotachopheresis for enrichment and separation of biomolecules. *Analytical chemistry*, 2007. 79(17): p. 6641-6649.
127. Ross, D. and J.G. Kralj, Simple device for multiplexed electrophoretic separations using gradient elution moving boundary electrophoresis with channel current detection. *Analytical chemistry*, 2008. 80(24): p. 9467-9474.
128. Hodáková, J., J. Preisler, F. Foret, and P. Kubáň, Sensitive determination of glutathione in biological samples by capillary electrophoresis with green (515nm) laser-induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 2015. 1391: p. 102-108.
129. Zhang, W., P. Li, Q. Geng, Y. Duan, M. Guo, and Y. Cao, Simultaneous determination of glutathione, cysteine, homocysteine, and cysteinylglycine in biological fluids by ion-pairing high-performance liquid chromatography coupled with precolumn derivatization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2014. 62(25): p. 5845-5852.
130. Katrusiak, A.E., P.G. Paterson, H. Kamencic, A. Shoker, and A.W. Lyon, Pre-column derivatization high-performance liquid chromatographic method for determination of cysteine, cysteinyl–glycine, homocysteine and glutathione in plasma and cell extracts. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. 758(2): p. 207-212.
131. Saitoh, K., K. Koichi, F. Yabiku, Y. Noda, M.D. Porter, and M. Shibukawa, On-column electrochemical redox derivatization for enhancement of separation selectivity of liquid chromatography: Use of redox reaction as secondary chemical equilibrium. *Journal of Chromatography A*, 2008. 1180(1–2): p. 66-72.
132. Reeve, J., J. Kuhlenkamp, and N. Kaplowitz, Estimation of glutathione in rat liver by reversed-phase high-performance liquid chromatography: separation from cysteine and γ -glutamylcysteine. *Journal of Chromatography A*, 1980. 194(3): p. 424-428.
133. Yoshida, T., Determination of reduced and oxidized glutathione in erythrocytes by high-performance liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1996. 678(2): p. 157-164.
134. Tsikas, D., J. Sandmann, D. Holzberg, P. Pantazis, M. Raida, and J.C. Frölich, Determination of S-Nitrosoglutathione in Human and Rat Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence and Ultraviolet Absorbance Detection after Precolumn Derivatization with o-Phthalaldehyde. *Analytical Biochemistry*, 1999. 273(1): p. 32-40.
135. Lipsa, D., C. Cacho, P. Leva, J. Barrero-Moreno, and P. Aguar, Development of a HPLC-UV Method for the Simultaneous Determination of Intracellular Glutathione Species in Human Cells. *Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques*, 2015. 2015.
136. Rabenstein, D.L. and R. Saetre, Mercury-based electrochemical detector for liquid chromatography for the detection of glutathione and other sulfur-containing compounds. *Analytical Chemistry*, 1977. 49(7): p. 1036-1039.

137. Allison, L.A., G.S. Mayer, and R.E. Shoup, The o-phthalaldehyde derivatives of amines for high-speed liquid chromatography/electrochemistry. *Analytical Chemistry*, 1984. 56(7): p. 1089-1096.
138. Richie, J.P. and C.A. Lang, The determination of glutathione, cyst(e)ine, and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Analytical Biochemistry*, 1987. 163(1): p. 9-15.
139. Imai, K., T. Toyo'oka, and Y. Watanabe, A novel fluorogenic reagent for thiols: Ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate. *Analytical Biochemistry*, 1983. 128(2): p. 471-473.
140. Abukhalaf, I.K., N.A. Silvestrov, J.M. Menter, D.A. von Deutsch, M.A. Bayorh, R.R. Soggi, et al., High performance liquid chromatographic assay for the quantitation of total glutathione in plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002. 28(3-4): p. 637-643.
141. Ates, B., B.C. Ercal, K. Manda, L. Abraham, and N. Ercal, Determination of glutathione disulfide levels in biological samples using thiol-disulfide exchanging agent, dithiothreitol. *Biomedical Chromatography*, 2009. 23(2): p. 119-123.
142. Kand'ár, R., P. Žáková, H. Lotková, O. Kučera, and Z. Červinková, Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2007. 43(4): p. 1382-1387.
143. Sakhi, A.K., R. Blomhoff, and T.E. Gundersen, Simultaneous and trace determination of reduced and oxidized glutathione in minute plasma samples using dual mode fluorescence detection and column switching high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2007. 1142(2): p. 178-184.
144. Sakhi, A.K., K.M. Russnes, S. Smeland, R. Blomhoff, and T.E. Gundersen, Simultaneous quantification of reduced and oxidized glutathione in plasma using a two-dimensional chromatographic system with parallel porous graphitized carbon columns coupled with fluorescence and coulometric electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 2006. 1104(1-2): p. 179-189.
145. Liang, S.-C., H. Wang, Z.-M. Zhang, and H.-S. Zhang, Determination of thiol by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection with 5-methyl-(2-(m-iodoacetylaminophenyl)benzoxazole). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005. 381(5): p. 1095-1100.
146. Nolin, T.D., M.E. McMenamin, and J. Himmelfarb, Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, and glutathione in human plasma by high-performance liquid chromatography: Application to studies of oxidative stress. *Journal of Chromatography B*, 2007. 852(1-2): p. 554-561.
147. Ercal, N., P. Yang, and N. Aykin, Determination of biological thiols by high-performance liquid chromatography following derivatization by ThioGlo maleimide reagents. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. 753(2): p. 287-292.
148. Hoff, S., F.H. Larsen, M.L. Andersen, and M.N. Lund, Quantification of protein thiols using ThioGlo 1 fluorescent derivatives and HPLC separation. *Analyst*, 2013. 138(7): p. 2096-2103.
149. Wada, M., M. Hirose, M. Kuroki, R. Ikeda, Y. Sekitani, N. Takamura, et al., Simultaneous determination of homocysteine, methionine and cysteine in maternal plasma after delivery by HPLC-fluorescence detection with DBD-F as a label. *Biomedical Chromatography*, 2013. 27(6): p. 708-713.
150. Guo, X.F., H. Zhu, H. Wang, and H.S. Zhang, Determination of thiol compounds by HPLC and fluorescence detection with 1, 3, 5, 7-tetramethyl-8-bromomethyl-difluoroboradiaza-s-indacene. *Journal of separation science*, 2013. 36(4): p. 658-664.

151. Benkova, B., V. Lozanov, I.P. Ivanov, A. Todorova, I. Milanov, and V. Mitev, Determination of plasma aminothiols by high performance liquid chromatography after precolumn derivatization with N-(2-acridonyl)maleimide. *Journal of Chromatography B*, 2008. 870(1): p. 103-108.
152. Kataoka, H., K. Takagi, H. Tanaka, and M. Makita, Determination of Sulfur Amino Acids, Glutathione, and Related Aminothiols in Biological Samples by Gas Chromatography with Flame Photometric Detection, in *Amino Acid Analysis Protocols*, C. Cooper, N. Packer, and K. Williams, Editors. 2000, Humana Press: Totowa, NJ. p. 207-225.
153. Cabral, C.B., K.H. Bullock, D.J. Bischoff, R.G. Tompkins, Y.M. Yu, and J.K. Kelleher, Estimating glutathione synthesis with deuterated water: A model for peptide biosynthesis. *Analytical Biochemistry*, 2008. 379(1): p. 40-44.
154. Tea, I., V. Ferchaud-Roucher, A. Küster, D. Darmaun, and R.J. Robins, Determination of ¹³C isotopic enrichment of glutathione and glycine by gas chromatography/combustion/isotope ratio mass spectrometry after formation of the N- or N,S-ethoxycarbonyl methyl ester derivatives. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007. 21(20): p. 3245-3252.
155. Küster, A., I. Tea, S. Sweeten, J.-C. Rozé, R.J. Robins, and D. Darmaun, Simultaneous determination of glutathione and cysteine concentrations and ²H enrichments in microvolumes of neonatal blood using gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008. 390(5): p. 1403-1412.
156. Capitan, P., T. Malmezat, D. Breuillé, and C. Obled, Gas chromatographic–mass spectrometric analysis of stable isotopes of cysteine and glutathione in biological samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1999. 732(1): p. 127-135.
157. Tsikas, D., J. Sandmann, S. Rossa, F.-M. Gutzki, and J.C. Frölich, Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Detection of S-Nitroso-cysteine and S-Nitroso-glutathione. *Analytical Biochemistry*, 1999. 272(2): p. 117-122.
158. Lyons, J., A. Rauh-Pfeiffer, Y.M. Yu, X.-M. Lu, D. Zurakowski, R.G. Tompkins, et al., Blood glutathione synthesis rates in healthy adults receiving a sulfur amino acid-free diet. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. 97(10): p. 5071-5076.
159. Tsikas, D., J. Sandmann, S. Rossa, F.-M. Gutzki, and J.C. Frölich, Investigations of S-Transnitrosylation Reactions between Low- and High-Molecular-Weight S-Nitroso Compounds and Their Thiols by High-Performance Liquid Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 1999. 270(2): p. 231-241.
160. Tsikas, D., M. Raida, J. Sandmann, S. Rossa, W.-G. Forssmann, and J.C. Frölich, Electrospray ionization mass spectrometry of low-molecular-mass S-nitroso compounds and their thiols. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000. 742(1): p. 99-108.
161. Camera, E., M. Rinaldi, S. Briganti, M. Picardo, and S. Fanali, Simultaneous determination of reduced and oxidized glutathione in peripheral blood mononuclear cells by liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. 757(1): p. 69-78.
162. Norris, R.L., G.K. Eaglesham, G.R. Shaw, M.J. Smith, R.K. Chiswell, A.A. Seawright, et al., A sensitive and specific assay for glutathione with potential application to glutathione disulphide, using high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. 762(1): p. 17-23.
163. Trabesinger, A.H., O.M. Weber, C.O. Duc, and P. Boesiger, Detection of glutathione in the human brain in vivo by means of double quantum coherence filtering. *Magnetic resonance in medicine*, 1999. 42(2): p. 283-289.

164. Sies, H., Oxidative stress. 2013: Elsevier.
165. Frank, L., J. Iqbal, M. Hass, and D. Massaro, New "rest period" protocol for inducing tolerance to high O₂ exposure in adult rats. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 1989. 257(4): p. L226-L231.
166. Orrenius, S., D.J. McConkey, G. Bellomo, and P. Nicotera, Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1989. 10(7): p. 281-285.
167. Cochrane, C.G., Mechanisms of oxidant injury of cells. *Molecular aspects of medicine*, 1991. 12(2): p. 137-147.
168. Lang, P.A., S. Kaiser, S. Myssina, T. Wieder, F. Lang, and S.M. Huber, Role of Ca²⁺-activated K⁺ channels in human erythrocyte apoptosis. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2003. 285(6): p. C1553-C1560.
169. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochemical and biophysical research communications*, 2010. 393(4): p. 561-564.
170. Çimen, M.B., Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica chimica acta*, 2008. 390(1): p. 1-11.
171. Alayash, A.I., R.P. Patel, and R.E. Cashon, Redox reactions of hemoglobin and myoglobin: biological and toxicological implications. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2001. 3(2): p. 313-327.
172. Barvitenko, N.N., N.C. Adragna, and R.E. Weber, Erythrocyte signal transduction pathways, their oxygenation dependence and functional significance. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2005. 15(1-4): p. 001-018.
173. Bracci, R., S. Perrone, and G. Buonocore, Oxidant injury in neonatal erythrocytes during the perinatal period. *Acta Paediatrica*, 2002. 91(s438): p. 130-134.
174. Abed, M., S.T. Towhid, S. Mia, T. Pakladok, I. Alesutan, O. Borst, et al., Sphingomyelinase-induced adhesion of eryptotic erythrocytes to endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2012. 303(9): p. C991-C999.
175. Ahmed, M.S.E., H. Langer, M. Abed, J. Voelkl, and F. Lang, The uremic toxin acrolein promotes suicidal erythrocyte death. *Kidney and Blood Pressure Research*, 2013. 37(2-3): p. 158-167.
176. Böttger, E., G. Multhoff, J.F. Kun, and M. Esen, Plasmodium falciparum-infected erythrocytes induce granzyme B by NK cells through expression of host-Hsp70. *PLoS One*, 2012. 7(3): p. e33774.
177. Felder, K.M., K. Hoelzle, M. Ritzmann, T. Kilchling, D. Schiele, K. Heinritzi, et al., Hemotrophic mycoplasmas induce programmed cell death in red blood cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2011. 27(5): p. 557-564.
178. Fırat, U., S. Kaya, A. Çim, H. Büyükbayram, O. Gökalp, M.S. Dal, et al., Increased caspase-3 immunoreactivity of erythrocytes in STZ diabetic rats. *Experimental diabetes research*, 2012. 2012.
179. Ganesan, S., N.D. Chaurasiya, R. Sahu, L.A. Walker, and B.L. Tekwani, Understanding the mechanisms for metabolism-linked hemolytic toxicity of primaquine against glucose 6-phosphate dehydrogenase deficient human erythrocytes: evaluation of eryptotic pathway. *Toxicology*, 2012. 294(1): p. 54-60.
180. Officioso, A., C. Manna, K. Alzoubi, and F. Lang, Bromfenvinphos induced suicidal death of human erythrocytes. *Pesticide biochemistry and physiology*, 2016. 126: p. 58-63.
181. Pretorius, E., J.N. du Plooy, and J. Bester, A Comprehensive Review on Eryptosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2016. 39(5): p. 1977-2000.
182. Abed, M., S.T. Towhid, N. Shaik, and F. Lang, Stimulation of suicidal death of erythrocytes by rifampicin. *Toxicology*, 2012. 302(2): p. 123-128.

183. Zappulla, D., Environmental stress, erythrocyte dysfunctions, inflammation, and the metabolic syndrome: adaptations to CO₂ increases? *Journal of the cardiometabolic syndrome*, 2008. 3(1): p. 30-34.
184. Calderon-Salinas, J., E. Munoz-Reyes, J. Guerrero-Romero, M. Rodriguez-Moran, R. Bracho-Riquelme, M. Carrera-Gracia, et al., Eryptosis and oxidative damage in type 2 diabetic mellitus patients with chronic kidney disease. *Molecular and cellular biochemistry*, 2011. 357(1-2): p. 171-179.
185. Maellaro, E., S. Leoncini, D. Moretti, B. Del Bello, I. Tanganelli, C. De Felice, et al., Erythrocyte caspase-3 activation and oxidative imbalance in erythrocytes and in plasma of type 2 diabetic patients. *Acta diabetologica*, 2013. 50(4): p. 489-495.
186. Nicolay, J.P., J. Schneider, O.M. Niemoeller, F. Artunc, M. Portero-Otin, G. Haik Jr, et al., Stimulation of suicidal erythrocyte death by methylglyoxal. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2006. 18(4-5): p. 223-232.
187. Myssina, S., S.M. Huber, C. Birka, P.A. Lang, K.S. Lang, B. Friedrich, et al., Inhibition of erythrocyte cation channels by erythropoietin. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2003. 14(11): p. 2750-2757.
188. Polak-Jonkisz, D. and L. Purzyc, Ca²⁺ influx versus efflux during eryptosis in uremic erythrocytes. *Blood purification*, 2012. 34(3-4): p. 209-210.
189. Lang, P.A., O. Beringer, J.P. Nicolay, O. Amon, D.S. Kempe, T. Hermle, et al., Suicidal death of erythrocytes in recurrent hemolytic uremic syndrome. *Journal of molecular medicine*, 2006. 84(5): p. 378-388.
190. Kempe, D.S., A. Akel, P.A. Lang, T. Hermle, R. Biswas, J. Muresanu, et al., Suicidal erythrocyte death in sepsis. *Journal of molecular medicine*, 2007. 85(3): p. 273-281.
191. Lang, P.A., R.S. Kasinathan, V.B. Brand, C. Duranton, C. Lang, S. Koka, et al., Accelerated clearance of Plasmodium-infected erythrocytes in sickle cell trait and annexin-A7 deficiency. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2009. 24(5-6): p. 415-428.
192. Föllner, M., D. Bobbala, S. Koka, S.M. Huber, E. Gulbins, and F. Lang, Suicide for survival-death of infected erythrocytes as a host mechanism to survive malaria. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2009. 24(3-4): p. 133-140.
193. Lang, K.S., B. Roll, S. Myssina, M. Schittenhelm, H.-G. Scheel-Walter, L. Kanz, et al., Enhanced erythrocyte apoptosis in sickle cell anemia, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2002. 12(5-6): p. 365-372.
194. Kempe, D.S., P.A. Lang, C. Duranton, A. Akel, K.S. Lang, S.M. Huber, et al., Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *The FASEB journal*, 2006. 20(2): p. 368-370.
195. Lang, E., S.M. Qadri, and F. Lang, Killing me softly—suicidal erythrocyte death. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2012. 44(8): p. 1236-1243.
196. Qadri, S.M., H. Mahmud, E. Lang, S. Gu, D. Bobbala, C. Zelenak, et al., Enhanced suicidal erythrocyte death in mice carrying a loss- of- function mutation of the adenomatous polyposis coli gene. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2012. 16(5): p. 1085-1093.
197. Föllner, M., I. Harris, A. Elia, R. John, F. Lang, T.J. Kavanagh, et al., Functional significance of glutamate–cysteine ligase modifier for erythrocyte survival in vitro and in vivo. *Cell Death & Differentiation*, 2013. 20(10): p. 1350-1358.
198. Chirico, E.N. and V. Pialoux, Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB life*, 2012. 64(1): p. 72-80.
199. Ginsburg, H. and H. Atamna, The redox status of malaria-infected erythrocytes: an overview with an emphasis on unresolved problems. *Parasite (Paris, France)*, 1994. 1(1): p. 5-13.

200. Awasthi, Y., E. Beutler, and S. Srivastava, Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 1975. 250(13): p. 5144-5149.
201. Low, F.M., M.B. Hampton, and C.C. Winterbourn, Peroxiredoxin 2 and peroxide metabolism in the erythrocyte. *Antioxidants & redox signaling*, 2008. 10(9): p. 1621-1630.
202. Eroglu, S., D. Pandir, F.G. Uzun, and H. Bas, Protective role of vitamins C and E in diclorvos-induced oxidative stress in human erythrocytes in vitro. *Biological research*, 2013. 46(1): p. 33-38.
203. Raval, J.S., J. Fontes, U. Banerjee, M. Yazer, E. Mank, and A. Palmer, Ascorbic acid improves membrane fragility and decreases haemolysis during red blood cell storage. *Transfusion Medicine*, 2013. 23(2): p. 87-93.
204. Arruda, M.M., G. Mecabo, C.A. Rodrigues, S.S. Matsuda, I.B. Rabelo, and M.S. Figueiredo, Antioxidant vitamins C and E supplementation increases markers of haemolysis in sickle cell anaemia patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *British journal of haematology*, 2013. 160(5): p. 688-700.
205. Iuchi, Y., F. Okada, R. Takamiya, N. Kibe, S. Tsunoda, O. Nakajima, et al., Rescue of anaemia and autoimmune responses in SOD1-deficient mice by transgenic expression of human SOD1 in erythrocytes. *Biochemical Journal*, 2009. 422(2): p. 313-320.
206. Grzelak, A., M. Kruszewski, E. Macierzyńska, Ł. Piotrowski, Ł. Pułaski, B. Rychlik, et al., The effects of superoxide dismutase knockout on the oxidative stress parameters and survival of mouse erythrocyt. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 2009. 14(1): p. 23-34.
207. Starzyński, R.R., F. Canonne-Hergaux, A. Willemetz, M.A. Gralak, J. Woliński, A. Styś, et al., Haemolytic anaemia and alterations in hepatic iron metabolism in aged mice lacking Cu, Zn-superoxide dismutase. *Biochemical Journal*, 2009. 420(3): p. 383-390.
208. Gaetani, G.F., S. Galiano, L. Canepa, A.M. Ferraris, and H.N. Kirkman, Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 1989. 73(1): p. 334-339.
209. Cohen, G. and P. Hochstein, Bringing An Enzyme Out Of The Closet-A Citation-Classic Commentary On Glutathione-Peroxidase-The Primary Agent For The Elimination Of Hydrogen-Peroxide In Erythrocytes By Cohen, G. And Hochstein, P. *Current Contents/Life Sciences*, 1991(16): p. 9-9.
210. Kirkman, H.N. and G.F. Gaetani, Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984. 81(14): p. 4343-4347.
211. Gaetani, G.F., A. Ferraris, M. Rolfo, R. Mangerini, S. Arena, and H. Kirkman, Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood*, 1996. 87(4): p. 1595-1599.
212. Agar, N.S., S. Sadrzadeh, P.E. Hallaway, and J.W. Eaton, Erythrocyte catalase. A somatic oxidant defense? *Journal of Clinical Investigation*, 1986. 77(1): p. 319.
213. Gallo, G. and G. Martino, Red blood cell glutathione peroxidase activity in female nulligravid and pregnant rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009. 7(1): p. 1.
214. Nagababu, E., F.J. Chrest, and J.M. Rifkind, Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2003. 1620(1): p. 211-217.
215. Ogasawara, Y., T. Ohminato, Y. Nakamura, and K. Ishii, Structural and functional analysis of native peroxiredoxin 2 in human red blood cells. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 2012. 44(7): p. 1072-1077.

216. Bilmen, S., T.A. Aksu, S. Gümüşlü, D.K. Korgun, and D. Canatan, Antioxidant capacity of G-6-PD-deficient erythrocytes. *Clinica chimica acta*, 2001. 303(1): p. 83-86.
217. Damonte, G., L. Guida, A. Sdraffa, U. Benatti, E. Melloni, G. Forteleoni, et al., Mechanisms of perturbation of erythrocyte calcium homeostasis in favism. *Cell calcium*, 1992. 13(10): p. 649-658.
218. Mavelli, I., M.R. Ciriolo, L. Rossi, T. Meloni, G. Forteleoni, A. FLORA, et al., Favism: a hemolytic disease associated with increased superoxide dismutase and decreased glutathione peroxidase activities in red blood cells. *European journal of biochemistry*, 1984. 139(1): p. 13-18.
219. Duranton, C., S.M. Huber, and F. Lang, Oxidation induces a Cl⁻ dependent cation conductance in human red blood cells. *The Journal of physiology*, 2002. 539(3): p. 847-855.
220. Bookchin, R.M., O.E. Ortiz, and V.L. Lew, Activation of calcium-dependent potassium channels in deoxygenated sickled red cells. *Progress in clinical and biological research*, 1987. 240: p. 193.
221. Brugnara, C., L. de Franceschi, and S.L. Alper, Inhibition of Ca (2+)-dependent K⁺ transport and cell dehydration in sickle erythrocytes by clotrimazole and other imidazole derivatives. *Journal of Clinical Investigation*, 1993. 92(1): p. 520.
222. Huber, S.M., A.C. Uhlemann, N.L. Gamper, C. Duranton, P.G. Kremsner, and F. Lang, Plasmodium falciparum activates endogenous Cl⁻ channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *The EMBO journal*, 2002. 21(1-2): p. 22-30.
223. Tanneur, V., C. Duranton, V.B. Brand, C.D. Sandu, C. Akkaya, R.S. Kasinathan, et al., Purinoceptors are involved in the induction of an osmolyte permeability in malaria-infected and oxidized human erythrocytes. *The FASEB journal*, 2006. 20(1): p. 133-135.
224. Myssina, S., P.A. Lang, D.S. Kempe, S. Kaiser, S.M. Huber, T. Wieder, et al., Cl⁻ channel blockers NPPB and niflumic acid blunt Ca²⁺-induced erythrocyte 'apoptosis'. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2004. 14(4-6): p. 241-248.
225. Matarrese, P., E. Straface, D. Pietraforte, L. Gambardella, R. Vona, A. Maccaglia, et al., Peroxynitrite induces senescence and apoptosis of red blood cells through the activation of aspartyl and cysteinyl proteases. *The FASEB journal*, 2005. 19(3): p. 416-418.
226. Mandal, D., V. Baudin-Creuz, A. Bhattacharyya, S. Pathak, J. Delaunay, M. Kundu, et al., Caspase 3-mediated proteolysis of the N-terminal cytoplasmic domain of the human erythroid anion exchanger 1 (band 3). *Journal of Biological Chemistry*, 2003. 278(52): p. 52551-52558.
227. Bratosin, D., J. Estaquier, F. Petit, D. Arnoult, B. Quatannens, J. Tissier, et al., Programmed cell death in mature erythrocytes: a model for investigating death effector pathways operating in the absence of mitochondria. *Cell death and differentiation*, 2001. 8(12): p. 1143-1156.
228. Mandal, D., P.K. Moitra, S. Saha, and J. Basu, Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes. *FEBS letters*, 2002. 513(2-3): p. 184-188.
229. Berg, C., I. Engels, A. Rothbart, K. Lauber, A. Renz, S. Schlosser, et al., Human mature red blood cells express caspase-3 and caspase-8, but are devoid of mitochondrial regulators of apoptosis. *Cell death and differentiation*, 2001. 8(12): p. 1197-1206.
230. Lang, K., S. Myssina, V. Brand, C. Sandu, P. Lang, S. Berchtold, et al., Involvement of ceramide in hyperosmotic shock-induced death of erythrocytes. *Cell Death & Differentiation*, 2004. 11(2): p. 231-243.
231. Weil, M., M.D. Jacobson, and M.C. Raff, Are caspases involved in the death of cells with a transcriptionally inactive nucleus? Sperm and chicken erythrocytes. *Journal of cell science*, 1998. 111(18): p. 2707-2715.

232. Dumaswala, U., M. Wilson, Y. Wu, J. Wykle, L. Zhuo, L. Douglass, et al., Glutathione loading prevents free radical injury in red blood cells after storage. *Free radical research*, 2000. 33(5): p. 517-529.
233. Ghashghaeinia, M., J.C. Cluitmans, A. Akel, P. Dreischer, M. Toulany, M. Köberle, et al., The impact of erythrocyte age on eryptosis. *British journal of haematology*, 2012. 157(5): p. 606-614.
234. Vota, D.M., R.L. Crisp, A.B. Nesse, and D.C. Vittori, Oxidative stress due to aluminum exposure induces eryptosis which is prevented by erythropoietin. *Journal of cellular biochemistry*, 2012. 113(5): p. 1581-1589.
235. Gökkuşu, C. and T. Mostafazadeh, Changes of oxidative stress in various tissues by long-term administration of vitamin E in hypercholesterolemic rats. *Clinica Chimica Acta*, 2003. 328(1): p. 155-161.
236. Jain, S., Vitamin E and stabilization of membrane lipid organization in red blood cells with peroxidative damage. *Biomedica biochimica acta*, 1982. 42(11-12): p. S43-7.
237. Kobayashi, S., H. Moriya, K. Aso, and T. Ohtake, Vitamin E-bonded hemodialyzer improves atherosclerosis associated with a rheological improvement of circulating red blood cells. *Kidney international*, 2003. 63(5): p. 1881-1887.
238. TEMD, Diabetes Mellitus Ve Komplikasyonlarının Tanı, Tedavi ve İzlem Kılavuzu. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği, 2016: p. http://www.turkendokrin.org/files/DIYABET_web.pdf.
239. Thornalley, P.J., Modification of the glyoxalase system in human red blood cells by glucose in vitro. *Biochemical Journal*, 1988. 254(3): p. 751-755.
240. Nwose, E., H. Jelinek, R. Richards, and P. Kerr, Erythrocyte oxidative stress in clinical management of diabetes and its cardiovascular complications. *British journal of biomedical science*, 2007. 64(1): p. 35-43.
241. Bandeira, S.d.M., G.d.S. Guedes, L.J.S.d. Fonseca, A.S. Pires, D.P. Gelain, J.C.F. Moreira, et al., Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012. 2012.
242. Ellman, G. and H. Lysko, A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Analytical biochemistry*, 1979. 93: p. 98-102.
243. Hu, M.-L., [41] Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods in enzymology*, 1994. 233: p. 380-385.
244. Daniel W. Tholen, A.K., John W. Kennedy, Jan S. Krouwer, Kristen Meiser, Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods. USA: CLSI, 2004. CLSI document EP05-A2.
245. Fang, Y.-Z., S. Yang, and G. Wu, Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 2002. 18(10): p. 872-879.
246. Guarino, M.P., R.A. Afonso, N. Raimundo, J.F. Raposo, and M.P. Macedo, Hepatic glutathione and nitric oxide are critical for hepatic insulin-sensitizing substance action. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2003. 284(4): p. G588-G594.
247. Sen, C., L. Packer, and O. Hänninen, Biological thiols and redox regulation of cellular signal transduction pathways. *Handbook of oxidants and antioxidants in exercise*. Amsterdam, Elsevier, 2000: p. 375-402.
248. Li, L., G.-F. Zhang, K. Lee, R. Lopez, S.F. Previs, B. Willard, et al., A Western diet induced NAFLD in LDLR^{-/-} mice is associated with reduced hepatic glutathione synthesis. *Free Radical Biology and Medicine*, 2016. 96: p. 13-21.
249. Aw, T.Y., Cellular redox: a modulator of intestinal epithelial cell proliferation. *Physiology*, 2003. 18(5): p. 201-204.

250. Sies, H., Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999. 27(9): p. 916-921.
251. Cruz, R., M.W. Almaguer, and R.J. Bergado, [Glutathione in cognitive function and neurodegeneration]. *Revista de neurologia*, 2002. 36(9): p. 877-886.
252. Ni, P., Y. Sun, H. Dai, J. Hu, S. Jiang, Y. Wang, et al., Highly sensitive and selective colorimetric detection of glutathione based on Ag [I] ion-3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB). *Biosensors and Bioelectronics*, 2015. 63: p. 47-52.
253. Moore, T., A. Le, A.-K. Niemi, T. Kwan, K. Cusmano-Ozog, G.M. Enns, et al., A new LC-MS/MS method for the clinical determination of reduced and oxidized glutathione from whole blood. *Journal of Chromatography B*, 2013. 929: p. 51-55.
254. Zhang, F., M.J. Bartels, M.J. LeBaron, M.R. Schisler, B.B. Gollapudi, and N.P. Moore, A novel approach for concurrent quantitation of glutathione, glutathione disulfide, and 2-hydroxyethylated glutathione in lungs of mice exposed to ethylene oxide, using liquid chromatography-positive electrospray tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 2015. 29(9): p. 1364-1374.
255. Fahrenholz, T., M.M. Wolle, H.S. Kingston, S. Faber, J.C. Kern, M. Pamuku, et al., Molecular speciated isotope dilution mass spectrometric methods for accurate, reproducible and direct quantification of reduced, oxidized and total glutathione in biological samples. *Analytical chemistry*, 2015. 87(2): p. 1232-1240.
256. Camera, E. and M. Picardo, Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *Journal of Chromatography B*, 2002. 781(1): p. 181-206.
257. Carru, C., L. Deiana, S. Sotgia, G.M. Pes, and A. Zinellu, Plasma thiols redox status by laser- induced fluorescence capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2004. 25(6): p. 882-889.
258. Chen, W., Y. Zhao, T. Seefeldt, and X. Guan, Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2008. 48(5): p. 1375-1380.
259. Erel, O. and S. Neselioglu, A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis. *Clinical biochemistry*, 2014. 47(18): p. 326-332.
260. Yang, Q., C. Krautmacher, D. Schilling, M.R. Pittelkow, and S. Naylor, Simultaneous analysis of oxidized and reduced glutathione in cell extracts by capillary zone electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, 2002. 16(3): p. 224-228.
261. Stempak, D., S. Dallas, J. Klein, R. Bendayan, G. Koren, and S. Baruchel, Glutathione stability in whole blood: effects of various deproteinizing acids. *Therapeutic drug monitoring*, 2001. 23(5): p. 542-549.
262. Reed, D., J. Babson, P. Beatty, A. Brodie, W. Ellis, and D. Potter, High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical biochemistry*, 1980. 106(1): p. 55-62.
263. Pakfetrat, A., Z. Dalirsani, S.I. Hashemy, A. Ghazi, L.V. Mostaan, K. Anvari, et al., Evaluation of serum levels of oxidized and reduced glutathione and total antioxidant capacity in patients with head and neck squamous cell carcinoma. 2017.
264. Vogt, W., Oxidation of methionyl residues in proteins: tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995. 18(1): p. 93-105.
265. Claiborne, A., J.I. Yeh, T.C. Mallett, J. Luba, E.J. Crane, V. Charrier, et al., Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. *Biochemistry*, 1999. 38(47): p. 15407-15416.
266. Klatt, P. and S. Lamas, Regulation of protein function by S- glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *European Journal of Biochemistry*, 2000. 267(16): p. 4928-4944.

267. GSH/GSSG Ratio Assay Kit.
http://www.merckmillipore.com/TR/tr/product/GSH%2FGSSG-Ratio-Assay-Kit,EMD_BIO-371757#documentation. GSH/GSSG Ratio Assay Kit(Son erişim tarihi: 02.01.2017).
268. Microplate Assay for GSH/GSSG. <http://www.oxfordbiomed.com/gshgssg-assay-1> Son erişim tarihi: 25.12.2016.
269. Delmas-Beauvieux, M.-C., E. Peuchant, A. Couchouron, J. Constans, C. Sergeant, M. Simonoff, et al., The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients: effects of supplementation with selenium or beta-carotene. *The American journal of clinical nutrition*, 1996. 64(1): p. 101-107.
270. Navarro, J., E. Obrador, J.A. Pellicer, M. Asensi, J. Viña, and J.M. Estrela, Blood glutathione as an index of radiation-induced oxidative stress in mice and humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 1997. 22(7): p. 1203-1209.
271. Spickett, C.M., J. Reglinski, W.E. Smith, R. Wilson, J.J. Walker, and J. McKillop, Erythrocyte glutathione balance and membrane stability during preeclampsia. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998. 24(6): p. 1049-1055.
272. Samiec, P.S., C. Drews-Botsch, E.W. Flagg, J.C. Kurtz, P. Sternberg, R.L. Reed, et al., Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998. 24(5): p. 699-704.
273. Sampathkumar, R., M. Balasubramanyam, S. Sudarslal, M. Rema, V. Mohan, and P. Balaram, Increased glutathionylated hemoglobin (HbSSG) in type 2 diabetes subjects with microangiopathy. *Clinical biochemistry*, 2005. 38(10): p. 892-899.
274. De Mattia, G., M. Bravi, O. Laurenti, M. Cassone-Faldetta, A. Proietti, O. De Luca, et al., Reduction of oxidative stress by oral N-acetyl-L-cysteine treatment decreases plasma soluble vascular cell adhesion molecule-1 concentrations in non-obese, non-dyslipidaemic, normotensive, patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetologia*, 1998. 41(11): p. 1392-1396.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılı Malatya doğumlu. İlköğrenimimi Topsöğüt İlköğretim Okulunda, orta öğrenimimi Atatürk Ortaokulunda, lise öğrenimimi Malatya Anadolu Lisesinde tamamladı. 2004 yılında girdiğim Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesinden 2011 yılında mezun oldu. 2011 yılı Eylül ile 2012 yılı Mayıs ayları arasında Muş Devlet Hastanesi Acil servisinde pratisyen hekim olarak çalıştı. 2012 yılının Aralık ayından beri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümünde asistan olarak görev yapmaktadır.

