

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

TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTEYİ ÖLÇEN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi
Dr. Merve ERGİN

Ankara, 2015

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ATATÜRK EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTEYİ ÖLÇEN YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Uzmanlık Tezi
Dr. Merve ERGİN

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Özcan EREL

Ankara, 2015

ÖNSÖZ

Asistanlığım süresince ve tezimin her aşamasında bana ışık tutan, cesaretlendiren, yanında çalışmaktan her zaman onur duyduğum, insani ve ahlaki değerleriyle de örnek edindiğim ve tecrübelerinden faydalanırken göstermiş olduğu sabır ve anlayıştan ötürü değerli hocam Prof. Dr. Özcan EREL'e teşekkürü borç bilirim.

Birlikte olduğumuz süreç boyunca bilgilerini ve desteklerini gülen yüzleriyle hiç esirgemeyen değerli başasistanlarımız Doç. Dr. Cemile BİÇER ve Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN'a şükranlarımı sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim boyunca yakın ilgilerini gördüğüm, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, ihtiyaç duyduğum tüm zamanlarda yanımda olan, Ankara'da beni yalnız hissettirmeyen, uzman olmaktan da öte benim için birer abla, ağabey olan değerli uzmanlarımız Uzm. Dr. Pervin BARAN, Uzm. Dr. Orhan ŞEN, Uzm. Dr. Güler ŞAŞMAZ ve Uzm. Dr. Funda EREN'e minnettarım.

İyi ve zor günleri paylaştığım, birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, beni içtenlikle destekleyen sevgili asistan arkadaşlarım Salim NEŞELİOĞLU, Semra IŞIKOĞLU ve Murat ALIŞIK'a ve tüm laboratuvar çalışanlarına ve her koşulda yanımda olan dostlarıma teşekkür ederim.

Her zaman ailem oldukları için kendimi şanslı hissettiğim ve şükrettiğim, attığım her adımda beni koşulsuz destekleyen, var olma nedenim anneme, bugünlere gelmemde büyük pay sahibi olan ama maalesef yanımda olamayan ve benimle her zaman gurur duyduğunu bildiğim babama bu tezi ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1 Serbest radikaller.....	1
1.1.2 Serbest oksijen radikalleri.....	1
1.1.2.1 Süperoksit radikali.....	3
1.1.2.2 Hidrojen perosit.....	3
1.1.2.3 Hidroksil radikali.....	4
1.2 Serbest radikallerin kaynakları.....	5
1.3 Serbest radikallerin etkileri.....	6
1.3.1 Serbest radikallerin proteinlere etkisi.....	6
1.3.2 Serbest radikallerin lipidlere etkisi.....	6
1.3.3 Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri.....	7
1.3.4 Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi.....	7
1.4 Antioksidan sistem.....	8
1.5 Antioksidanların sınıflandırılması.....	9
1.5.1 Enzimatik olmayan antioksidanlar.....	10
1.5.1.1 E vitamini.....	10
1.5.1.2 C vitamini.....	11
1.5.1.3 A vitamini.....	12
1.5.1.4 Glutatyon.....	13
1.5.1.5 Ürik asit.....	14

1.5.1.6 Lipoik asit.....	14
1.5.1.7 Bilirubin.....	15
1.5.1.8 Fenolik bileşikler.....	16
1.5.1.8.1 Fenolik asitler.....	16
1.5.1.8.2 Flavonoidler.....	18
1.5.2 Enzimatik antioksidanlar.....	19
1.5.2.1 Süperoksit dismutaz.....	19
1.5.2.2 Katalaz.....	20
1.5.2.3 Glutasyon peroksidaz.....	20
1.5.2.4 Glutasyon redüktaz (GSH_Rx).....	21
1.5.2.5 Glutasyon-S-transferaz (GST).....	21
1.6 Oksidatif stres.....	21
1.7 Antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemler.....	23
1.7.1 Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP).....	24
1.7.2 Oksijen radikal absorbands kapasitesi yöntemi (ORAC).....	25
1.7.3 Krosin yöntemi.....	28
1.7.4 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite / ABTS yöntemi (TEAC).....	28
1.7.5 Daha stabil ABTS radikali ile total antioksidan kapasite ölçümü (TAS).....	30
1.7.6 Potent serbest radikal reaksiyonlarına karşı total antioksidan yanıt (TAR).....	31
1.7.7 Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi (FRAP).....	31
1.7.8 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesi yöntemi (DPPH).....	32
1.7.9 Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik bileşik tayini (FCR).....	33
1.7.10 Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC).....	34
1.7.11 Total tiyol (sülhidril grupları) ölçüm yöntemi (TTL).....	35
2. MATERYAL VE METOD.....	36
2.1 Materyal.....	36
2.1.1 Kullanılan ekipmanlar.....	36
2.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler.....	36

2.1.3 Kullanılan kimyasal çözeltiler.....	37
2.2 Metod.....	39
2.2.1 FRAP tayini	39
2.2.2 TAS tayini.....	40
2.2.3 TAR tayini.....	40
2.2.4 TTL tayini.....	41
2.3 Yöntemlerin performans değerlendirmeleri.....	42
2.3.1 Doğrusallık (linearite) çalışması.....	42
2.3.2 Analitik sensitivite çalışması.....	42
2.3.3 Geri kazanım (recovery) çalışması	42
2.3.4 Gözlenebilirlik sınırı çalışması (limit of detection).....	42
2.3.5 Tekrarlanabilirlik çalışması.....	42
2.3.6 İnterferans çalışmaları.....	43
2.3.6.1 Hemoliz interferansı.....	43
2.3.6.2 Bilirubin interferansı.....	43
2.3.6.3 Lipemi interferansı.....	43
2.3.7 Yöntemlerin dilüsyon sensitivitesi çalışmaları.....	43
2.3.8 Yöntemlerin karşılaştırılması.....	43
3. BULGULAR.....	44
3.1 Spektral analizler.....	44
3.1.1 FRAP yönteminin spektral analizi.....	44
3.1.2 TAS yönteminin spektral analizi.....	44
3.1.3 TAR yönteminin spektral analizi.....	45
3.1.4 TTL yönteminin spektral analizi.....	46
3.2 Çeşitli serum örneklerinin ve körün reaksiyon kinetikleri.....	46
3.3 Saf antioksidanların reaksiyon kinetikleri	50
3.3.1 FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	51
3.3.2 TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	52
3.3.3 TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon	

kinetikleri.....	53
3.3.4 TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	55
3.4 Saf antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	55
3.4.1 FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	55
3.4.2 TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	57
3.4.3 TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	58
3.4.4 TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	59
3.4 Yöntemlerin lineariteleri.....	59
3.4.1 FRAP yönteminin linearitesi.....	59
3.4.2 TAS yönteminin linearitesi.....	59
3.4.3 TAR yönteminin linearitesi.....	60
3.4.4 TTL yönteminin linearitesi.....	60
3.5 Yöntemlerin analitik sensitivitei.....	60
3.5.1 FRAP yönteminin sensitivitesi.....	60
3.5.2 TAS yönteminin sensitivitesi.....	60
3.5.3 TAR yönteminin sensitivitesi.....	60
3.5.4 TTL yönteminin sensitivitesi.....	61
3.6 Yöntemlerin analitik geri kazanımları.....	61
3.6.1 FRAP yönteminin analitik geri kazanımı.....	61
3.6.2 TAS yönteminin analitik geri kazanımı.....	61
3.6.3 TAR yönteminin analitik geri kazanımı.....	61
3.6.4 TTL yönteminin analitik geri kazanımı.....	61
3.7 Yöntemlerin gözlenebilirlik sınırları (limit of detection).....	61
3.7.1 FRAP yönteminin gözlenebilirlik sınırı.....	61

3.7.2 TAS yönteminin gözlenebilirlik sınırı.....	62
3.7.3 TAR yönteminin gözlenebilirlik sınırı.....	62
3.7.4 TTL yönteminin gözlenebilirlik sınırı.....	62
3.8 Yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri.....	62
3.8.1 FRAP yönteminin tekrarlanabilirliği.....	62
3.8.2 TAS yönteminin tekrarlanabilirliği.....	66
3.8.3 TAR yönteminin tekrarlanabilirliği.....	70
3.8.4 TTL yönteminin tekrarlanabilirliği.....	74
3.9 İnterferans çalışmaları.....	78
3.9.1 Hemoliz interferansı.....	78
3.9.1.1 FRAP yöntemi için hemoliz interferansı.....	78
3.9.1.2 TAS yöntemi için hemoliz interferansı.....	79
3.9.1.3 TAR yöntemi için hemoliz interferansı.....	80
3.9.1.4 TTL yöntemi için hemoliz interferansı.....	81
3.9.2 Bilirubin interferansı.....	82
3.9.2.1 FRAP yöntemi için bilirubin interferansı.....	82
3.9.2.2 TAS yöntemi için bilirubin interferansı.....	82
3.9.2.3 TAR yöntemi için bilirubin interferansı.....	83
3.9.2.4 TTL yöntemi için bilirubin interferansı.....	83
3.9.3 Lipemi interferansı.....	83
3.9.3.1 FRAP yöntemi için lipemi interferansı.....	83
3.9.3.2 TAS yöntemi için lipemi interferansı.....	83
3.9.3.3 TAR yöntemi için lipemi interferansı.....	83
3.9.3.4 TTL yöntemi için lipemi interferansı.....	83
3.10 Yöntemlerin dilüsyon sensitiviteleeri.....	84
3.10.1 FRAP yönteminin dilüsyon sensitivitesi.....	84
3.10.2 TAS yönteminin dilüsyon sensitivitesi.....	84
3.10.3 TAR yönteminin dilüsyon sensitivitesi.....	85
3.10.4 TTL yönteminin dilüsyon sensitivitesi.....	86

3.11 Yöntemlerin karşılaştırılması.....	87
4. TARTIŞMA	92
5.SONUÇ.....	98
KAYNAKLAR.....	99
ÖZGEÇMİŞ.....	106



ÖZET

Biyolojik sistemlerde çeşitli nedenlerle aşırı miktarlarda üretilen serbest radikaller ile bu radikallerin detoksifikasyonundan sorumlu antioksidanlar arasında hassas bir denge mevcuttur. Bu denge oksidatif stres oluşturacak şekilde oksidanlar yönüne kayabilir. Oksidatif stres pek çok hastalığın etyopatogenezinde önemli rol oynar. Bu noktada hem biyolojik materyallerdeki endojen hem gıdalardaki ekzojen antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi önemlidir.

Bugüne kadar pek çok farklı teknikle in vitro ve in vivo antioksidan ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir ve uygulanmaktadır. Bu çalışmada antioksidan kapasiteyi direkt ölçen dört fotometrik yöntem, ferrik iyonu indirgeyici güç (FRAP), total antioksidan durum (TAS), total antioksidan yanıt (TAR), total tiyol (TTL) analitik performans karakteristikleri ve aralarındaki ilişki analiz edilerek değerlendirilmiştir.

Elde edilen verilere göre FRAP yöntemi her ne kadar tiyol bileşiklerini ölçmede yetersiz kalsa da yöntemin basit, ucuz olduğu ve özel ekipmanlar gerektirmediği görüldü. TAR yönteminin tekrarlanabilirliğinin diğer üç yöntemle göre daha düşük olduğu, ürik asidi ölçmede yetersiz kaldığı ancak diğer yöntemlere göre daha yüksek lineariteye sahip olduğu görüldü. Hemoliz interferansından en az etkilenen TAS yönteminin ise basit ve uygulamasının kolay olmasından dolayı birçok araştırma laboratuvarında kullanılabileceği kanaatine varıldı. TTL yönteminin ise gözlenebilirlik sınırının en düşük, sensitivitesinin yüksek ve tekrarlanabilirliğinin oldukça iyi olduğu izlendi.

Sonuç olarak, antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Her birinin tekniği farklı ilkelere dayanır. Total antioksidan kapasiteyi değerlendirirken sonuçlar genellikle benzer eğilimleri yansıtırsa da nadir olarak farklı sonuçlara yol açabilirler. Bir bileşiğin antioksidan aktivitesini tayin etmek için standart bir metod yoktur bu nedenle antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde farklı yöntemlerin kullanılması ve sonuçların birlikte değerlendirilmesi daha uygun olacaktır.

Anahtar kelimeler: antioksidan kapasite, FRAP, TAS, TAR, TTL

ABSTRACT

In biological systems there is a sensitive balance between free radicals produced in excessive amounts by various reasons and antioxidants that are responsible for detoxification of these radicals. This balance may shift to oxidant side with forming oxidative stress. Oxidative stress plays an important role in the ethiopathogenesis of several diseases. Therefore, it is important to assess exogenous and endogenous antioxidant activities in the food and biological materials.

So far, in vitro and in vivo antioxidant measurement methods using several different techniques have been developed and implemented. In this study, four photometric methods directly measuring the antioxidant capacity; ferric ion reducing power (FRAP), total antioxidant status (TAS), total antioxidant response (TAR), total thiol (TTL), have been evaluated by analyzing the analytical performance characteristics and the relationships between them.

According to data obtained, FRAP method was inadequate for measuring the thiol compounds, although it was observed as a simple and cheap method that did not require any special equipment. It was found that repeatability of TAR method was worse than the other three methods and it was inadequate to measure the uric acid but it had a higher linearity than the other methods. TAS method was the least affected by the hemolysis interference. It was concluded that the TAS method could be used in research laboratories due to its simple and easy application. TTL method with the lowest limit of detection and high sensitivity and repeatability was found to be quite efficient.

In conclusion, many methods are in use to assess the antioxidant capacity. Each technique is based on different principles. Evaluating the total antioxidant capacity, the results can often lead to similar trends and rarely reflect the different results. There is no standard method to determine the antioxidant activity of a compound. Therefore, the use of different methods and assessing the results together will be more convenient for evaluating the antioxidant capacity.

Key words: antioxidant capacity, FRAP, TAS, TAR, TTL

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.4: Antioksidandan serbest radikale elektron transferi.....	9
Şekil 1.5.1.1: Alfa-tokoferol'ün kimyasal yapısı.....	11
Şekil 1.5.1.2 : C vitamininin kimyasal yapısı.....	12
Şekil 1.5.1.3 : Beta-karoten'in kimyasal yapısı.....	13
Şekil 1.5.1.4 : Glutasyonun kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.5.1.5 : Ürik asitin kimyasal yapısı.....	14
Şekil 1.5.1.6 : Antioksidan rejenerasyon yolu.....	15
Şekil 1.5.1.7 : Bilirubin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 1.5.1.8.1 : Gallik asitin kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.5.1.8.2 : Flavonoidlerin kimyasal yapıları.....	18
Şekil 1.6 : Antioksidan-oksidan sistem arasındaki denge.....	22
Şekil 1.7.2: ORAC metodunun prensibinin şematik gösterimi.....	26
Şekil 1.7.4.1 : ABTS molekülünün yapısı.....	29
Şekil 1.7.4.2 : ABTS'nin persülfatla oksidasyonu.....	30
Şekil 1.7.7.1 : TPTZ molekülünün yapısı.....	31
Şekil 1.7.7.2 : Fe(III)-TPTZ kompleksinin, Fe(II) formuna indirgenmesi.....	32
Şekil 1.7.8 DPPH yönteminin şematik gösterimi.....	33
Şekil 1.7.10 : Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi.....	35
Şekil 3.1.1: Fe ⁺² -TPTZ kompleksinin absorban spektrumu.....	44
Şekil 3.1.2: ABTS radikalinin absorban spektrumu.....	45
Şekil 3.1.3: o-dianizidil radikalinin absorban spektrumu.....	45
Şekil 3.1.4: DTNB radikalinin absorban spektrumu.....	46
Şekil 3.2.1: FRAP yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	47
Şekil 3.2.2: TAS yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	47
Şekil 3.2.3: TAR yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	48
Şekil 3.2.4: TTL yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	48
Şekil 3.2.5: FRAP yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	49
Şekil 3.2.6: TAS yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	49

Şekil 3.2.7: TAR yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	50
Şekil 3.2.8: TTL yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri.....	50
Şekil 3.3.1-A-B-C: FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	52
Şekil 3.3.2-A-B-C- : TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	53
Şekil 3.3.3-A-B-C : TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	54
Şekil 3.3.4-A: TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri.....	55
Şekil 3.4.1 A-B: FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	56
Şekil 3.4.2-A-B: TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	57
Şekil 3.4.3-A-B: TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	58
Şekil 3.4.4: TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri.....	59
Şekil 3.8.1-A: 1.düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	63
Şekil 3.8.1-B: 2.düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	65
Şekil 3.8.1-C: 3.düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	66
Şekil 3.8.2-A: 1.düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	67
Şekil 3.8.2-B: 2.düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	69

Şekil 3.8.2-C: 3.düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	70
Şekil 3.8.3-A: 1.düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	71
Şekil 3.8.3-B: 2.düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	73
Şekil 3.8.3-C: 3.düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	74
Şekil 3.8.4-A: 1.düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	75
Şekil 3.8.4-B: 2.düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	77
Şekil 3.8.4-C: 3.düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	78
Şekil 3.10.1: Serumun farklı dilüsyonlarındaki FRAP değerleri	84
Şekil 3.10.2: Serumun farklı dilüsyonlarındaki TAS değerleri.....	85
Şekil 3.10.3: Serumun farklı dilüsyonlarındaki TAR değerleri.....	86
Şekil 3.10.4: Serumun farklı dilüsyonlarındaki TTL değerleri	87
Şekil 3.11.1: TAS ve FRAP yöntemi arasındaki ilişki.....	89
Şekil 3.11.2: TAS ve TAR yöntemi arasındaki ilişki.....	89
Şekil 3.11.3: TAS ve TTL yöntemi arasındaki ilişki.....	90
Şekil 3.11.4: FRAP ve TAR yöntemi arasındaki ilişki.....	90
Şekil 3.11.5: FRAP ve TTL yöntemi arasındaki ilişki.....	91
Şekil 3.11.6: TAR ve TTL yöntemi arasındaki ilişki.....	91

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.1 : Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türleri.....	2
Tablo 1.1.2 : Serbest oksijen radikallerinin bazı karakteristik özellikleri.....	3
Tablo 1.5 : Antioksidan savunma sistemleri	10
Tablo 1.7 : Antioksidan kapasite ölçümünde kullanılan yöntemler.....	24
Tablo 3.8.1-A1:1. düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	63
Tablo 3.8.1-A2: FRAP yönteminin 1.düzyey CV sonuçları.....	63
Tablo 3.8.1-B1: 2. düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	64
Tablo 3.8.1-B2: FRAP yönteminin 2.düzyey CV sonuçları.....	64
Tablo 3.8.1-C1: 3. düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	65
Tablo 3.8.1-C2: FRAP yönteminin 3.düzyey CV sonuçları.....	66
Tablo 3.8.2-A1: 1. düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	67
Tablo 3.8.2-A2: TAS yönteminin 1.düzyey CV sonuçları.....	67
Tablo 3.8.2-B1: 2. düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	68
Tablo 3.8.2-B2: TAS yönteminin 2.düzyey CV sonuçları.....	68
Tablo 3.8.2-C1: 3. düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	69
Tablo 3.8.2-C2: TAS yönteminin 3.düzyey CV sonuçları.....	70
Tablo 3.8.3-A1:1. düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	71
Tablo 3.8.3-A2: TAR yönteminin 1.düzyey CV sonuçları.....	71
Tablo 3.8.3-B1:2. düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	72
Tablo 3.8.3-B2: TAR yönteminin 2.düzyey CV sonuçları.....	72
Tablo 3.8.3-C1:3. düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	73
Tablo 3.8.3-C2: TAR yönteminin 3.düzyey CV sonuçları.....	74
Tablo 3.8.4-A1:1. düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	75
Tablo 3.8.4-A2: TTL yönteminin 1.düzyey CV sonuçları.....	75
Tablo 3.8.4-B1:2. düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	76
Tablo 3.8.4-B2: TTL yönteminin 2.düzyey CV sonuçları.....	76
Tablo 3.8.4-C1:3. düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük sonuçları.....	77
Tablo 3.8.4-C2: TTL yönteminin 3.düzyey CV sonuçları.....	78

Tablo 3.9.1.1: FRAP yönteminin hemoliz interferans çalışması.....	80
Tablo 3.9.1.2: TAS yönteminin hemoliz interferans çalışması.....	81
Tablo 3.9.1.3: TAR yönteminin hemoliz interferans çalışması.....	82
Tablo 3.9.1.4: TTL yönteminin hemoliz interferans çalışması.....	83
Tablo 3.11: Toplam antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlerin ve serumun antioksidan bileşenlerinin ilişkisi	89



SİMGELER VE KISALTMALAR

AAPH	2,2-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid
ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
AE	Antiradikal verim
AOX	Antioksidan
AUC	Eğri altındaki alan
CUPRAC	Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasitesi
CV	Varyasyon katsayısı
DCF	Diklorofloresin
DCFH-DA	Diklorofloresin-diasetat
DPPH	1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
4-DPS	4'4-dityodipiridin
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik) asit
DTT	Dithiothreitol
ET	Tek elektron transferi
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
FL	Floresin
FRAP	Demir (III)iyonu indirgeme gücü
GSH	Glutatyon
GSH-Px	Glutatyon peroksidaz
GSH-Rx	Glutatyon redüktaz
GSSG	Okside glutatyon
GST	Glutatyon-S-transferaz
HAT	Hidrojen atomu transferi
HRP	Horse radish peroxidase
NADH	Nikotinamidadenininükleotid
Nc (Neokuproin)	2,9-dimetil-1,10- fenantrolin
ORAC	Oksijen radikalini absorblama kapasitesi
PE	Fikoeritrin
PGR	Pirogallol kırmızısı

RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TAR	Total antioksidan yanıt
TAS	Total antioksidan durum
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TOSC	Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi
TPTZ	2,4,6-tripiryridyl-s-triazine
TRAP	Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre
Troloks	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid
TTL	Total tiyol



1.GENEL BİLGİLER

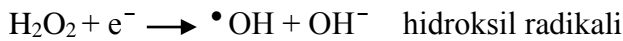
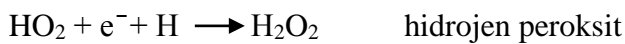
1.1 Serbest radikaller

Atom ve moleküllerin yapısında elektronlar genellikle eşleşmiş halde bulunur. Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip atom ya da moleküllerdir [1]. Bundan dolayı biyolojik serbest radikaller çeşitli organik substratlarla reaksiyona girebilen stabil olmayan moleküllerdir. En basit serbest radikal bir proton ve eşleşmemiş bir elektrona sahip hidrojen atomudur. Serbest radikaller daha çok elektron transferi sonucu meydana gelir. En önemli radikaller serbest oksijen radikalleri olmakla birlikte karbon, azot ve kükürt türevi olan radikaller de mevcuttur [2]. Tablo 1.1’de çeşitli serbest radikal ve non-radikal reaktif türleri görülmektedir.

İki serbest radikal karşılaştığında eşleşmemiş elektronlarını ortaklaşa kullanarak kovalent bağ oluştururlar. Radikaller radikal olmayan moleküller ile reaksiyona girdiğinde (katılma reaksiyonu, elektron vererek, elektron alarak veya hidrojen atomu transferi) ise yeni radikaller oluşur [3]. Bundan dolayı reaktif türlerinin in vivo oluşumu serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlatılması gibidir.

1.1.2 Serbest oksijen radikalleri

Moleküler oksijen iki eşleşmemiş elektrona sahip olduğu için biradikaldir. Oksijen, metabolizmasında bu eşleşmemiş iki elektronu ortaklaşa kullanarak radikal oluşturur. Moleküler oksijenin major metabolizması onun tamamen suya redüksiyonunu içerir. Bununla birlikte bir elektronun redüksiyonuyla çeşitli radikal türleri ve H₂O₂ aşağıdaki reaksiyonlarla oluşabilir [4]:



Serbest oksijen radikalleri kısa ömürlü ve güçlü oksidan özelliklere sahip oksijen metabolitleridir [5] (Tablo 1.1.2).

Tablo 1.1: Serbest radikaller ve radikal olmayan reaktif türleri [6]

A) Hidrojen merkezli serbest radikaller	Hidrojen atomu	H^{\bullet}
B) Oksijen merkezli serbest radikaller	Süperoksit radikali Hidroksil radikali Alkoksil radikali Peroksil radikali	O_2^{\bullet} OH^{\bullet} RO^{\bullet} ROO^{\bullet}
C) Karbon merkezli serbest radikaller	Triklorometil	CCl_3^{\bullet}
D) Nitrojen merkezli serbest radikaller	Nitröz oksit Nitrozil katyonu Peroksinitrit Nitrojen dioksit Peroksinitröz asit Dinitrojen trioksit Nitroksil anyonu Nitröz asit Nitril klorid	N_2O NO^+ $OONO^-$ NO_2^{\bullet} $ONOOH$ N_2O_3 NO^- HNO_2 NO_2Cl
E) Kükürt merkezli serbest radikaller	Tiyil	RS^{\bullet}
F) Radikal olmayan reaktif türleri	Peroksinitrit Hipokloröz asit Hidrojen peroksit Singlet (tekil) oksijen Ozon Lipid peroksit	$ONOO^-$ $HOCl$ H_2O_2 1O_2 O_3 $LOOH$

Tablo 1.1.2: Serbest oksijen radikallerinin bazı karakteristik özellikleri [7]

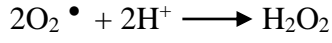
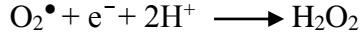
Tür	Sembol	Yarı ömür,s	Özellik
Süperoksit radikali	O_2^\bullet	1×10^{-6}	İyi redüktan, zayıf oksidan
Hidroksil radikali	OH^\bullet	1×10^{-9}	Çok reaktif
Perhidroksil	HO_2^\bullet		Süperoksite göre daha güçlü oksidan, lipid peroksidasyonunu başlatabilir.
Alkoksil radikali	RO^\bullet	1×10^{-6}	Reaktivitesi peroksil ve hidroksil radikali arasındadır.
Peroksil radikali	ROO^\bullet	1×10^{-2}	Hidroksile göre düşük oksitleyicidir ancak iyi dağılım gösterir.
Hidrojen peroksit	H_2O_2		Oksidandır fakat organik substratlarla reaksiyonu yavaştır. Yüksek difüzyon yeteneği vardır.
Singlet oksijen	1O_2	1×10^{-6}	Güçlü oksitleyici ajan

1.1.2.1 Süperoksit radikali

Oksijenin bir elektron alarak redüklenmesi sonucu süperoksit radikali oluşur. Oksijen toksisitesinin ana nedenidir [8]. Tiyoller, katekolaminler, tetrahidrofolatlar gibi moleküllerin otooksidasyonu sonucu süperoksit meydana gelir. Alfa, beta, gama gibi yüksek enerjili dalgalar oksijenden süperoksit oluşumuna neden olur [9]. Nötrofil, makrofaj gibi aktive olmuş fagositik hücreler çok miktarda süperoksit üretirler. Redüklenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu da süperoksit oluşturabilir [10]. Süperoksit radikali aktivitesi düşük ancak en kolay ve en çok oluşan radikaldir. Bununla birlikte diğer radikallerin oluşumuna yol açması açısından önemlidir [6].

1.1.2.2 Hidrojen peroksit

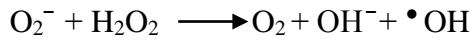
Hidrojen peroksit, oksijene 2 elektron eklenmesiyle veya süperoksite bir elektron eklenmesiyle oluşur. Eşleşmemiş elektron içermediği için gerçek bir radikal değildir [11].



Hidrojen peroksit radikal olmadığı halde serbest radikal oluşumu açısından önemlidir. Hidrojen peroksit ve ferro demir (Fe^{+2}) fenton reaksiyonu ile hidroksil radikaline dönüşür ve bir seri radikal reaksiyonuna yol açarlar [12]:

- 1) $\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-$ (Fenton reaksiyonu)
- 2) $\text{Fe}^{+3} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{O}_2^- + \text{H}$
- 3) $\bullet\text{OH} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{H} + \text{O}_2^-$
- 4) $\text{O}_2^- + \text{Fe}^{+3} \longrightarrow \text{Fe}^{+2} + \text{O}_2$
- 5) $\bullet\text{OH} + \text{Fe}^{+2} \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^-$

Hidrojen peroksitin direkt süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da hidroksil radikali oluşur [13]. Haber Weiss reaksiyonu olarak da bilinen bu reaksiyon Fenton reaksiyonuna göre oldukça yavaştır.



1.1.2.3 Hidroksil radikali

Hidroksil radikali en aktif ve toksik radikal türüdür. Fenton ve Haber Weiss reaksiyonları sonucunda oluşur [14]. Yarı ömrü çok kısa olmasına rağmen moleküllerde büyük hasara neden olur. Yağ asitleri ve tiyoller gibi çeşitli moleküllerden bir proton alarak yeni radikallerin oluşmasına neden olur [4].

1.2 Serbest radikallerin kaynakları

Endojen kaynaklar:

- Ksantin oksidaz, aminoasit oksidaz, triptofan dioksijenaz gibi bazı enzimlerin katalitik döngüleri sırasında serbest radikaller oluşur [15].
- Mitokondriyal elektron transportu hücrelerdeki en büyük reaktif oksijen türleri kaynağıdır. Bu sistemdeki elektron kaçağı süperoksit radikali üretebilir [1].
- Tiyoller, katekolaminler, flavinler, hidrokinonlar gibi oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında rol alabilen küçük moleküller serbest radikal oluşturabilir.
- Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlara bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanan serbest radikal üretimi olur [16].
- Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarında yer alan demir, bakır gibi geçiş metalleri serbest radikal reaksiyonlarını katalizler.
- Plazma membranında yer alan siklooksijenaz, lipooksijenaz, protein kinaz gibi enzimlerin aktivasyonu ile serbest kalan araşidonik asidin oksidasyonu sonucu serbest radikaller oluşur [17].
- Aktive olmuş fagositer hücrelerde (makrofaj, nötrofil vb.) solunumsal patlama sırasında süperoksit anyonu, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve hipoklorik asit gibi çeşitli reaktif oksijen türleri oluşur [5].
- Travma, yanık, iskemi gibi oksidatif stres oluşturan durumlar da serbest radikal kaynağıdır.

Ekzojen kaynaklar:

- Hava kirliliği, sigara dumanı, solventler, pestisidler, aromatik hidrokarbonlar gibi çevresel ajanlar
- Radyasyon
- Stresle katekolaminlerin sentezi uyarılır, katekolaminlerin oksidasyonu ise serbest radikal oluşumuna neden olur.

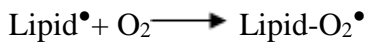
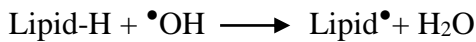
1.3 Serbest radikallerin etkileri

1.3.1 Serbest radikallerin proteinlere etkisi

Aminoasit içeriğine göre proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi değişir. Sistein, metionin gibi kükürt içeren aminoasitler serbest radikallerden daha kolay etkilenir [18]. Pek çok reaktif oksijen türleri –SH gruplarını okside edebilir. Bunun sonucunda sülfür radikalleri oluşur. Fazla sayıda disülfid bağı içeren moleküllerin yapısı bozulur. Oksitlenmiş metionin kalıntıları metionin sülfoksit redüktaz tarafından onarılabilir. Diğer hasar görmüş proteinler de ya onarılır ya da hücrel proteazlar tarafından ortadan kaldırılır [19].

1.3.2 Serbest radikallerin lipidlere etkisi

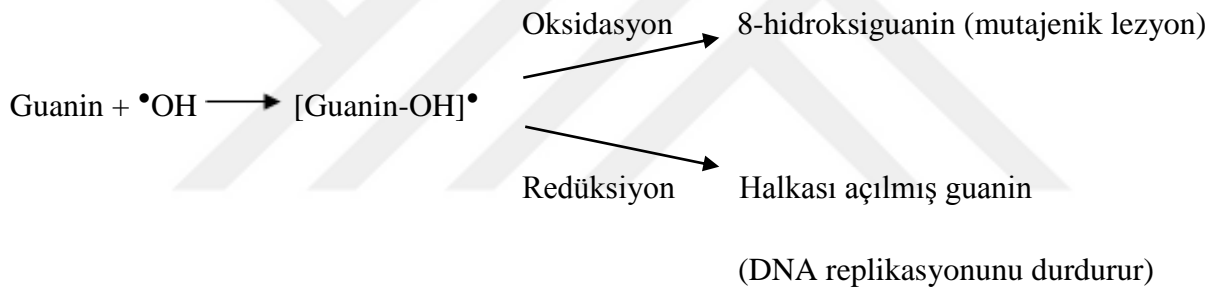
Lipidler serbest radikal türlerinin etkilerine karşı en duyarlı olan moleküllerdir. Lipid peroksidasyonu hücre membranında bulunan glikolipid, fosfolipid gibi lipidlerin yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin reaktif oksijen türleri ile reaksiyona girerek peroksit, aldehid, hidroksi yağ asitleri gibi çeşitli ürünlerin oluşmasıdır [5]. Membranda ya da serbest yağ asitlerinde lipid peroksidasyonu reaktif türlerin yağ asitlerindeki çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla başlar. Bu C atomunda eşleşmemiş bir elektron bırakır. Çoklu doymamış yağ asitlerindeki bu karbon radikallerinden moleküler düzenleme ile daha kararlı konjuge dienler oluşturulur. Konjuge dienin moleküler oksijenle hızla reaksiyonu sonucu hidroperoksi radikalleri (lipidperoksi radikalleri) oluşur. Lipidhidroperoksi radikali diğer lipidlerden H atomu alır ve lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonu devam eder [4].



Redoksu katalizleyen geçiş metal iyonlarının varlığında lipid peroksidasyonunun yayılımı artar. Zincir kırıcı antioksidanlar, peroksil radikallerinin zincir yayılımını ve fosfolipidhidroperoksitlerini yok eder. Glutasyon peroksidaz da membrandaki peroksitleri ortadan kaldırır [13]. Normal membran döngüsü de hasar görmüş lipidleri salar.

1.3.3 Serbest radikallerin nükleik asitlere ve DNA'ya etkileri

Serbest radikaller, nükleotidler ve DNA ile reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına ve DNA zincirinde kırılmalara yol açabilir [6]. Hidroksil radikali DNA'nın tüm komponentlerine saldırabilirken singlet O₂ daha çok guanini tercih eder. •OH radikalının etkisiyle pürin ve pirimidin bazlarında 5-hidroksi sitozin, timin glikol, 8-hidroksi adenin, 8-hidroksi guanin gibi yeni ürünler oluşur [20].



Pek çok enzim DNA'daki anormallikleri tanır; onları eksizyon, yeniden sentaz ya da DNA dizisine tekrar birleştirerek ortadan kaldırır [21, 22].

1.3.4 Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisi

Serbest reaktif türleri karbonhidratlarda monosakkarit otooksidasyonu ve polisakkarit depolarizasyonu gibi reaksiyonlara neden olur. Bu reaksiyonlar sonucu oluşan oksaldehyitlerin DNA, RNA ve proteinlere de bağlanabilme özellikleri vardır [23, 24].

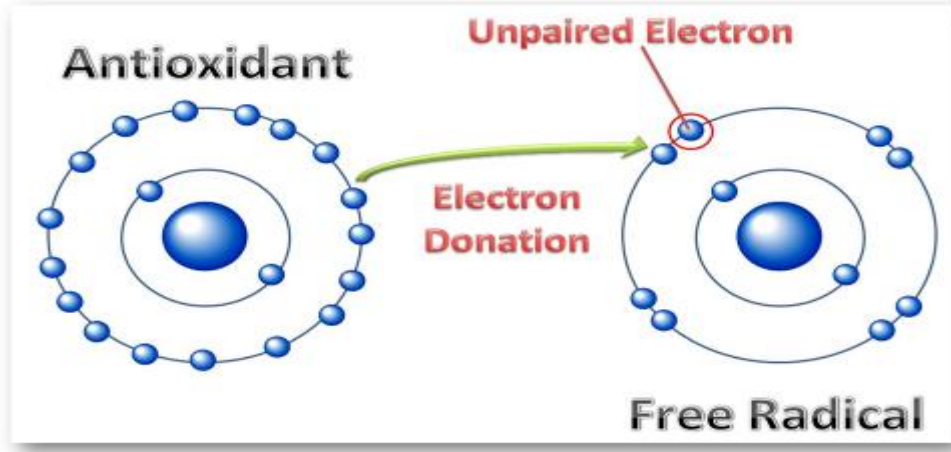
1.4 Antioksidan sistem

Antioksidanlar

Serbest radikallerin potansiyel zararlı etkilerini nötralize eden maddeler antioksidan savunma sistemi içinde gruplanmıştır. Antioksidan sistem oksidatif strese karşı hücrel korunmadan sorumludur. Maksimum koruma sağlamak için hücreler, lipid peroksit ve organik karbon merkezli radikaller gibi farklı serbest radikal türlerini yakalama yeteneğine sahip çeşitli maddeler içerirler. Bu maddelerin jenerik isimleri antioksidanlar olsa da serbest radikal yakalayıcıları, zincir yok ediciler ya da redükthanlar olarak da bilinirler. Halliwell ve arkadaşları antioksidanın daha kapsamlı bir tanımını şu şekilde yapmışlardır [25]: Oksitlenebilir substratla karşılaştırıldığında düşük konsantrasyonlarda bulunan herhangi bir madde o substratın oksidasyonunu önler ya da geciktirir. Bu tanımlamaya göre bir kimyasal reaksiyonda yer alan tüm redükthanlar antioksidan değildir. Sadece biyolojik hedefi koruyabilme kapasitesine sahip bileşikler bu kriteri karşılar. Antioksidanların oksidatif reaksiyonlara etkisi farklı şekillerde olabilir [5, 26]:

- Metal iyonlarını şelatlayarak radikal oluşumunu önleyebilirler.
- Daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürebilirler (süpürme aktivitesi).
- Radikalleri yakalayıp bağlayarak nötralize edebilirler (zincir kırma reaksiyonları).
- Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive edebilirler (söndürme etkisi).
- Oksidatif hasar görmüş molekülleri onarabilirler.
- Gerçek antioksidanların aktivitesini arttırabilirler (sinerjistler).

Antioksidan molekülden serbest radikale elektron transferi Şekil 1.4'te görülmektedir.



Şekil 1.4: Antioksidandan serbest radikale elektron transferi

1.5 Antioksidanların sınıflandırılması

Serbest radikal yakalayıcıları maksimum koruma sağlayabilmek için hücre içinde bölümlere ayrılmıştır. Lokalizasyonlarına göre intraselüler ve ekstraselüler olmak üzere iki grupta yer alırlar [27]. Örneğin süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz sadece sitozolde dağılmayıp hücre içinde en fazla serbest radikalın üretildiği mitokondride de lokalize olmuşlardır. Hücre içi sitozolik savunmanın entegrasyonunun yanı sıra plazmadaki çeşitli antioksidanların etkileşimi ekstraselüler kompartımandaki serbest radikal reaksiyonlarının baskılanması için çok önemlidir. En önemli biyolojik ekstraselüler antioksidanlar, glutatyon, E vitamini, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz ve seruloplazmindir.

Antioksidan savunma sistemleri geleneksel olarak antioksidanların süpürücü eylemlerini belirlemek için primer ve sekonder olarak isimlendirilir [28]. Primer savunma direkt O_2 'den türeyen serbest radikallerle etkileşir. Sekonder savunma ise $O_2^{\bullet-}$ 'nin dismutasyonu ile oluşan radikalleri yakalar. Bazı araştırmacılar çeşitli kimyasal antioksidanları primer savunma komponenti, süpürücü enzimleri ise sekonder olarak sınıflamışlardır. Tablo 1.5'te görüldüğü gibi antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde de sınıflandırılırlar.

Tablo 1.5: Antioksidan savunma sistemleri [29]

Enzimatik antioksidanlar	Süperoksit dismutaz Katalaz Glutasyon peroksidaz Glutasyon-S-transferaz Glutasyon redüktaz	
Enzimatik olmayan radikal yakalayıcı antioksidanlar	Suda çözünenler	C vitamini Ürik asit Sistein Glutasyon
	Yağda çözünenler	E vitamini Bilirubin β karoten Flavanoidler Lipoik asit

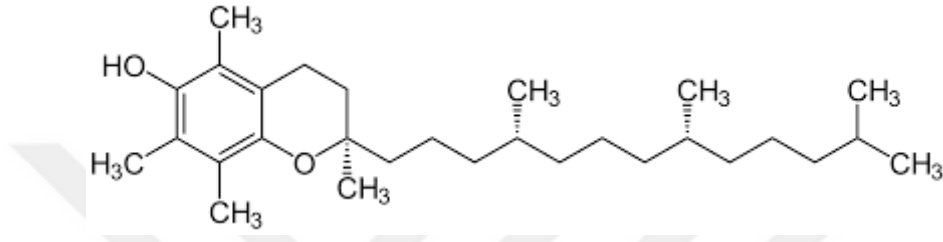
1.5.1 Enzimatik olmayan antioksidanlar

1.5.1.1 E vitamini

Hem bitkilerde hem hayvanlarda doğada en yaygın bulunan antioksidandır. Jenerik terim olan E vitamini tokoferolün en az sekiz çeşit yapısal izomeridir. En az etkili olan tokoferol gama- tokoferoldür. α - tokoferol en iyi bilinen ve en potent antioksidan aktiviteye sahip izomerdir [30] (Şekil 1.5.1.1). Tokoferol molekülünün lipofilik özelliğinden dolayı E vitamini, plazma lipoproteinleri gibi lipofilik çevrede en temel serbest radikal zincir yok edicisidir [31].

Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır. Fenolik hidrojen atomunu lipid peroksil radikaline transfer eder. Oluşan tokoferoksi radikali yeni bir serbest lipid peroksil radikali ile reaksiyona girer. Sonuçta α tokoferol serbest olmayan radikal ürününe okside olur. Bu oksidasyon ürünü, glukronik asit ile konjugasyona uğrayarak safra yolu ile atılır.

Adrenal bez, kalp, karaciğer gibi dokularda tokoferol yüksek düzeylerde bulunur. Hücre içinde E vitamini mitokondri, endoplazmik retikulum gibi lipidden zengin membranlarla ilişkilidir. Bundan dolayı tokoferolün antioksidan aktivitesinin lipid peroksil ve alkoksil radikalleri ile oluşan lipid peroksidasyonuna karşı membranları korumada yüksek etkiye sahip olması beklenir [5]. Çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonuna karşı ilk defans mekanizmasını oluşturur. Böylece membranların stabilitesini artırır. Düşük dansiteli lipoproteinin daha yüksek riskli oksitlenmiş haline dönüşmesini E vitamini inhibe eder.



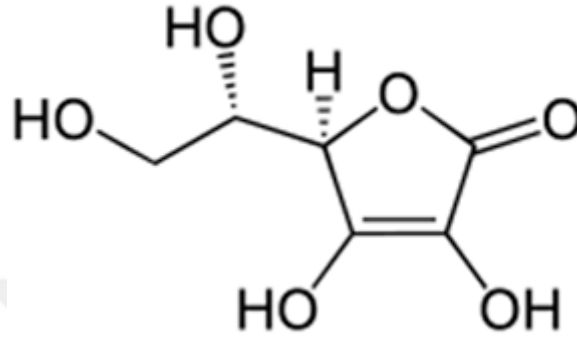
Şekil 1.5.1.1 : Alfa-tokoferolün kimyasal yapısı

1.5.1.2 C vitamini

E vitaminin tersine C vitamini hidrofiliktir ve aköz çevrede E vitaminine göre daha iyi fonksiyon görür [32]. Kimyasal yapısı Şekil 1.5.1.2’de görülmektedir. Antioksidan olarak rolü serbest radikal yakalamaktır. Redüktan ve antioksidan ajan olarak süperoksit, hidroksil radikali ve çeşitli lipid hidroperoksitlerle direkt reaksiyona girer [33, 34]. Ayrıca okside E vitaminin antioksidan özelliklerini restore edebilir [32].

C vitamini pek çok dokuda dağılmasına karşın adrenal ve hipofiz bezlerde göreceli olarak yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Daha düşük miktarlarda ise karaciğer, dalak, pankreas ve beyinde bulunur. Diğer suda çözünen antioksidanlarla karşılaştırıldığında C vitamini plazma lipid peroksidasyonuna karşı en etkili koruma sağlar [35]. C vitamini hem antioksidan hem prooksidandır [36]. Antioksidan olarak E vitamini ve selenyumun antioksidan aktiviteleri ile beraber koruyucu etkisi vardır. Ancak aşırı miktarlarda (~1 mM) geçiş elementleri varlığında prooksidan olarak aktivite gösterebilir. Yapılan çalışmalarda askorbatın lipid peroksidasyonunu indükleyen prooksidan aktivitesi onun Fe^{+3} ’ü Fe^{+2} ’ye indirgeyebilmesine bağlı olduğu gösterilmiştir [37].

Askorbik asitin pKa'sı 4,5 olduğu için fizyolojik pH'da bulunan predominant form askorbat anyonudur. Askorbat geri dönüşümlü bir oksidasyonla dihidroaskorbik asite dönüşür. Dihidroaskorbik asit de askorbata benzer şekilde antioksidan ve prooksidan özelliklere sahiptir [38].

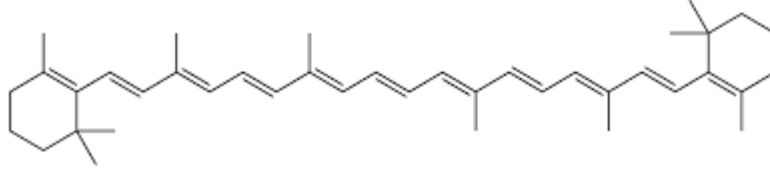


Şekil 1.5.1.2: C vitamininin kimyasal yapısı

1.5.1.3 A vitamini

Karotenoidler serbest radikalleri yakalama kapasitelerinden dolayı antioksidan olarak bilinirler [39, 40]. Karotenoidler serbest radikalleri ve diğer reaktif oksijen türlerini söndürerek lipidleri prooksidasyona karşı korurlar. β - karoten, ksantin oksidaz sistemi tarafından indüklenmiş lipid peroksidasyonu inhibe ederek biyolojik radikal yakalayıcı antioksidan aktivite sergiler [40]. β - karotenin uzun zinciri ve konjuge çift bağlarıyla yapısal düzenlemesi reaktif serbest radikaller için mükemmel yakalayıcı olacağını gösterir [41] (Şekil 1.5.1.3).

β - karoten de C vitamini gibi hem antioksidan hem prooksidan fonksiyon görür. Düşük oksijen parsiyel basıncı altında β - karoten radikal yakalayıcı aktivite gösterirken yüksek oksijen parsiyel basıncında serbest radikal yakalama kapasitesi antioksidan aktivite kaybı ile beraber otokatalitik prooksidan etki gösterir [42].

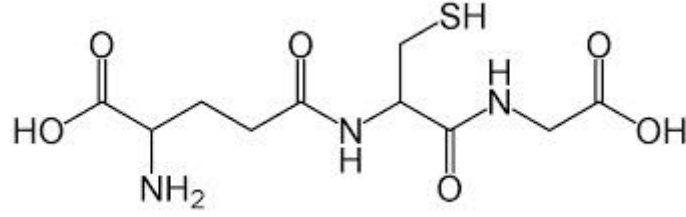


Şekil 1.5.1.3 : Beta-karotenin kimyasal yapısı

1.5.1.4 Glutasyon

Redükte glutasyon, gama glutamil-sistein-glisin, tüm memeli hücre sistemlerinde en fazla bulunan düşük molekül ağırlıklı tiyoldür (Şekil 1.5.1.4). Hücre içi konsantrasyonu genelde ~0,5 mM'dır ancak bazen 10 mM'a kadar ulaştığı olur [43]. Redükte glutasyonu peptidaz ataklarına karşı dirençli yapan tiyol grupları ve γ - glutamil bağlarıdır. Onun çok yönlülüğü kimyasal özelliklerinden kaynaklanır. H_2O_2 , O_2^\bullet ve OH^\bullet radikali gibi çeşitli elektrofilik ve okside edici bileşiklerle etkileşimle hem nükleofil hem de etkili redüktan olarak işlev görür. Efektif redüktan olarak çeşitli detoksifikasyon süreçlerinde önemli rol alır [44]. Redükte glutasyon hidrojen atomu vererek serbest radikallerle özellikle hidroksil ve karbon radikalleriyle etkileşime girer. Bu reaksiyonlar serbest radikal hasarında temel radikal olarak bilinen reaktif hidroksil radikalini nötralize ederek koruma sağlayabilir [45].

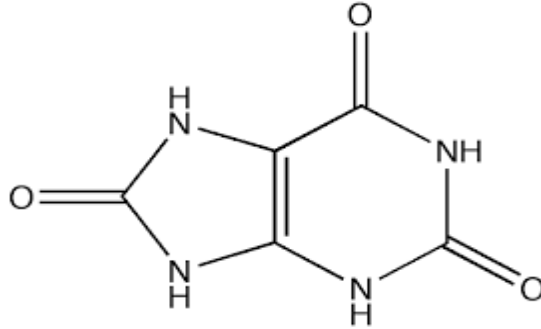
Çoğu antioksidan savunmada olduğu gibi lipid peroksidasyon artışının eşlik ettiği yaşlanma gibi fizyolojik durumlarda ve bazı neoplastik hastalıklarda glutasyon düzeyi dalgalanır. Yaşa bağlı glutasyon düzeylerinde azalma yaşla ilişkili artmış oksidasyon hızı veya total glutasyon biyosentezinde azalma ya da artmış degradasyonun sonucu olarak glutasyon döngüsünde azalma ile ilişkili olabilir [46, 47]. Bileşenindeki aminoasitlerden glutasyon sentezi glutamilsistein sentaz ve glutasyon sentaz tarafından katalizlenir. Çünkü γ -glutamilttransferaz plazma membranında bulunur ve aktif merkezi ekstraselüler alana bakar. Glutasyonun artmış ihtiyacı yaşla birlikte artan peroksitlerle artar. Bundan dolayı yaşlanma sürecinde toksik maddelerin birikimi glutasyon transferaz ve peroksidaz gibi enzim aktivitelerini artırır. Bu da intraselüler glutasyonun tükenmesine yol açar.



Şekil 1.5.1.4 : Glutatyonun kimyasal yapısı

1.5.1.5 Ürik asit

Ürik asit pürin metabolizmasında son ürün olmakla birlikte biyolojik antioksidan fonksiyonu görür. Kimyasal yapısı Şekil 1.5.1.5'te görülmektedir. Ürat tarafından OH^\bullet radikalinin yakalanması 1960 yılında Howell ve Wyngarden tarafından bulunmuştur [48]. Oksidan hasara karşı korumasıyla antioksidan aktivitesi doğrulanmıştır [49]. Ürik asidin plazmada askorbik asidi stabilize etme fonksiyonu direk antioksidan aktivitesinden daha önemli bulunmaktadır [50].



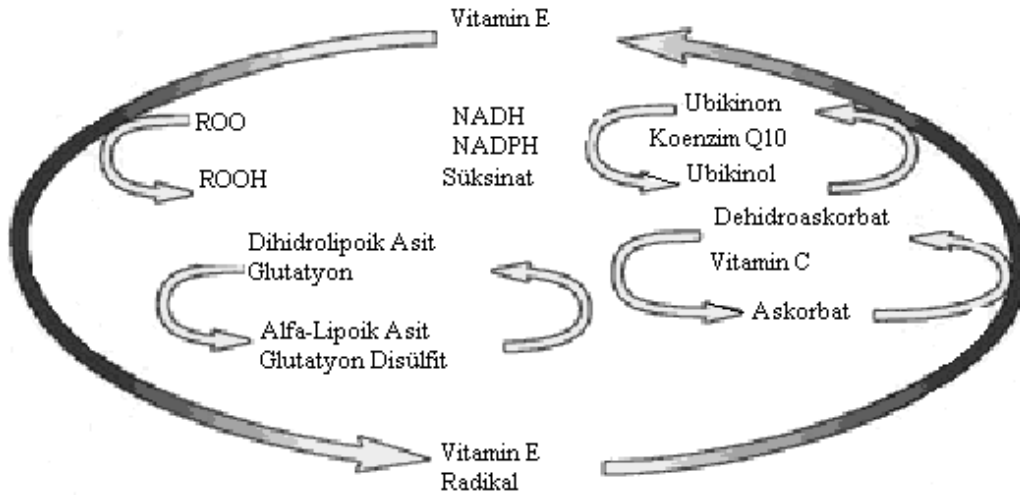
Şekil 1.5.1.5 : Ürik asitin kimyasal yapısı

1.5.1.6 Lipoik asit

Alfa lipoik asit bazı yiyeceklerde bulunan ve aynı zamanda vücutta sentezlenen doğal bir maddedir [51]. Serbest radikal hasarını önleyen lipoik asit yağda ve suda çözünebilmesi açısından antioksidanlar arasında tektir.

İnsanlarda lipoik asit enerji oluşumunu içeren çeşitli 2-oksoasit dehidrogenazların bir parçasıdır. Okside lipoik asit ve redükte lipoik asit olarak 2 formu bulunmaktadır. Redükte lipoik aside dihidrolipoik asit de denmektedir. Dihidrolipoik asit biyolojik olarak daha aktiftir [52].

Lipoik asit mitokondride oktanoik asit ve bir sülfür kaynağından sentez edilmektedir. Lipoik asit oral verildiğinde % 93'den fazlası barsaktan emilir, karaciğerde metabolizmayla % 20-30 ilk geçiş etkisine uğrar [53]. α -lipoik asidin insanlardaki primer metabolik yolu S-metilasyon β -oksidasyondur. Lipoik asit açıl taşıyıcı olup iki elektron taşımakla görevlidir. α -ketoglutarat dehidrogenaz ile pirüvat dehidrogenaz enzim kompleksleri içinde bulunur. Lipoik asit pirüvatın oksidatif dekarboksilasyonunda koenzim olarak görev yapmaktadır. Lipoik asidin serbest radikal hasarını uzaklaştıran E vitamini ve C vitaminini rejenere ettiği gösterilmiştir [54]. Şekil 1.5.1.6'da görüldüğü gibi R-lipoik asit, E ve C vitamini ve redükte formlarında geri dönüşüm yaparken dihidrolipoik asit mitokondri içinde güçlü antioksidan olarak aktivite gösterir.

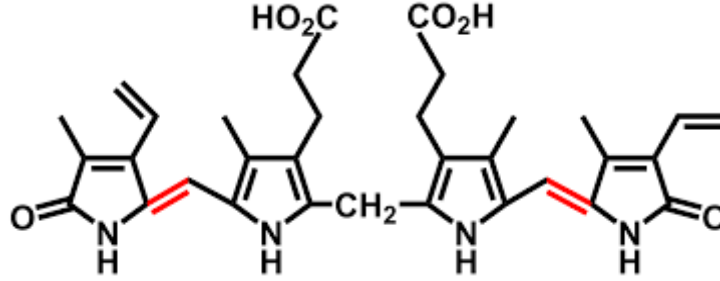


Şekil 1.5.1.6: Antioksidan rejenerasyon yolu [55]

1.5.1.7 Bilirubin

Plazmanın temel antioksidanlarından biri olan bilirubin HEM metabolizmasının son ürünlerinden biridir (Şekil 1.5.1.7). Askorbat gibi suda çözünen peroksitlere karşı koruma

sağlamada etkilidir [56]. Düşük konsantrasyonlarda lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği in vitro olarak gösterilmiştir [57].



Şekil 1.5.1.7: Bilirubin kimyasal yapısı

1.5.1.8 Fenolik bileşikler

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerden gıdaların yapılarında yer alan fenolik asitler ve flavonoidler önem taşımaktadır [58].

1.5.1.8.1 Fenolik asitler

Fenolik asitler; hidroksisinamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki gruba ayrılır [59].

Fenolik asit bakımından zengin besinlerin karaciğer üzerinde koruyucu etkileri olamla birlikte bu besinler antioksidan, antibakteriyel, antiinflamatuvar, antiallerjik, antiviral özellik gösterirler [60]. Kanser, kardiovasküler hastalıklar, diyabet, hipertansiyon gibi kronik hastalıklarda da polifenoller hafifletici özelliklere sahiptir [61].

Hidroksisinamik asitler

Hidroksisinamik asitler bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunurlar ve fenilpropan halkasına bağlanan hidroksil grubunun konumu ve sayısına göre farklı özellik gösterirler.

Bunlar arasında ferulik asit, kafeik asit, o-kumarik asit ve p-kumarik asit önem taşımaktadır [62].

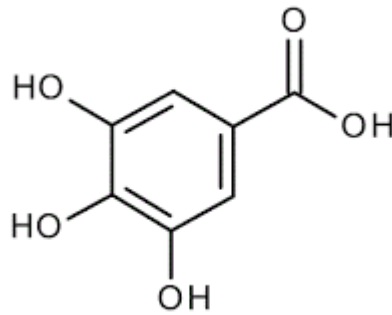
Hidroksisünamik asitler çoğunlukla asit türevleri halindedirler, çok az miktarlarda serbest halde bulunurlar, Hidroksisünamik asit glikozidleri ve amidleri de birçok bitkide bulunmaktadır. Hidroksisünamik asitin esterleri de gıdalarda çok yaygındır.

Hidroksibenzoik asitler

Hidroksibenzoik asitler ise bitkisel gıdaların yapısında çok az miktarlarda (10 ppm kadar) bulunur veya hiç bulunmayabilirler. Bunlar arasında salisilik asit, m-hidroksibenzoik asit, p-hidroksibenzoik asit, gallik ve vanilik asit gibi asitler sayılabilir [63].

Gallik asit

Gallik asit kimya, besin ve boya endüstrilerini gibi çok geniş bir alanda çeşitli amaçlarda kullanılan bir organik asittir (Şekil 1.5.1.8.1). Hidroliz olabilen tanenlerden (gallotanen) elde edilir. Gallik asit, anti mantar, antioksidan ve anti viral etkilere sahiptir. Kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterir [64].

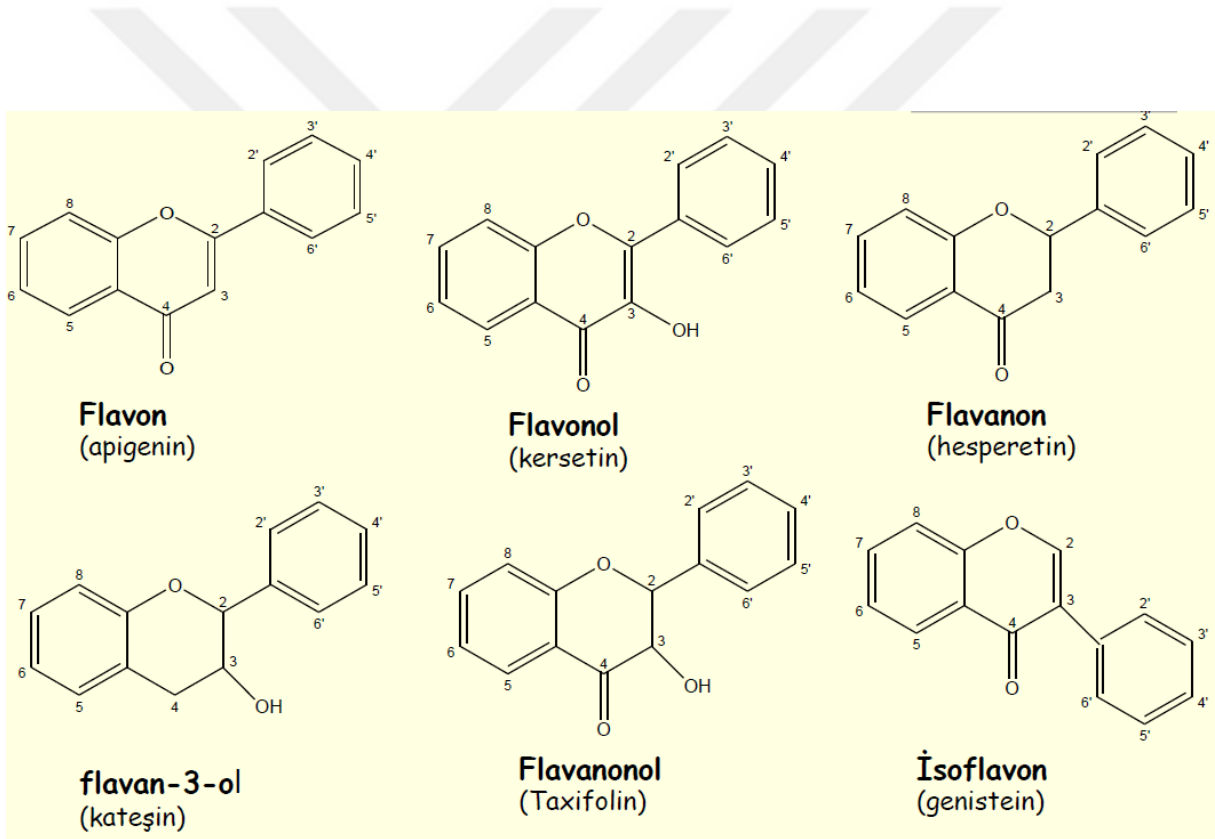


Şekil 1.5.1.8.1 : Gallik asitin kimyasal yapısı

1.5.1.8.2 Flavonoidler

Flavonoidler C6–C3–C6 difenilpropan yapısındadır ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır (flavan halkası). Flavonoidler, yapısal olarak altı gruba ayrılırlar (Şekil 1.5.1.8.2):

- ✓ antosiyanidinler,
- ✓ flavonoller,
- ✓ flavonlar
- ✓ flavanonlar,
- ✓ kateşinler (flavanoller),
- ✓ izoflavonoidler.



Şekil 1.5.1.8.2: Flavonoidlerin kimyasal yapıları

Flavonoidler antitoksidan özelliklerini gösterebilmek için serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisiz hale getirirler. Flavonoidler, lipid peroksil zincirini kırarlar, süperoksit radikali, hidroksil radikali gibi radikalleri temizlerler ve demir ve bakır gibi geçiş metallarını şelatlarlar.

Kateşin

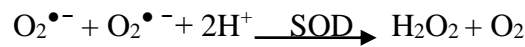
Kateşinler, renksiz bileşiklerdir. Hemen her meyvede bulunan kateşinler, flavonoid biyosentezinde ara ürün olarak yer alırlar. Gıdalarda en yaygın olarak bulunan flavonoid grubunu oluştururlar [65].

Kateşinler biyomoleküllere zarar veren serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırdıklarından antioksidan aktiviteye sahiptirler bu sayede DNA'yı ve diğer biyomolekülleri serbest radikallerin zararlı etkilerinden korurlar [66]. Ayrıca kateşinlerin antimikrobiyal, antifungal, antialerjik ve antitümör özellikleri de vardır [67]. Kateşinler hücreleri DNA hasarına ve tümör oluşumuna karşı korurlar, serum kolesterol seviyesini azaltırlar, hipertansiyonu düşürürler ayrıca antimitojenik etkiye sahiptirler [68]. Kateşinlerin lipid metabolizması üzerine de etkileri vardır, total kolesterol ve trigliserit miktarını azaltırlar, karaciğerdeki yağ birikimini inhibe ederler, karaciğerdeki lipid katabolizmasını stimüle ederler ve enerji tüketimi artırırlar [69].

1.5.2 Enzimatik antioksidanlar

1.5.2.1 Süperoksit dismutaz

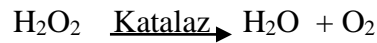
Süperoksit radikalının süperoksit dismutaz (SOD) tarafından hidrojen peroksit dismutasyonu primer savunma olarak bilinir çünkü bu enzim daha ileri serbest radikal üretilmesini önler. SOD'un katalitik fonksiyonu McCord ve Fridovich tarafından bulunmuştur [70]. O₂ solunumu yapan tüm organizmalarda bulunur ve temel fonksiyonu dismutatik reaksiyonu katalizlemektir. Dismutasyon oranı kimyasal dismutasyondan ~ 10⁴ kat fazladır [71].



SOD'un içerdığı metal iyonuna bağlı olarak 3 tipi bulunmaktadır. Sitozolde bulunan dimerik, Cu ve Zn içeren CuZnSOD, mitokondride bulunan tetramerik, Mn içeren MnSOD ve hücre dışı sıvılarda bulunan Cu ve Zn içeren ECSOD. SOD'un ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür. SOD'un aktivitesi dokular arasında değişir. En yüksek düzeyleri karaciğer, böbrek üstü bezi, böbrek ve dalakta görülür [72]. SOD'un katalizlediği reaksiyon sonucu H₂O₂ oluştuğu için H₂O₂'yi metabolize eden enzimlerle birlikte çalışır [6].

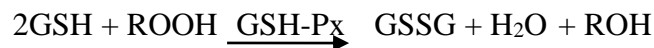
1.5.2.2 Katalaz

Primer antioksidan savunma komponenti olan bir hem proteindir. Hidrojen peroksite suya dekompozisyonunu katalizler ve bu görevi glutatyon peroksidazla (GSH-Px) paylaşır [73]. Bu enzimler farklı substrat aktivitelere sahiptir. Düşük H₂O₂ düzeylerinde organik peroksitler peroksidazlar tarafından katalizlenir. Ancak yüksek H₂O₂ konsantrasyonlarında katalaz tarafından metabolize edilirler. SOD gibi katalazın doku dağılımı geniştir. Aktivitenin düzeyi sadece dokular arasında değişmez hücrede de değişir. Karaciğer, böbrek ve kırmızı kan hücreleri yüksek miktarda katalaza sahiptir. Hepatositlerde peroksidazlar yüksek katalaz aktivitesi sergiler. Ayrıca aktivite mikrozomlarda ve sitozolde de bulunmuştur [74].



1.5.2.3 Glutatyon peroksidaz

Glutatyon peroksidaz intraselüler sitozolde ve mitokondri matriksinde lokalizedir. H₂O₂ ve organik peroksitlerin redüksiyonunu katalizler [75].



Selenyuma bağımlı ve bağımsız olan iki tipi vardır. Selenyuma bağımlı olan; hem H₂O₂, hem lipid hidroperoksitlerini, selenyumdan bağımsız olan; sadece lipid hidroperoksitlerini metabolize edebilmektedir [76]. Hücrelerde ayrıca sitozolik olan fosfolipid hidroperoksit glutatyon peroksidaz (PLGSH-Px) enzimi de vardır. Membran fosfolipid hidroperoksitlerini alkollere indirger. Reaksiyonlar sonucunda oksitlenmiş glutatyon (GSSG) oluşur. Antioksidan savunmanın etkinliğini sürdürebilmesi için oksitlenmiş glutatyonun tekrar indirgenmiş şekle (GSH) dönüşmesi gerekir. GSSG konsantrasyonundaki artış oksidatif stresin bir göstergesidir. GSH-Px'in hidrojen peroksid ve hidroperoksitleri indirgemesi glutatyon redüktaz ve NADPH mevcudiyetine bağlıdır. Glutatyon redüktaz glutatyonunu okside formunun redüksiyonundan sorumludur [77].

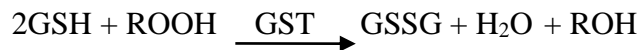
1.5.2.4 Glutatyon redüktaz (GSH-Rx)

Hücre içinde sitozol ve mitokondride bulunur. Prostetik grubu flavin adenin dinükleotid (FAD)'tir. Oksitlenmiş glutatyonun redüksiyonunu NADPH varlığında katalizler [6].



1.5.2.5 Glutatyon-S-transferaz (GST)

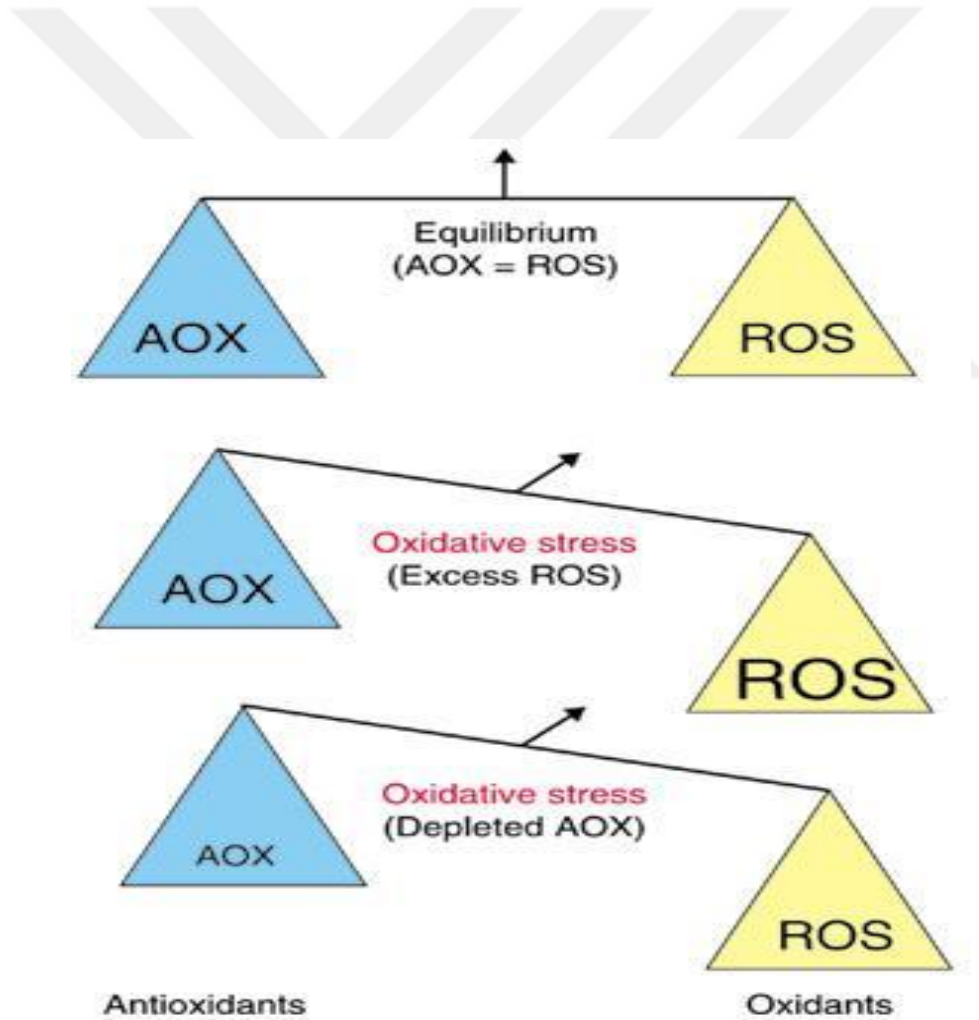
Araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri gibi lipid peroksitlere karşı selenyumdan bağımsız GSH-Px aktivitesi gösterirler.



1.6 Oksidatif stres

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve antioksidan savunmanın aktivitesi in vivo denge halindedir. Ancak denge ROS tarafına kayabilir (Şekil 1.6). Oksidatif olarak hasar

görmüş moleküllerle mücadele için onarım sistemlerine ihtiyaç oluşur. Ancak ROS lehine daha büyük bir dengesizlik oluşursa oksidatif stres meydana gelir [78]. Çoğu aerob organizma hafif oksidatif stresi tolere edebilir. Ekstra antioksidan savunma sentezini indükleyerek karşılık verebilirler. Bununla birlikte ciddi oksidatif stres hücre hasarına ve ölümüne yol açabilir [79]. Memeli hücrelerinde oksidatif stres hücre içinde protein hasarı yaparak serbest kalsiyum ve demir artışına neden olur [80]. Demir iyonu salınımı OH^\bullet radikali üretimine neden olur. İntraselüler serbest Ca'nın aşırı artışı endonükleazları aktive eder ve DNA fragmantasyonuna yol açar [81]. Bundan dolayı oksidatif stres lipid, protein, DNA ve karbonhidratlarda hasarla sonuçlanır [82]. Farklı hedef moleküllerde oluşan hasarın önemi oksidatif stresin derecesi, mekanizması ve süresiyle ilişkilidir.



Şekil 1.6 : Antioksidan-oksidan sistem arasındaki denge

1.7 Antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemler

Bugüne kadar pek çok farklı teknikle in vitro ve in vivo antioksidan ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir ve uygulanmaktadır [83, 84]. Antioksidan kapasiteyi tanımlamak için “kapasite” veya “etkinlik”, “güç”, “parametre”, “potansiyel”, “potens” ve “aktivite” gibi farklı terimlerin kullanıldığı görülür. Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite terimleri birbiri yerine kullanılırlar. Fakat farklı anlamlara sahiptirler. Aktivite, spesifik bir antioksidan ve oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitini kapsar. Kapasite, bir numune tarafından süpürülen belirli bir serbest radikalin miktarının ölçüsüdür [85].

Antioksidan kapasite ölçümleri, örneğin toplam süpürme kabiliyetini belirleyen, heterojen bir antioksidan karışımının miktarını verir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez [86]. Farklı antioksidanlar ve oksidanlar arasındaki reaksiyonlar farklı hız sabitlerine sahiptir ve bu yüzden örneğin antioksidan kapasitesi farklı oksidanlarla değişir [87]. Ölçümde kullanılan analitik metotlar ve analizin olduğu koşullar da aynı örnek için farklı sonuçlara neden olabilir.

Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri başlıca iki gruba ayrılabilir [88] (Tablo 1.7):

1. Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)
2. Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)

HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. HAT- esaslı yöntemler genellikle bir sentetik serbest radikal oluşturucu, bir oksitlenebilen prob ve bir antioksidandan oluşur. HAT-temelli metodlarda peroksil radikali (ROO•) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. ROO• tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuçta ROO• ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir [88, 89].

ET temelli yöntemler ise antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır [84].

HAT ve ET esaslı yöntemler bir örneğin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) süpürücü kapasitesini ölçmeye dönüktür.

Tablo 1.7: Antioksidan kapasite ölçümünde kullanılan yöntemler

HAT esaslı yöntemler	Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP) Oksijen radikal absorban kapasitesi yöntemi (ORAC) Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi yöntemi (TOSC) Diklorofloresin-diasetat yöntemi (DCFH-DA) Fikoeritrin esaslı yöntem (PE) Krosin yöntemi
ET esaslı yöntemler	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite / ABTS yöntemi (TEAC) Total antioksidan durum (TAS) Total antioksidan yanıt (TAR) Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi (FRAP) 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesi yöntemi (DPPH) Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik bileşik tayini (FCR) Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

1.7.1 Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)

Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi ilk defa Wayner ve ark. [90] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, bir azo bileşiğinin termal bozunmasıyla indüklenen kontrollü bir lipid peroksidasyon reaksiyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi temeline dayanır.

Bu yöntemde serbest radikal üretimini başlatıcı olarak 2,2-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) tarafından üretilen peroksil radikalleri kullanılmaktadır [8]. Plazmaya AAPH eklendikten sonra okside olabilen materyalin oksidasyonu, reaksiyon süresince tüketilen oksijen yoluyla izlenir. Bu oksidasyon plazmada bulunan antioksidan tarafından engellenir. Sonuçlar Troloks C'nin sonuçları ile kıyaslanır [86, 91, 92].

Çözünmüş oksijen tüketimi, lipid peroksidasyon hızının bir göstergesidir ve bundan dolayı plazmanın bu reaksiyonu engelleme kabiliyetinin dolaylı olarak ölçülmesidir. Plazmanın oksijen tüketimi üzerine geciktirme etkisi, bilinen miktarda troloksun geciktirme etkisiyle karşılaştırılır. Bu metot zaman alıcı bir metottur (örnek başına 2 saat) ve dolayısıyla günlük çalışılacak örnek sayısı sınırlıdır. Bu yöntemde karşılaşılan problemlerden biri oksijen elektrotunun gereken zaman boyunca stabilitesinin sağlanamamasıdır. TRAP metodunda daha önemli bir problem, plazmanın yüksek oranda seyreltilmesinden kaynaklanır. Bu seyreltme yağ asitleri arasındaki reaksiyonun ilerlemesini zorlaştırır [93]. Bu durumda TRAP değeri seyreltmeyle orantılı olarak artar. Reaksiyon karışımına küçük bir miktar linoleik asit eklenmesiyle problemin üstesinden gelinmiştir. DeLange ve arkadaşları, antioksidan kapasiteyi ölçmek için bir dış prob kullanmayı önermişlerdir [94]. Bu metot R-fikoeritrini (R-PE) floresan prob olarak kullanmıştır. AAPH eklenmesiyle R-PE floresansı doğrusal olarak azalır. Plazma veya tek antioksidan eklenmesi, eklenen antioksidan miktarına bağlı olarak, floresandaki azalmayı geciktirir. R-PE ile AAPH reaksiyonunun ilerleyişi florimetrik olarak izlenir (λ_{uyarma} = 495 nm ve $\lambda_{emisyon}$ = 575 nm).

Valkonen ve Kuusi, TRAP metodunu moleküler prob olarak diklorofloresin diasetat (DCFH-DA) uygulayarak modifiye etmişlerdir [95]. AAPH varlığında oluşan peroksil radikalleri ile DCFH-DA okside olur ve diklorofloresine (DCF) dönüşür. DCF yüksek floresans özellik gösteren bir bileşiktir (λ_{uyarma} = 480 nm ve $\lambda_{emisyon}$ = 526 nm) ve 504 nm'de absorbansa da sahiptir. Bu yüzden meydana gelen DCF ya florimetrik olarak ya da spektrofotometrik olarak izlenebilir [96].

Glutasyon, bilirubin, ürik asit ve askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanların süpürücü aktivitesini ölçtüğünden dolayı serum veya plazma gibi biyolojik materyallerde antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılabilir olması yöntemin avantajıdır [88]. Yüksek derecede uzmanlık ve deneyim gerektirmesi, karışık ve zaman alıcı bir yöntem olması ise dezavantajıdır.

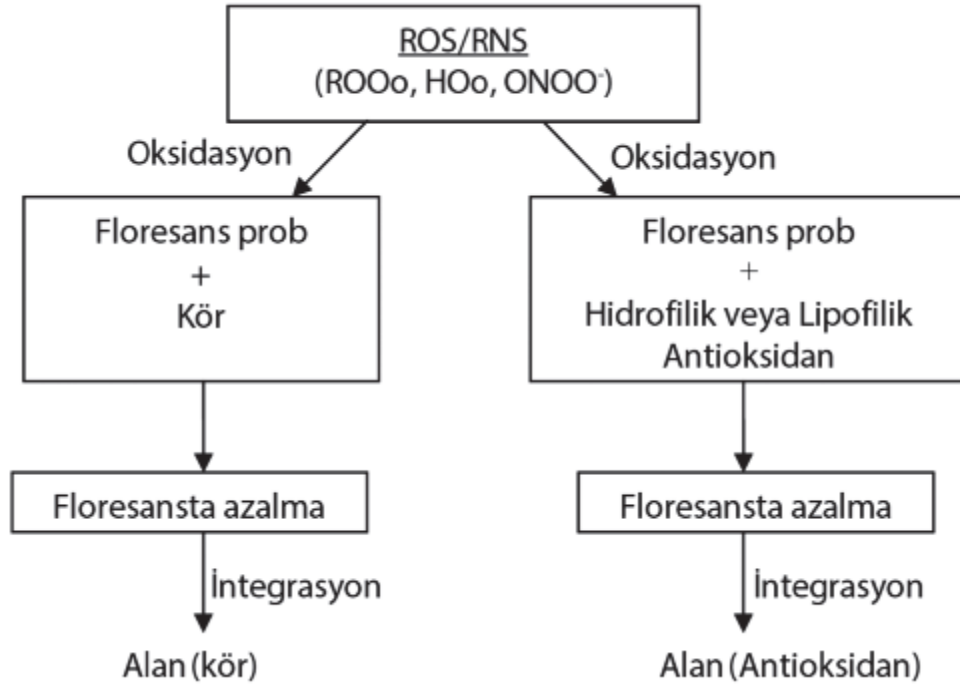
1.7.2 Oksijen radikal absorbans kapasitesi yöntemi (ORAC)

Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi fitokimyasalların, bitkisel maddelerin, diğer biyolojik örneklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde çok fazla kullanılan bir yöntemdir [86, 97, 98]. Cao ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir [99]. ORAC peroksil radikalinin antioksidan inhibisyonunu ölçer. Bu yöntemde peroksil radikali floresans özellik gösteren bir molekülle (prob) floresans olmayan bir ürün oluşturmak üzere

reaksiyona girer. Peroksil radikalleri ile oksitlenen bir hedef molekülün bir antioksidan tarafından ne kadar korunduğu, hedef molekülün bozunması floresans takibi ile izlenerek, bozunma kinetiği eğrisinin altında kalan alanın değişimi ile ölçülür.

Antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, floresans bozunma eğrisinin altındaki integrale edilmiş net alandan yapılır (AUC) (Şekil 1.7.2).

[Alan antioksidan- Alan kör (antioksidan olmayan)]



Antioksidan Kapasite = Alan (Antioksidan) - Alan (kör)

Şekil 1.7.2: ORAC metodunun prensibinin şematik gösterimi [100].

2,2-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) gibi azo-bileşiklerin sıcaklıkla bozulması sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır [92]. Orjinal yöntemde prob olarak *Porphyridium cruentum*'dan izole edilen floresan bir protein olan B-fikoeritrin (B-PE) kullanılmaktadır. B-PE'nin floresan bozulması onun peroksil radikalleri ile reaksiyonunun göstergesidir. B-PE, yüksek floresans verimi, ROS'a hassasiyeti ve suda çözünürlüğü nedeniyle

tercih edilmektedir [86]. Ancak çok fazla çeşitliliğe sahiptir, oda koşullarında ışık ile rengi değişmektedir. Aynı zamanda spesifik olmayan proteinik bağlardan dolayı polifenoller ile ilişkiye girmektedir ve böylece radikal üretici eklenmeden bile floresans kayıpları olmaktadır. Bu nedenle sonuçlar tekrarlanabilir değildir [86, 88]. Bu dezavantajlarından dolayı prob olarak B-PE yerine floresein (FL) (3,6'-dihidroksi-spiro [isobenzofuran- 1 [3H], 9'[9H]-xanthen]-3-one) kullanılmaktadır [89]. FL sentetik protein yapıda olmayan bir probtur ve BPE'nin sınırlamalarını gidermektedir. FL kesin, sağlam ve doğru sonuçlar vermektedir. Fakat FL probu pahalı ve pH duyarlıdır. Bu nedenle reaksiyon pH'ı dikkatlice izlenmelidir [86].

ORAC değerleri genellikle Troloks eşdeğer olarak rapor edilir. Farklı derişimdeki Troloks standartları kullanılarak kalibrasyon eğrisi elde edilir [101]. Numunenin Troloks eşdeğeri, Troloks derişimi (Y)(μM) ve floresans bozunma eğrisi altındaki net alan (Alan örnek – Alan blank) arasındaki doğrusal veya ikinci dereceden ilişki kullanılarak hesaplanır ($Y=a+bX$, doğrusal veya $Y=a+bX+cX^2$, ikinci dereceden).

ORAC yöntemi hem lipofilik hem de hidrofilik ekstrelerin antioksidan kapasitesinin ölçülmesini mümkün kılar. Aynı zamanda farklı radikal kaynaklar kullanılabilir [102]. ORAC yöntemi kolayca otomatikleştirilir. 96 veya 48 kuyucuklu floresans mikroparka okuyucu sistem ile birleştirilen robotik sekiz kanallı sıvı işleme sistemi kullanılarak, mükemmel sonuçlar elde edilmiştir [100]. ORAC reaksiyonu sıcaklığa duyarlı bir reaksiyon olduğundan, plaka boyunca sıcaklık kontrolü önemlidir. Küçük sıcaklık farklılıkları tekrar üretilebilirliği azaltır. AAPH eklenmeden önce reaksiyonun 37 °C'de inkübasyonu gün-içi değişkenliği azaltır [103]. Uzun analiz zamanı (~1 saat) önemli bir eleştiri olmuştur.

Hem fikoeritrin hem de floresein ile yapılan ORAC ölçümleri floresans spektrofotometre gerektirmektedir. Ayrıca test edilen bileşiğin antioksidan aktivitesinin yüksek olması durumunda kesin kinetik veri elde etmek zorlaşmaktadır. Bu nedenle bu reaktiflerin yerine renkli bir reaktif olan pirogallol red (PGR)'in kullanılması önerilmiştir [104]. Pirogallol red kullanılarak elde edilen ORAC değerlerinin antioksidanların peroksil radikallerine karşı reaktivitesini daha doğru gösterdiği de rapor edilmiştir [105]. Pirogallol red kullanılarak ORAC yöntemi ile antioksidan tayini saf antioksidan maddeler ve kompleks antioksidan karışımları için denenmiş ve sonuçların test edilen bileşiklerin reaktivitesi ile daha iyi korelasyon gösterdiği ve görünür spektroskopik uygulanmasının daha kolay olduğu sonucuna varılmıştır [104].

1.7.3 Krosin yöntemi

Krosin doğal bir karotenoid türevidir. Karotenoidlerin otooksidasyon yoluyla renkleri açılır. Oksidasyon ışık veya ısı yoluyla [106] veya peroksil radikalleri ile (örneğin AAPH veya yükseltgeyici lipitler) başlatılır [107]. Bu renk açılması radikallere hidrojen atomu veren klasik antioksidanlar tarafından önlenabilir veya azaltılabilir.

Deneysel olarak reaksiyon krosin içeren fosfat tamponu ve bilinen miktarda antioksidan ile gerçekleştirilir. Reaksiyon AAPH eklenmesi ile başlatılır ve krosin beyazlaması 443 nm dalga boyunda spektrofotometre ile izlenmektedir. Beyazlama oranı AAPH ilavesinden sonra 10 dak boyunca izlenir [86, 88]. AAPH eklendikten sonra krosinin ağarma hızı yaklaşık 1 dakika doğrusaldır. Antioksidanlar ağarmaya engel olur. Başlangıç krosin ağarma hızları antioksidan varlığında (V) ve yokluğundaki (V_0) kinetik eğrilerden elde edilir [108].

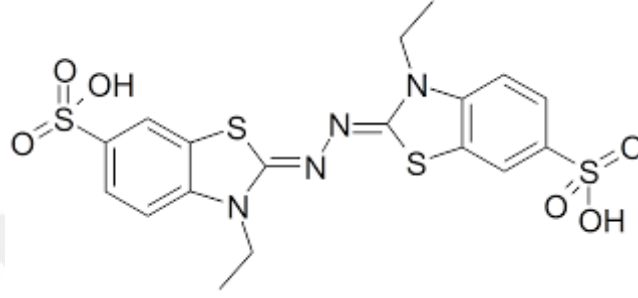
Krosin yöntemi kullanılarak analiz edilen askorbik asitin antioksidan kapasitesi 7.7 troloks eşiti olarak kaydedilmiştir ki diğer yöntemlerden elde edilen değerlerden çok daha yüksektir (ORAC değeri 0.95'dir) [88, 91].

Krosin ağartma tekniği, mikroplakalar gibi yüksek işlem hacimli metodolojilere kolaylıkla adapte edilebilir. Bununla birlikte sıcaklık kontrolü kritiktir [109]. Krosin ağartma tekniğinin, gıda örneklerinde uygulamaları sınırlıdır. ROO• ve fitokimyasallar arasındaki reaksiyon hız sabitleri büyük ölçüde değişebilir. Bazı fitokimyasalların reaksiyon hızları krosine benzerdir. Bu durumda, inhibe edilmiş ağartma hızları çok küçüktür ve metot antioksidanlardaki konsantrasyon değişimine duyarlı değildir. Krosin 450 nm'de absorbans yapar ve karotenoid gibi pek çok meyve pigmenti ışığı aynı dalgaboyunda absorplar. Her bir örneğe girişimi önlemek için, yalnızca gıda örneği ve AAPH içeren bir karışım aynı zamanda denenmelidir [88]. Krosin safrondan ekstrakte edilen bir doğal pigment karışımıdır ve çok çeşitlilik gösterir. Bu yüzden partiler arası (inter-batch) farklılık fazladır. Bu problemler metodun güvenilirliğini ve kantitatif endüstriyel uygulamalarda kullanımını kısıtlar [86].

1.7.4 Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite / ABTS yöntemi (TEAC)

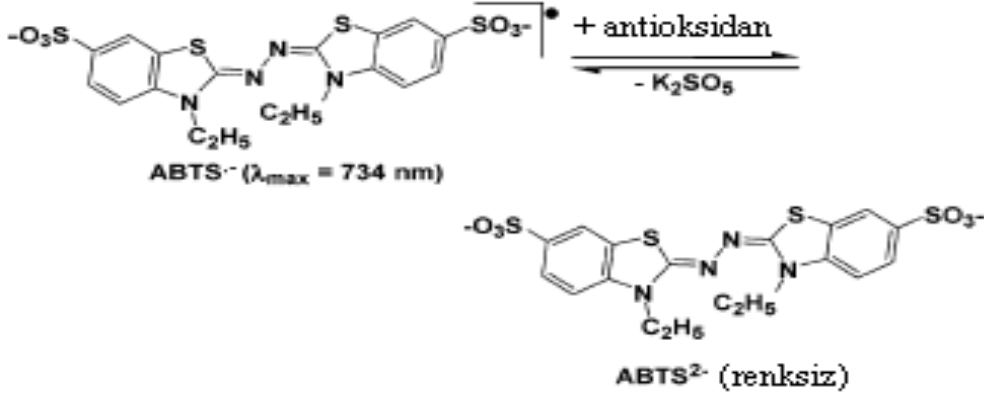
TEAC yöntemi ilk defa Miller ve ark. [110] tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra, Re ve ark. [111] tarafından değiştirilmiştir. Kromojenik bir redoks radikali olan ABTS [2,2-azinobis (3-etilbenzotiyazolin 6-sülfonat)] aynı zamanda kararlı bir radikaldir (Şekil 1.7.4.1). ABTS,

660, 734 ve 820 nm’de maksimum olan karakteristik uzun dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösterir. Hem suda hem organik çözücülerde çözüldüğünden hem hidrofilik hem de hidrofobik antioksidan aktivite tayininde kullanılabilir. TEAC yöntemi, antioksidan varlığında çözeltideki ABTS radikalinin absorbansındaki azalmanın ölçülmesine dayanmaktadır [111, 112].



Şekil 1.7.4.1: ABTS molekülünün yapısı

Orijinal yöntemde ABTS radikal katyonu, H₂O₂ ile metilmiyoglobinin reaksiyona girmesiyle oluşan ferrilmiyoglobin ile ABTS arasındaki etkileşimden oluşmaktadır. Orijinal TEAC yönteminde analiz edilen maddenin (antioksidanın) ABTS radikalini indirgeme yeteneği ölçülmektedir. Ancak bu madde ferrilmiyoglobini de indirgeyebilir. Re ve arkadaşları [111] tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu ABTS.+ radikal katyonu oluşmaktadır (Şekil 1.7.4.2). Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal katyonu oluşturulmaktadır. Orijinal metotta ise antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir [113]. Oluşan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır. Geliştirilen metodun orijinal metottan farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır.



Şekil 1.7.4.2: ABTS'nin persülfatla oksidasyonu

TEAC metodunun diğer bir modifikasyonu Van der Berg [113] tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada bir azo bileşiği olan 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl (ABTS) kullanılarak ABTS•⁻ radikal anyonu oluşturulmuştur. Yöntemde antioksidanlar radikalın oluşmasından önce eklenmektedir. Böylece radikal oluşumuna etki edecek bileşiklerin girişimini önlemektedir. Bu yöntemde de hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasitesi ölçülebilmektedir. Diğer bir yenilik Arnao ve ark. [114] tarafından ortaya konulmuştur. Burada ABTS radikalinin oluşumunda horse radish peroxidase (HRP) enzimi kullanılmıştır. ABTS/H₂O₂/ HRP enzimatik sistemi kullanılarak hidrofilik ve lipofilik antioksidan aktivitesi ölçülebilmektedir [59, 114].

1.7.5 Daha stabil ABTS radikali ile total antioksidan durum ölçümü (TAS)

Redükte 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) molekülü asidik ortamda (30 mM asetat tamponu pH 3,6) hidrojen peroksit ile ABTS^{•+}ye oksitlenir. Asetat tamponunda ABTS^{•+} molekülleri (koyu yeşil renkte) uzun süre stabil kalır. Erel tarafından geliştirilen yöntemde [115] daha konsantre yüksek pH'ta asetat tamponuyla (400 mM pH 5,8) dilüe edilirse renk spontan yavaş yavaş açılır. Örnekte var olan antioksidanlar kendi konsantrasyonlarıyla orantılı olarak rengi açılmasını hızlandırırlar. Bu reaksiyon spektrofotometrede takip edilir. Rengin açılma oranı örneğin total antioksidan kapasitesiyle ters ilişkilidir. Reaksiyon Troloks'la kalibre edilir. Sonuçlar mM Troloks Eq/L olarak verilir.

1.7.6 Potent serbest radikal reaksiyonlarına karşı total antioksidan yanıt (TAR)

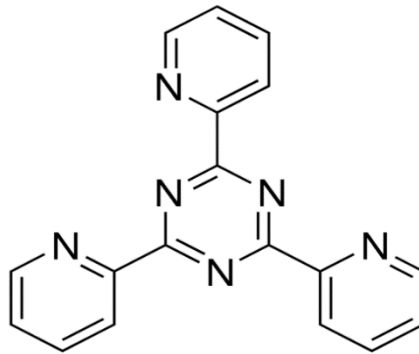
Erel tarafından geliştirilen bu yöntemde Fe^{+2} – o-dianizidin kompleksi hidrojen peroksitle reaksiyona girer ve OH^\bullet radikali oluşur [116]. Bu güçlü radikal düşük pH'ta o-dianizidin moleküllerini sarı-kahverengi renkli dianizidil radikallerine oksitler. Renk oluşumu ileri oksidasyon reaksiyonlarıyla artar. Örnekteki antioksidanlar oksidasyon reaksiyonlarını ve renk oluşumunu baskılar. Bu reaksiyon spektrofotometre ile takip edilir. Renk oluşumunun baskılanması Troloks'la kalibre edilir. Sonuçlar mM Troloks Eq/L olarak verilir.

Reaksiyon kinetiği 3 faza ayrılabilir. İlk fazda o-dianizidin oksitlenir ve absorbans lineer olarak artar. Bundan sonraki fazda oksidasyon tamamlanır ve grafik plato çizer. Bu alanda renk yoğunluğu en yüksek noktaya ulaşır. En son fazda renk kahverengiden siyaha döner ve çözünmeyen presipatlar oluşur.

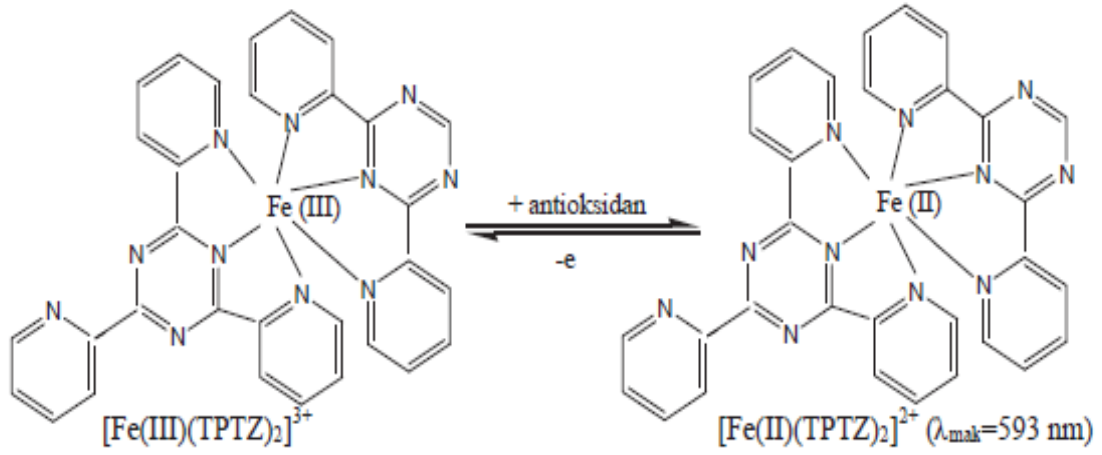
1.7.7 Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi (FRAP)

Benzie ve ark. tarafından geliştirilen bu metotta düşük pH'da ferik tripiridiltriazin kompleksi (Fe^{+3} -TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe^{+2} -TPTZ) indirgenir (Şekil 1.7.7.2). Oluşan kompleksin 593 nm'de absorbansı ölçülür [117]. Böylece elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle lineer olduğu varsayılır. TPTZ molekülünün yapısı Şekil 1.7.7.1'de görülmektedir.

Sonuçlar troloks eşiti olarak ifade edilir. Orijinal yöntemde absorbans 4 dak izlenir. Fakat bu zamanda reaksiyon tamamlanmaz. Bu nedenle izleme zamanının 30 dakikaya uzatılması tavsiye edilmektedir [118].



Şekil 1.7.7.1: TPTZ molekülünün yapısı



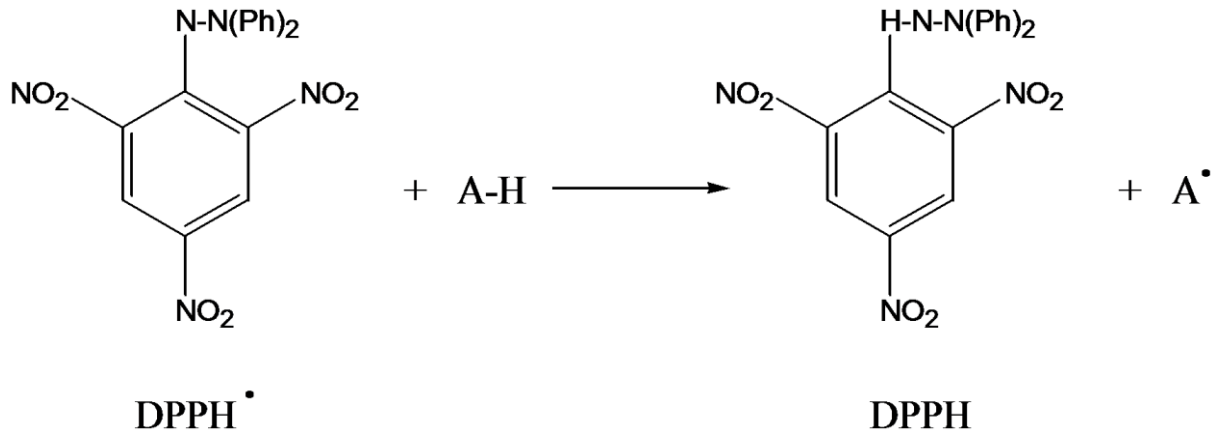
Şekil 1.7.7.2: Fe(III)-TPTZ kompleksinin, Fe(II) formuna indirgenmesi

1.7.8 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesi yöntemi (DPPH)

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. DPPH radikallerinin antioksidan moleküllerin tayininde kullanılabileceğini ilk kez Blois önermiştir [119]. Brand-Williams ve arkadaşları yöntemi geliştirmişlerdir [120].

DPPH radikali koyu menekşe (mor) renklidir ve 515 nm'de maksimum absorbanı verir. Antioksidan tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 515 nm'de absorbanın azalmasına neden olur (Şekil 1.7.8). Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorban sabitlenene kadar takip edilir. Kalan DPPH yüzdesi antioksidan derişimiyle doğru orantılıdır. Başlangıç DPPH• derişiminde %50 azalmaya neden olan derişim EC_{50} olarak tanımlanır. EC_{50} denge derişimine ulaşması için gerekli olan zaman, kinetik eğrilerden hesaplanır ve $\text{T}_{\text{EC}_{50}}$ olarak tanımlanır. Antioksidan kapasiteyi ifade etmek için, antiradikal verim (AE) denilen başka bir parametre tanımlamışlardır. Antiradikal verim aşağıdaki şekilde bulunur:

$$\text{AE} = (1/\text{EC}_{50}) \text{T}_{\text{EC}_{50}}$$

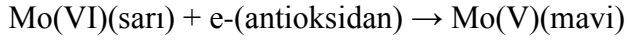


Şekil 1.7.8: DPPH yönteminin şematik gösterimi

Teknik olarak basit ve hızlı bir yöntemdir. Fakat uygulamasını sınırlandıran bazı dezavantajlara sahiptir. Uzun ömürlü nitrojen radikali olan DPPH, lipid peroksidasyonu ile ilişkili olan reaktif ve kısa ömürlü peroksil radikallerine benzerlik göstermez. Peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona giren birçok antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir [84, 88]. DPPH yalnızca organik ortamda çözülebilir (özellikle alkol ortamında), sulu ortamda çözünmez. Bu hidrofilik antioksidanların rolünün yorumlanmasında önemli bir sınırlamadır. Fenolik bileşiklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini ölçmek ve karşılaştırmak için geniş ölçüde kullanılmaktadır, fakat ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Metanol ve aseton içindeki DPPH'nin 515 nm'deki absorbansı ışık altında, 120 dakikalık süre boyunca %20 ve %35 azalmaktadır. Karanlıkta ise 150 dakika süre boyunca önemli bir değişme olmadığı bulunmuştur [121].

1.7.9 Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenolik bileşik tayini (FCR)

Folin-Ciocalteu reaktifi (Folin Fenol Reaktifi veya Folin-Denis reaktifi) fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır. İlk olarak Singleton ve Rossi tarafından önerilmiş [122] ve daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Varsayılan aktif merkezi Molibdenyum (VI) dir. Fenolik antioksidanların varlığında ayraçtaki Mo(VI)'nın indirgenmesiyle renk sarıdan maviye döner ve 760 nm'de absorbans ölçülür.



Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşiti (mg/L) olarak verilir. FC ayırıcı fenolik bileşikler için spesifik değildir. Fenolik olmayan bir çok bileşik (aromatik aminler, sülfür dioksit, askorbik asit, Cu (I) ve Fe (II) gibi) tarafından indirgenebilir. Bu nedenle “toplam fenolik madde” belirlenmesi için uygun değildir. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer [84].

FC yöntemi ile diğer elektron transferine dayanan metotlar arasında (örnek olarak, TEAC ve DPPH•) mükemmel doğrusal korelasyon olduğu belirlenmiştir [109]. FC metodu ve ORAC metoduyla elde edilen antioksidan kapasite ölçümleri arasındaki ilişki genellikle iyidir [84]. Bu korelasyonlar, gıda örneklerinde antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için, FC toplam indirgeyici kapasitesinin yararlılığını doğrulamaktadır. FCR'nin tanımlanmamış kimyasal yapısına rağmen, FC yöntemi ile toplam fenol tayini güvenilir, basit ve tekrarlanabilir [88].

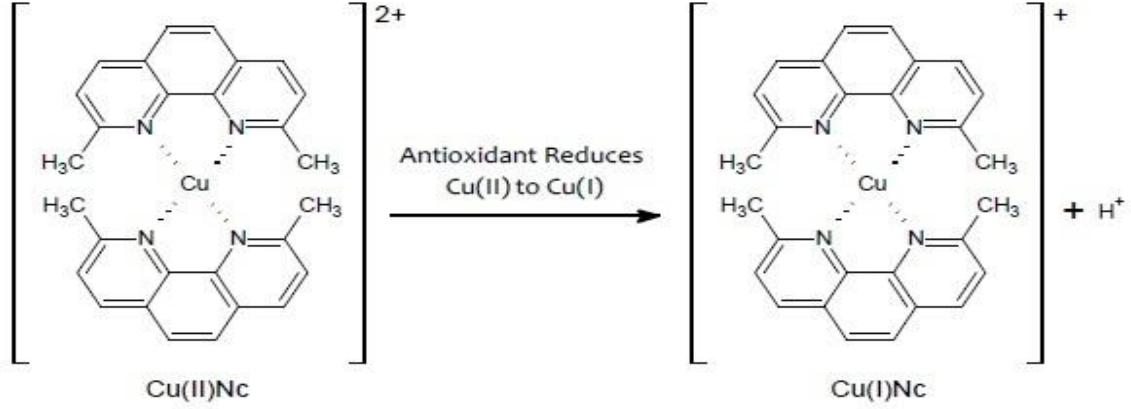
Çok sayıda makale önerilen gallik asit referans standardı yerine kateşin eşdeğeri [123], klorogenik asit eşdeğeri [124], kafeik asit eşdeğeri [125] ve vanilik asit eşdeğerini [126] kullanarak hesaplama yapmışlardır. Metotların standardizasyon eksikliği tayin edilen fenollerde farklı değerler elde edilmesine neden olmaktadır. Son absorbans değerleri genellikle reaksiyona giren fenolik hidroksil gruplarının sayısı ile orantılıdır ve molekülün yapısına bağlıdır. Eğer kalibrasyon için kullanılan standart madde yüksek reaktivlikte ise ve yüksek bir absorbans veriyorsa, ölçülen numune değerleri düşük olacaktır. Yöntemin zaman alması, rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için, lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır.

1.7.10 Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)

Apak ve arkadaşlarının [127] geliştirdiği bu yöntem, bir numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi temeline dayanır (Şekil 1.7.10). Yöntemde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] şelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

Örnek başına sadece 10 dak gereken çok hızlı bir yöntem olması avantajdır. Askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kersetin için CUPRAC yöntemi birkaç dakikada tamamlanırken

daha kompleks moleküller için 30-60 dak gerekmektedir [84]. Yöntemde kullanılan ayıraçlar oldukça ucuzdur, yöntem çok fazla uzmanlık gerektirmez. Bakır reaksiyon kinetikleri demirden daha hızlıdır.



Şekil 1.7.10: Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi

1.7.11 Total tiyol (sülfhidril grupları) ölçüm yöntemi (TTL)

Plazma tiyol içeriği Ellman tarafından tanımlanmış [128]ve Hu tarafından modifiye edilmiş yöntem ile ölçülür [129]. 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) molekülü serbest tiyoller tarafından redüklenerek disülfid ve bir molekül 5-tiyonitrobenzoik asit oluşturur. Bu reaksiyon spektrofotometrede 412 nm'de gözlenir. Renk oluşumu merkaptoetanol ile kalibre edilir. Sonuçlar µmol/L olarak verilir. 4'4-ditiyodipiridin (4-DPS), DTNB'ye alternatif bir reaktiftir. 4-DPS'nin redüksiyonu 4-tiyopiridon'a yol açar ve 324 nm'de ölçülebilir. Ancak bu dalga boyu klinik kimya laboratuvarlarında bulunan otomatik analizörlerde kullanılamaz.

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

2.1.1 Kullanılan ekipmanlar

Soğutmalı santrifüj	: Nüve NF800R (Türkiye)
-80 °C derin dondurucu	: Sanyo (Japonya)
Hassas terazi	: Mettler Toledo ML204-a (Amerika)
Vorteks	: Genie 2 (Amerika)
Isıtıcı ve mantetik karıştırıcı	: IKA rct basic (Almanya)
pH metre	: Inolab WTW pH 730 (Almanya)
Spektrofotometre	: Shimadzu UV 1800 (Japonya)
Otomatik pipetler	: Socorex (İsviçre), Nichipet (Japonya)
Otoanalizör	: Roche Hitachi cobas 501 (Almanya)

2.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler analitik reaktif ayar (Analytical reagent grade-ACS) saflıkta olup, Sigma -Aldrich'den satın alındı.

FRAP tayini için [117]:

- Sodyum asetat
- Asetik asit
- TPTZ (2,4,6-tripiryridyl-s-triazine)
- Hidroklorik asit
- Demir (III) klorür

TAS tayini için [115]:

- Sodyum asetat
- Asetik asit
- ABTS
- H₂O₂

TAR tayini için [116]:

- Potasyum klorür
- Hidroklorik asit
- Ortodianizidin dihidroklorid
- Demir(II) amonyumsülfat
- H₂O₂

TTL tayini için [128, 129]:

- DTNB
- Metanol
- EDTA
- Tris
- HCl

2.1.3 Kullanılan kimyasal çözeltiler**FRAP tayini için:**

300 mM asetat tamponu (pH 3,6) : 24,6 g CH₃COONa tartılarak distile suda çözüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı. 1,705 ml glasiyal asetik asit 1000 ml distile suya tamamlandı. 75 ml sodyum asetat solüsyonu 925 ml asetik asit solüsyonu ile pH metre altında pH 3,6 olacak şekilde karıştırıldı.

10 mM TPTZ çözeltisi: 0,31 g TPTZ tartılarak balon jodede 100 ml 40 mM HCl içinde çözüldü.

20 mM FeCl₃ çözeltisi: 0,32 g FeCl₃ tartılarak distile suda çözüldü ve balon jodede 100 ml'ye tamamlandı.

Çalışma solüsyonu (working reagent): 10 v asetat tamponu + 1 v TPTZ çözeltisi + 1 v FeCl₃ çözeltisi olacak şekilde günlük hazırlandı.

TAS tayini için:

Reaktif 1:

400 mM asetat tamponu (pH 5,8) : 32,8 g CH₃COONa tartılarak distile suda çözüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı. 22,8 ml glasiyal asetik asit 1000 ml distile suya tamamlandı. 940 ml sodyum asetat solüsyonu 60 ml asetik asit solüsyonu ile pH metre altında pH 5,8 olacak şekilde karıştırıldı.

Reaktif 2:

300 mM asetat tamponu (pH 3,6) : 24,6 g CH₃COONa tartılarak distile suda çözüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı. 1,705 ml glasiyal asetik asit 1000 ml distile suya tamamlandı. 75 ml sodyum asetat solüsyonu 925 ml asetik asit solüsyonu ile pH metre altında pH 3,6 olacak şekilde karıştırıldı.

2 mM H₂O₂ (278 µl) solüsyonu (%35) 1000 ml tampon solüsyonuna tamamlandı.

10 mM (0,549 g) ABTS hazırlanmış 100 ml solüsyonda çözüldü.

Reaktif 2 kullanılması için 24 saat oda ısısında bekletildi.

TAR tayini için:

Reaktif 1:

75 mM Clark ve Lubs solüsyonu (pH 1,8) : 5,591 g KCl tartılarak distile suda çözüldü ve 1000 ml'ye tamamlandı. 6,41 ml HCl (%36,5) 1000 ml distile suya tamamlandı. 800 ml KCl solüsyonu 200 ml HCl solüsyonu ile pH metre altında pH 1,8 olacak şekilde karıştırıldı. 10 mM (3,17 g) ortodianizidin dihidroklorid bu solüsyonda çözüldü. 45 µM (0,01764) Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O tartılarak hazırlanan solüsyonda çözüldü.

Reaktif 2:

7,5 mM H₂O₂ solüsyonu: 0,641 ml H₂O₂ solüsyonu (%35) 1000 ml Clark ve Lubs solüsyonuna tamamlandı.

TTL tayini için:

Reaktif 1:

10 mM EDTA (3,8 g) tartılarak 1000 ml 100 mM Tris tamponunda (pH 8,2) çözüldü.

Reaktif 2:

10 mM DTNB çözeltisi: 3,963 DTNB 1000 ml metanolde çözüldü. Reaktif taze olarak hazırlanıp kullanıldı.

2.2 Metod

2.2.1 FRAP tayini

Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü yönteminin prensibi Benzie ve ark.larının geliştirdiği metoda dayanmaktadır [117]. Bu metotta düşük pH'da ferik tripiridiltriiazin kompleksi (Fe⁺³-TPTZ) antioksidanların etkisiyle ferröz kompleksine (Fe⁺²-TPTZ) indirgenir. Oluşan kompleksin 593 nm'de absorbansı ölçülür. Böylece elektron vermenin antioksidanların toplam indirgeme kapasitesiyle lineer olduğu varsayılır.

Deneyin yapılışı: 300 µl çalışma solüsyonuna (10 hacim asetat tamponu + 1 hacim TPTZ çözeltisi + 1 hacim FeCl₃ çözeltisi olacak şekilde günlük hazırlandı). 10 µl numune ve 30 µl H₂O eklendi. Reaksiyon ortamındaki numunenin en son dilüsyonu 1/34'tür. Final absorbans ile reaktif körü arasındaki absorbans değişimi her bir numune için ayrı ayrı hesaplandı.

Otomatik analizör için ölçüm prosedürü:

Numune hacmi: 10 µl numune ve 30 µl H₂O karışımından 20 µl

Reaktif hacmi: 150 µl (10 hacim asetat tamponu + 1 hacim TPTZ çözeltisi + 1 hacim FeCl₃ çözeltisi)

Dalga boyu: 593 nm

Okuma noktası:

Reaksiyon Troloks'la kalibre edildi. Sonuçlar mM Troloks Eq/L olarak verildi.

2.2.2 TAS tayini

Daha stabil ABTS radikali ile total antioksidan kapasite ölçümünün prensibi Erel'in geliştirdiği metoda dayanmaktadır [115]. Redükte ABTS molekülü asidik ortamda hidrojen peroksit ile $ABTS^{\bullet+}$ ye oksitlenir. Asetat tamponunda $ABTS^{\bullet+}$ molekülleri (koyu yeşil renkte) uzun süre stabil kalır. Örnekte var olan antioksidanlar kendi konsantrasyonlarıyla orantılı olarak rengi açılmasını hızlandırırlar. Rengin açılma oranı örneğin total antioksidan kapasitesiyle ters ilişkilidir.

Otomatik analizör için ölçüm prosedürü:

Numune hacmi: 6 µl numune

Reaktif 1 hacmi: 100 µl (400 mM pH 5,8 asetat tamponu)

Reaktif 2 hacmi: 10 µl (30 mM pH3,6 asetat tamponu içerisinde $ABTS^{\bullet+}$)

Dalga boyu: 660 nm

Okuma noktası: İlk absorbans R1 ve R2 karışımından önce son absorbans inkübasyon periodunun sonunda alındı (10 dk).

Reaksiyon Troloks'la kalibre edildi. Sonuçlar mM Troloks Eq/L olarak verildi.

2.2.3 TAR tayini

Erel tarafından geliştirilen bu yöntemde Fe^{+2} – o-dianizidin kompleksi hidrojen peroksitle reaksiyona girer ve OH^{\bullet} radikali oluşur [116]. Bu güçlü radikal düşük pH'ta o-dianizidin moleküllerini sarı-kahverengi renkli dianizidil radikallerine oksitler. Renk oluşumu ileri oksidasyon reaksiyonlarıyla artar. Örnekteki antioksidanlar oksidasyon reaksiyonlarını ve renk oluşumunu baskırlar.

Otomatik analizör için ölçüm prosedürü:

Numune hacmi: 4,5 µl numune

Reaktif 1 hacmi: 180 µl (75 mM pH 1,8 Clark ve Lubs solüsyonu içerisinde 10 mM o-dianizidin ve 45 µM ferröz iyon)

Reaktif 2 hacmi: 10 µl (Clark ve Lubs solüsyonunda 7,5 mM H₂O₂)

Dalga boyu: 450 nm

Okuma noktası: İlk absorbans R1 ve R2 karışımından önce son absorbans reaksiyon trasesi platoya eriştiğinde alındı (10 dk).

Reaksiyon Troloks'la kalibre edildi. Sonuçlar mM Troloks Eq/L olarak verildi.

2.2.4 TTL tayini

Ellman tarafından tanımlanmış ve Hu tarafından modifiye edilmiş yöntem ile ölçülür [128, 129]. Yöntemin prensibi 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) molekülünün serbest tiyoller tarafından redüklenerek disülfid ve bir molekül 5-tiyonitrobenzoik asit oluşturmasına dayanır.

Otomatik analizör için ölçüm prosedürü:

Numune hacmi: 10 µl numune

Reaktif 1 hacmi: 110 µl (100 mM pH 8,2 Tris tamponu içerisinde 10 mM EDTA)

Reaktif 2 hacmi: 10 µl (Metanolde 10 mM DTNB çözeltisi)

Dalga boyu: 412 nm

Okuma noktası: İlk absorbans R1 ve R2 karışımından önce son absorbans reaksiyon trasesi platoya eriştiğinde alındı (10 dk).

Reaksiyon merkaptolanol ile kalibre edildi. Sonuçlar µmol/L olarak verildi.

2.3 Yöntemlerin performans değerlendirmeleri

2.3.1 Doğrusallık (linearite) çalışması

Her bir yöntemde kullanılan kalibratörün seri dilüsyonuyla yapıldı. x eksenine beklenen değerler y eksenine bulunan değerlerin girilmesiyle dağılım grafikleri çizildi. Regresyon analizleri yapıldı. Regresyon denklemleri bulundu. Korelasyon katsayıları, eğim (slope), kesim (intercept) ve standart hataları gösterildi.

2.3.2 Analitik sensitivite çalışması

Sensitivitenin göstergesi olan kalibrasyon eğrilerinin eğimlerine göre yöntemlerin analitik sensitivite tanımlandı.

2.3.3 Geri kazanım (recovery) çalışması

FRAP, TAS ve TAR yöntemlerinin geri kazanımı deneylerinde 2 mmol C vitamini kullanılırken TTL yönteminde 200 µmol GSH kullanıldı. Bazal numune için 1 ml serum havuzuna 0,1 ml distile su eklendi. Test numunesi için 1 ml serum havuzuna 0,1 ml hazırlanan standarttan eklendi. 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 konsantrasyon) x 100

2.3.4 Gözlenebilirlik sınırı çalışması (limit of detection)

0 kalibratör (kör) her bir yöntemde 10 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

2.3.5 Tekrarlanabilirlik çalışması

Tekrarlanabilirlik çalışması için her bir yöntemde 3 farklı düzey belirlendi. Her bir düzey günlük 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 hesaplandı.

2.3.6 İnterferans çalışmaları

2.3.6.1 Hemoliz interferansı

Hemoliz interferansı deneyleri için hemoglobin standardı kullanıldı. Serum havuzuna uygun oranlarda eklenerek hemoglobin konsantrasyonu 20, 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600, 800,1000 mg/dl olan test serumları elde edildi. Her bir yöntem için % interferans değerleri hesaplandı.

2.3.6.2 Bilirubin interferansı

Bilirubin interferansı deneyleri için bilirubin standardı kullanıldı. Serum havuzuna uygun oranlarda eklenerek bilirubin konsantrasyonu 2,5, 5, 7,5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 mg/dl olan test serumları elde edildi. Bazal ve test ölçüm numuneleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

Bazal numune = 0,9 mL serum + 0,1 mL distile su

Test numunesi = 0,9 mL serum + 0,1 mL bilirubin standardı

2.3.6.3 Lipemi interferansı

Lipemi interferansı deneyleri için %20'lik Clinoleic lipid emülsiyonu (Eczacıbaşı, Baxter) kullanıldı. Lipemi kaynaklı türbiditeyi taklit etmek için serum havuzuna on farklı oranda %20'lik lipid emülsiyonu eklendi. Bu amaçla serum havuzu ikiye ayrıldı. Bunlardan birine 1/20 oranında lipid emülsiyonu katıldı. Lipid emülsiyonundan kaynaklanan seyreltmeyi gidermek için serum havuzlarının diğer yarısına aynı oranda (1/20) deiyonize su eklendi. En yüksek lipid emülsiyonu içeren serum havuzunun trigliserit konsantrasyonu ortalama 2000 g/L idi. Bu şekilde hazırlanan toplam 10 serum havuzunda FRAP, TAS, TAR ve TTL testleri çalışıldı.

2.3.7 Yöntemlerin dilüsyon sensitivitesi çalışmaları

Farklı serum dilüsyonlarında yöntemlerin sensitiviteleri değerlendirildi. Beklenen değerlere karşı bulunan değerlerin grafikleri çizildi. Regresyon analizleri yapıldı.

2.3.8 Yöntemlerin karşılaştırılması

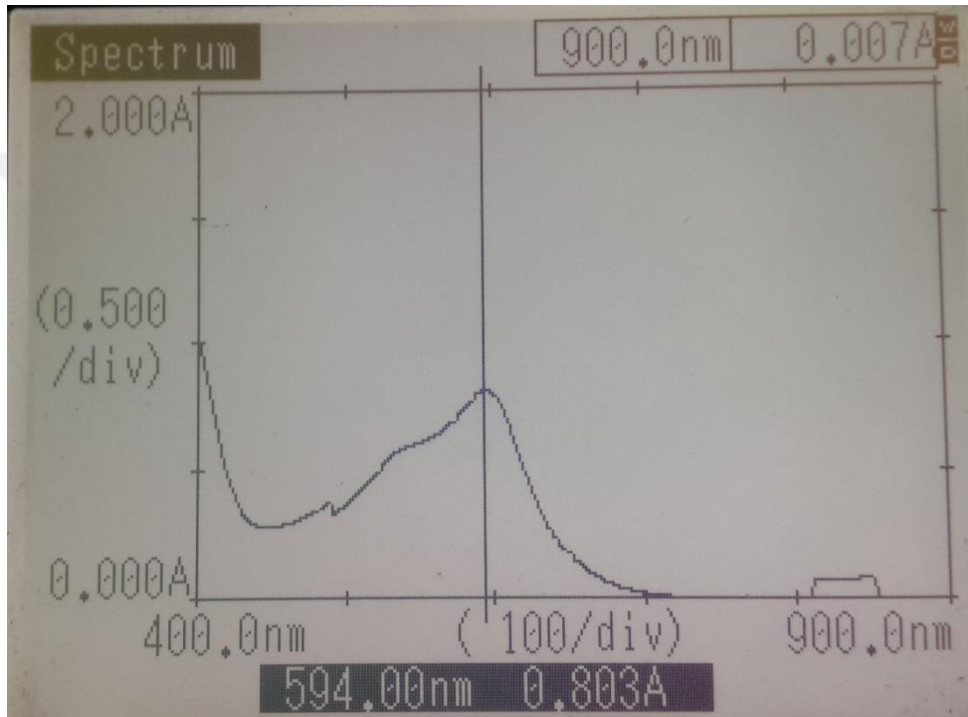
Yöntem karşılaştırma deneyi için BD vacutainer markalı silikajelli 10 mL'lik vakumlu tüplere alınmış venöz kanlar 1600 g'de 10 dk santrifüj edildi ve serumlar çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı. Çalışma günü 100'er numunede FRAP, TAS, TAR ve TTL testleri analiz edildi. Korelasyon analizleri yapıldı ve regresyon grafikleri çizildi.

3. BULGULAR

3.1 Spektral analizler

3.1.1 FRAP yönteminin spektral analizi

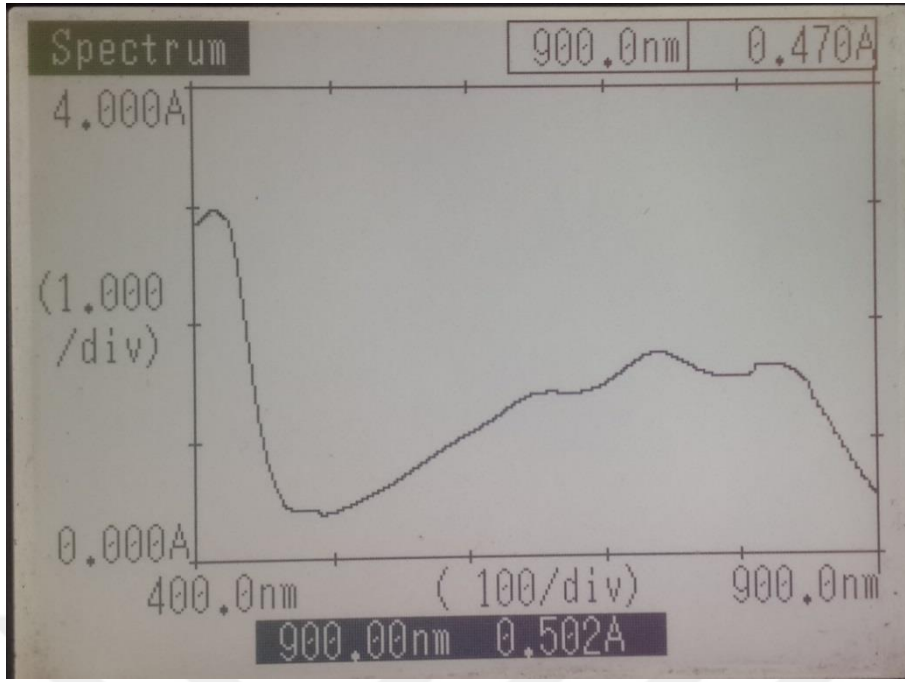
Fe^{+2} -TPTZ kompleksinin spektral absorbansı şekil 3.1.1’de görülmektedir. Maksimal absorbans şekilde görüldüğü gibi 593 nm’dir.



Şekil 3.1.1: Fe^{+2} -TPTZ kompleksinin absorbans spektrumu

3.1.2 TAS yönteminin spektral analizi

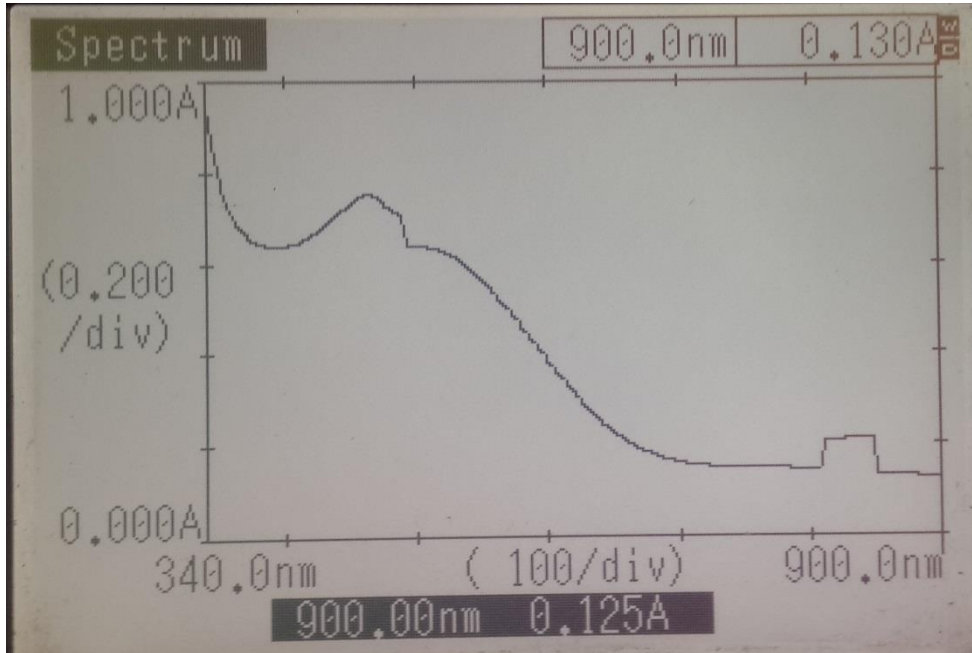
ABTS radikalinin spektral absorbansları şekil 3.1.2’de görüldüğü gibi 420, 660 ve 740 nm’dir.



Şekil 3.1.2: ABTS radikalinin absorbans spektrumu

3.1.3 TAR yönteminin spektral analizi

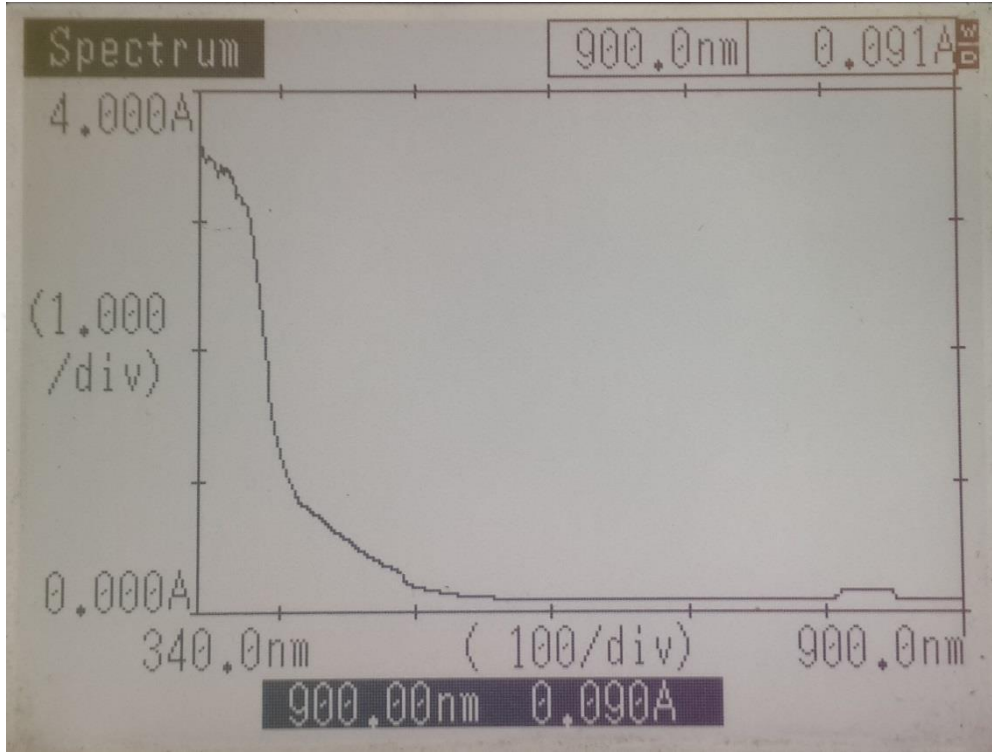
o-dianizidil radikalinin spektral absorbansı şekil 3.1.3'te görülmektedir. Maksimal absorbans şekilde görüldüğü gibi 444 nm'dir.



Şekil 3.1.3: o-dianizidil radikalinin absorbans spektrumu

3.1.4 TTL yönteminin spektral analizi

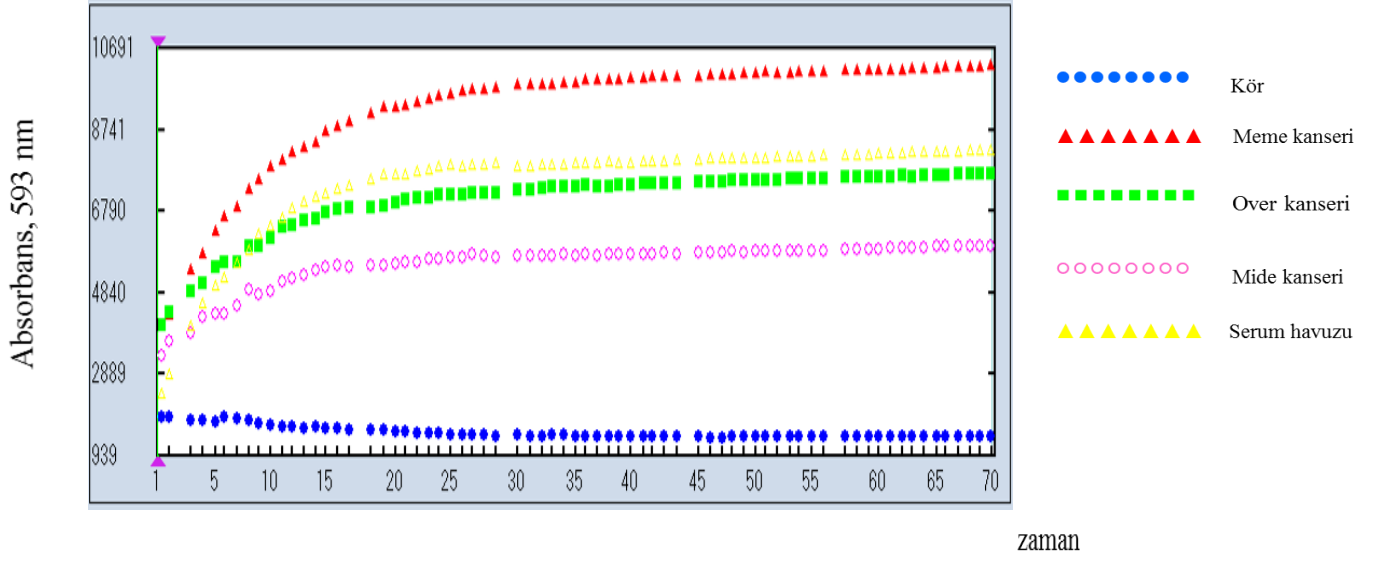
DTNB radikalinin spektral absorbansı şekil 3.1.4'te görülmektedir. Maksimal absorbans şekilde görüldüğü gibi 412 nm'dir.



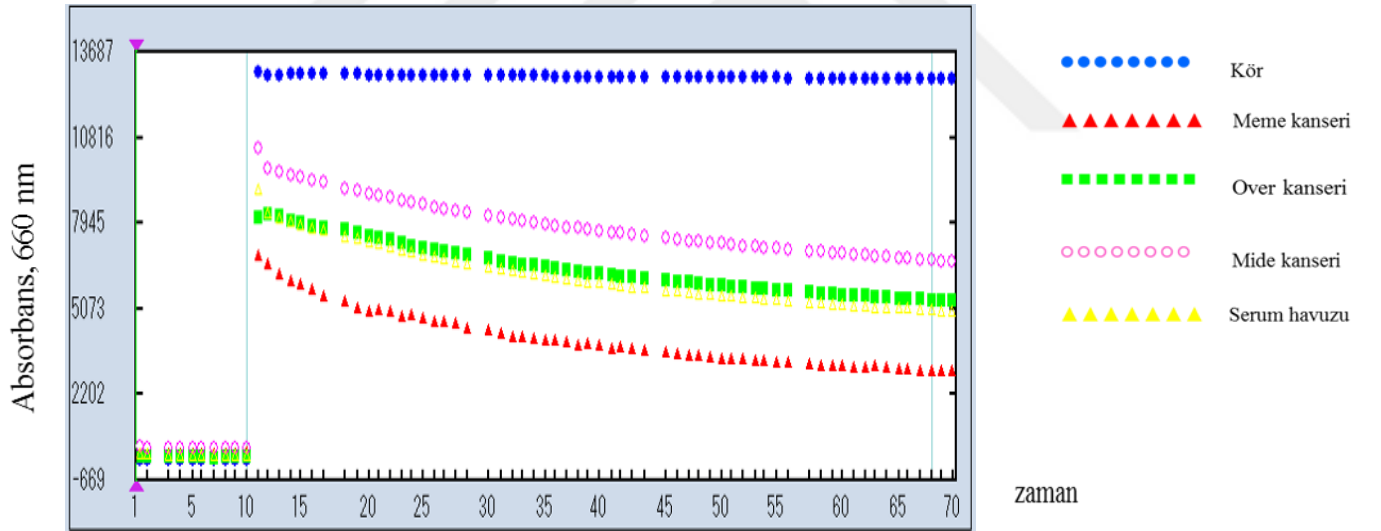
Şekil 3.1.4: DTNB radikalinin absorbans spektrumu

3.2 Çeşitli serum örneklerinin ve körün reaksiyon kinetikleri

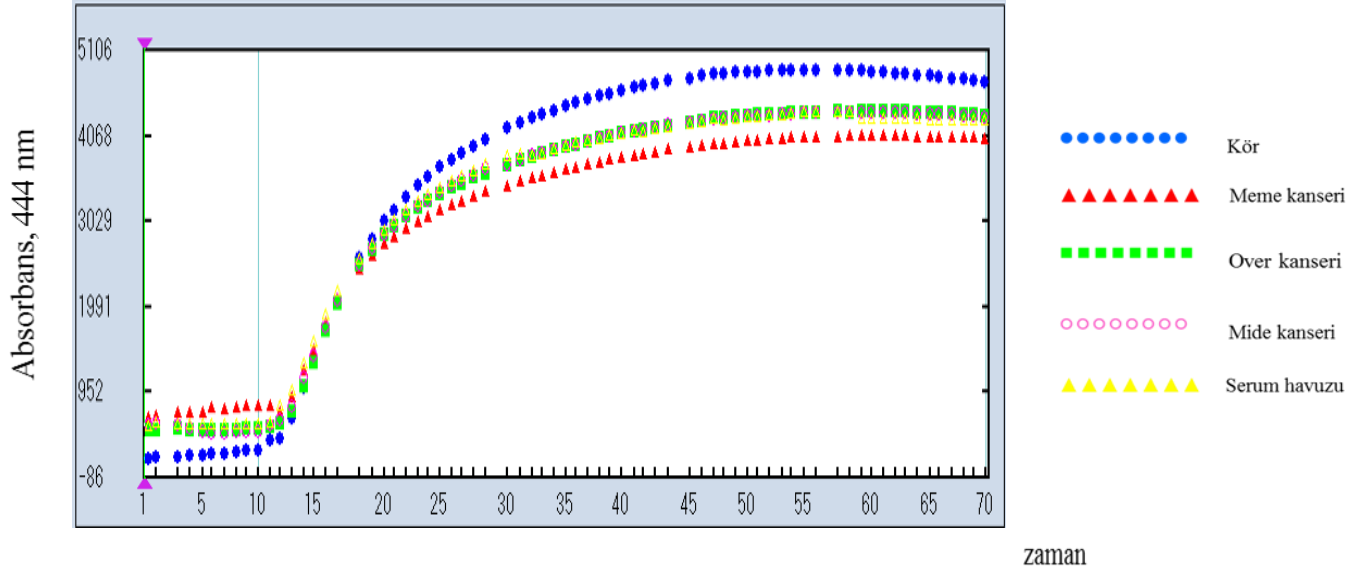
Otomatik analizörde FRAP, TAR, TAS VE TTL yöntemleriyle çalışılan çeşitli hastalıklara ait örnekler, serum havuzu ve körün reaksiyon kinetikleri şekil 3.2.1-8'de görülmektedir. Meme kanserli hastaya ait serum örneğinin antioksidan kapasitesi over ve mide kanserli hastalara ait serumlara göre her dört yöntemde de en yüksek bulundu (Şekil 3.2.1-4). Mide kanserli hastaya ait serum örneğinin antioksidan kapasitesi ise her dört yöntemle de diğer kanserli serum örneklerine kıyasla en düşük ölçüldü (Şekil 3.2.1-4).



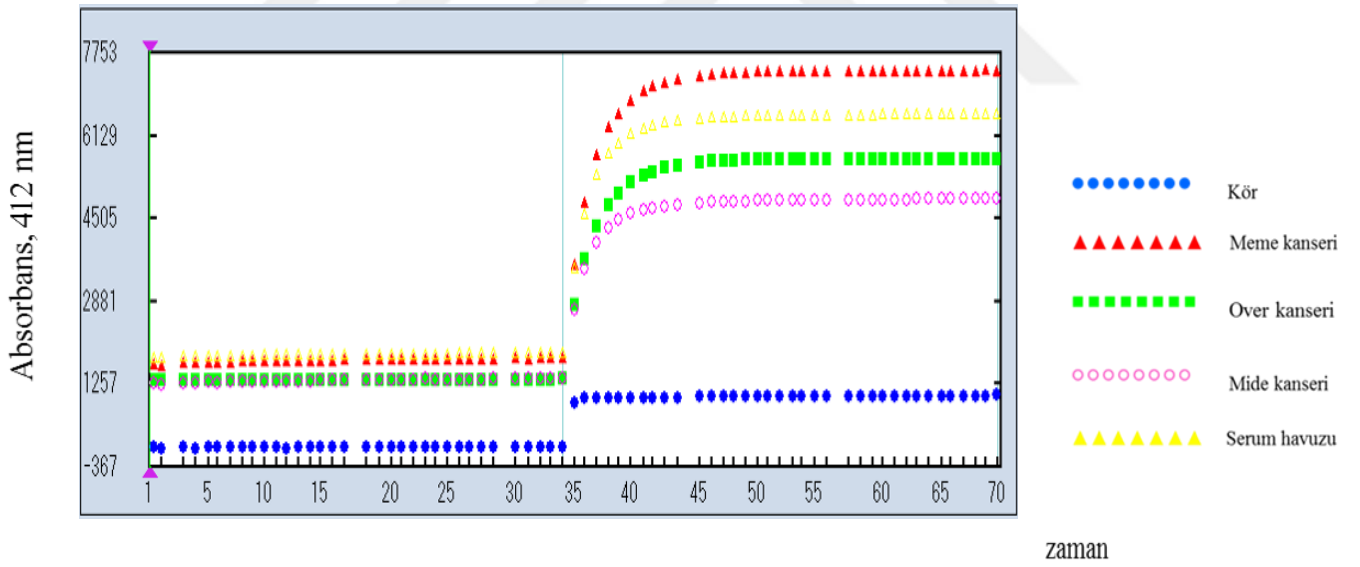
Şekil 3.2.1: FRAP yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri



Şekil 3.2.2: TAS yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri

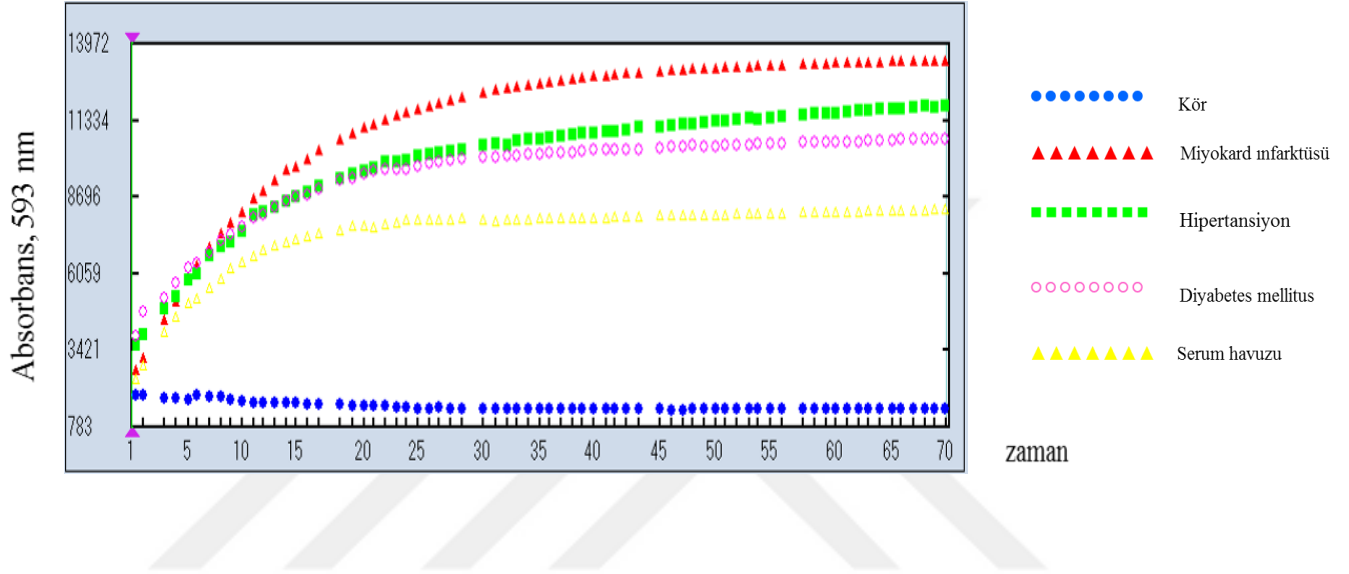


Şekil 3.2.3: TAR yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri

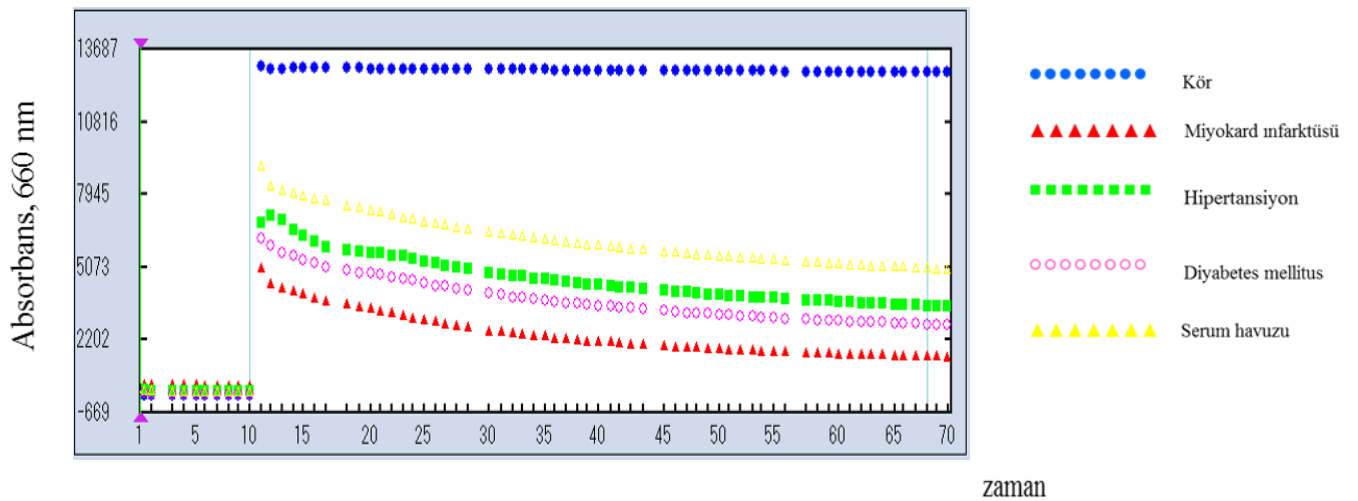


Şekil 3.2.4: TTL yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri

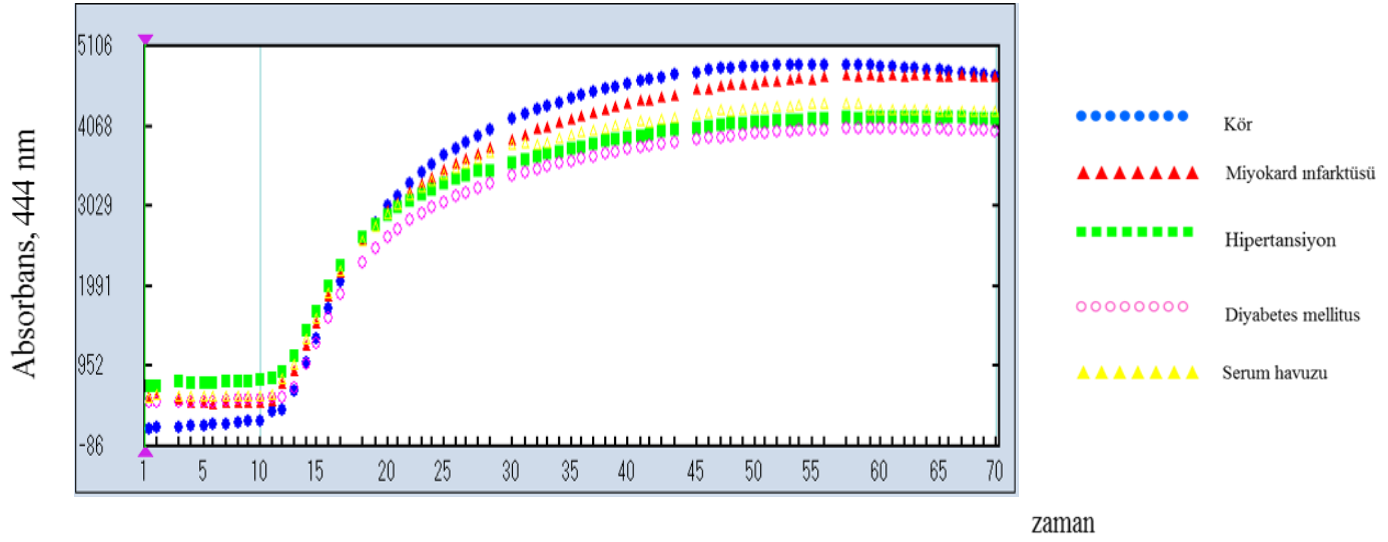
Miyokard infarktüsülü hastaya ait serum örneğinin antioksidan kapasitesi TAS ve FRAP yöntemleriyle diyabetes mellituslu ve hipertansiyonlu hastaların örneklerine göre en yüksek bulunurken TAR ve TTL yöntemleriyle en düşük bulundu (Şekil 3.2.5-8). Ayrıca hipertansiyonlu hastaya ait örneğin antioksidan kapasitesi diğer hasta gruplarıyla karşılaştırıldığında TAR ve TTL yöntemleriyle en yüksek bulunurken, TAS ve FRAP yöntemleriyle orta düzeyde elde edildi (Şekil 3.2.5-8).



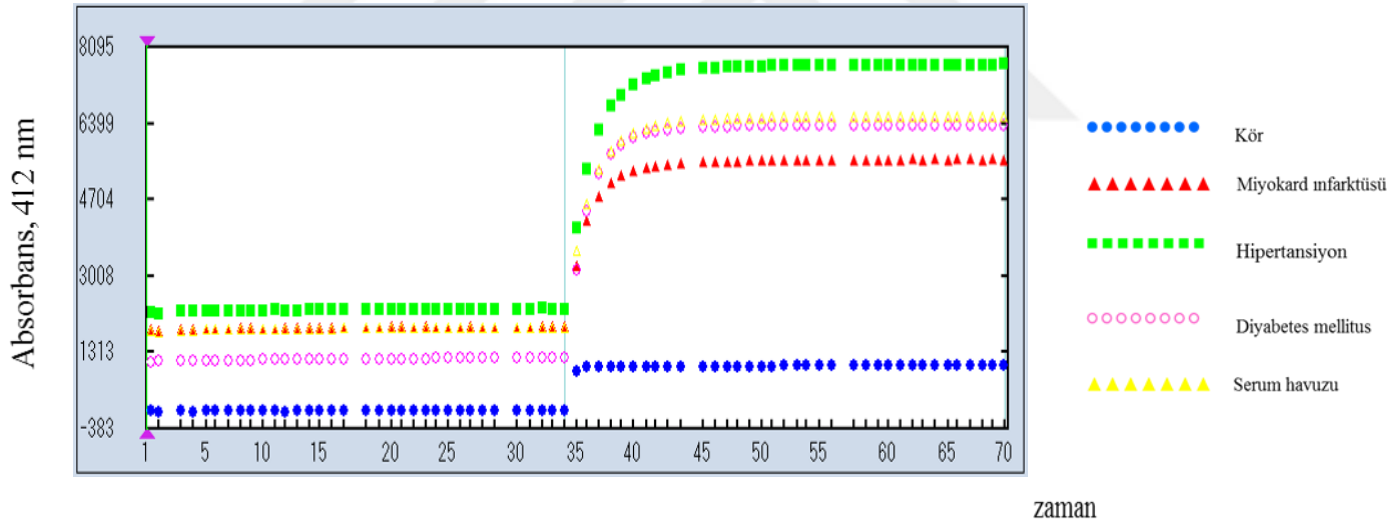
Şekil 3.2.5: FRAP yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri



Şekil 3.2.6: TAS yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri



Şekil 3.2.7: TAR yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri



Şekil 3.2.8: TTL yöntemiyle ölçülen çeşitli serumların reaksiyon kinetikleri

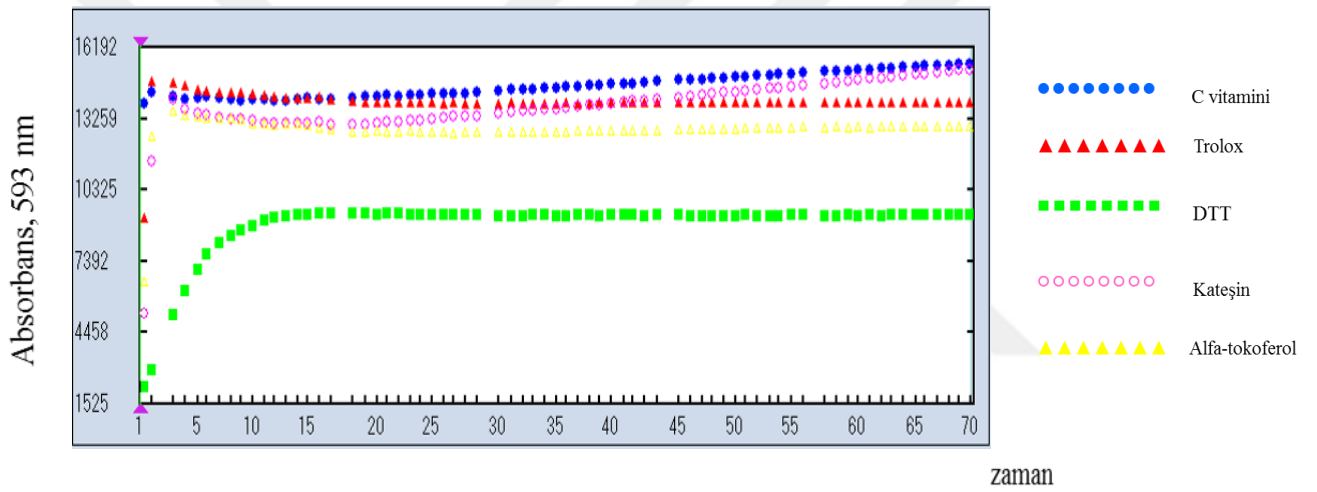
3.3 Saf antioksidanların reaksiyon kinetikleri

Troloks, E ve C vitamini, bilirubin, ürik asit, redükte glutatyon, DTT, gallik asit ve kateşinin reaksiyon kinetikleri belirlendi.

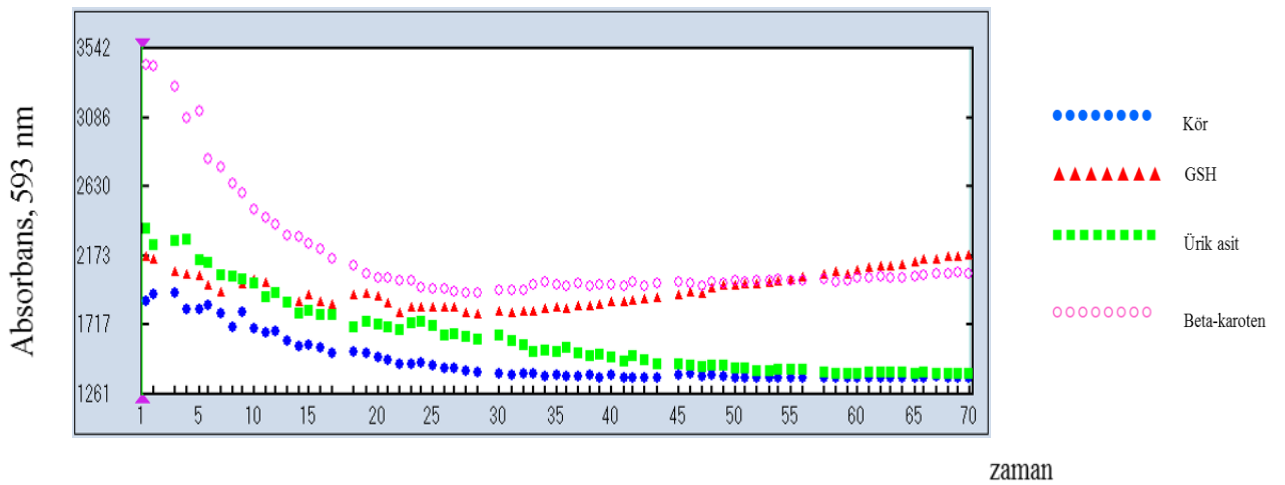
3.3.1 FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

Şekil 3.3.1-A’da görüldüğü gibi C vitamini, troloks, kateşin ve alfa-tokoferolün antioksidan etkileri hızlıydı ve reaksiyonun başlangıcında tamamlandı. Ayrıca DTT’nin antioksidan etkisi diğerlerine göre daha düşüktü ve daha geç tamamlanmıştı. Ürik asitin antioksidan etkisi yok denecek kadar azdı. Beta-karoten ve GSH’nin antioksidan etkileri birbirine yakın olmakla birlikte diğer güçlü antioksidanlara göre daha zayıftı. (Şekil 3.3.1-B). Gallik asit ve bilirubinün antioksidan etkileri ise c vitamini, troloks gibi antioksidanlara göre çok daha fazla bulundu (Şekil 3.3.1-C).

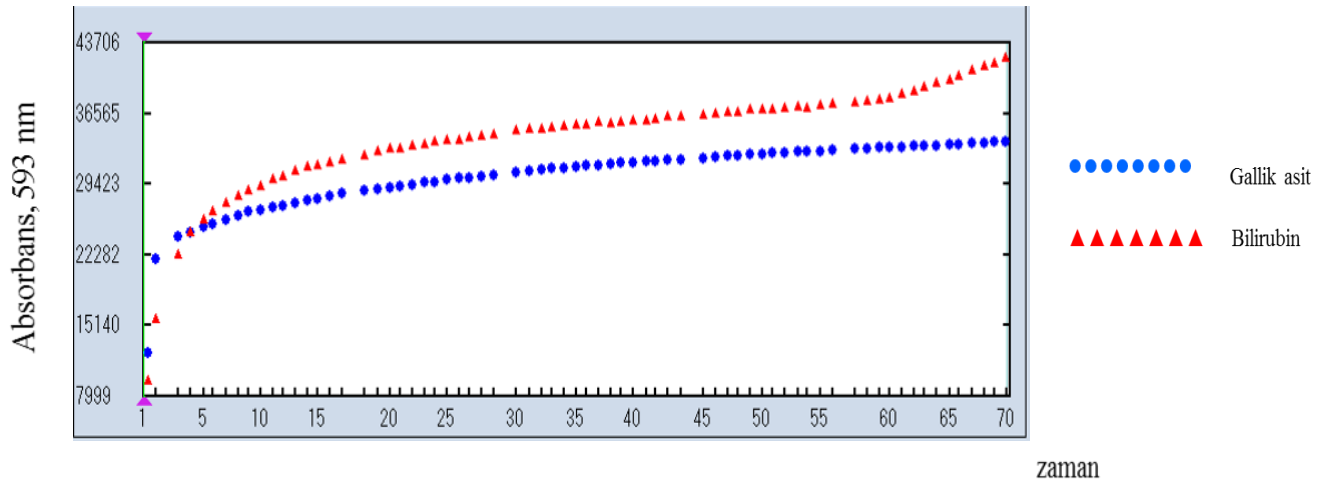
A)



B)



C)

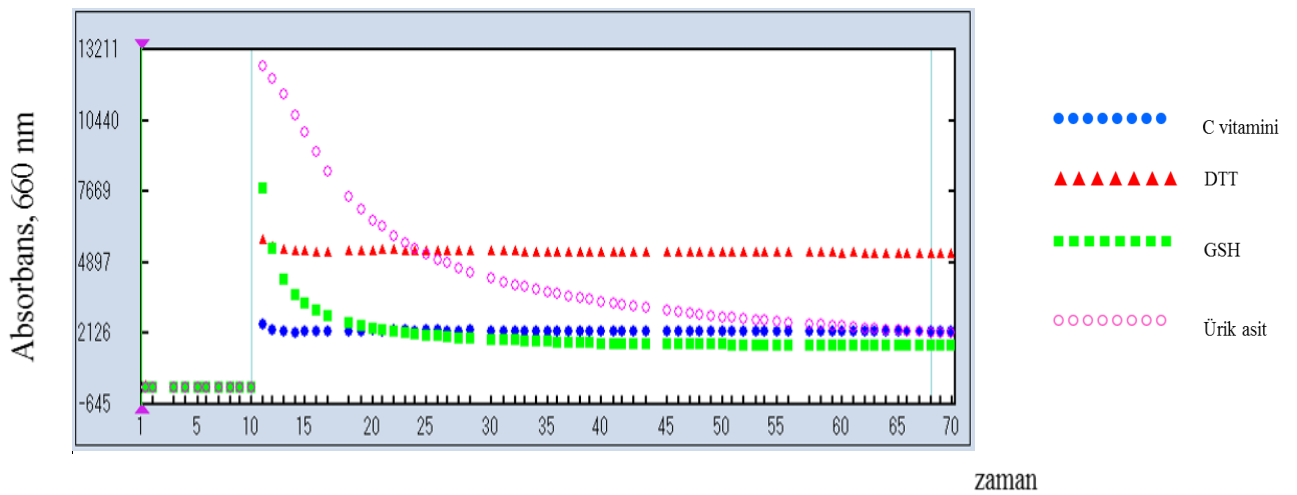


Şekil 3.3.1-A-B-C: FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

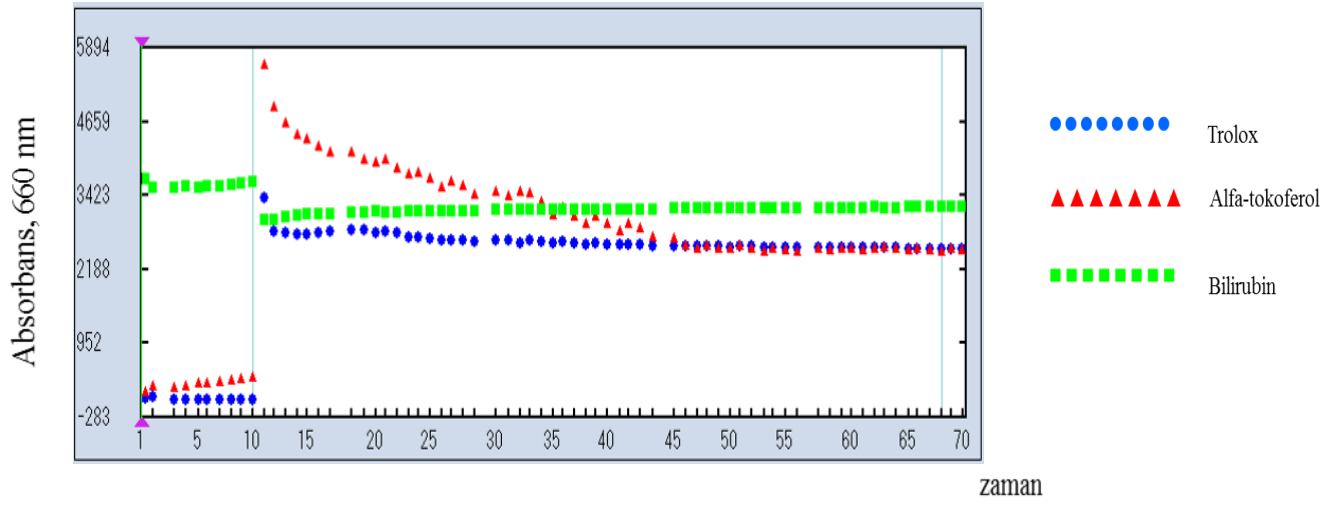
3.3.2 TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

C vitamini, troloks, DTT ve bilirubinün antioksidan etkileri hızlıydı ve reaksiyonun başlangıcında gerçekleşti. Ürik asit, alfa-tokoferol ve GSH'nin etkileri diğer antioksidanlara göre daha geç oluştu. Özellikle ürik asitin etkisi en geç oluştu. Gallik asit ve kateşinin etkileri saniyeler içerisinde reaksiyonun başlangıcında gerçekleşti ve diğer antioksidanlara göre daha güçlülerdi (Şekil 3.3.2-A-B-C).

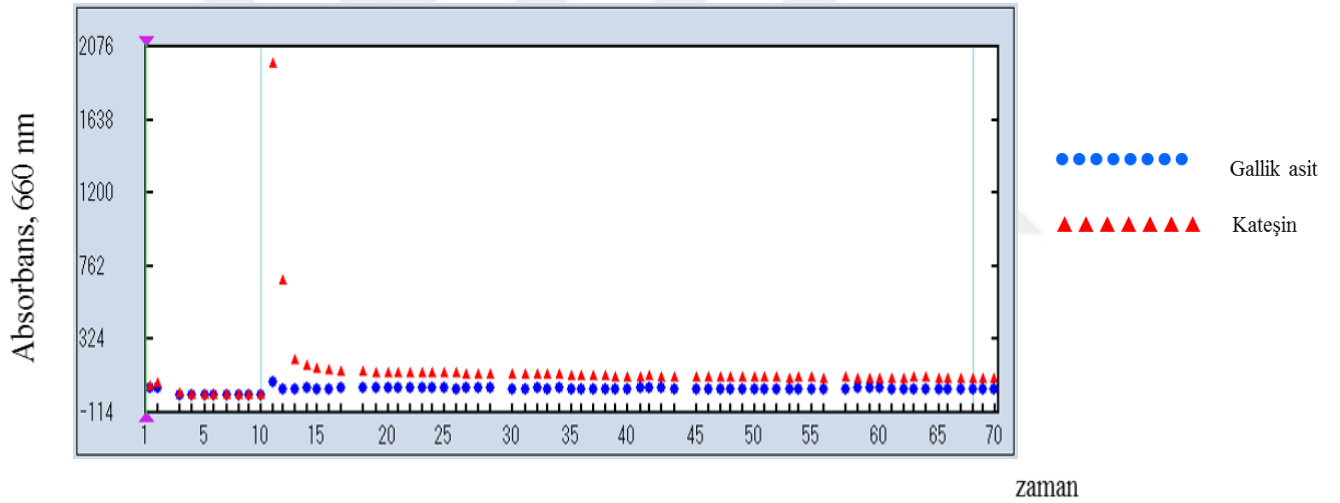
A)



B)



C)

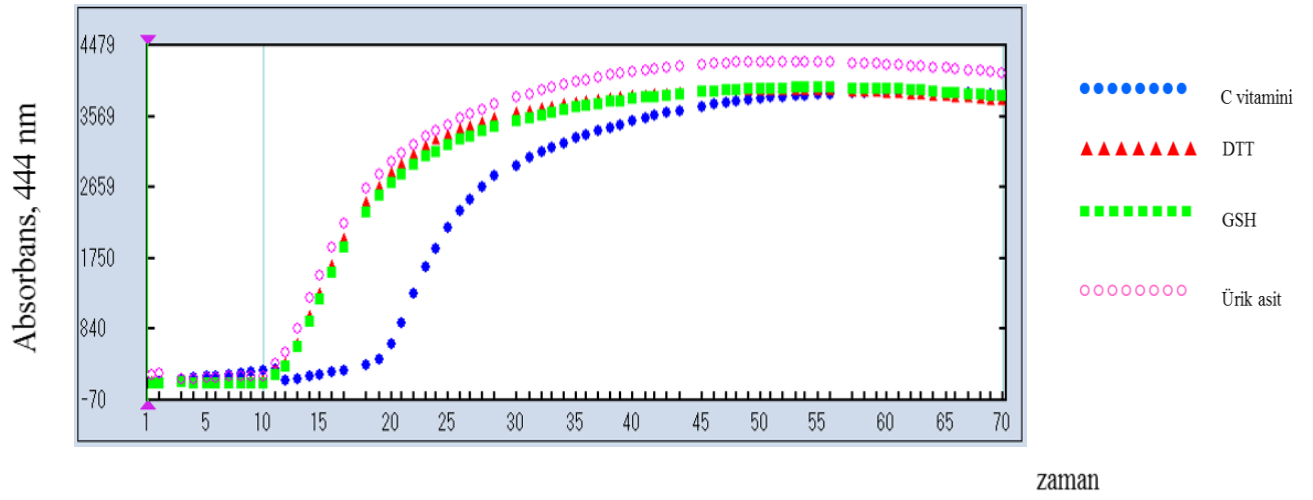


Şekil 3.3.2-A-B-C- : TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

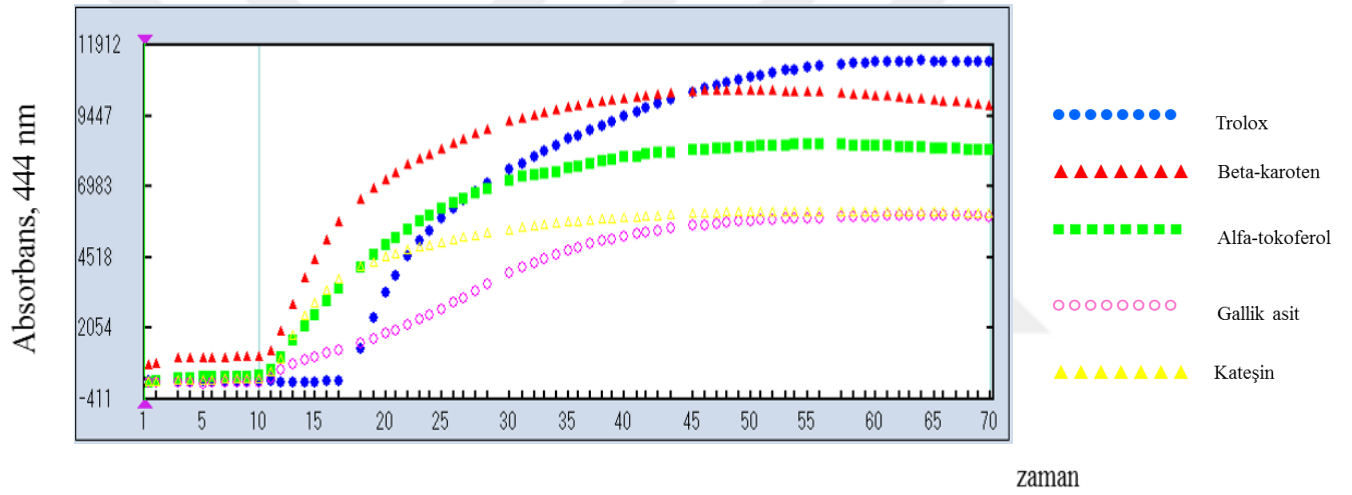
3.3.3 TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

Şekil 3.3.3-A-B-C'de görüldüğü gibi C vitamininin antioksidan etkisi DTT, ürik asit ve GSH'a göre daha yavaştı. Beta-karotenin antioksidan etkisi ise troloks, alfa-tokoferol, gallik asit ve kateşinden daha hızlıydı. Tüm antioksidanlar içerisinde gallik asit en geç etkiye sahip olandı. Bilirubin ise en hızlı ve en yüksek etkiye sahip olan olarak görüldü.

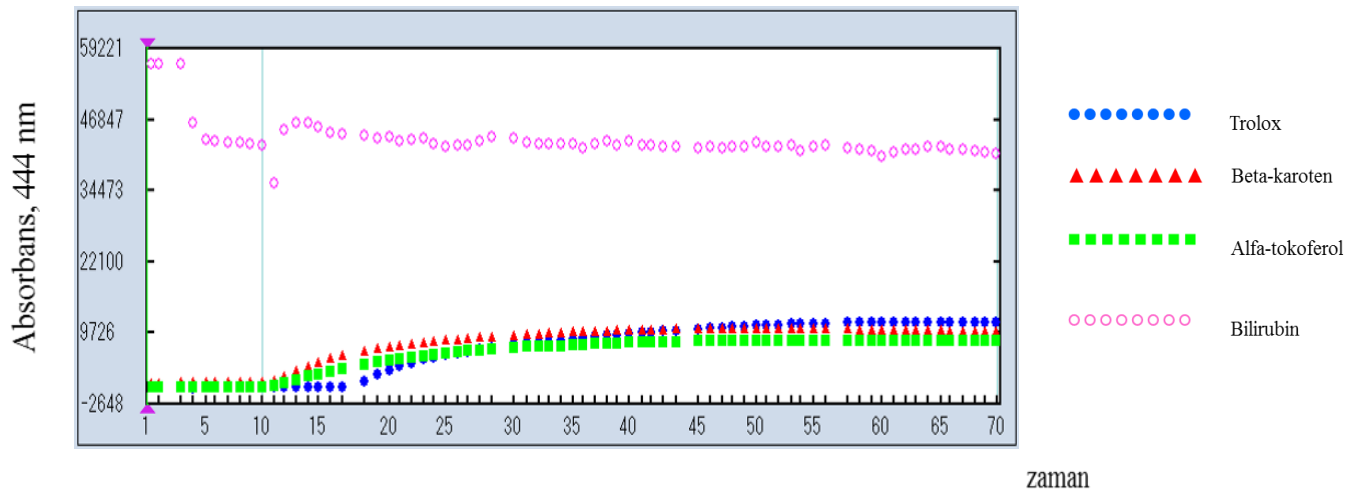
A)



B)



C)

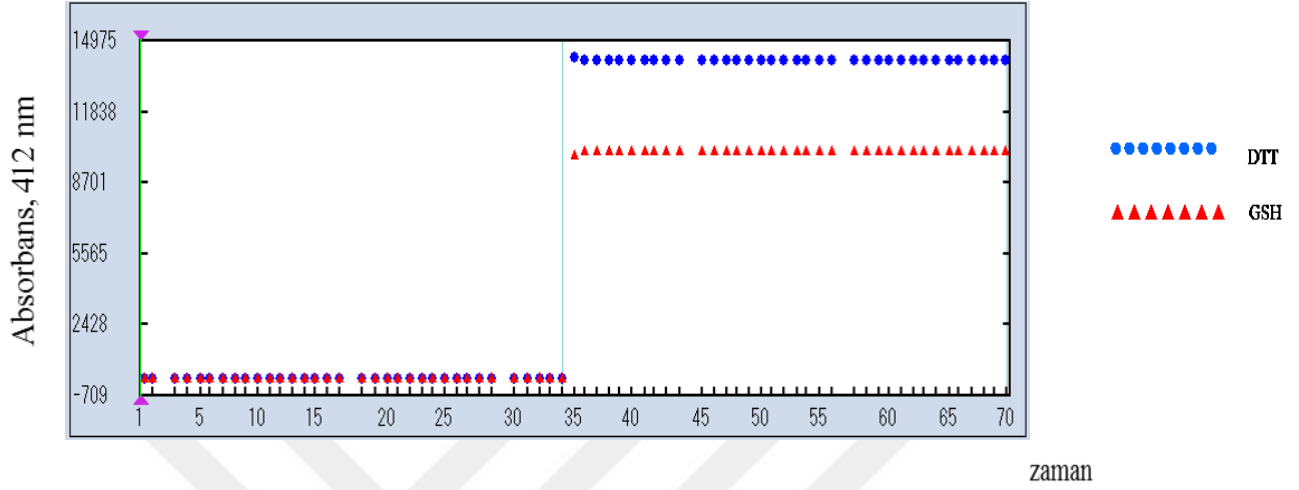


Şekil 3.3.3-A-B-C : TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

3.3.4 TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

DTT, GSH'a göre daha yüksek antioksidan etkiye sahipti (Şekil 3.3.4-A).

A)



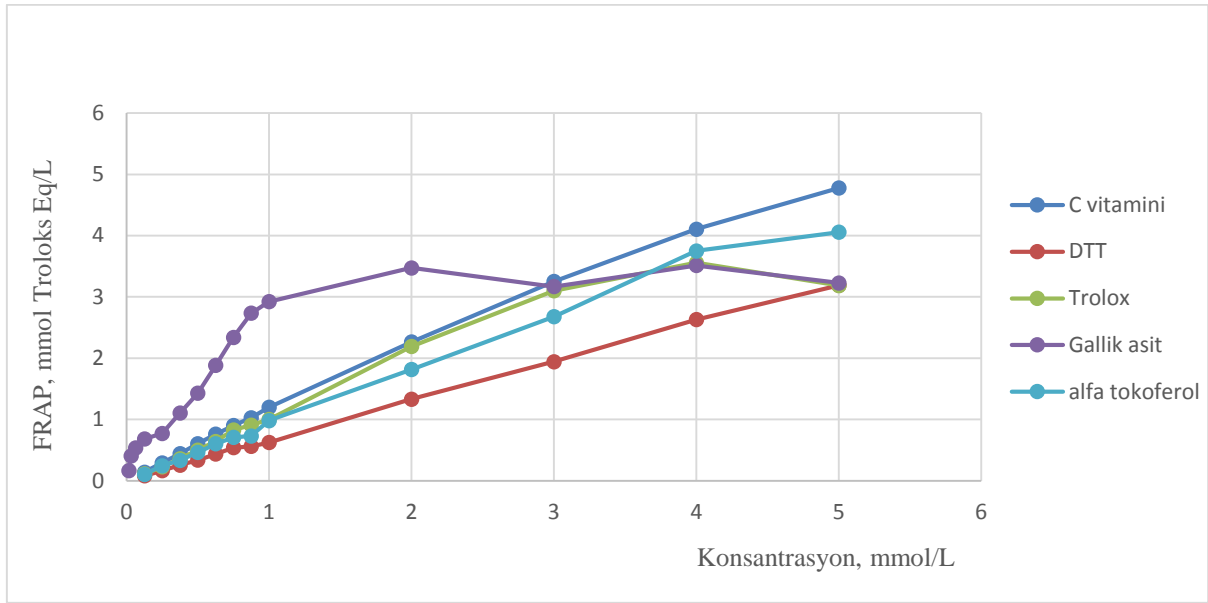
Şekil 3.3.4-A: TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların reaksiyon kinetikleri

3.4 Saf antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

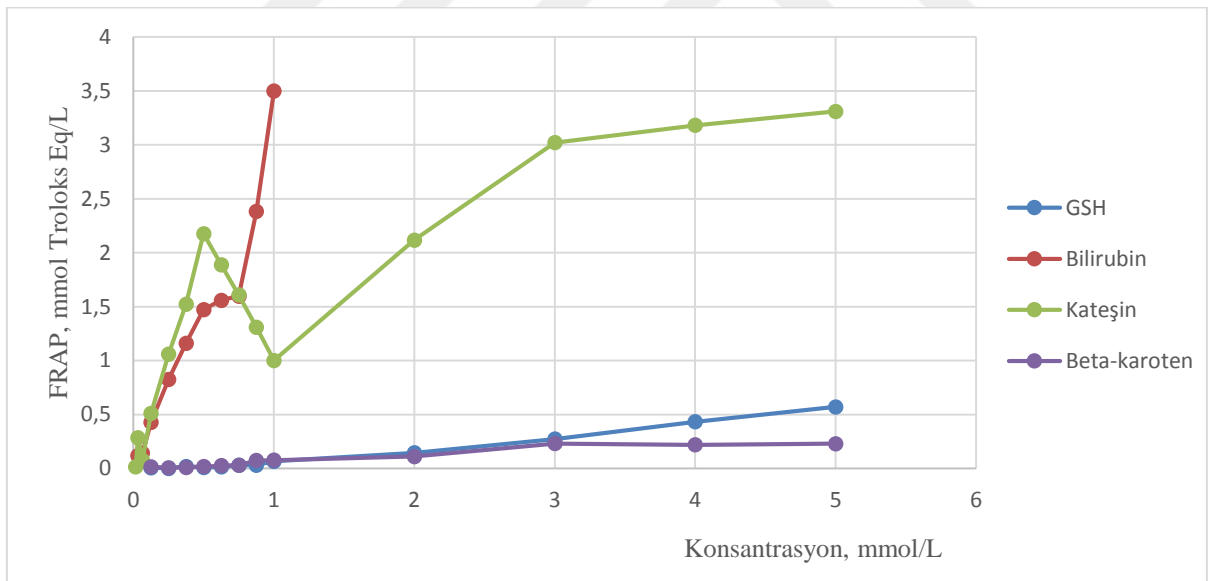
3.4.1 FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

Gallik asit, C vitamini, troloks, alfa-tokoferol ve DTT'ye göre çok hızlı antoksidan etki gösterdi ve 1mmol/L'ye kadar doğrusaldı (şekil 3.4.1-A). Kateşin ve bilirubin de diğer antioksidanlara göre oldukça hızlı etki gösterirken doğrusallıkları her ikisinin de 0,5 mmol/L'ye kadardı (Şekil 3.4.1-B).

A)



B)

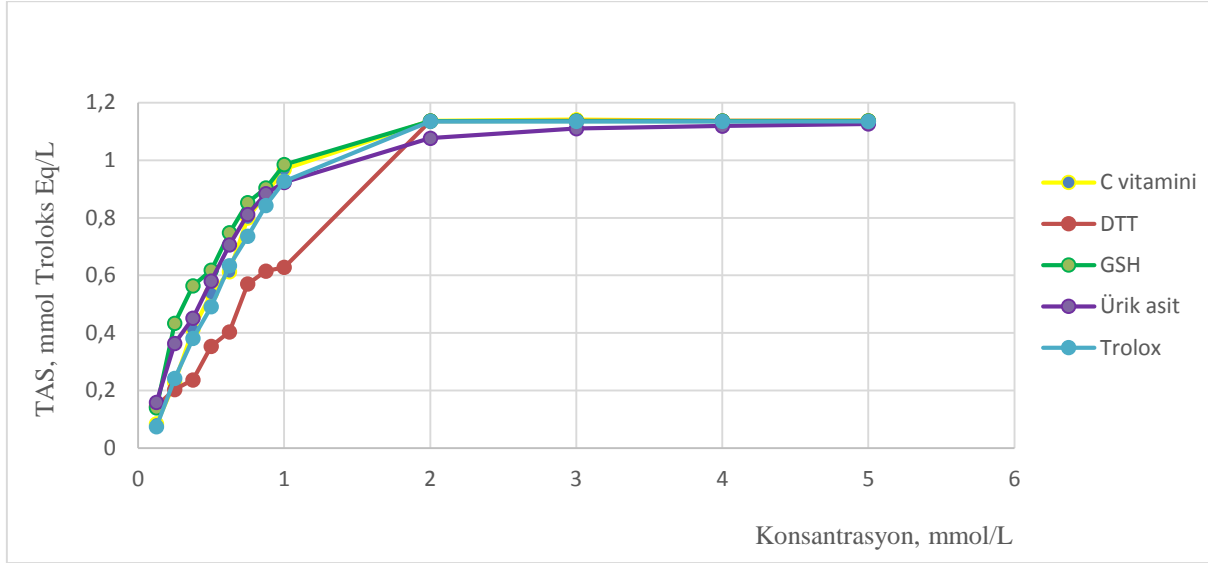


Şekil 3.4.1 A-B: FRAP yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

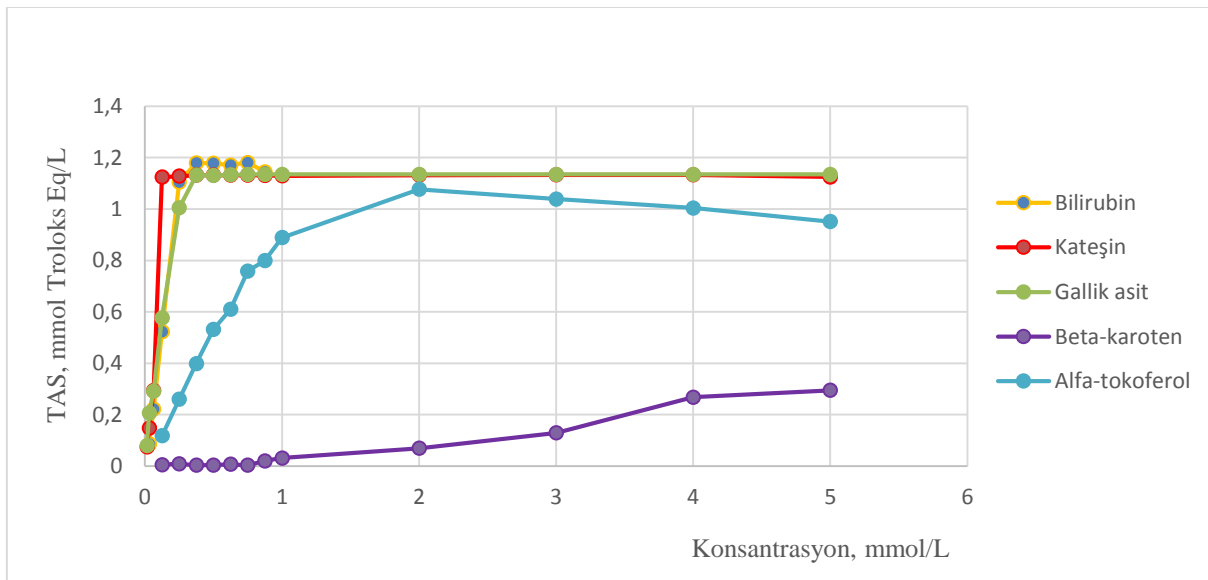
3.4.2 TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

Şekil 3.4.2-A'da görüldüğü gibi C vitamini, DTT, GSH, ürik asit ve troloks 1 mmol/L'ye kadar doğrusaldı. Bilirubin ve gallik asit 0,25 mmol/L'ye kadar, kateşin 0,125 mmol/L'ye kadar, alfa-tokoferol 1mmol/L'ye beta-karoten ise 3 mmol/L'ye kadar doğrusaldı.

A)



B)

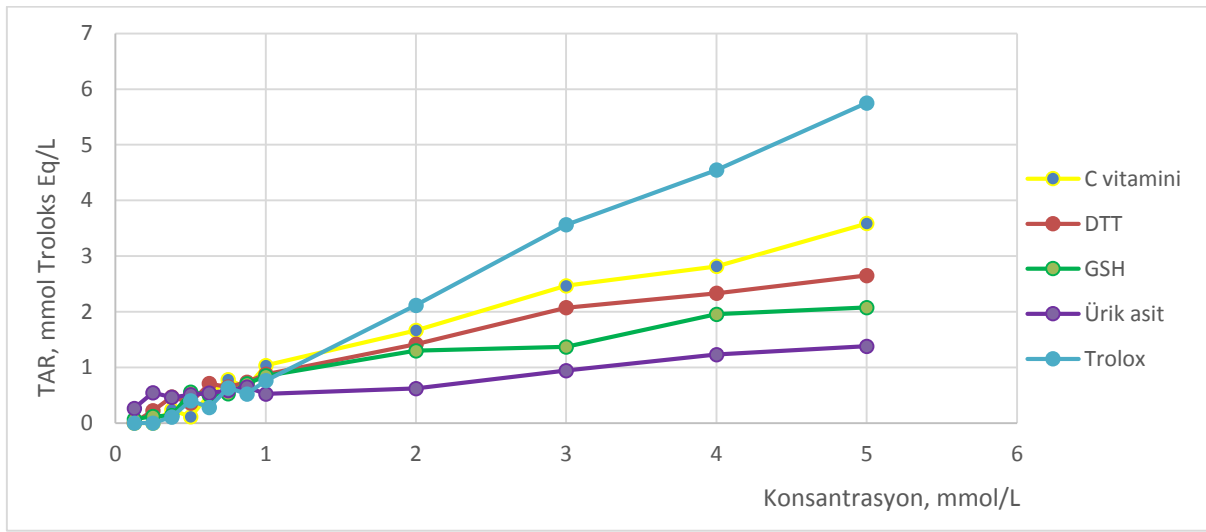


Şekil 3.4.2-A-B: TAS yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

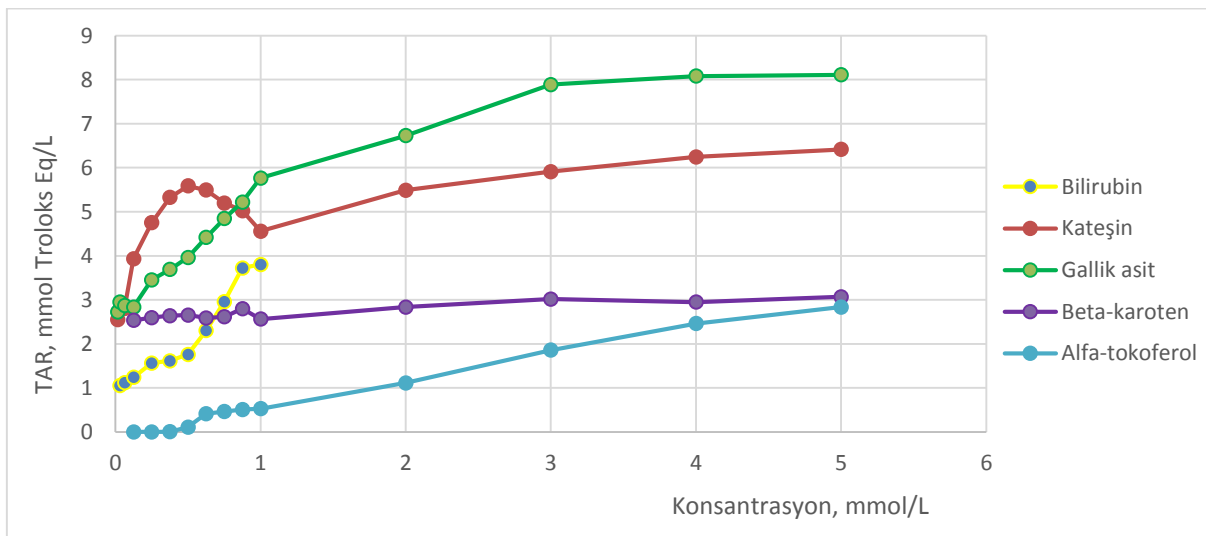
3.4.3 TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

C vitamini, DTT, GSH, ürik asit ve troloks şekil 3.4.3-A’da görüldüğü gibi 5 mmol/L’ye kadar doğrusaldı. Şekil 3.4.3-B’de görüldüğü gibi 1 mmol/L’ye kadar doğrusaldı. Kateşin sigmoidal bir eğri sergilerken, bilirubin 0,5 mmol/L’de kırılma göstererek 0,875 mmol/L’ye kadar doğrusaldı. Alfa-tokoferol ise 1 mmol/L’ye kadar doğrusallık göstermese de 1-4 mmol/L arasında doğrusaldı.

A)



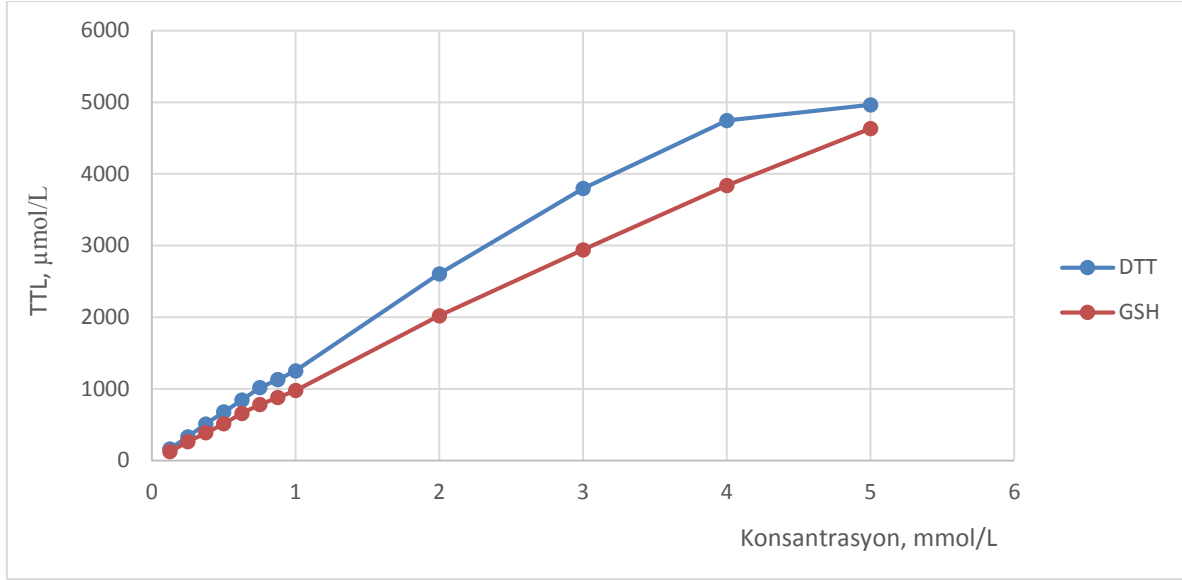
B)



Şekil 3.4.3-A-B: TAR yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

3.4.4 TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

Şekil 3.4.4'te görüldüğü gibi DTT 4 mmol/L'ye kadar GSH ise 5 mmol/L'ye kadar doğrusaldı.



Şekil 3.4.4: TTL yöntemi ile ölçülen endojen ve ekzojen antioksidanların doz bağımlı karakteristikleri

3.4 Yöntemlerin lineariteleri

3.4.1 FRAP yönteminin linearitesi

Troloks solüsyonunun seri dilüsyonuyla yapıldı. FRAP yönteminde linearitenin üst limiti 4 mmol Troloks Eq/L bulundu. Regresyon analizinde r değeri 0,99 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,147$), slope 0,94 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,037$) ve intercept 0,07 ($p = 0,334$, $Sy/x = 0,064$) idi.

3.4.2 TAS yönteminin linearitesi

Troloks solüsyonunun seri dilüsyonuyla yapıldı. TAS yönteminde linearitenin üst limiti 2 mmol Troloks Eq/L bulundu. Regresyon analizinde r değeri 0,99 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,028$), slope 0,97 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,036$) ve intercept -0,004 ($p = 0,863$, $Sy/x = 0,023$)' tü.

3.4.3 TAR yönteminin linearitesi

Troloks solüsyonun seri dilüsyonuyla yapıldı. TAR yönteminde linearitenin üst limiti 5 mmol Troloks Eq/L bulundu. Regresyon analizinde r değeri 0,99 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,136$), slope 1,248 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,025$) ve intercept -0,401 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,055$)' di.

3.4.4 TTL yönteminin linearitesi

DTT solüsyonun seri dilüsyonuyla yapıldı. TTL yönteminde linearitenin üst limiti 4 mmol/L bulundu. Regresyon analizinde r değeri 0,99 ($p < 0,001$, $Sy/x = 79,5$), slope 1203 ($p < 0,001$, $Sy/x = 20,12$) ve intercept 75,21 ($p = 0,057$, $Sy/x = 34,42$)' di.

3.5 Yöntemlerin analitik sensitivitelemi

3.5.1 FRAP yönteminin sensitivitesi

Kalibrasyon eğrisinin slope'si olarak FRAP yönteminin sensitivitesi $8,7 \times 10^{-5}$ Absorbans/ Miktar, $[A \times (mM)^{-1}]$ olarak bulunmuştur.

3.5.2 TAS yönteminin sensitivitesi

Kalibrasyon eğrisinin slope'si olarak TAS yönteminin sensitivitesi $1,05 \times 10^{-5}$ Absorbans/ Miktar, $[A \times (mM)^{-1}]$ olarak bulunmuştur.

3.5.3 TAR yönteminin sensitivitesi

Kalibrasyon eğrisinin slope'si olarak TAR yönteminin sensitivitesi $6,67 \times 10^{-4}$ Absorbans/ Miktar, $[A \times (mM)^{-1}]$ olarak bulunmuştur.

3.5.4 TTL yönteminin sensitivitesi

Kalibrasyon eğrisinin slope'si olarak TTL yönteminin sensitivitesi $1,96 \times 10^{-4}$ Absorbans/ Miktar, $[A \times (\mu M)^{-1}]$ olarak bulunmuştur.

3.6 Yöntemlerin analitik geri kazanımları

3.6.1 FRAP yönteminin analitik geri kazanımı

FRAP yönteminin yüzde geri kazanımı serumlara 2 mmol/L C vitamini eklenerek tespit edildi. Yüzde geri kazanımın ortalaması % 136-141 olarak bulundu.

3.6.2 TAS yönteminin analitik geri kazanımı

TAS yönteminin yüzde geri kazanımı serumlara 2 mmol C vitamini eklenerek tespit edildi. Yüzde geri kazanımın ortalaması % 110-114 olarak bulundu.

3.6.3 TAR yönteminin analitik geri kazanımı

TAR yönteminin yüzde geri kazanımı serumlara 2 mmol C vitamini eklenerek tespit edildi. Yüzde geri kazanımın ortalaması % 128-132 olarak bulundu.

3.6.4 TTL yönteminin analitik geri kazanımı

TTL yönteminin yüzde geri kazanımı serumlara 200 μ mol GSH eklenerek tespit edildi. Yüzde geri kazanımın ortalaması % 97-102 olarak bulundu.

3.7 Yöntemlerin gözlenebilirlik sınırları (limit of detection)

3.7.1 FRAP yönteminin gözlenebilirlik sınırı

Sıfır kalibratör değerlerinin ortalaması + 3 standart sapma şeklinde tanımlanan deteksiyon limiti FRAP yöntemi için 0,070 mmol Troloks Eq/L'dir.

3.7.2 TAS yönteminin gözlenebilirlik sınırı

Sıfır kalibratör değerlerinin ortalaması + 3 standart sapma şeklinde tanımlanan deteksiyon limiti TAS yöntemi için 0,091 mmol Troloks Eq/L'dir.

3.7.3 TAR yönteminin gözlenebilirlik sınırı

Sıfır kalibratör değerlerinin ortalaması + 3 standart sapma şeklinde tanımlanan deteksiyon limiti TAR yöntemi için 0,184 mmol Troloks Eq/L'dir.

3.7.4 TTL yönteminin gözlenebilirlik sınırı

Sıfır kalibratör değerlerinin ortalaması + 3 standart sapma şeklinde tanımlanan deteksiyon limiti TTL yöntemi için 3,92 µmol/L'dir.

3.8 Yöntemlerin tekrarlanabilirlikleri

3.8.1 FRAP yönteminin tekrarlanabilirliği

A) FRAP Düzey 1

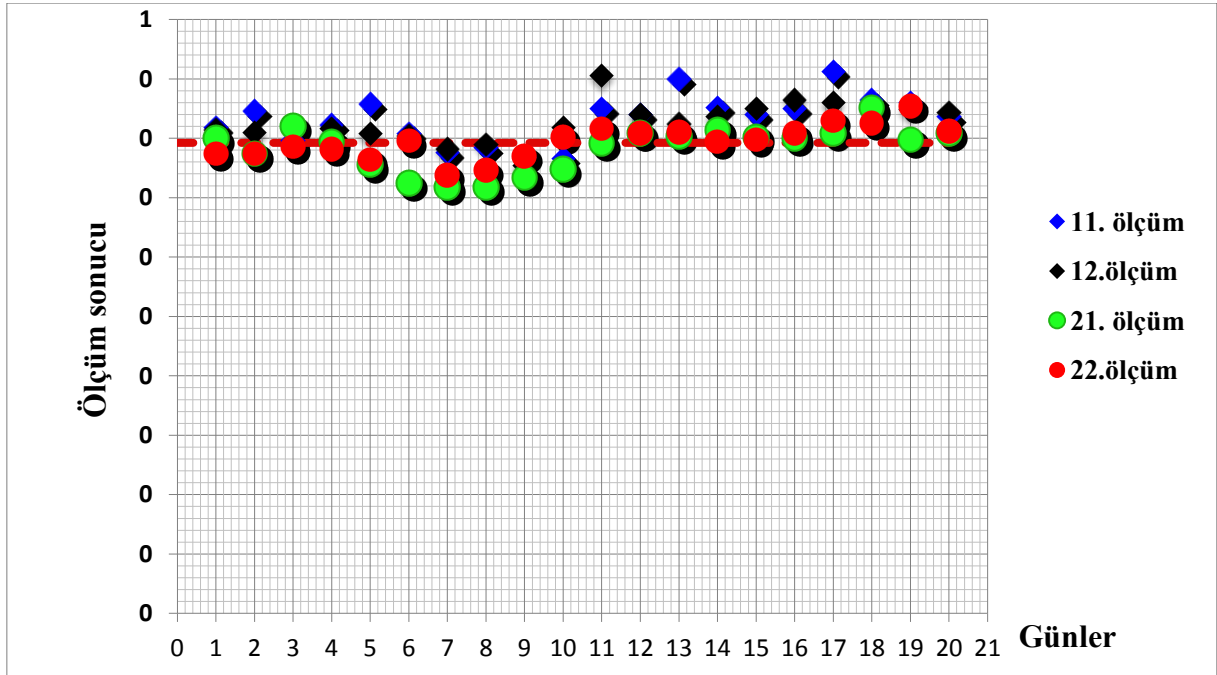
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 1. düzeyin FRAP yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.1-A1 ve şekil 3.8.1-A'da görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 2,74, günler arası 2,16, çalışmalar arası 3,53 ve toplam CV'si 4,96 olarak bulundu (Tablo 3.8.1-A2).

Tablo 3.8.1-A1:1. düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12.ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22.ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,409	0,407	0,408	0,4	0,387	0,3935	0,397125
2	0,423	0,405	0,414	0,387	0,387	0,387	0,387
3	0,398	0,409	0,4035	0,41	0,393	0,4015	0,39725
4	0,411	0,408	0,4095	0,397	0,391	0,394	0,3925
5	0,429	0,404	0,4165	0,378	0,382	0,38	0,381
6	0,404	0,402	0,403	0,362	0,398	0,38	0,389
7	0,388	0,391	0,3895	0,359	0,369	0,364	0,3665
8	0,392	0,395	0,3935	0,359	0,373	0,366	0,3695
9	0,384	0,377	0,3805	0,367	0,385	0,376	0,3805
10	0,383	0,409	0,396	0,374	0,401	0,3875	0,39425
11	0,425	0,453	0,439	0,396	0,408	0,402	0,405
12	0,42	0,42	0,42	0,404	0,404	0,404	0,404
13	0,45	0,412	0,431	0,402	0,405	0,4035	0,40425
14	0,426	0,418	0,422	0,407	0,397	0,402	0,3995
15	0,42	0,425	0,4225	0,401	0,399	0,4	0,3995
16	0,425	0,432	0,4285	0,4	0,404	0,402	0,403
17	0,456	0,43	0,443	0,404	0,415	0,4095	0,41225
18	0,432	0,427	0,4295	0,426	0,413	0,4195	0,41625
19	0,43	0,424	0,427	0,399	0,427	0,413	0,42
20	0,418	0,422	0,42	0,404	0,406	0,405	0,4055
Ortalama	0,416	0,414	0,415	0,392	0,397	0,395	0,396
SS	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,01
%CV	4,85	4,05	4,04	4,82	3,58	3,83	3,58

Tablo 3.8.1-A2: FRAP yönteminin 1.düzyen CV sonuçları

Çalışma içi	2,74
Günler arası %CV	2,16
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	3,53
Toplam %CV	4,96



Şekil 3.8.1-A: 1.düzyen FRAP yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

B) FRAP Düzey 2

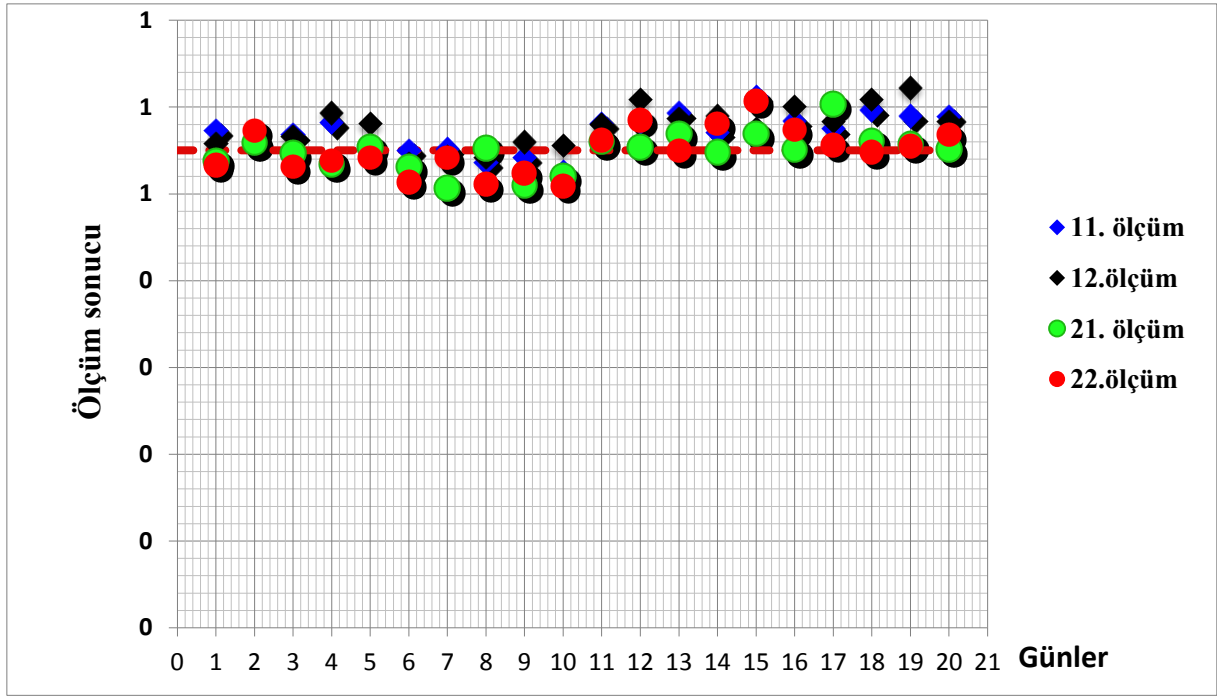
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 2. düzeyin FRAP yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.1-B1 ve şekil 3.8.1-B'de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 2,71, günler arası 3,21, çalışmalar arası 3,14 ve toplam CV'si 5,25 olarak bulundu (Tablo 3.8.1-B2).

Tablo 3.8.1-B1: 2. düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,573	0,558	0,5655	0,538	0,533	0,5355	0,543
2	0,558	0,56	0,559	0,559	0,573	0,566	0,5695
3	0,568	0,566	0,567	0,547	0,531	0,539	0,535
4	0,582	0,593	0,5875	0,534	0,538	0,536	0,537
5	0,557	0,581	0,569	0,554	0,542	0,548	0,545
6	0,55	0,535	0,5425	0,531	0,514	0,5225	0,51825
7	0,552	0,543	0,5475	0,507	0,542	0,5245	0,53325
8	0,536	0,542	0,539	0,553	0,511	0,532	0,5215
9	0,542	0,56	0,551	0,51	0,524	0,517	0,5205
10	0,526	0,556	0,541	0,52	0,509	0,5145	0,51175
11	0,581	0,58	0,5805	0,56	0,562	0,561	0,5615
12	0,582	0,609	0,5955	0,554	0,585	0,5695	0,57725
13	0,593	0,587	0,59	0,569	0,55	0,5595	0,55475
14	0,571	0,59	0,5805	0,548	0,581	0,5645	0,57275
15	0,612	0,575	0,5935	0,569	0,607	0,588	0,5975
16	0,584	0,601	0,5925	0,551	0,574	0,5625	0,56825
17	0,575	0,583	0,579	0,603	0,556	0,5795	0,56775
18	0,597	0,609	0,603	0,561	0,548	0,5545	0,55125
19	0,59	0,622	0,606	0,557	0,555	0,556	0,5555
20	0,589	0,583	0,586	0,552	0,568	0,56	0,564
Ortalama	0,571	0,577	0,574	0,549	0,550	0,550	0,550
SS	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,02	0,02
%CV	3,88	4,16	3,72	3,97	4,79	3,80	4,13

Tablo 3.8.1-B2: FRAP yönteminin 2.düzey CV sonuçları

Çalışma içi	2,71
Günler arası %CV	3,21
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	3,14
Toplam %CV	5,25



Şekil 3.8.1-B: 2.düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

C) FRAP Düzey 3

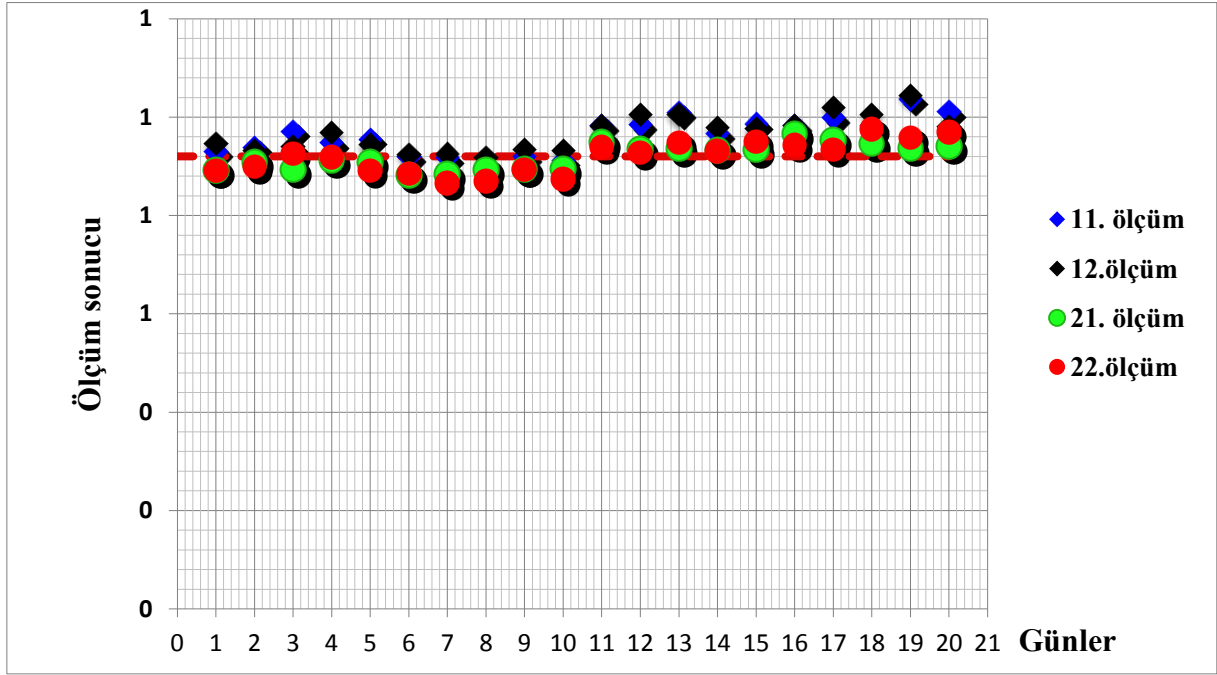
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 3. düzeyin FRAP yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.1-C1 ve şekil 3.8.1-C'de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 1,33, günler arası 2,05, çalışmalar arası 3,57 ve toplam CV'si 4,33 olarak bulundu (Tablo 3.8.1-C2).

Tablo 3.8.1-C1: 3. düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,93	0,946	0,938	0,892	0,891	0,8915	0,903125
2	0,939	0,932	0,9355	0,909	0,899	0,904	0,9015
3	0,971	0,941	0,956	0,893	0,926	0,9095	0,91775
4	0,948	0,969	0,9585	0,912	0,919	0,9155	0,91725
5	0,955	0,944	0,9495	0,909	0,891	0,9	0,8955
6	0,92	0,924	0,922	0,882	0,885	0,8835	0,88425
7	0,917	0,925	0,921	0,884	0,866	0,875	0,8705
8	0,9	0,918	0,909	0,893	0,87	0,8815	0,87575
9	0,92	0,935	0,9275	0,894	0,893	0,8935	0,89325
10	0,912	0,932	0,922	0,895	0,874	0,8845	0,87925
11	0,983	0,982	0,9825	0,949	0,939	0,944	0,9415
12	0,985	1,005	0,995	0,935	0,928	0,9315	0,92975
13	1,009	1,005	1,007	0,936	0,948	0,942	0,945
14	0,967	0,979	0,973	0,933	0,93	0,9315	0,93075
15	0,986	0,977	0,9815	0,934	0,95	0,942	0,946
16	0,983	0,984	0,9835	0,967	0,943	0,955	0,949
17	0,999	1,02	1,0095	0,953	0,934	0,9435	0,93875
18	0,983	1,006	0,9945	0,946	0,976	0,961	0,9685
19	1,037	1,044	1,0405	0,937	0,958	0,9475	0,95275
20	1,011	0,981	0,996	0,941	0,97	0,9555	0,96275
Ortalama	0,963	0,967	0,965	0,920	0,920	0,920	0,920
SS	0,04	0,04	0,04	0,03	0,03	0,03	0,03
%CV	3,97	3,77	3,78	2,84	3,67	3,12	3,32

Tablo 3.8.1-C2: FRAP yönteminin 3.düzey CV sonuçları

Çalışma içi	1,33
Günler arası %CV	2,05
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	3,57
Toplam %CV	4,33



Şekil 3.8.1-C: 3.düzeyin FRAP yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

3.8.2 TAS yönteminin tekrarlanabilirliği

A) TAS Düzey 1

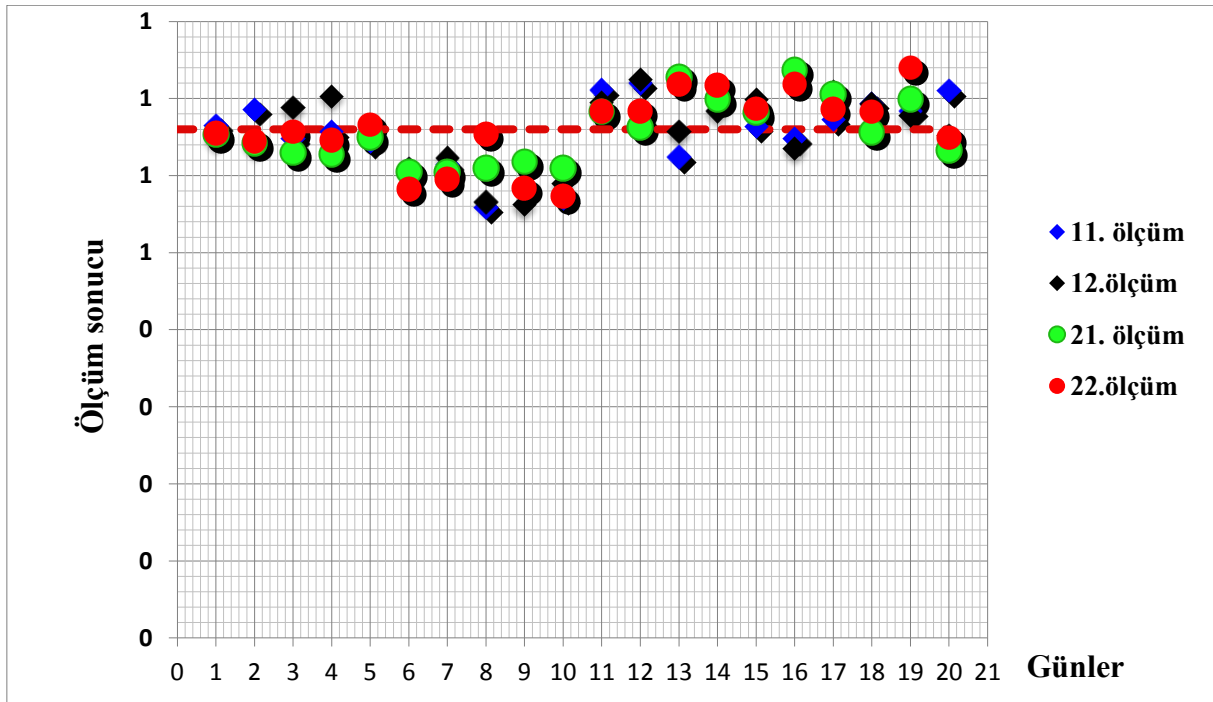
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 1. düzeyin TAS yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.2-A1 ve şekil 3.8.2-A'da görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 2,88, günler arası 6,24, çalışmalar arası 3,58 ve toplam CV'si 7,74 olarak bulundu (Tablo 3.8.2-A2).

Tablo 3.8.2-A1: 1. düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,665	0,648	0,6565	0,653	0,655	0,654	0,654625
2	0,686	0,639	0,6625	0,642	0,645	0,6435	0,64425
3	0,648	0,688	0,668	0,63	0,657	0,6435	0,65025
4	0,657	0,703	0,68	0,628	0,646	0,637	0,6415
5	0,644	0,665	0,6545	0,65	0,666	0,658	0,662
6	0,607	0,609	0,608	0,605	0,582	0,5935	0,58775
7	0,614	0,623	0,6185	0,604	0,595	0,5995	0,59725
8	0,559	0,566	0,5625	0,61	0,654	0,632	0,643
9	0,618	0,562	0,59	0,618	0,584	0,601	0,5925
10	0,571	0,59	0,5805	0,61	0,573	0,5915	0,58225
11	0,711	0,695	0,703	0,683	0,684	0,6835	0,68375
12	0,72	0,725	0,7225	0,663	0,684	0,6735	0,67875
13	0,624	0,657	0,6405	0,728	0,719	0,7235	0,72125
14	0,705	0,684	0,6945	0,699	0,717	0,708	0,7125
15	0,664	0,699	0,6815	0,682	0,687	0,6845	0,68575
16	0,648	0,635	0,6415	0,737	0,719	0,728	0,7235
17	0,673	0,709	0,691	0,706	0,686	0,696	0,691
18	0,694	0,693	0,6935	0,656	0,683	0,6695	0,67625
19	0,684	0,678	0,681	0,699	0,74	0,7195	0,72975
20	0,71	0,652	0,681	0,633	0,649	0,641	0,645
Ortalama	0,655	0,656	0,656	0,657	0,661	0,659	0,660
SS	0,05	0,05	0,04	0,04	0,05	0,04	0,05
%CV	6,96	7,19	6,67	6,31	7,27	6,58	6,88

Tablo 3.8.2-A2: TAS yönteminin 1.düzye CV sonuçları

Çalışma içi	2,88
Günler arası %CV	6,24
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	3,58
Toplam %CV	7,74



Şekil 3.8.2-A: 1.düzye TAS yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

B) TAS Düzey 2

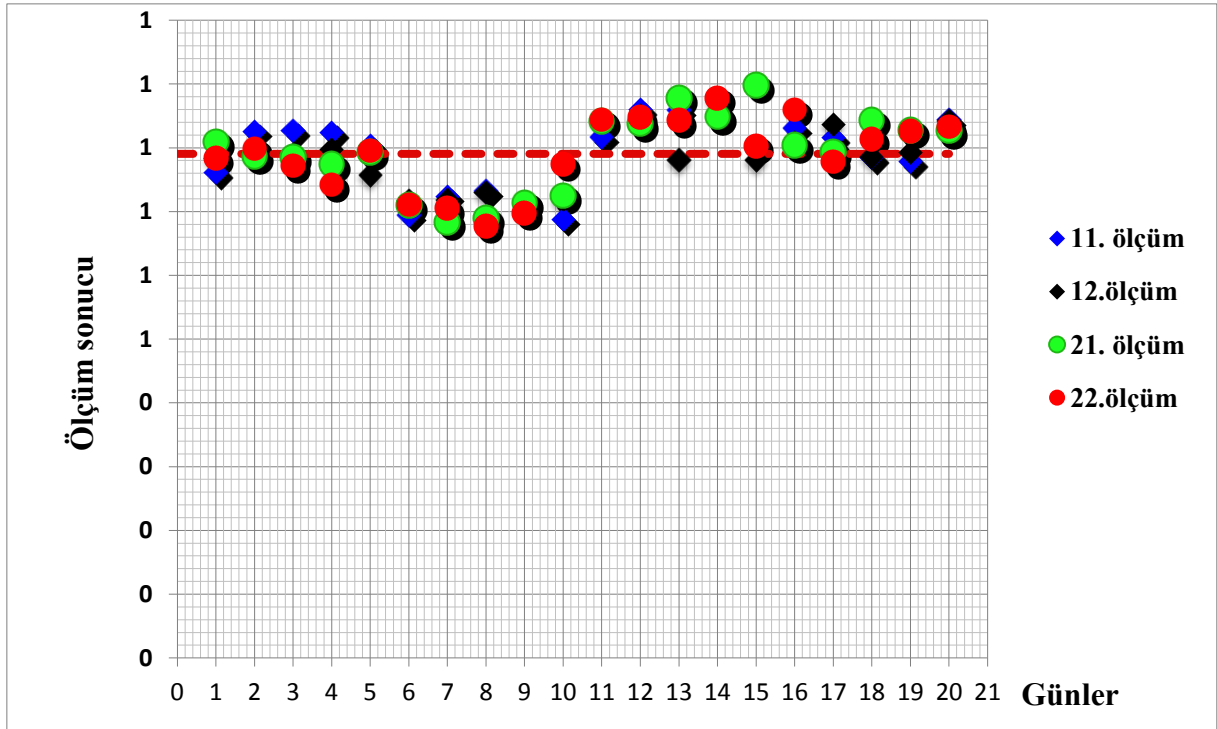
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 2. düzeyin TAS yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.2-B1 ve şekil 3.8.2-B’de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV’si 2,74, günler arası 6,92, çalışmalar arası 2,14 ve toplam CV’si 7,74 olarak bulundu (Tablo 3.8.2-B2).

Tablo 3.8.2-B1: 2. düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,761	0,783	0,772	0,81	0,784	0,797	0,79075
2	0,826	0,791	0,8085	0,787	0,799	0,793	0,796
3	0,827	0,789	0,808	0,786	0,772	0,779	0,7755
4	0,824	0,798	0,811	0,774	0,742	0,758	0,75
5	0,804	0,757	0,7805	0,793	0,796	0,7945	0,79525
6	0,695	0,717	0,706	0,71	0,711	0,7105	0,71075
7	0,724	0,718	0,721	0,684	0,705	0,6945	0,69975
8	0,732	0,73	0,731	0,69	0,677	0,6835	0,68025
9	0,714	0,703	0,7085	0,714	0,698	0,706	0,702
10	0,688	0,719	0,7035	0,725	0,774	0,7495	0,76175
11	0,817	0,844	0,8305	0,842	0,844	0,843	0,8435
12	0,86	0,851	0,8555	0,838	0,848	0,843	0,8455
13	0,859	0,781	0,82	0,878	0,843	0,8605	0,85175
14	0,849	0,876	0,8625	0,849	0,878	0,8635	0,87075
15	0,801	0,781	0,791	0,898	0,803	0,8505	0,82675
16	0,831	0,809	0,82	0,804	0,86	0,832	0,846
17	0,816	0,837	0,8265	0,794	0,778	0,786	0,782
18	0,785	0,786	0,7855	0,843	0,814	0,8285	0,82125
19	0,778	0,793	0,7855	0,828	0,826	0,827	0,8265
20	0,844	0,842	0,843	0,827	0,833	0,83	0,8315
Ortalama	0,792	0,785	0,789	0,794	0,789	0,791	0,790
SS	0,05	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,06
%CV	6,93	6,33	6,38	7,74	7,32	7,25	7,21

Tablo 3.8.2-B2: TAS yönteminin 2.düzyen CV sonuçları

Çalışma içi	2,74
Günler arası %CV	6,92
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	2,14
Toplam %CV	7,74



Şekil 3.8.2-B: 2.düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

C)TAS Düzey 3

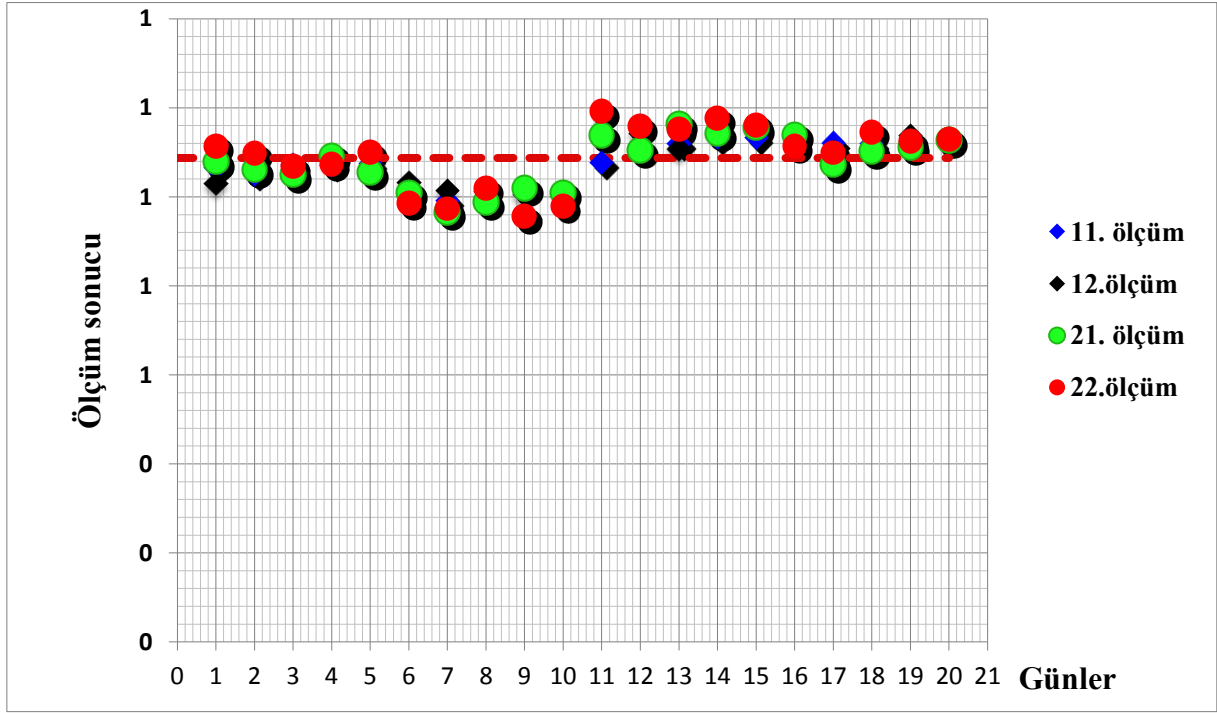
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 3. düzeyin TAS yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.2-C1 ve şekil 3.8.2-C'de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 1,93, günler arası 6,13, çalışmalar arası 0,73 ve toplam CV'si 6,46 olarak bulundu (Tablo 3.8.2-C2).

Tablo 3.8.2-C1: 3. düzeyin TAS yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	1,066	1,03	1,048	1,079	1,114	1,0965	1,084375
2	1,051	1,067	1,059	1,061	1,098	1,0795	1,08875
3	1,072	1,062	1,067	1,05	1,068	1,059	1,0635
4	1,071	1,082	1,0765	1,093	1,074	1,0835	1,07875
5	1,075	1,064	1,0695	1,055	1,1	1,0775	1,08875
6	1,019	1,032	1,0255	1,009	0,986	0,9975	0,99175
7	0,992	1,014	1,003	0,966	0,973	0,9695	0,97125
8	0,993	1,012	1,0025	0,988	1,019	1,0035	1,01125
9	0,962	1,005	0,9835	1,019	0,956	0,9875	0,97175
10	0,979	1,011	0,995	1,009	0,979	0,994	0,9865
11	1,077	1,146	1,1115	1,138	1,192	1,165	1,1785
12	1,112	1,143	1,1275	1,105	1,158	1,1315	1,14475
13	1,12	1,108	1,114	1,163	1,152	1,1575	1,15475
14	1,133	1,147	1,14	1,143	1,177	1,16	1,1685
15	1,133	1,155	1,144	1,155	1,162	1,1585	1,16025
16	1,137	1,137	1,137	1,14	1,114	1,127	1,1205
17	1,121	1,102	1,1115	1,072	1,099	1,0855	1,09225
18	1,12	1,103	1,1115	1,103	1,145	1,124	1,1345
19	1,124	1,137	1,1305	1,112	1,125	1,1185	1,12175
20	1,13	1,131	1,1305	1,127	1,13	1,1285	1,12925
Ortalama	1,074	1,084	1,079	1,079	1,091	1,085	1,087
SS	0,06	0,05	0,05	0,06	0,07	0,06	0,07
%CV	5,36	4,91	5,01	5,43	6,63	5,88	6,22

Tablo 3.8.2-C2: TAS yönteminin 3.düzyey CV sonuçları

Çalışma içi	1,93
Günler arası %CV	6,13
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	0,73
Toplam %CV	6,46



Şekil 3.8.2-C: 3.düzyeyin TAS yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

3.8.3 TAR yönteminin tekrarlanabilirliği

A) TAR Düzey 1

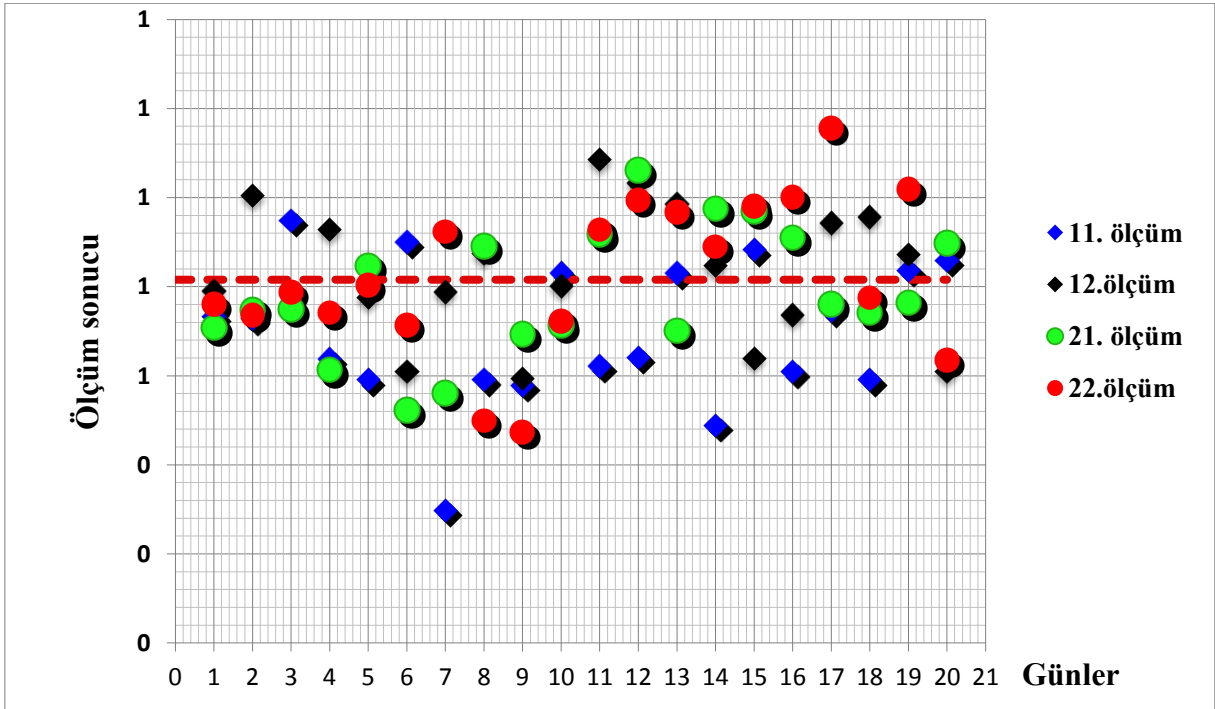
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 1. düzeyin TAR yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.3-A1 ve şekil 3.8.3-A'da görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 20,55, günler arası 15,63, çalışmalar arası 8,22 ve toplam CV'si 24,47 olarak bulundu (Tablo 3.8.3-A2).

Tablo 3.8.3-A1:1. düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,733	0,79	0,7615	0,708	0,761	0,7345	0,74125
2	0,728	1,004	0,866	0,748	0,736	0,742	0,739
3	0,949	0,755	0,852	0,749	0,787	0,768	0,7775
4	0,638	0,928	0,783	0,614	0,742	0,678	0,71
5	0,591	0,776	0,6835	0,847	0,803	0,825	0,814
6	0,9	0,609	0,7545	0,523	0,714	0,6185	0,66625
7	0,298	0,788	0,543	0,561	0,924	0,7425	0,83325
8	0,592	0,874	0,733	0,891	0,499	0,695	0,597
9	0,579	0,593	0,586	0,693	0,473	0,583	0,528
10	0,831	0,802	0,8165	0,714	0,723	0,7185	0,72075
11	0,622	1,085	0,8535	0,918	0,928	0,923	0,9255
12	0,641	1,033	0,837	1,062	0,995	1,0285	1,01175
13	0,831	0,986	0,9085	0,702	0,967	0,8345	0,90075
14	0,489	0,847	0,668	0,975	0,89	0,9325	0,91125
15	0,883	0,639	0,761	0,97	0,981	0,9755	0,97825
16	0,61	0,736	0,673	0,91	1,001	0,9555	0,97825
17	0,746	0,943	0,8445	0,761	1,156	0,9585	1,05725
18	0,591	0,956	0,7735	0,742	0,776	0,759	0,7675
19	0,837	0,872	0,8545	0,764	1,019	0,8915	0,95525
20	0,859	0,609	0,734	0,898	0,635	0,7665	0,70075
Ortalama	0,697	0,831	0,764	0,788	0,826	0,807	0,816
SS	0,16	0,15	0,10	0,14	0,18	0,13	0,14
%CV	23,15	17,78	12,62	18,15	21,32	15,62	17,77

Tablo 3.8.3-A2: TAR yönteminin 1.düzyen CV sonuçları

Çalışma içi	20,55
Günler arası %CV	15,63
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	8,22
Toplam %CV	24,47



Şekil 3.8.3-A: 1.düzyen TAR yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

B) TAR Düzey 2

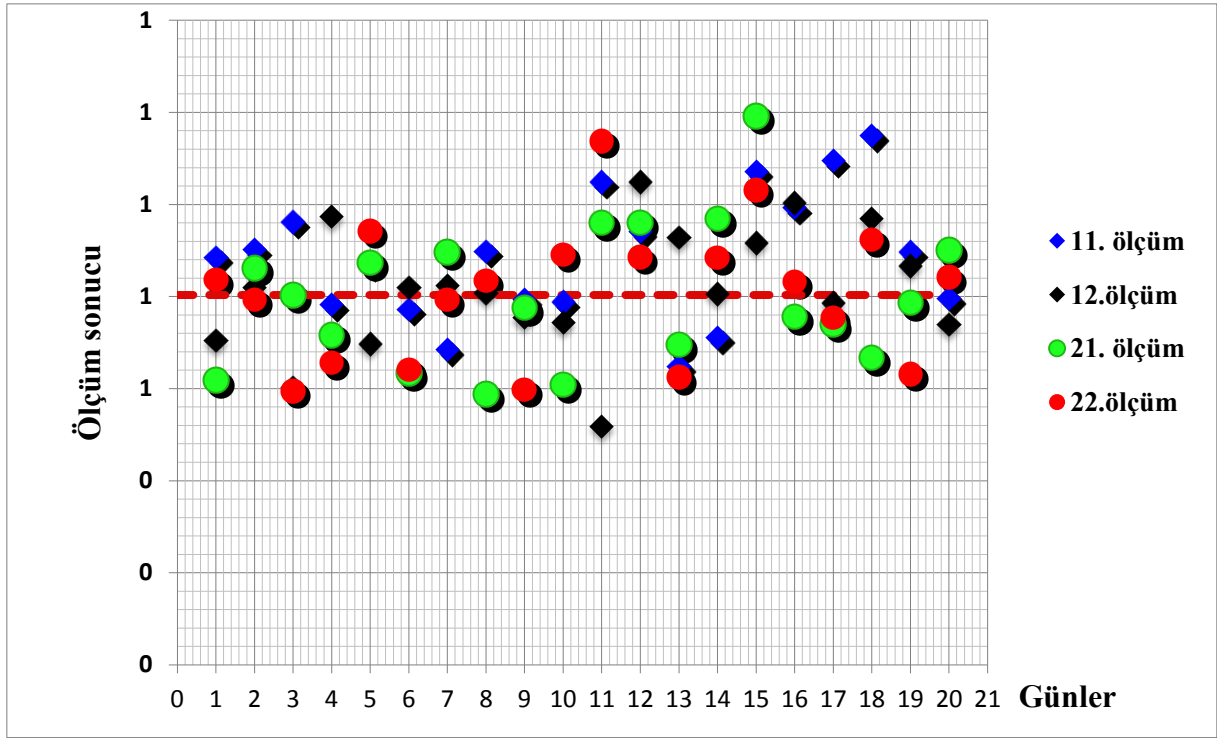
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 2. düzeyin TAR yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.3-B1 ve şekil 3.8.3-B'de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 15,68, günler arası 13,92, çalışmalar arası 7,18 ve toplam CV'si 22,16 olarak bulundu (Tablo 3.8.3-B2).

Tablo 3.8.3-B1:2. düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	0,885	0,704	0,7945	0,619	0,837	0,728	0,744625
2	0,902	0,82	0,861	0,862	0,793	0,8275	0,81025
3	0,962	0,602	0,782	0,803	0,595	0,699	0,647
4	0,782	0,974	0,878	0,717	0,656	0,6865	0,67125
5	0,87	0,697	0,7835	0,874	0,942	0,908	0,925
6	0,772	0,819	0,7955	0,633	0,641	0,637	0,639
7	0,685	0,824	0,7545	0,896	0,793	0,8445	0,81875
8	0,898	0,808	0,853	0,588	0,834	0,711	0,7725
9	0,793	0,754	0,7735	0,776	0,598	0,687	0,6425
10	0,788	0,743	0,7655	0,609	0,891	0,75	0,8205
11	1,049	0,517	0,783	0,961	1,138	1,0495	1,09375
12	0,941	1,049	0,995	0,961	0,886	0,9235	0,90475
13	0,648	0,928	0,788	0,695	0,624	0,6595	0,64175
14	0,711	0,806	0,7585	0,969	0,884	0,9265	0,90525
15	1,071	0,916	0,9935	1,192	1,032	1,112	1,072
16	0,993	1,003	0,998	0,756	0,832	0,794	0,813
17	1,095	0,786	0,9405	0,74	0,754	0,747	0,7505
18	1,15	0,97	1,06	0,667	0,924	0,7955	0,85975
19	0,897	0,866	0,8815	0,787	0,632	0,7095	0,67075
20	0,795	0,739	0,767	0,9	0,842	0,871	0,8565
Ortalama	0,884	0,816	0,850	0,800	0,806	0,803	0,803
SS	0,14	0,13	0,10	0,15	0,15	0,13	0,13
%CV	15,85	16,42	11,40	19,16	18,46	16,13	16,76

Tablo 3.8.3-B2: TAR yönteminin 2.düzyen CV sonuçları

Çalışma içi	15,68
Günler arası %CV	13,92
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	7,18
Toplam %CV	22,16



Şekil 3.8.3-B: 2.düzeğin TAR yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

C) TAR Düzey 3

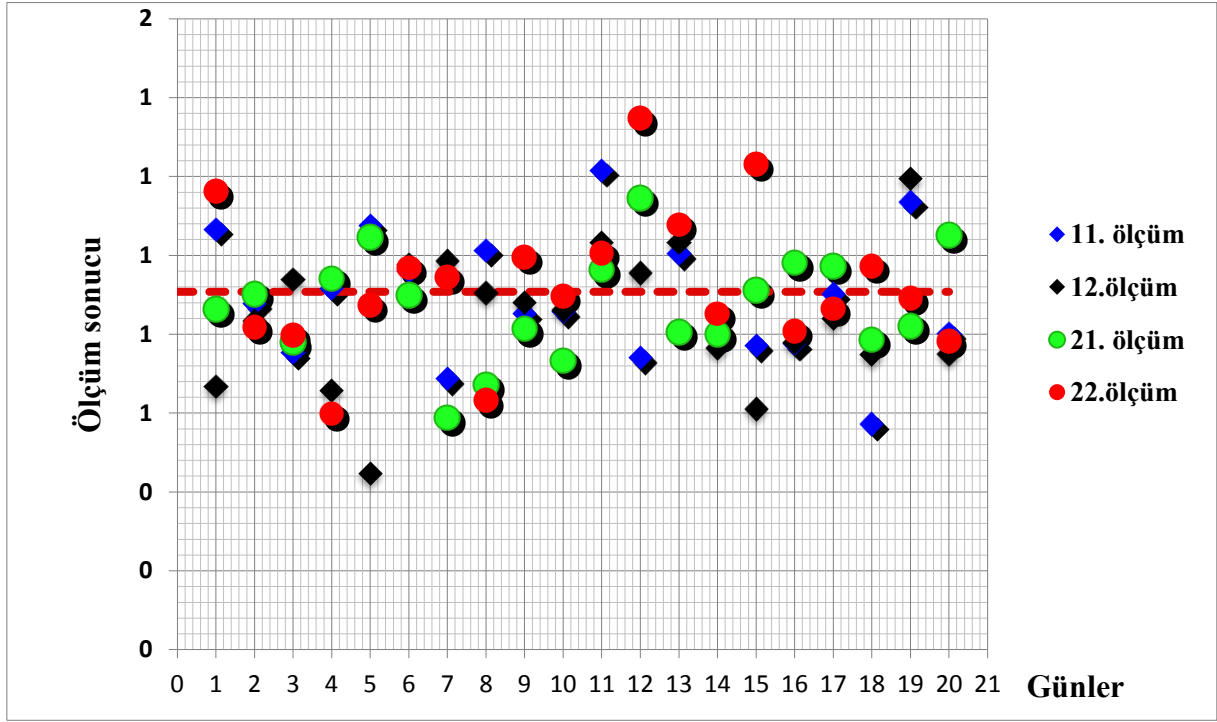
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 3. düzeyin TAR yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.3-C1 ve şekil 3.8.3-C’de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV’si 16,15, günler arası 12,19, çalışmalar arası 8,67 ve toplam CV’si 22,02 olarak bulundu (Tablo 3.8.3-C2).

Tablo 3.8.3-C1:3. düzeyin TAR yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	1,066	0,667	0,8665	0,863	1,162	1,0125	0,976
2	0,878	0,833	0,8555	0,902	0,819	0,8605	0,83975
3	0,753	0,938	0,8455	0,78	0,798	0,789	0,7935
4	0,915	0,658	0,7865	0,941	0,599	0,77	0,6845
5	1,076	0,447	0,7615	1,047	0,874	0,9605	0,91725
6	0,96	0,977	0,9685	0,899	0,969	0,934	0,9515
7	0,688	0,986	0,837	0,589	0,945	0,767	0,856
8	1,013	0,905	0,959	0,672	0,632	0,652	0,642
9	0,852	0,881	0,8665	0,814	0,996	0,905	0,9505
10	0,858	0,862	0,86	0,733	0,897	0,815	0,856
11	1,216	1,033	1,1245	0,964	1,006	0,985	0,9955
12	0,741	0,955	0,848	1,145	1,347	1,246	1,2965
13	1,005	1,033	1,019	0,806	1,078	0,942	1,01
14	0,8	0,765	0,7825	0,8	0,852	0,826	0,839
15	0,772	0,61	0,691	0,912	1,231	1,0715	1,15125
16	0,776	0,779	0,7775	0,982	0,807	0,8945	0,85075
17	0,902	0,84	0,871	0,973	0,865	0,919	0,892
18	0,573	0,748	0,6605	0,786	0,972	0,879	0,9255
19	1,135	1,195	1,165	0,821	0,892	0,8565	0,87425
20	0,802	0,75	0,776	1,051	0,783	0,917	0,85
Ortalama	0,889	0,843	0,866	0,874	0,926	0,900	0,908
SS	0,16	0,17	0,13	0,14	0,18	0,13	0,14
%CV	18,13	20,47	14,83	15,46	19,73	13,99	15,86

Tablo 3.8.3-C2: TAR yönteminin 3.düzyey CV sonuçları

Çalışma içi	16,15
Günler arası %CV	12,19
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	8,67
Toplam %CV	22,02



Şekil 3.8.3-C: 3.düzyeyin TAR yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

3.8.4 TTL yönteminin tekrarlanabilirliği

A) TTL Düzey 1

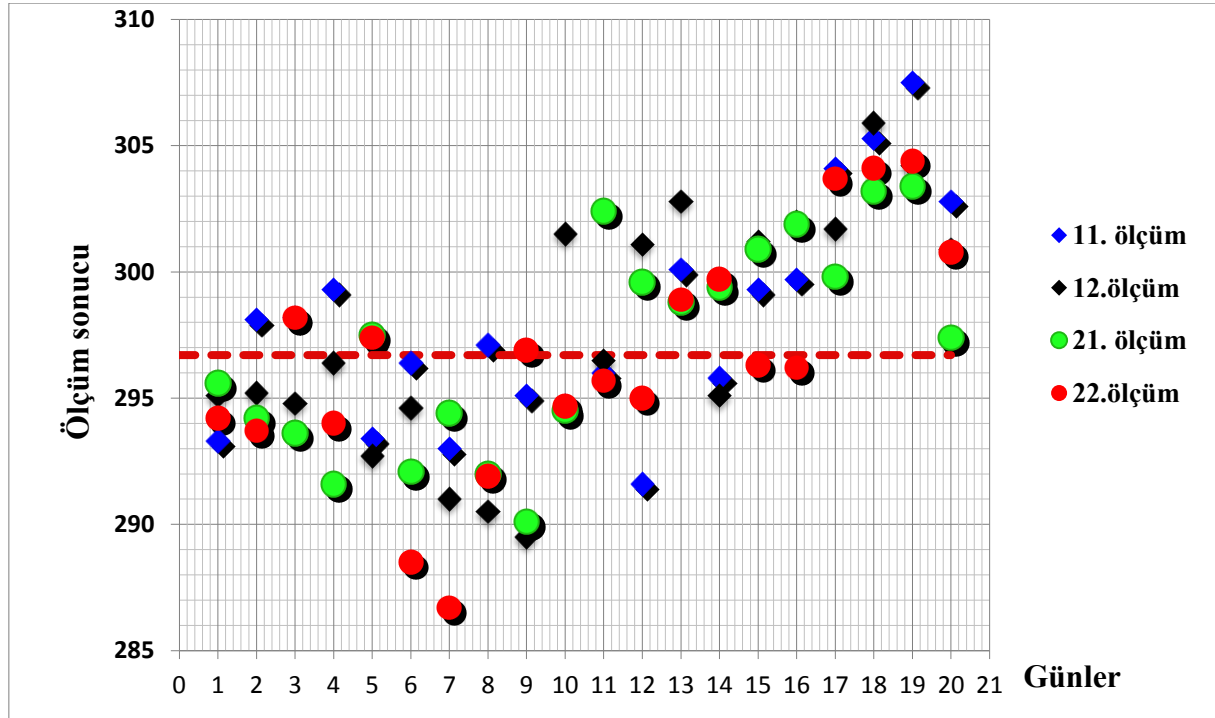
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 1. düzeyin TTL yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.4-A1 ve şekil 3.8.4-A'da görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 0,91, günler arası 1,35, çalışmalar arası 0,15 ve toplam CV'si 1,63 olarak bulundu (Tablo 3.8.4-A2).

Tablo 3.8.4-A1:1. düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total Ortalama
	11. ölçüm	12.ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22.ölçüm	Ortalama	
1	293,3	295,1	294,2	295,6	294,2	294,9	294,725
2	298,1	295,2	296,65	294,2	293,7	293,95	293,825
3	298,2	294,8	296,5	293,6	298,2	295,9	297,05
4	299,3	296,4	297,85	291,6	294	292,8	293,4
5	293,4	292,7	293,05	297,5	297,4	297,45	297,425
6	296,4	294,6	295,5	292,1	288,5	290,3	289,4
7	293	291	292	294,4	286,7	290,55	288,625
8	297,1	290,5	293,8	292	291,9	291,95	291,925
9	295,1	289,5	292,3	290,1	296,9	293,5	295,2
10	294,7	301,5	298,1	294,5	294,7	294,6	294,65
11	296	296,5	296,25	302,4	295,7	299,05	297,375
12	291,6	301,1	296,35	299,6	295	297,3	296,15
13	300,1	302,8	301,45	298,8	298,9	298,85	298,875
14	295,8	295,1	295,45	299,4	299,7	299,55	299,625
15	299,3	301,2	300,25	300,9	296,3	298,6	297,45
16	299,7	302	300,85	301,9	296,2	299,05	297,625
17	304,1	301,7	302,9	299,8	303,7	301,75	302,725
18	305,3	305,9	305,6	303,2	304,1	303,65	303,875
19	307,5	304,2	305,85	303,4	304,4	303,9	304,15
20	302,8	300,9	301,85	297,4	300,8	299,1	299,95
Ortalama	298,0	297,6	297,8	297,1	296,6	296,8	296,7
SS	4,32	4,86	4,17	4,18	4,69	3,99	4,23
%CV	1,45	1,63	1,40	1,41	1,58	1,34	1,43

Tablo 3.8.4-A2: TTL yönteminin 1.düzyen CV sonuçları

Çalışma içi	0,91
Günler arası %CV	1,35
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	0,15
Toplam %CV	1,63



Şekil 3.8.4-A: 1.düzyenin TTL yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

B) TTL Düzey 2

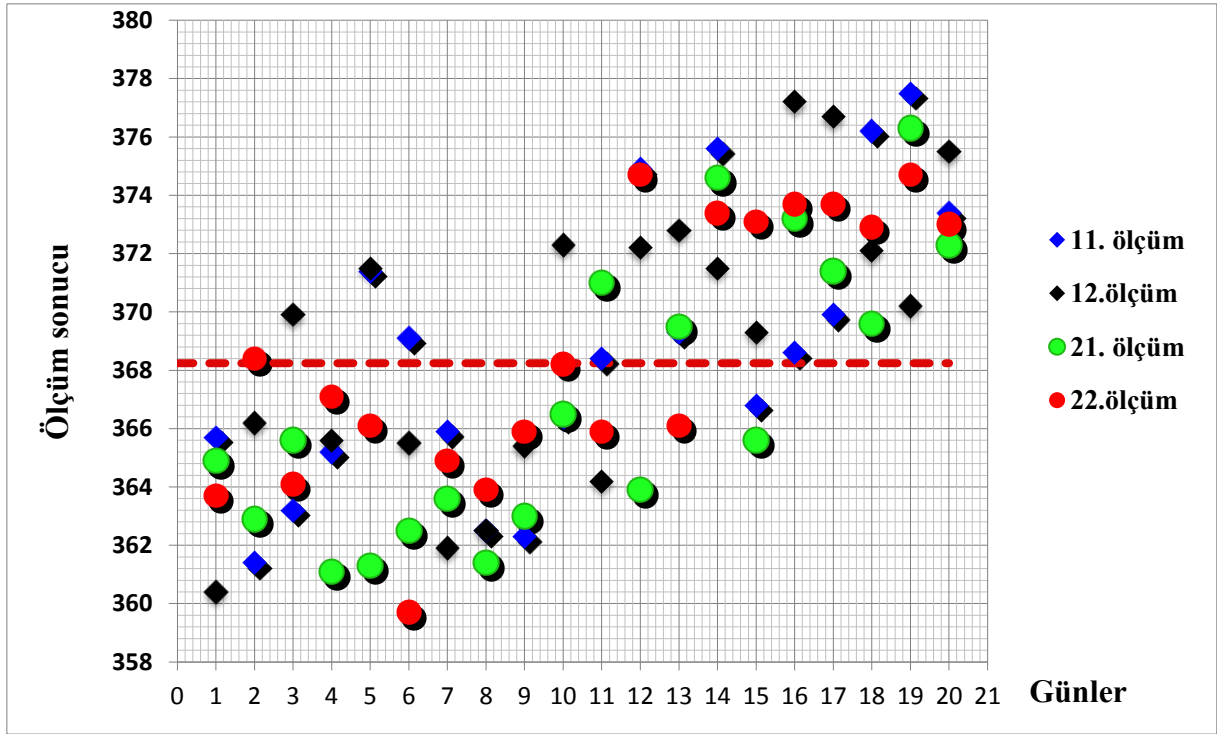
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 2. düzeyin TTL yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.4-B1 ve şekil 3.8.4-B'de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV'si 0,85, günler arası 1,10, çalışmalar arası 0,24 ve toplam CV'si 1,37 olarak bulundu (Tablo 3.8.4-B2).

Tablo 3.8.4-B1:2. düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	365,7	360,4	363,05	364,9	363,7	364,3	363,9875
2	361,4	366,2	363,8	362,9	368,4	365,65	367,025
3	363,2	369,9	366,55	365,6	364,1	364,85	364,475
4	365,2	365,6	365,4	361,1	367,1	364,1	365,6
5	371,4	371,5	371,45	361,3	366,1	363,7	364,9
6	369,1	365,5	367,3	362,5	359,7	361,1	360,4
7	365,9	361,9	363,9	363,6	364,9	364,25	364,575
8	362,5	362,5	362,5	361,4	363,9	362,65	363,275
9	362,3	365,4	363,85	363	365,9	364,45	365,175
10	366,4	372,3	369,35	366,5	368,2	367,35	367,775
11	368,4	364,2	366,3	371	365,9	368,45	367,175
12	374,9	372,2	373,55	363,9	374,7	369,3	372
13	369,3	372,8	371,05	369,5	366,1	367,8	366,95
14	375,6	371,5	373,55	374,6	373,4	374	373,7
15	366,8	369,3	368,05	365,6	373,1	369,35	371,225
16	368,6	377,2	372,9	373,2	373,7	373,45	373,575
17	369,9	376,7	373,3	371,4	373,7	372,55	373,125
18	376,2	372,1	374,15	369,6	372,9	371,25	372,075
19	377,5	370,2	373,85	376,3	374,7	375,5	375,1
20	373,4	375,5	374,45	372,3	373	372,65	372,825
Ortalama	368,7	369,1	368,9	367,0	368,7	367,8	368,2
SS	4,88	4,93	4,31	4,82	4,57	4,26	4,30
%CV	1,32	1,34	1,17	1,31	1,24	1,16	1,17

Tablo 3.8.4-B2: TTL yönteminin 2.düzyen CV sonuçları

Çalışma içi	0,85
Günler arası %CV	1,10
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	0,24
Toplam %CV	1,37



Şekil 3.8.4-B: 2.düzeğin TTL yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

C) TTL Düzey 3

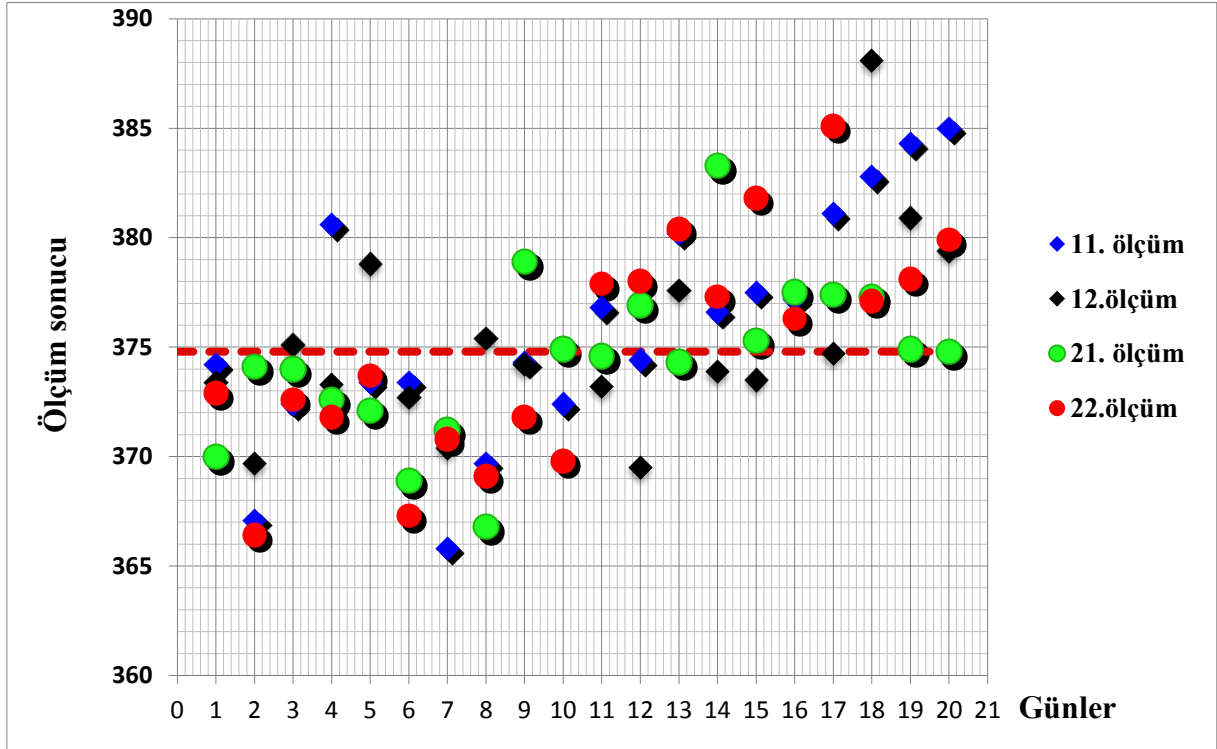
Serum havuzlarıyla oluşturulmuş düzeylerden 3. düzeyin TTL yöntemi ile 20 gün boyunca ölçülen sonuçları tablo 3.8.4-C1 ve şekil 3.8.4-C’de görülmektedir. Yöntemin çalışma içi CV’si 0,8, günler arası 1,03, çalışmalar arası 0,48 ve toplam CV’si 1,39 olarak bulundu (Tablo 3.8.4-C2).

Tablo 3.8.4-C1:3. düzeyin TTL yöntemiyle 20 günlük sonuçları

Günler	Run 1			Run 2			Total
	11. ölçüm	12. ölçüm	Ortalama	21. ölçüm	22. ölçüm	Ortalama	Ortalama
1	374,2	373,4	373,8	370	372,9	371,45	372,0375
2	367,1	369,7	368,4	374,1	366,4	370,25	368,325
3	372,4	375,1	373,75	374	372,6	373,3	372,95
4	380,6	373,3	376,95	372,6	371,8	372,2	372
5	373,4	378,8	376,1	372,1	373,7	372,9	373,3
6	373,4	372,7	373,05	368,9	367,3	368,1	367,7
7	365,8	370,4	368,1	371,2	370,8	371	370,9
8	369,7	375,4	372,55	366,8	369,1	367,95	368,525
9	374,3	374,2	374,25	378,9	371,8	375,35	373,575
10	372,4	369,8	371,1	374,9	369,8	372,35	371,075
11	376,8	373,2	375	374,6	377,9	376,25	377,075
12	374,4	369,5	371,95	376,9	378	377,45	377,725
13	380,2	377,6	378,9	374,3	380,4	377,35	378,875
14	376,6	373,9	375,25	383,3	377,3	380,3	378,8
15	377,5	373,5	375,5	375,3	381,8	378,55	380,175
16	377,2	377,4	377,3	377,5	376,3	376,9	376,6
17	381,1	374,7	377,9	377,4	385,1	381,25	383,175
18	382,8	388,1	385,45	377,3	377,1	377,2	377,15
19	384,3	380,9	382,6	374,9	378,1	376,5	377,3
20	385	379,4	382,2	374,8	379,9	377,35	378,625
Ortalama	376,0	375,1	375,5	374,5	374,9	374,7	374,8
SS	5,31	4,46	4,45	3,70	5,05	3,83	4,34
%CV	1,41	1,19	1,19	0,99	1,35	1,02	1,16

Tablo 3.8.4-C2: TTL yönteminin 3.düzye CV sonuçları

Çalışma içi	0,80
Günler arası %CV	1,03
Çalışmalar arası (gün içi) %CV	0,48
Toplam %CV	1,39



Şekil 3.8.4-C: 3.düzyein TTL yöntemiyle 20 günlük ölçüm sonuçlarının grafiksel gösterimi

3.9 İnterferans çalışmaları

3.9.1 Hemoliz interferansı

3.9.1.1 FRAP yöntemi için hemoliz interferansı

FRAP yöntemi için yapılan hemoliz interferansı çalışmasında 400 mg/dl'nin üzerindeki hemoglobın konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı. Hemoliz interferansı çalışması için ölçülen test serumu konsantrasyonları ve % interferans değerleri Tablo 3.9.1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 3.9.1.1: FRAP yönteminin hemoliz interferans çalışması

Hb(mg/dL)	Ölçülen değer			Ölçüm ortalaması	% interferans
0	0,567	0,600	0,569	0,579	0
20	0,582	0,586	0,578	0,582	0,5
40	0,554	0,591	0,577	0,574	0,8
60	0,579	0,557	0,587	0,574	0,8
80	0,585	0,622	0,593	0,600	3,6
100	0,618	0,596	0,601	0,605	4,4
200	0,632	0,627	0,611	0,623	7,5
400	0,669	0,699	0,714	0,694	19,8
600	0,762	0,748	0,761	0,757	30,7
800	0,809	0,821	0,822	0,817	41,1
1000	0,859	0,874	0,840	0,858	48,1

3.9.1.2 TAS yöntemi için hemoliz interferansı

TAS yöntemi için yapılan hemoliz interferansı çalışmasında 800 mg/dl'nin üzerindeki hemoglobün konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı. Hemoliz interferansı çalışması için ölçülen test serumu konsantrasyonları ve % interferans değerleri Tablo 3.9.1.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.9.1.2: TAS yönteminin hemoliz interferans çalışması

Hb(mg/dL)	Ölçülen değer			Ölçüm ortalaması	% interferans
0	0,706	0,744	0,725	0,725	0
20	0,708	0,704	0,721	0,711	1,9
40	0,756	0,697	0,728	0,727	0,2
60	0,738	0,723	0,758	0,740	2
80	0,682	0,73	0,704	0,705	2,7
100	0,693	0,67	0,647	0,670	7,5
200	0,721	0,653	0,67	0,681	6
400	0,772	0,724	0,787	0,761	4,9
600	0,815	0,791	0,751	0,786	8,4
800	0,828	0,808	0,823	0,820	13,1
1000	0,899	0,855	0,899	0,884	21,9

3.9.1.3 TAR yöntemi için hemoliz interferansı

TAR yöntemi için yapılan hemoliz interferansı çalışmasında 200 mg/dl'nin üzerindeki hemoglobin konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı. Hemoliz interferansı çalışması için ölçülen test serumu konsantrasyonları ve % interferans değerleri Tablo 3.9.1.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.9.1.3: TAR yönteminin hemoliz interferans çalışması

Hb(mg/dL)	Ölçülen değer			Ölçüm ortalaması	% interferans
0	0,959	0,738	0,787	0,828	0
20	0,896	0,75	0,762	0,803	3
40	0,801	0,839	0,785	0,808	3,3
60	0,557	0,948	0,84	0,782	5,5
80	0,672	0,83	1,048	0,850	2,6
100	0,905	0,635	0,745	0,761	8,9
200	0,641	0,728	0,731	0,700	15,4
400	0,888	0,992	0,979	0,953	15
600	0,891	0,883	1,107	0,960	15,9
800	1,124	0,995	0,875	0,998	20,5
1000	1,273	1,192	1,025	1,163	40,4

3.9.1.4 TTL yöntemi için hemoliz interferansı

TTL yöntemi için yapılan hemoliz interferansı çalışmasında 200 mg/dl'nin üzerindeki hemoglobin konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı. Hemoliz interferansı çalışması için ölçülen test serumu konsantrasyonları ve % interferans değerleri Tablo 3.9.1.4'te gösterilmiştir.

Tablo 3.9.1.4: TTL yönteminin hemoliz interferans çalışması

Hb(mg/dL)	Ölçülen değer			Ölçüm ortalaması	% interferans
0	394,3	387,8	389,5	390,5	0
20	387,8	380,7	385,8	384,8	1,4
40	388,8	389,3	388,2	388,8	0,4
60	387,2	393,6	388,9	389,9	0,1
80	373,7	375	366,3	371,7	4,8
100	374,2	362,5	360,2	365,6	6,3
200	350,8	349,2	353,1	351,0	10,11
400	352,1	342,5	339	344,5	11,7
600	339	341,8	342,6	341,1	12,6
800	307,4	305,6	322,6	311,9	20,1
1000	313,4	298,9	334,2	315,5	19,2

3.9.2 Bilirubin interferansı

3.9.2.1 FRAP yöntemi için bilirubin interferansı

FRAP yöntemi için yapılan bilirubin interferansı çalışmasında 2,5 mg/dl'nin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı.

3.9.2.2 TAS yöntemi için bilirubin interferansı

TAS yöntemi için yapılan bilirubin interferansı çalışmasında 5 mg/dl'nin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı.

3.9.2.3 TAR yöntemi için bilirubin interferansı

TAR yöntemi için yapılan bilirubin interferansı çalışmasında 7,5 mg/dl'nin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı.

3.9.2.4 TTL yöntemi için bilirubin interferansı

TTL yöntemi için yapılan bilirubin interferansı çalışmasında 20 mg/dl'nin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında %10'dan fazla interferans saptandı.

3.9.3 Lipemi interferansı

3.9.3.1 FRAP yöntemi için lipemi interferansı

FRAP yöntemi için yapılan lipemi interferans çalışmasında test sonuçları 500 lipemi indeksine kadar etkilenmedi.

3.9.3.2 TAS yöntemi için lipemi interferansı

TAS yöntemi için yapılan lipemi interferans çalışmasında test sonuçları 1000 lipemi indeksine kadar etkilenmedi.

3.9.3.3 TAR yöntemi için lipemi interferansı

TAR yöntemi için yapılan lipemi interferans çalışmasında test sonuçları 500 lipemi indeksine kadar etkilenmedi.

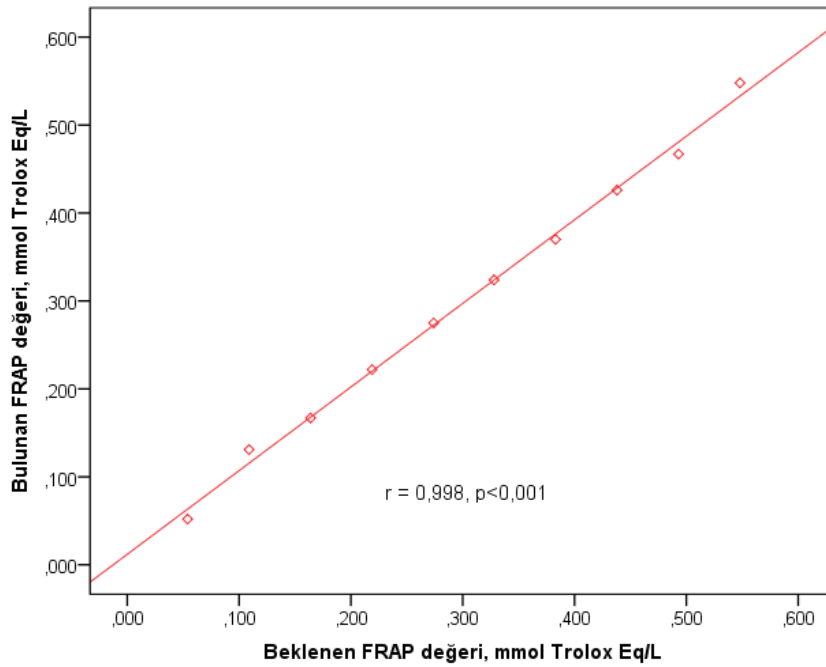
3.9.3.4 TTL yöntemi için lipemi interferansı

TTL yöntemi için yapılan lipemi interferans çalışmasında test sonuçları 500 lipemi indeksine kadar etkilenmedi.

3.10 Yöntemlerin dilüsyon sensitivitelemi

3.10.1 FRAP yönteminin dilüsyon sensitivitesi

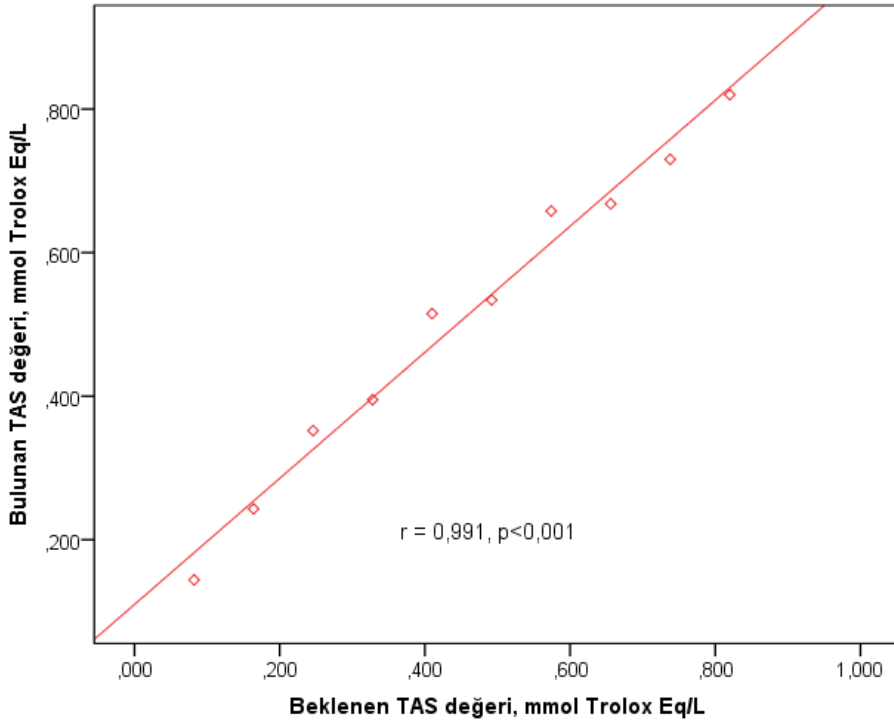
FRAP yönteminin dilüsyon sensitivitesi, farklı serum dilüsyonlarında beklenen değere karşı bulunan değeri kaydedilerek değerlendirildi. Regresyon analizinde r değeri 0,998 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,01$), slope 0,95 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,02$) ve intercept 0,01 ($p = 0,122$, $Sy/x = 0,007$)' di (Şekil 3.10.1).



Şekil 3.10.1: Serumun farklı dilüsyonlarındaki FRAP değerleri

3.10.2 TAS yönteminin dilüsyon sensitivitesi

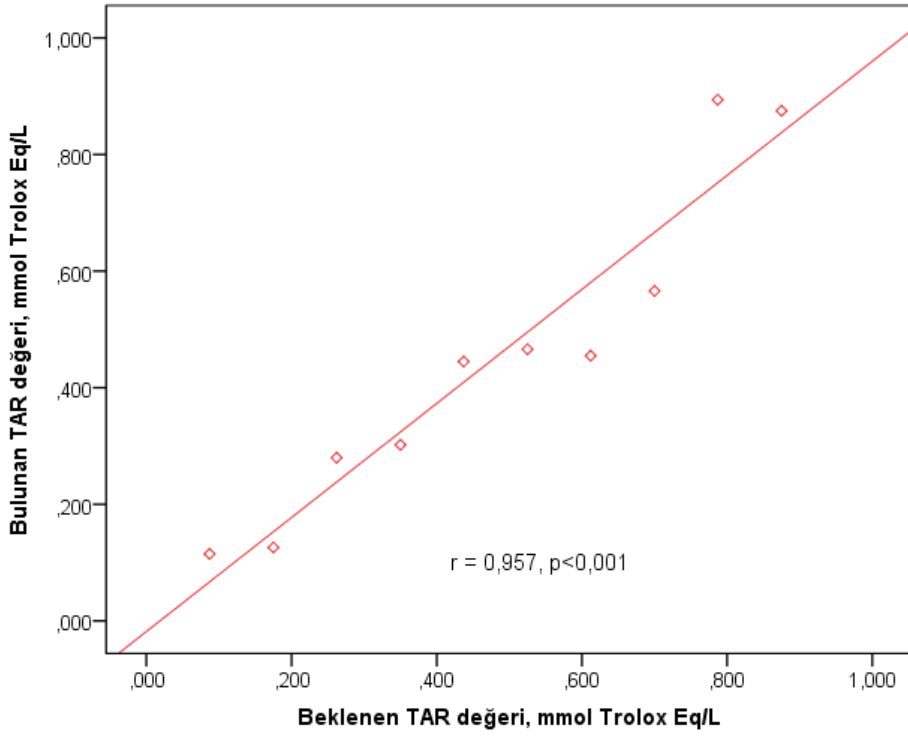
TAS yönteminin dilüsyon sensitivitesi, farklı serum dilüsyonlarında beklenen değere karşı bulunan değeri kaydedilerek değerlendirildi. Regresyon analizinde r değeri 0,991 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,03$), slope 0,88 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,04$) ve intercept 0,1 ($p = 0,001$, $Sy/x = 0,02$)' di (Şekil 3.10.2).



Şekil 3.10.2: Serumun farklı dilüsyonlarındaki TAS değerleri

3.10.3 TAR yönteminin dilüsyon sensitivitesi

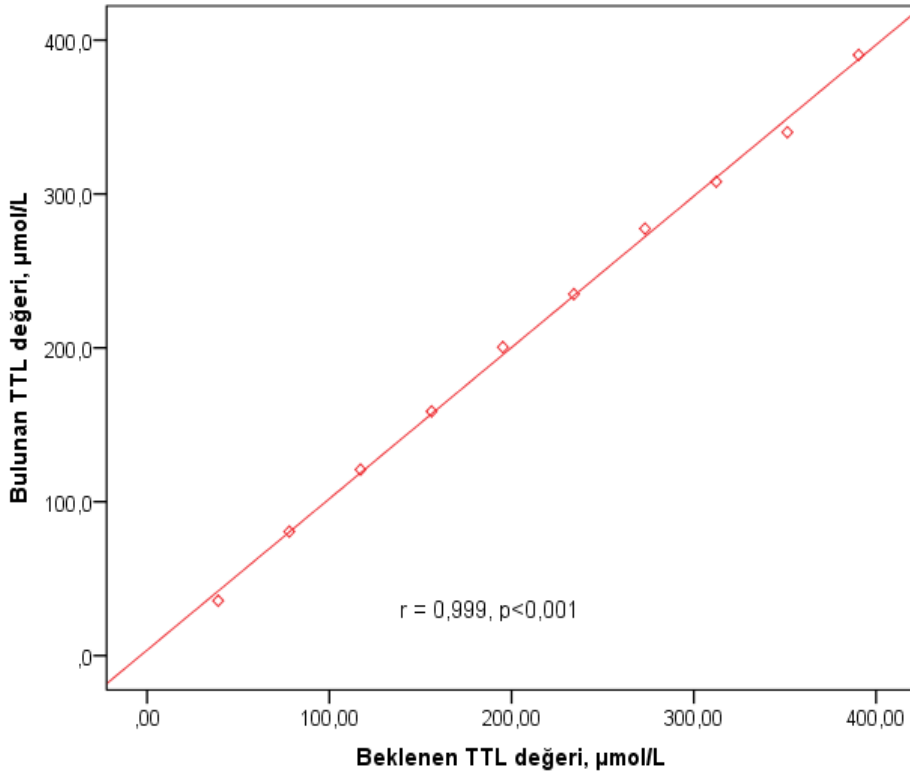
TAR yönteminin dilüsyon sensitivitesi, farklı serum dilüsyonlarında beklenen değere karşı bulunan değer kaydedilerek değerlendirildi. Regresyon analizinde r değeri 0,957 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,08$), slope 0,98 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,1$) ve intercept 0,02 ($p = 0,75$, $Sy/x = 0,05$)' di (Şekil 3.10.3).



Şekil 3.10.3: Serumun farklı dilüsyonlarındaki TAR değerleri

3.10.4 TTL yönteminin dilüsyon sensitivitesi

TTL yönteminin dilüsyon sensitivitesi, farklı serum dilüsyonlarında beklenen değere karşı bulunan değer kaydedilerek değerlendirildi. Regresyon analizinde r değeri 0,999 ($p < 0,001$, $Sy/x = 4,9$), slope 0,98 ($p < 0,001$, $Sy/x = 0,01$) ve intercept 3,61 ($p = 0,316$, $Sy/x = 3,3$)' di (Şekil 3.10.4).



Şekil 3.10.4: Serumun farklı dilüsyonlarındaki TTL değerleri

3.11 Yöntemlerin karşılaştırılması

Tablo 3.11’de görüldüğü gibi hem TAS yöntemi hem de FRAP yöntemi serum ürik asit, total protein ve total bilirubinle anlamlı korelasyon gösterdi. TAR yöntemi ise total protein ve total bilirubinle pozitif anlamlı korelasyon gösterirken ürik asit ile istatistiksel açıdan önemli bir ilişkisi yoktu.

TTL yöntemi ise total protein ile yüksek düzeyde pozitif korelasyon gösterirken ne ürik asit ne de total bilirubinle anlamlı bir ilişkisi vardı. TAS yönteminin FRAP ve TAR yöntemleriyle ilişkisi istatistiksel açıdan anlamlıydı (Şekil 3.11.1-2). TAS ve TTL yöntemi arasında ise anlamlı bir ilişki görülmedi (şekil 3.11.3). FRAP yöntemiyle hem TAR hem de TTL yöntemleri arasında anlamlı bir korelasyon görülmedi (Şekil 3.11.4-5). TAR ve TTL yöntemleri arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı olan pozitif bir korelasyon vardı (Şekil 3.11.6).

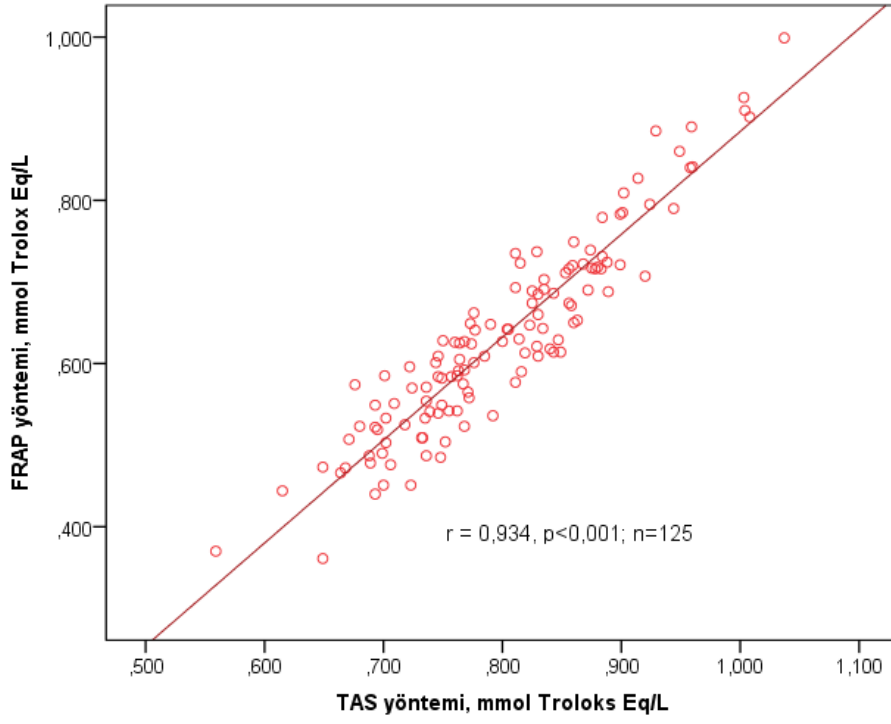
Tablo 3.11: Toplam antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlerin ve serumun antioksidan bileşenlerinin ilişkisi

	FRAP yöntemi	TAS yöntemi	TAR yöntemi	TTL yöntemi	Total protein	Ürik asit	Total bilirubin
FRAP yöntemi	$r = 0,934$ $p < 0,001$ $n = 125$	$r = 0,129$ $p = 0,154$ $n = 125$	$r = -0,063$ $p = 0,485$ $n = 125$	$r = 0,22$ $p = 0,014$ $n = 125$	$r = 0,952$ $p < 0,001$ $n = 125$	$r = 0,265$ $p = 0,003$ $n = 125$	
TAS yöntemi		$r = 0,18$ $p = 0,016$ $n = 125$	$r = -0,022$ $p = 0,810$ $n = 125$	$r = 0,22$ $p = 0,014$ $n = 125$	$r = 0,924$ $p < 0,001$ $n = 125$	$r = 0,282$ $p = 0,001$ $n = 125$	
TAR yöntemi			$r = 0,332$ $p < 0,001$ $n = 125$	$r = 0,182$ $p = 0,044$ $n = 125$	$r = 0,125$ $p = 0,169$ $n = 125$	$r = 0,307$ $p = 0,001$ $n = 125$	
TTL yöntemi				$r = 0,405$ $p < 0,001$ $n = 125$	$r = -0,053$ $p = 0,562$ $n = 125$	$r = 0,074$ $p = 0,416$ $n = 125$	

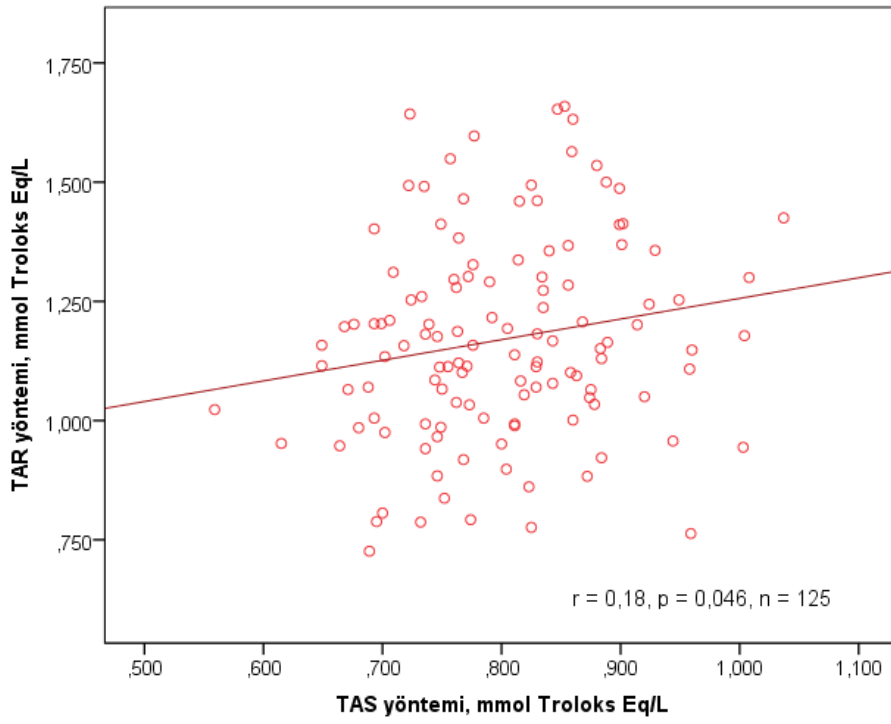
r = korelasyon katsayısı,

p = istatistiksel anlamlılık,

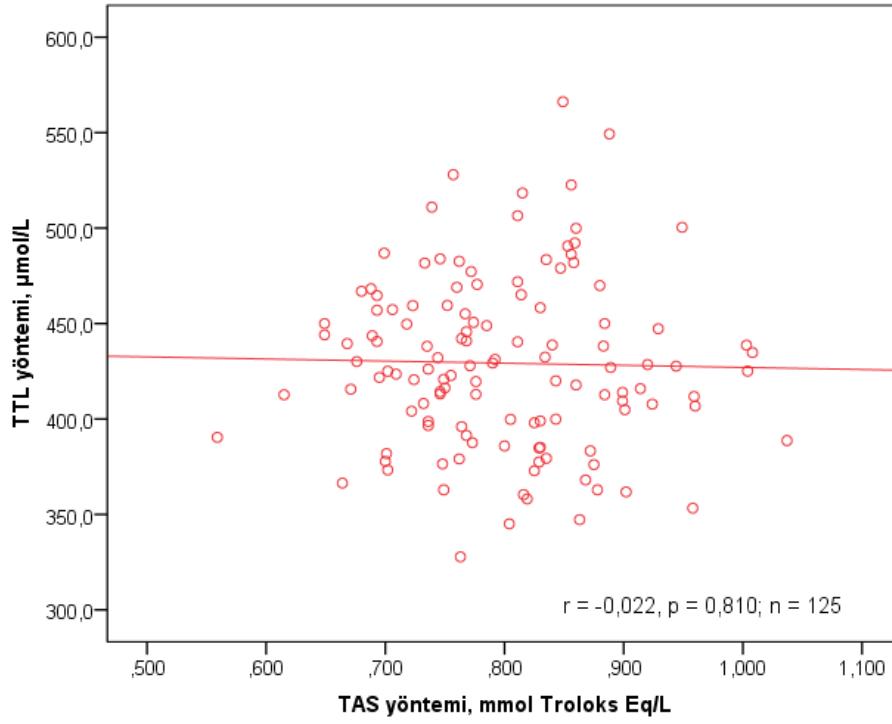
n = numune sayısı



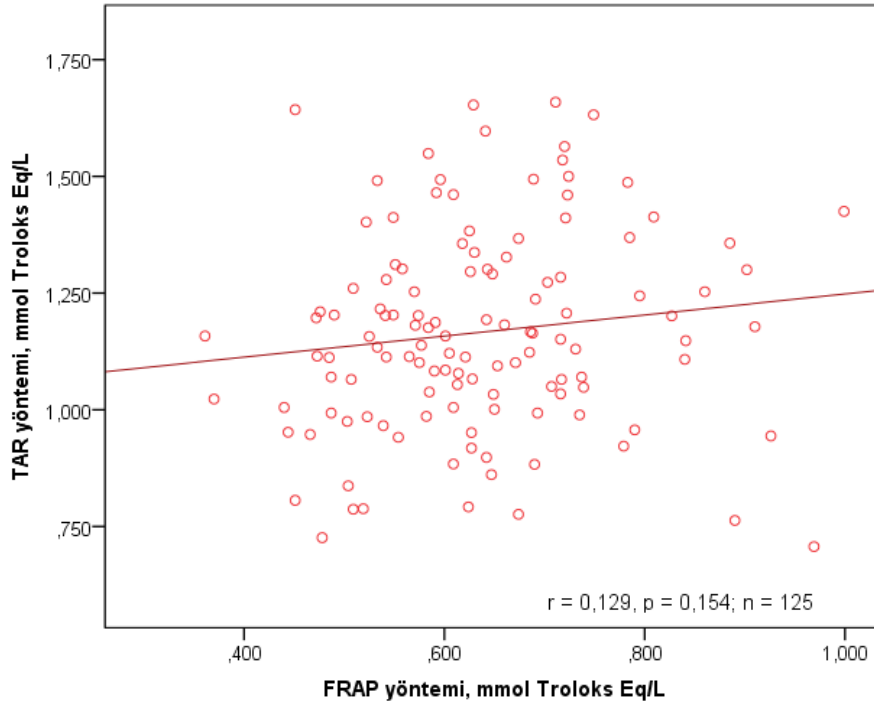
Şekil 3.11.1: TAS ve FRAP yöntemi arasındaki ilişki



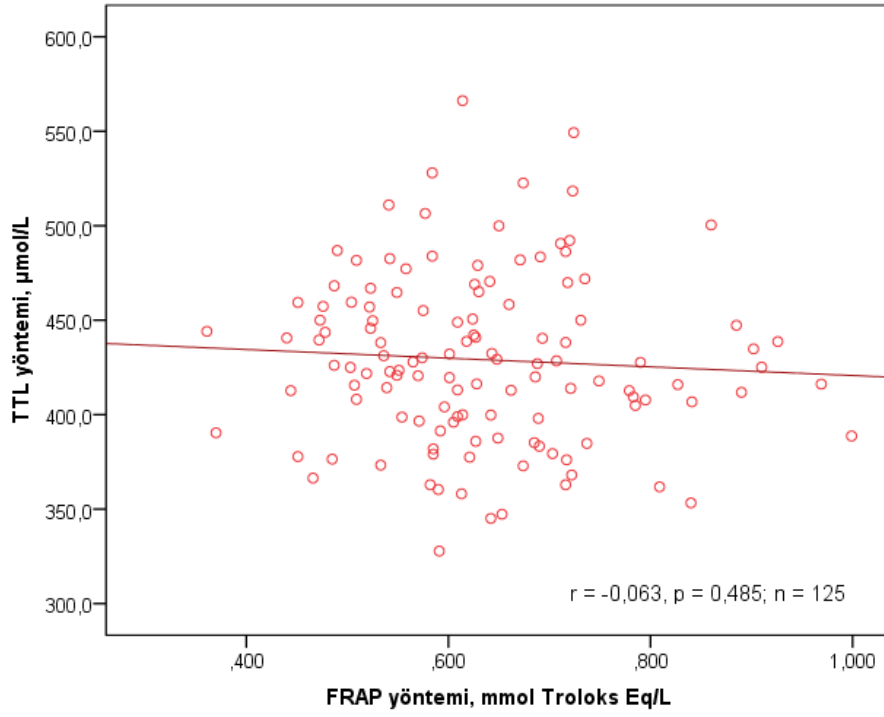
Şekil 3.11.2: TAS ve TAR yöntemi arasındaki ilişki



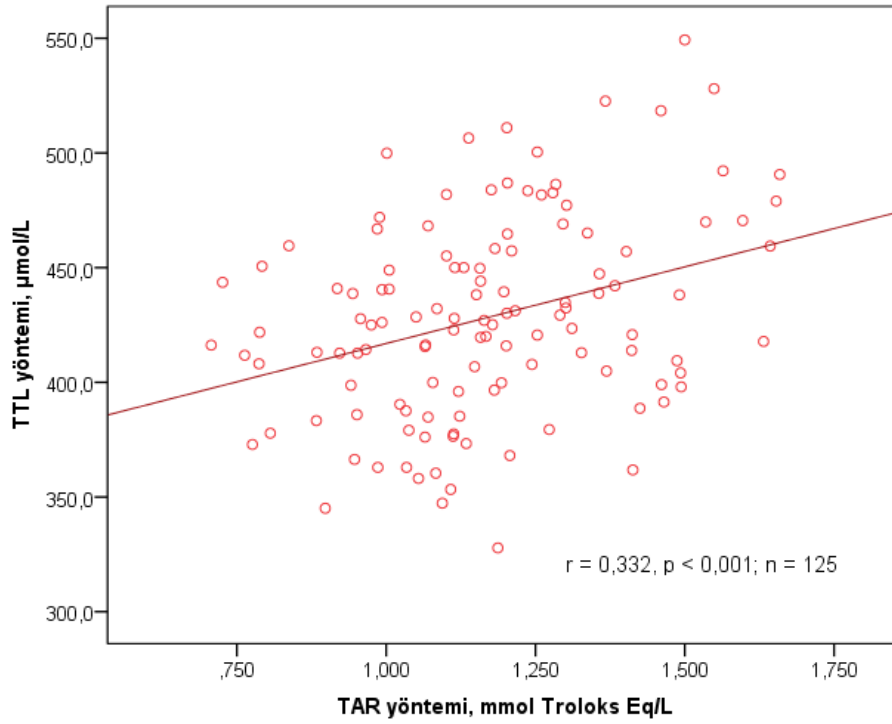
Şekil 3.11.3: TAS ve TTL yöntemi arasındaki ilişki



Şekil 3.11.4: FRAP ve TAR yöntemi arasındaki ilişki



Şekil 3.11.5: FRAP ve TTL yöntemi arasındaki ilişki



Şekil 3.11.6: TAR ve TTL yöntemi arasındaki ilişki

4. TARTIŞMA

Antioksidanlar, serbest radikal hasarının zararlı etkilerine karşı organizmayı korur. Toplam antioksidan kapasitesinin ölçümü bir dokunun ya da biyolojik sıvının oksidan tamponlama potansiyelini gösterir. Toplam antioksidan kapasiteyi ölçmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir [130-133]. Yöntemin kimyası, hedef moleküller, ölçüm koşullarının farklılıkları, pH, dalga boyu, reaksiyonun süresi gibi metodolojik yönler antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlerin sonuçlarının değerlendirilmesinde önemli rol oynar [134, 135].

Antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemlerden bir grup, elektron transfer (ET) mekanizmasını temel alır [84, 88]. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır [88]. ET temelli metotlarda reaktivite fonksiyonel gruplarının iyonizasyon potansiyeline ve deprotonasyonuna bağlıdır [84]. Bundan dolayı ET reaksiyonları pH bağımlıdır. Genel olarak iyonizasyon potansiyeli pH artışıyla azalır, bu durum da deprotonasyonla birlikte elektron verme kapasitesinde artışa yol açar [88]. Sonuç olarak pH değerleri antioksidan redükleme kapasitesi üzerine önemli bir etkiye sahiptir. Asidik koşullarda antioksidan bileşiklerdeki protonasyona bağlı olarak redükleme kapasitesi bastırılmış olabilir. Alkali koşullarda ise proton salınımıyla fenolik bileşiklerin disosiasyonu redükleme kapasitesini artırır [84].

Bu çalışmada değerlendirilen antioksidan kapasiteyi direkt ölçen dört fotometrik yöntemin hepsinin prensibi farklı temele dayanır. FRAP yöntemi Fe^{+3} -TPTZ kompleksinin antioksidanlar tarafından Fe^{+2} -TPTZ'ye redüklenmesi ve oluşan renk değişikliğinin monitorizasyonuna dayanır [117]. TAS yöntemi ise ABTS radikalinin örnekte var olan antioksidanların bu radikali redüklemesiyle orantılı olarak rengin açılması prensibine dayanır [115]. TAR yönteminde ise Fe^{+2} – o-dianizidin kompleksi hidrojen peroksitle reaksiyona girer ve OH^{\bullet} radikali oluşur [116]. Bu radikal o-dianizidin moleküllerini sarı-kahverengi renkli dianizidil radikallerine oksitler. Örnekteki antioksidanların oksidasyon reaksiyonlarını ve renk oluşumunu baskılaması spektrofotometre ile takip edilir. TTL yönteminde DTNB molekülünün örnekte bulunan tiyoller tarafından redüklenmesiyle oluşan renk değişimi gözlenir [128, 129].

Düşük, orta ve yüksek şeklinde 3 düzeyde oluşan serum havuzlarında yapılan tekrarlanabilirlik çalışmalarında TTL yönteminin her 3 düzeyde de çalışma içi, günler arası, çalışmalar arası ve toplam CV'si diğer değerlendirilen yöntemlere göre oldukça düşük bulundu. Düzey 1'de yöntemlerin CV sıralaması $TTL < FRAP < TAS < TAR$ şeklinde iken orta ve yüksek

düzeylede TAS yönteminin çalışmal arası tekrarlabilirliğinin FRAP yönteminkinden daha yüksek olduğu görüldü. Cao ve ark.[136] , FRAP yönteminin çalışma içi CV'sini 3,5, çalışmal arası CV'sini 5,6 bulurken; Jansen ve ark. [137] ise 11,4 olarak belirtmiştir. Bu çalışmada FRAP yönteminin her 3 düzeydeki CV'leri literatürdekilere göre daha düşük elde edildi. Erel TAS yönteminin geliştirdiği çalışmasında [115] her 3 düzeyde de bu çalışmada elde edilenden daha düşük çalışma içi ve çalışmal arası CV'ler elde etmiş olmasına rağmen her iki çalışmada da TAS yönteminin CV'lerinin % 4'ün altında olduğu görüldü. Jansen ve ark. [137] ise TAS yönteminin CV'sini hem Erel'in çalışmasına hem de bizim çalışmamıza göre oldukça yüksek bulmuştur. Erel, TAR yönteminin her 3 düzeyde de çalışma içi ve çalışmal arası tekrarlabilirliklerini %3'ün altında olduğunu belirtse de [116] çalışmamızda tüm seviyelerde %10'un üzerinde elde edildi (Tablo 3.8.1-4). TAR yönteminin tekrarlabilirliğinin diğer yöntemlerden daha düşük olması yöntemin prensibinin diğer yöntemlere göre daha fazla basamakta gerçekleşiyor olmasından kaynaklanabilir.

FRAP yöntemi 400 mg/dl, TAS yöntemi 800 mg/dl'nin üzerindeki hemoglobin konsantrasyonlarında %10'dan fazla değişim gösterirken TAR ve TTL yöntemi için bu değer 200 mg/dl idi (Tablo 3.9.1.1-4). Erel, TAR yönteminde hemoliz interferansından bahsetmiş ancak herhangi bir değer vermemiştir [116]. TAS yönteminde ise Erel hemolizin interfere etmediğini belirtirken [115] bu çalışmada 800 mg/dl gibi yüksek hemoglobin konsantrasyonlarından sonra %10'dan fazla değişim gözlenmiştir. TTL yönteminin hemoliz interferansından etkilenmesinin nedeni hemoglobinin spektral absorbanı olabilir çünkü hemoglobinin ışığı en güçlü absorbladığı karakteristik dalga boyu 415 nm'dir. TTL yöntemi ise 412 nm'de spektrofotometrik olarak gözlenir. Bu bulguların aksine Erel en son geliştirdiği modifiye Ellman reaktifi kullanarak tiyolleri ölçtüğü yönteminin hemoliz interferansından etkilenmediğini belirtmiştir [138]. TAR yönteminin diğer değerlendirilen yöntemlerden daha düşük hemoglobin konsantrasyonlarında etkilenmesinin nedeni yöntemin prensibinde oluşan sarı-kahverengi renk olabilir. Yüksek hemoglobin konsantrasyonlarında hemoglobin bu rengin koyulaşmasına neden olarak absorban artışına yol açmış olabilir.

Bilirubin interferans çalışmalarında FRAP yöntemi için 2,5 mg/dl, TAS için 5 mg/dl, TAR için 7,5 mg/dl ve TTL yöntemi için ise 20 mg/dl'nin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında %10'dan fazla değişim saptandı. Bu değişimlerin spektral absorbanstan kaynaklanmadığı söylenebilir. Çünkü bilirubin 340-500 nm dalga boylarında ışığı en iyi absorblar. Bu çalışmadaki yöntemlerin prensiplerindeki dalga boyları bu iki dalga boyuyla eşleşmemektedir. Bilirubinün redüktan bir madde olmasından dolayı hem FRAP hem TAS hem

de TAR yöntemleri bilirubinle interfere olmuş olabilir. Bilirubinün H_2O_2 ile reaksiyona girebilmesinden dolayı TAS ve TAR yöntemlerinde kimyasal interferansa yol açmış olabilir. Ayrıca serum bilirubin konsantrasyonları ile FRAP, TAS ve TAR yöntemleri arasında anlamlı ilişki olduğu görüldü (Tablo 3.11). TTL yönteminin prensibi elektron transferine dayanmadığı için bilirubinün redükten madde olmasından etkilenmemiş olabilir ve serum bilirubin konsantrasyonlarıyla TTL yöntemi arasında bir ilişki yoktu (Tablo 3.11).

Lipemi interferans çalışmalarında FRAP, TAR ve TTL yöntemlerinde test sonuçları 500 lipemi indeksine kadar, TAS yönteminde ise 1000 lipemi indeksine kadar etkilenmedi. Lipemi FRAP, TAS ve TAR yöntemlerini pozitif interfere ederken TTL yöntemini negatif interfere etti.

Serum farklı antioksidan molekülleri içerir. Proteinler serumun ana antioksidan bileşenidir. Proteinlerin serbest sülfhidril grupları onların antioksidan etkilerinden sorumludur [139]. Çalışmada karşılaştırılan antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlerin tamamının serum total protein düzeyi ile istatistiksel açıdan anlamlı pozitif korelasyonu vardı ancak en yüksek ilişki TTL yöntemi ile görüldü (Tablo 3.11). Literatürden elde edilen verilere göre serum total protein içeriğinin FRAP, TAS ve TAR yöntemlerine tahmini katkısı sırasıyla %10, %52,9 ve % 48,89'dur [115-117]. FRAP yöntemi ferrik redükleme yeteneğini ölçer, diğer ET temelli TAS, TAR gibi yöntemlerden farklıdır çünkü yöntemde herhangi bir serbest radikal ya da oksidan yoktur. Bir antioksidanın herhangi bir oksidana karşı antioksidan kapasitesi ferrik demiri ferröz demire redükleme kabiliyetine uymayabilir. Bundan dolayı FRAP yöntemi –SH içeren moleküllere karşı yeterince cevap oluşturamaz [136, 140]. Bu farklılık TAS ve TAR ile elde edilen sonuçlara göre FRAP yöntemi ile daha düşük sonuçlar bulunmasına yol açtı. Şekil 3.3.1'de görüldüğü gibi GSH molekülü FRAP yönteminde neredeyse sıfıra yakın ölçülebilmişken DTT molekülü ise daha fazla –SH içerdiği için GSH'a göre nispeten daha yüksek değerler elde edildi ancak bu DTT değerleri de TAS ve TAR ile ölçülenlerden daha düşüktü. Ayrıca karotenoidlerin de ferrik redükleme yeteneğinin olmadığı bilinmektedir [118]. Beta-karotenin reaksiyon kinetiği GSH ve suyunakine yakın olarak izlendi (Şekil 3.3.1).

Pek çok çalışmada bilirubinün güçlü, fizyolojik bir antioksidan olduğunu, ateroskleroz, koroner arter hastalığı ve inflamasyona karşı koruma sağlayabileceği gösterilmiştir [141, 142]. Literatürden elde edilen verilere göre serum total bilirubin içeriğinin FRAP, TAS ve TAR yöntemlerine tahmini katkısı sırasıyla %5, %2,4 ve % 1,69 olduğu görüldü [115-117]. Çalışmada karşılaştırılan yöntemlerden TTL hariç diğer 3 yöntemin de serum total bilirubin

düzeyi ile anlamlı korelasyonu olduğu görüldü. Bu çalışmada bilirubinin serbest radikal reaksiyonlarına karşı güçlü bir antioksidan molekülü olduğu görüldü. Şekil 3.3.1-4'te görüldüğü gibi bilirubinin antioksidan aktivitesi C vitamini ve trolokstan daha yüksekti.

Ürik asit radikal yakalama ve redükleme yeteneğiyle güçlü bir antioksidan görevi görür [87, 143]. Ürik asidin plazma konsantrasyonu C, E vitamini gibi diğer antioksidanlardan yaklaşık 10 kat daha fazladır [87]. Serum ürik asit konsantrasyonunun FRAP ve TAS yöntemleriyle çok güçlü bir ilişkisinin ($r = 0,952$, $r = 924$, sırasıyla) olduğu görüldü (Tablo 3.11). Ruskovska ve ark. [144] ve Junsen ve ark. da [137] ürik asit ve FRAP ve TAS yöntemleri arasında bu çalışmadakine benzer şekilde anlamlı ve oldukça güçlü korelasyonlar bulmuşlardır. TAR ve TTL yöntemleri ve ürik asit düzeyleri arasında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon yoktu. Junsen ve ark. da [137] TTL ve ürik asit arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığını göstermiştir. Literatürden elde edilen verilere göre serum ürik asit içeriğinin FRAP, TAS ve TAR yöntemlerine tahmini katkısı sırasıyla %60, %33,1 ve % 3,83 olduğu görüldü [115-117].

E vitamini doğada en yaygın bulunan antioksidandır. Alfa-tokoferol ise E vitamininin en iyi bilinen ve en potent antioksidan aktiviteye sahip izomeridir [31]. Tokoferolün antioksidan aktivitesinin lipid peroksidasyonuna karşı membranları korumada yüksek etkiye sahip olduğu bilinmektedir [5]. Literatürden verilerine göre serum alfa-tokoferol içeriğinin FRAP, TAS ve TAR yöntemlerine tahmini katkısı sırasıyla %5, %1,7 ve % 1,88'di [115-117].

Gıdalarda özellikle meyve, sebzelerde, çeşitli bitkilerde ve çayda bulunan fenolik bileşiklerin antioksidan etkileri bilinmektedir [145, 146]. Bir fenolik asit olan gallik asit ile gıdalarda en yaygın bulunan flavonoid olan kateşinin antioksidan etkilerinin yanı sıra antimikrobiyal etkileri de gözlenmiştir [65, 67]. Çalışmada gallik asit ve kateşinin FRAP ve TAS yöntemiyle ölçülen reaksiyon kinetiklerine ve doz bağımlı grafiklerine bakıldığında diğer ölçülen antioksidanlara kıyasla daha güçlü ve daha hızlı antioksidan etkiye sahip oldukları ve daha erken platoya eriştikleri görüldü (Şekil 3.3.1-2, Şekil 3.4.1-2).

Çalışma kapsamında değerlendirilen antioksidan yöntemlerin sonuçları karşılaştırıldığında tablo 3.11'de listelendiği gibi TAS yöntemi FRAP ($r = 0,934$, $p < 0,001$) ve TAR ($r = 0,18$, $p = 0,016$) yöntemleriyle anlamlı korelasyon gösterirken TTL yöntemi ile arasında ilişki yoktu ($r = -0,022$, $p = 0,81$). Benzer şekilde hem Erel hem de Jansen ve arkadaşları TAS ve FRAP yöntemi arasında güçlü bir ilişki bulmuşlardır [115, 137]. FRAP ve TAR yöntemi arasında ilişki yokken TAS ve TAR yöntemi arasında zayıf fakat anlamlı bir ilişki

vardı. Serumun önemli antioksidan bileşenlerinden olan ürik asidin FRAP ve TAS yöntemleriyle güçlü korelasyonunun olması ve TAR ve TTL yöntemleriyle korelasyonunun olmaması yöntemler arasında bulunan ilişkiyi değerlendirmede yardımcı olabilir. TAR yönteminin prensibinden kaynaklanan asidik pH'tan dolayı ürik asit ölçülememiş ya da çok zayıf tespit edilmiş olabilir. TTL yöntemi ise diğer 3 yöntemden farklı mekanizmaya sahip, serbest tiyol gruplarının varlığını yansıtan bir antioksidan metottur. TTL yönteminin ürik asitle ilişkisinin olmaması bu yöntemin hem FRAP hem de TAS yöntemiyle korelasyonunun olmamasını açıklayabilir. Ayrıca FRAP yöntemi –SH içeren molekülleri ölçmede yetersiz olduğu için TTL yöntemi ile korelasyonunun olmaması beklenmedik bir durum değildir.

FRAP, TAS, TAR ve TTL yöntemleri ile çalışılan meme, over ve mide kanserli hastaların serum örneklerinde sonuçların aynı eğilimleri yansıttığı görüldü. Meme kanserli hastaya ait serum örneğinin antioksidan kapasitesi diğer kanserli serum örneklerine kıyasla her dört yöntemde de en yüksek bulunurken, mide kanserli hastaya ait serum örneğinin antioksidan kapasitesi ise en düşük ölçüldü (Şekil 3.2.1-4). Bu sonuçlardan tümöreenez ve karsinoenez durumlarında meydana gelen oksidatif hasarda her dört yöntemin de benzer antioksidan kapasite tayin etkisine sahip olduğu söylenebilir. Miyokard infarktüsülü hastaya ait serum örneğinin antioksidan kapasitesi TAS ve FRAP yöntemleriyle diabetes mellituslu ve hipertansiyonlu hastaların örneklerine göre en yüksek bulunurken TAR ve TTL yöntemleriyle en düşük bulundu (Şekil 3.2.5-8). Ayrıca hipertansiyonlu hastaya ait örneğin antioksidan kapasitesi diğer hasta gruplarıyla karşılaştırıldığında TAR ve TTL yöntemleriyle en yüksek bulunurken, TAS ve FRAP yöntemleriyle orta düzeyde elde edildi (Şekil 3.2.5-8). Miyokard infarktüsü, diyabetes mellitus ve hipertansiyonun patogeneplerinde yer alan çeşitli mekanizmalardan dolayı farklı oksidan ve antioksidan moleküllerin düzeyinin değişiminden dolayı aynı numunelerde farklı sonuçlar elde edilmiş olabilir. Tüm bu sonuçlar göstermektedir ki aynı varlığı yani serumdaki total antioksidan düzeyi ölçmek tasarlanmış olsa da aynı numunelerde yöntemler bazen farklı sonuçlara yol açabilir.

Özetle, TAS yöntemi geniş bir pH aralığında kararlıdır. FRAP ve TAR yöntemi ise daha asidik koşullarda gerçekleşirken TTL yöntemi ise daha bazik koşullarda uygulanır. FRAP yöntemi sadece demir iyonunu temel aldığı için bu reaksiyon spesifik değildir ve glutasyon gibi tiyol bileşikler ölçmede yetersizdir. Ayrıca in vivo olarak antioksidan özellik göstermeyen herhangi bir bileşik bile demiri indirgeyebilir. Bunlara rağmen yöntem basit, ucuzdur ve özel ekipmanlar gerektirmez. TAR yöntemi ise pH'ından dolayı ürik asit gibi serumun önemli bir antioksidan bileşenini ölçmede yetersiz kalmaktadır. Buna ek olarak TAR yönteminin

tekrarlanabilirliği de diğer üç yönteme göre kötüdür ancak diğer yöntemlere daha yüksek lineariteye sahiptir. TAS yöntemi de basit ve uygulamasının kolay olmasından dolayı pek çok laboratuvar da antioksidan kapasite araştırma çalışmalarında kullanılabilir. Hemoliz ve lipemiyi etkilemesinden en az etkilenmesi de bu yöntemin bir avantajıdır. TTL yöntemi ise gözlemlenebilirlik sınırı en düşük, sensitivitesi yüksek ve tekrarlanabilirliği oldukça iyi bir yöntemdir.



5.SONUÇ

Sonuç olarak, antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Her birinin tekniği farklı ilkelere dayanır ve bileşiklerin spesifik gruplarının antioksidan kapasitelerinin belirlenmesini mümkün kılarlar. Bu çalışmada değerlendirilen antioksidan kapasite yöntemlerinin sınırlamaları, güçlü tarafları, avantaj ve dezavantajları açıklanmıştır. Analiz tekniklerinin gücü ve sınırlamaları onların en fazla uygulanabilir oldukları durumları belirler. Total antioksidan kapasiteyi değerlendirirken sonuçlar genellikle benzer eğilimleri yansıtsa da nadir olarak farklı sonuçlara yol açabilirler. Ayrıca in vitro antioksidan kapasite ölçme yöntemlerinin sonuçlarından in vivo'daki durumu tahmin etmek zordur. Halbuki antioksidan kapasiteyi ölçen yöntemlerin koşulları fizyolojik koşullara mümkün olduğu kadar yakın olmalıdır ve kullanılan radikal biyolojik sisteme uygun olmalıdır. Bir bileşiğin antioksidan aktivitesini tayin etmek için standart bir metod yoktur. Antioksidan aktivite tayin metodları çalışılan sistemdeki substrat, reaksiyon koşulları, konsantrasyonlar ve analizlenecek bileşiğin yapısı, analizin hızı, duyarlılığı gibi çeşitli parametrelere bağlı olduğundan, antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde farklı yöntemlerin kullanılması ve sonuçların birlikte değerlendirilmesi daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

1. Halliwell, B., *Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?* The Lancet, 1994. 344(8924): p. 721-724.
2. Halliwell, B., *Oxidants and human disease: some new concepts*. The FASEB journal, 1987. 1(5): p. 358-364.
3. 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.
4. Halliwell, B. and J. Gutteridge, *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. Methods in enzymology, 1990. 186: p. 1.
5. Gutteridge, J., *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clinical chemistry, 1995. 41(12): p. 1819-1828.
6. Halliwell, B., *Free radicals and antioxidants: a personal view*. Nutrition reviews, 1994. 52(8): p. 253-265.
7. Florence, T. *Free radicals, antioxidants and cancer prevention*. in *Proceedings of the Nutrition Society of Australia*. 1990.
8. Zhang, Y., et al., *The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase*. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(27): p. 16330-16336.
9. Hileman, E.A., G. Achanta, and P. Huang, *Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2001. 5(6): p. 697-710.
10. Sloan, J., et al., *Colitis complicating chronic granulomatous disease. A clinicopathological case report*. Gut, 1996. 38(4): p. 619-622.
11. Yu, B.P., *Cellular defenses against damage from reactive oxygen species*. Physiological reviews, 1994. 74(1): p. 139-162.
12. Aruoma, O.I. and B. Halliwell, *Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron. Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?* Biochem. J, 1987. 241: p. 273-278.
13. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiological reviews, 1979. 59(3): p. 527-605.
14. Haber, F. and J. Weiss. *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. in *Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 1934: The Royal Society.
15. McCord, J.M. and I. Fridovich, *The reduction of cytochrome c by milk xanthine oxidase*. Journal of Biological Chemistry, 1968. 243(21): p. 5753-5760.
16. Morehouse, L., C. Thomas, and S. Aust, *Superoxide generation by NADPH-cytochrome P-450 reductase: the effect of iron chelators and the role of superoxide in microsomal lipid peroxidation*. Archives of biochemistry and biophysics, 1984. 232(1): p. 366-377.
17. Kadiiska, M., et al., *Biomarkers of oxidative stress study: III. Effects of the nonsteroidal anti-inflammatory agents indomethacin and meclofenamic acid on measurements of oxidative products of lipids in CCl4 poisoning*. Free Radical Biology and Medicine, 2005. 38(6): p. 711-718.
18. van der Vliet, A., et al., *Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite: evidence for hydroxyl radical production from peroxynitrite*. Febs Letters, 1994. 339(1): p. 89-92.
19. Harrison, J.F., et al., *Oxidative stress-induced apoptosis in neurons correlates with mitochondrial DNA base excision repair pathway imbalance*. Nucleic acids research, 2005. 33(14): p. 4660-4671.
20. Dizdaroglu, M., *Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins*. DNA and free radicals, 1993: p. 19-39.
21. Epe, B., et al., *Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems*. Toxicology letters, 1993. 67(1): p. 57-72.

22. Halliwell, B. and O.I. Aruoma, *DNA and free radicals*. 1993: Ellis Horwood Limited.
23. Wolff, S., M. Crabbe, and P. Thornalley, *The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides*. *Experientia*, 1984. 40(3): p. 244-246.
24. Wolff, S.P. and R. Dean, *Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes*. *Biochem. j*, 1987. 245: p. 243-250.
25. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *The definition and measurement of antioxidants in biological systems*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995. 18(1): p. 125-126.
26. Rice-Evans, C., *15 Screening of Phenolics and Flavonoids for Antioxidant Activity*. *Antioxidant food supplements in human health*, 1999: p. 239.
27. Percival, M., *Antioxidants*. 1998.
28. Gordon, M.H., *The development of oxidative rancidity in foods*. *Antioxidants in food practical applications*, 2001.
29. Heffner, J.E. and J.E. Repine, *Pulmonary strategies of antioxidant defense 1*. *Am. Rev. Respir. Dis*, 1989. 140: p. 531-554.
30. Akkuş, İ., *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Mimoza Yayınları, Konya, 1995
31. Anderson, R., *Prescribing antioxidants*. *Integrative Medicine*. 2nd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2007.
32. Witting, L. and M. Horwitt, *Effect of degree of fatty acid unsaturation in tocopherol deficiency-induced creatinuria*. *The Journal of nutrition*, 1964. 82(1): p. 19-33.
33. 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.
34. Frei, B., et al., *Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma, in Antioxidants in therapy and preventive medicine*. 1990, Springer. p. 155-163.
35. 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.
36. Bendich, A., et al., *The antioxidant role of vitamin C*. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 1986. 2(2): p. 419-444.
37. 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.
38. Laroff, G.P., R.W. Fessenden, and R.H. Schuler, *Electron spin resonance spectra of radical intermediates in the oxidation of ascorbic acid and related substances*. *Journal of the American Chemical Society*, 1972. 94(26): p. 9062-9073.
39. Krinsky, N.I., *Carotenoid protection against oxidation*. *Pure and Applied Chemistry*, 1979. 51(3): p. 649-660.
40. Krinsky, N.I. and S.M. Deneke, *Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids*. *Journal of the National Cancer Institute*, 1982. 69(1): p. 205-210.
41. Packer, J.E., T. Slater, and R. Willson, *Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C*. 1979.
42. Burton, G.W. and K.U. Ingold, *Beta-carotene: an unusual type of lipid antioxidant*. *Science*, 1984. 224(4649): p. 569-573.
43. Al-Turk, W., et al., *Changes in glutathione, glutathione reductase and glutathione-S-transferase as a function of cell concentration and age*. *Pharmacology*, 1987. 34(1): p. 1-8.
44. Ames, B.N., *Dietary carcinogens and anticarcinogens oxygen radicals and degenerative diseases*. *Science*, 1983. 221(4617): p. 1256-1264.
45. 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.
46. Davies, K.J., *Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis*. *Journal of free radicals in biology & medicine*, 1986. 2(3): p. 155-173.

47. Farooqui, M.Y., W.W. Day, and D.M. Zamorano, *Gluthathione and lipid peroxidation in the aging rat*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 1987. 88(1): p. 177-180.
48. 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.
49. Ames, B.N., et al., *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.
50. Cutler, R.G., *Antioxidants and longevity of mammalian species*, in *Molecular biology of aging*. 1985, Springer. p. 15-73.
51. Cadenas, E. and L. Packer, *Handbook of antioxidants*. 1996: Marcel Dekker Inc.
52. Brockman Jr, J.A., et al., *Proposed structures for protogen-A and protogen-B*. Journal of the American Chemical Society, 1954. 76(7): p. 1827-1828.
53. Cremer, D., et al., *Safety evaluation of Î±-lipoic acid (ALA)*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2006. 46(1): p. 29-41.
54. Busse, E., et al., *Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo*. Arzneimittel-Forschung, 1992. 42(6): p. 829-831.
55. Kramer, K., P.-P. Hoppe, and L. Packer, *Nutraceuticals in health and disease prevention*. Vol. 6. 2001: CRC Press.
56. Stryer, L., *Biochemistry*. 4th. Edition. USA, 1995.
57. Yeşilkaya, A., et al., *The effect of bilirubin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in cumene hydroperoxide-treated erythrocytes*. International Journal of Clinical and Laboratory Research, 1998. 28(4): p. 230-234.
58. Bravo, L., *Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance*. Nutrition reviews, 1998. 56(11): p. 317-333.
59. Rice-Evans, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*. Free radical biology and medicine, 1996. 20(7): p. 933-956.
60. 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.
61. Fujii, H., et al., *Acute, subchronic and genotoxicity studies conducted with Oligonol, an oligomerized polyphenol formulated from lychee and green tea extracts*. Food and chemical toxicology, 2008. 46(12): p. 3553-3562.
62. Kurzak, B., H. Kozłowski, and E. Farkas, *Hydroxamic and aminohydroxamic acids and their complexes with metal ions*. Coordination chemistry reviews, 1992. 114(2): p. 169-200.
63. Cuvelier, M.-E., H. Richard, and C. Berset, *Comparison of the antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 1992. 56(2): p. 324-325.
64. Aruoma, O.I., et al., *Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1993. 41(11): p. 1880-1885.
65. Aherne, S.A. and N.M. O'Brien, *Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism*. Nutrition, 2002. 18(1): p. 75-81.
66. Chu, K.O., et al., *Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coulometric array detection and selective solid phase extraction*. Journal of chromatography B, 2004. 810(2): p. 187-195.
67. Veluri, R., et al., *Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives*. Journal of agricultural and food chemistry, 2004. 52(5): p. 1077-1082.
68. Lin, S.-D., E.-H. Liu, and J.-L. Mau, *Effect of different brewing methods on antioxidant properties of steaming green tea*. LWT-Food Science and Technology, 2008. 41(9): p. 1616-1623.
69. Chengelis, C.P., et al., *28-Day oral (gavage) toxicity studies of green tea catechins prepared for beverages in rats*. Food and chemical toxicology, 2008. 46(3): p. 978-989.

70. McCord, J.M. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein*. Journal of Biological chemistry, 1969. 244(22): p. 6049-6055.
71. Beauchamp, C. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels*. Analytical biochemistry, 1971. 44(1): p. 276-287.
72. Gregory, E.M. and I. Fridovich, *Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen*. Journal of Bacteriology, 1973. 114(2): p. 543-548.
73. Feierabend, J. and S. Engel, *Photoinactivation of catalase in vitro and in leaves*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1986. 251(2): p. 567-576.
74. Thomas, C.E. and S.D. Aust, *Rat liver microsomal NADPH-dependent release of iron from ferritin and lipid peroxidation*. Journal of free radicals in biology & medicine, 1985. 1(4): p. 293-300.
75. Wendel, A. and P. Cikryt, *The level and half-life of glutathione in human plasma*. FEBS letters, 1980. 120(2): p. 209-211.
76. 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.
77. Seven, A. and G. Candan, *Antioksidan savunma sistemleri*. Cerrahpaşa Med, 1996. 27: p. 41-50.
78. Sies, H., *Oxidative stress*: Elsevier.
79. Frank, L., et al., *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.
80. Orrenius, S., et al., *Role of Ca²⁺ in toxic cell killing*. Trends in Pharmacological Sciences, 1989. 10(7): p. 281-285.
81. Cochrane, C.G., *Mechanisms of oxidant injury of cells*. Molecular aspects of medicine, 1991. 12(2): p. 137-147.
82. Gutteridge, J.M. and B. Halliwell, *Antioxidants: Molecules, medicines, and myths*. Biochemical and biophysical research communications. 393(4): p. 561-564.
83. Ndhkala, A.R., M. Moyo, and J. Van Staden, *Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules?* Molecules. 15(10): p. 6905-6930.
84. Prior, R.L., X. Wu, and K. Schaich, *Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. 53(10): p. 4290-4302.
85. Sies, H., *Total antioxidant capacity: appraisal of a concept*. The Journal of nutrition, 2007. 137(6): p. 1493-1495.
86. MacDonald-Wicks, L.K., L.G. Wood, and M.L. Garg, *Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2006. 86(13): p. 2046-2056.
87. Ghiselli, A., et al., *Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. 29(11): p. 1106-1114.
88. Huang, D., B. Ou, and R.L. Prior, *The chemistry behind antioxidant capacity assays*. Journal of agricultural and food chemistry, 2005. 53(6): p. 1841-1856.
89. Ou, B., M. Hampsch-Woodill, and R.L. Prior, *Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe*. Journal of agricultural and food chemistry, 2001. 49(10): p. 4619-4626.
90. Wayner, D., et al., *Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins*. FEBS letters, 1985. 187(1): p. 33-37.
91. Prior, R.L. and G. Cao, *In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods 1*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. 27(11): p. 1173-1181.
92. Somogyi, A., et al., *Antioxidant measurements*. Physiological Measurement, 2007. 28(4): p. R41.

93. Wayner, D., et al., *The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987. 924(3): p. 408-419.
94. DeLange, R.J. and A.N. Glazer, *Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents*. *Analytical Biochemistry*, 1989. 177(2): p. 300-306.
95. Valkonen, M. and T. Kuusi, *Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum*. *Journal of Lipid Research*, 1997. 38(4): p. 823-833.
96. Hammes, E., et al., *Light-induced decrease in DCF fluorescence of wheat leaves in the presence of salicyl hydroxamate*. *Protoplasma*, 2005. 227(1): p. 11-15.
97. Gillespie, K.M., J.M. Chae, and E.A. Ainsworth, *Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants*. *Nature Protocols*, 2007. 2(4): p. 867-870.
98. Tomer, D.P., et al., *Comparison of the total oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays*. *Journal of medicinal food*, 2007. 10(2): p. 337-344.
99. Cao, G., H.M. Alessio, and R.G. Cutler, *Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants*. *Free radical biology and medicine*, 1993. 14(3): p. 303-311.
100. Huang, D., et al., *High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2002. 50(16): p. 4437-4444.
101. Huang, D., et al., *Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50(7): p. 1815-1821.
102. Ou, B., et al., *Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50(10): p. 2772-2777.
103. Prior, R.L., et al., *Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003. 51(11): p. 3273-3279.
104. Lopez-Alarcon, C. and E. Lissi, *A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of Pyrogallol Red with peroxy radicals*. *Free radical research*, 2006. 40(9): p. 979-985.
105. Lopez-Alarcon, C. and E. Lissi, *Interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. A basis for a simple methodology for the evaluation of antioxidant capabilities*. *Free radical research*, 2005. 39(7): p. 729-736.
106. Burda, S. and W. Oleszek, *Antioxidant and antiradical activities of flavonoids*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001. 49(6): p. 2774-2779.
107. Ursini, F., et al., *Postprandial plasma lipid hydroperoxides: a possible link between diet and atherosclerosis*. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998. 25(2): p. 250-252.
108. Ordoudi, S.A. and M.Z. Tsimidou, *Crocin bleaching assay step by step: observations and suggestions for an alternative validated protocol*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2006. 54(5): p. 1663-1671.
109. Lussignoli, S., et al., *A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma*. *Analytical Biochemistry*, 1999. 269(1): p. 38-44.
110. Miller, N.J., et al., *A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates*. *Clinical science*, 1993. 84: p. 407-407.
111. Re, R., et al., *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free radical biology and medicine*, 1999. 26(9): p. 1231-1237.
112. Rice-Evans, C. and N.J. Miller, *[241 Total antioxidant status in plasma and body fluids*. *Methods in enzymology*, 1994. 234: p. 279-293.

113. van den Berg, R., et al., *Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures*. Food Chemistry, 1999. 66(4): p. 511-517.
114. Arnao, M., A. Cano, and M. Acosta, *Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology*. Recent Re Devel Agric Food Chem, 1998. 2: p. 893-905.
115. Erel, O., *A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation*. Clinical biochemistry, 2004. 37(4): p. 277-285.
116. Erel, O., *A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions*. Clinical biochemistry, 2004. 37(2): p. 112-119.
117. Benzie, I.F. and J. Strain, *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Analytical biochemistry, 1996. 239(1): p. 70-76.
118. Pulido, R., L. Bravo, and F. Saura-Calixto, *Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2000. 48(8): p. 3396-3402.
119. Blois, M.S., *Antioxidant determinations by the use of a stable free radical*. 1958.
120. Brand-Williams, W., M. Cuvelier, and C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*. LWT-Food Science and Technology, 1995. 28(1): p. 25-30.
121. Ozcelik, B., J. Lee, and D. Min, *Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*. Journal of Food Science, 2003. 68(2): p. 487-490.
122. Singleton, V.L. and J.A. Rossi, *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents*. American journal of Enology and Viticulture, 1965. 16(3): p. 144-158.
123. Vinson, J.A., et al., *Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001. 49(11): p. 5315-5321.
124. Wang, M., et al., *Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (Cynara scolymus L.)*. Journal of agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(3): p. 601-608.
125. Cai, R., N. Hettiarachchy, and M. Jalaluddin, *High-performance liquid chromatography determination of phenolic constituents in 17 varieties of cowpeas*. Journal of agricultural and food chemistry, 2003. 51(6): p. 1623-1627.
126. Jayasinghe, C., et al., *Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (Ocimum basilicum L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003. 51(15): p. 4442-4449.
127. Apak, R., et al., *Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004. 52(26): p. 7970-7981.
128. 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.
129. Hu, M.-L., *[41] Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma*. Methods in enzymology, 1994. 233: p. 380-385.
130. Magalhaes, L.s.M., et al., *Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties*. Analytica chimica acta, 2008. 613(1): p. 1-19.
131. Scalzo, J., B. Mezzetti, and M. Battino, *Total antioxidant capacity evaluation: critical steps for assaying berry antioxidant features*. Biofactors, 2005. 23(4): p. 221-227.
132. Niki, E., *Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo*. Free Radical Biology and Medicine. 49(4): p. 503-515.
133. Alam, M.N., N.J. Bristi, and M. Rafiquzzaman, *Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity*. Saudi Pharmaceutical Journal. 21(2): p. 143-152.
134. Bartosz, G., *Non-enzymatic antioxidant capacity assays: limitations of use in biomedicine*. Free radical research. 44(7): p. 711-720.
135. Wright, J.S., E.R. Johnson, and G.A. DiLabio, *Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants*. Journal of the American Chemical Society, 2001. 123(6): p. 1173-1183.

136. Cao, G. and R.L. Prior, *Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum*. *Clinical chemistry*, 1998. 44(6): p. 1309-1315.
137. Jansen, E.n.H. and T. Ruskovska, *Comparative analysis of serum (anti) oxidative status parameters in healthy persons*. *International journal of molecular sciences*. 14(3): p. 6106-6115.
138. Erel, O. and S. Neselioglu, *A novel and automated assay for thiol/disulphide homeostasis*. *Clinical biochemistry*. 47(18): p. 326-332.
139. Balcerczyk, A., et al., *Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity*. *Biofactors*, 2003. 17(1-4): p. 75-82.
140. Janaszewska, A. and G. Bartosz, *Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma*. *Scandinavian journal of clinical & laboratory investigation*, 2002. 62(3): p. 231-236.
141. Wang, W.W., D.L. Smith, and S.D. Zucker, *Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxin in rats*. *Hepatology*, 2004. 40(2): p. 424-433.
142. Mayer, M., *Association of serum bilirubin concentration with risk of coronary artery disease*. *Clinical chemistry*, 2000. 46(11): p. 1723-1727.
143. Sevanian, A., K. Davies, and P. Hochstein, *Serum urate as an antioxidant for ascorbic acid*. *The American journal of clinical nutrition*, 1991. 54(6): p. 1129S-1134S.
144. Ruskovska, T., E.H. Jansen, and R. Antarov, *Evaluation of assays for measurement of serum (anti) oxidants in hemodialysis patients*. *BioMed research international*. 2014.
145. Benzie, I., et al., *Consumption of green tea causes rapid increase in plasma antioxidant power in humans*. *Nutrition and cancer*, 1999. 34(1): p. 83-87.
146. Leenen, R., et al., *A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans*. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2000. 54(1): p. 87-92.

ÖZGEÇMİŞ

1986 Konya doğumluyum. İlköğrenimimi Mahmut Şevket Paşa ilkokulunda, orta ve lise öğrenimimi ise Karatay Anadolu Lisesinde tamamladım. 2004 yılında girdiğim Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinden 2010 yılında mezun oldum. 2010 yılında Eylül-Ekim aylarında Muş Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesinde pratisyen hekim olarak çalıştım. 2011 yılının Ağustos ayından beri Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümünde asistan olarak görev yapmaktayım.

