

**T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

**MANİSA VE YÖRESİNDEKİ SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM
PARAOKSONAZ, ARİLESTERAZ VE LİPİD HİDROPEROKSİD
REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Sezen IRMAK GÖZÜKARA**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zeki ARI**

Manisa, 2013

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	IV
KISALTMALAR	V
I. GİRİŞ VE AMAÇ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
II.1. Referans Değer ve Referans Aralığının Tanımı	2
II.2. Referans Birey	3
II.2.1. Referans Bireyin Tanımı	3
II.2.2. Referans Bireylerin Seçilmesi	3
II.2.2.1. Direkt Örnekleme Yöntemi	5
II.2.2.2. İndirekt Örnekleme Yöntemi	7
II.2.3. Referans Kitesinin Gruplandırılması	8
II.3. Kan Örneklerinin Alınması	9
II.4. Kan Örneklerinin Transferi ve Ayrılması	10
II.5. Referans Değerlerin İstatistiksel Analizi	10
II.5.1. Verilerin Toplanması	11
II.5.2. Referans Değerlerin Gruplara Ayrılması	11
II.5.3. Referans Gruplardaki Veri Sayısının Önemi	13
II.5.4. Dağılımın İncelenmesi	14
II.5.5. Aşırı Uçlarda Gözlenen Değerlerin Belirlenmesi	15
II.5.6. Referans Kitesi Dağılım Tipinin Değerlendirilmesi	16
II.5.7. Referans Sınırların Saptanması	18
II.5.7.1. Parametrik Yöntemler	20
II.5.7.2. Non-Parametrik Yöntemler	21
II.6. Veri Transformasyonu	21
II.7. Referans Aralıklarının Transfer Edilebilirliği	22
II.8. Oksidatif Stres	23
II.8.1. Serbest Radikaller	23
II.8.2. Reaktif Oksijen Partiküllerinin Sınıflandırılması	25
II.8.3. Lipid Peroksidasyonu ve Lipid Hidroperoksid	26
II.9. Antioksidan Savunma Sistemleri	30

II.9.1. Paraoksonaz ve Arilesteraz Enzim Grubu	30
II.9.1.1. Paraoksonaz Enzimi	30
II.9.1.2. Enzimin Adlandırılması	32
II.9.1.3. Paraoksonaz Gen Ailesi	33
II.9.1.4. Paraoksonaz 1(PON1)	33
II.9.1.4.1. PON1'in Biyokimyasal Yapısı	33
II.9.1.4.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması	35
II.9.1.4.3. PON1'in Sentez ve Salgılanması	36
II.9.1.4.4. PON1'in Fonksiyonel Önemi	37
II.9.1.5. PON2	40
II.9.1.6. PON3	41
II.9.2. Arilesteraz Aktivitesi	41
III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	43
III.1. Çalışma Grubu	43
III.2. Araç ve Gereçler	43
III.3. Yöntemler	44
III.3.1. Paraoksonaz Ölçümü	44
III.3.2. Arilesteraz Ölçümü	45
III.3.3. Lipid Hidroperoksid Ölçümü	46
III.4. İstatistiksel Analizler	47
IV. BULGULAR	48
V. TARTIŞMA	62
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	74
VII. ÖZET	76
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	77
IX. EKLER	78
X. KAYNAKLAR	81

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda geçirdiğim uzmanlık eğitimi süresi boyunca verdikleri destek ve katkılarından dolayı tez hocam ve danışmanım Prof.Dr. Zeki ARI başta olmak üzere değerli hocalarım Prof.Dr. Fatma TANELİ'ye, Prof.Dr. Ece ONUR'a, Prof.Dr. Cevval ULMAN'a, Prof.Dr. Ahmet VAR'a, Yrd.Doç.Dr. Yeşim GÜVENÇ'e,

Yardımlarından dolayı Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Erhan ESER'e ve Sağlık Yüksek Okulu Biyokimya Öğretim Üyesi Doç.Dr.Funda KOSOVA'ya,

Dört yıl boyunca çalışmalarımızı uyumlu bir şekilde yürüttüğümüz tüm asistan ve teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili anneme, babama ve kardeşlerime,

Bu süreçte gösterdiği destek ve sabır için, varlığıyla, sevgi ve şefkatiyle beni onurlandıran sevgili eşim Ceyhun'a,

En içten sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Sezen IRMAK GÖZÜKARA

KISALTMALAR

ARE: Arilesteraz

CLSI: Klinik ve Laboratuar Standartları Enstitüsü

CAT: Katalaz

CV: Varyasyon katsayısı

DFP: Diizopropil florofosfat

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

FAD: Flavin adenin dinükleotid

GSH: Glutatyon(redükte)

GSH-Px: Glutatyon peroksidaz

GSSG: Glutatyon(okside)

GST: Glutatyon-S-Transferaz

HLA: Histokompabilite Antijeni

HDL: Yüksek dansiteli lipoprotein

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HOCl: Hipoklorik Asit

IFCC: Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu

K-S: Kolmogorov-Smirnov Testi

LO[•]: Alkoksil radikali

LOO[•]: Peroksil Radikali

LOOH: Lipid Hidroperoksid

LDL: Düşük Dansiteli Lipoprotein

LPS: Lipopolisakkarit

MDA: Malondialdehid

NaCl: Sodyum klorür

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat(redükte)

NCCLS: ABD Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi

NCBI: Ulusal biyoteknoloji enformasyon merkezi

OP : Organofosfat

O₂⁻ : Süperoksid radikali

OH⁻: Hidroksil radikali

PHGPX: Fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz

PON: Paraoksonaz

PUFA: Çoklu doymamış yağ asidi

ROO⁻.: Peroksil radikali

ROP: Reaktif oksijen partikülleri

SD: Standart Sapma

SOD: Süperoksid Dismutaz

SPSS: Statistical Package for Social Sciences(istatistik programı)

UV: Ultraviyole

X²: Ki-kare testi

VKİ: Vücut kitle indeksi

I. GİRİŞ VE AMAÇ

Klinik laboratuvarlarda elde edilen sonuçlar, referans aralığı değerleri göz önünde bulundurularak yorumlanır. Klinisyenin sonuçlardan verimli bir şekilde yararlanabilmesi için, sonuçların doğru ve güvenilir referans aralıkları içerisinde sunulması gerekir.

Referans aralıklarının belirlenmesi, ABD Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards: NCCLS) ve Uluslar Arası Klinik Kimya Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry: IFCC) önerilerine göre yapılmaktadır. Aynı şekilde referans bireylerinin seçimi de NCLSS ve IFCC ilgili dokümanlarında standardize edilmiştir(1-3).

Her analit için, üreten firma tarafından belirlenmiş bir referans aralığı mevcuttur. Ancak bu aralık, hizmet sunduğumuz toplumun referans değerleriyle her zaman örtüşmemektedir. Bu nedenle hizmet verdiğimiz populasyonun referans değerlerini belirlememiz ve bu değerleri kullanmamız gerekir(4).

Referans aralık belirlemenin gereklilikleri; yeni bir analitik ölçümün yapılmaya başlanması, daha önce referans veya fizyolojik değerleri bilinen bir analitin, farklı veya yeni bir metotla ölçülmeye başlanması ve referans değeri başka laboratuvarlarca (üretici de olabilir) belirlenmiş bir analitin, aynı veya mukayese edilebilir başka metotlarla ölçülmesi durumunda mevcut verinin transferi şeklinde sıralanmaktadır(5).

Bizim bu çalışmada amacımız, laboratuvarımızda ve diğer birçok laboratuvarında rutin olarak çalışılmayan, bu yüzden güvenilir bir referans aralığı tanımlanmamış olan, ancak birçok hastalıkla ilişkisi tanımlanmış serbest oksijen partiküllerinden biri olan Lipid hidroperoksid (LOOH) ve lipid peroksidleri hidrolize ederek LDL'yi oksidasyondan koruyan Paraoksonaz (PON) ve Arilesteraz (ARE) testlerinin Manisa ve yöresine ait referans aralıklarını belirlemek ve bu testlerin rutin çalışılabilmesi amacıyla ölçüm yöntemlerini laboratuvarımıza kurmaktır.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. Referans Değer ve Referans Aralığının Tanımı

Referans aralığının tanımı; “klinik tanı laboratuvarlarının, karşılaştırmaya dayanan testleri için, sağlıklı toplumdaki elde edilen “sağlıklı olmakla ilişkili” değer aralığının, gerekli en az düzeydeki şartları sağlayacak şekilde güvenli ve kullanışlı olacak biçimde belirlenmesi” şeklinde yapılabilir. Referans aralığı tanımlanması yalnızca sağlıklı bireyleri belirlemek için değil, belirli fizyolojik ve patofizyolojik durumları temsil etmek üzere de yapılabilir. Preanalitik şartların değişkenliği, kullanılan yöntem ve materyallerin çeşitliliği, laboratuvarlarda görevli uzmanların eğitim ve uygulama konusundaki farklılıkları, pratikte laboratuvarlar arası farklılıkların oluşmasına neden olabilmektedir(6). Referans değer tanımı NCCLS'nin ilgili dokümanında ise şöyle yapılmaktadır: “Bir referans bireyinde belirli bir fenotipin gözlemlenmesi ya da ölçülmesi yolu ile elde edilen değerdir”(1). IFCC ise “referans değerler” terimini, “belirli bir kantite için tanımlanmış tek bir bireyden veya gruptan elde edilen değerlerdir” şeklinde tanımlar ve bu terimin kullanılmasını önerir. Bununla ilişkili olarak referans birey, referans değer, referans dağılımı, referans sınır, referans aralık ve gözlenen değerler terimlerini de önermektedir(7).

Dolayısı ile örnek bir gruptan seçilen referans bireyler bir araya getirilerek, bir referans kitlesi oluşturulabilir. Bu değerler bir dağılım oluşturur ve bu dağılım istatistiksel analize tabi tutulduğunda dağılımın belli bir bölümünü sınırlandıran alt ve üst değerlerin içine aldığı kesim dağılımının belli bir yüzdesini ifade eder(8).

Bu arada, yukarıda adı geçen terimlerin, IFCC'nin önerdiği terminolojiye göre tanımı aşağıdaki gibidir(8,9):

Referans değer: Referans örnek grubundaki bireylerde yapılan özel ölçümler veya gözlemlerin sonucunda elde edilen değerlerdir.

Referans dağılımı: Referans değer verilerinin istatistiksel dağılımıdır.

Referans sınır: Referans dağılımdan bulunur ve tanımlayıcı amaç için kullanılır.

Referans aralığı: Alt ve üst referans sınırları içine alan aralıktır. Bazı durumlarda tek bir referans sınır önemli olabilir. Bu durumlarda, genellikle üst sınır (X) önemlidir ve referans aralık, sıfır ile üst sınır arasındadır (0-X).

Gözlenen değerler: Gözlem ve ölçümle belirlenen, tıbbi referans değerler, referans dağılım, referans sınırları ve aralıklarıyla karşılaştırılarak tıbbi karar vermek için kullanılan sayısal değerdir.

Referans değerler terimi, önüne değerlerin hangi temele göre elde edildiğini veya neyi / hangi grubu temsil ettiğini gösterir bir sıfat (sağlıkla ilişkili referans değerler, diyabetik hastalar, yatan diyabetik hastalar ve ayaktan tedavi gören diyabetik hastalar) eklenerek kullanılmaktadır. Bu sıfatlar her referans değerinin sağlıklı popülasyona ilişkin olmadığını kanıtlamaktadır(7).

Diğer bir ayırım da bireyin ve popülasyonun referans değerleri arasındadır. Bireyin referans değeri bireyin daha önce tanımlanmış sağlık durumuna ilişkin kendisinin değeridir. Popülasyonun referans değeri ise, tanımlanmış sağlık durumundaki birey grubundan elde edilmiş değerlerdir ve referans değerlerinin başına hiçbir sıfat konmadan kullanıldığı zaman popülasyonun referans değerleri kastedilmektedir(7).

II.2. Referans Birey

II.2.1. Referans Bireyin Tanımı

Referans birey, iyi tanımlanmış kriterlere göre seçilmiş kişidir(5).

II.2.2. Referans Bireylerin Seçilmesi

Referans bireyler grubuna hangi bireylerin seçileceği bir dizi kriter ile belirlenir. Bu kriterler referans popülasyonun tanımını, sağlık veya ilgilenilen hastalık için spesifikasyonları içerir(8). Tablo 1'de sağlıkla ilişkili referans bireylerin seçimi için önemli olan dışlama kriterleri belirtilmektedir.

Tablo 1: Sağlıkla İlişkili Referans Değerleri İçin Dışlama Kriterlerine(8,10).

Hastalık	
Risk faktörleri	Obezite Hipertansiyon Çevresel ve mesleki riskler Genetik olarak belirlenen riskler
Farmakolojik olarak aktif ajanların alınması	Hastalık ve rahatsızlık için ilaç tedavisi Oral kontraseptifler İlaç bağımlılığı Alkol Tütün
Özel fizyolojik durumlar	Gebelik Stres Yoğun egzersiz

Referans bireylerin seçiminde çeşitli metotlar (direkt-indirekt, önceden belirleme-sonradan seçme, random-nonrandom) kullanılabilir. Referans değer belirlemede direkt yöntemin kullanılması, IFCC ile görüş birliğine varılan tek yöntemdir(5).

Yukarıda yapılan açıklamalarda değinildiği gibi öncelikle referans popülasyonunun iyi belirlenmesi gerekir. Bu popülasyon kişinin kendisi (kişinin sağlıklı dönemlerinde elde edilmiş olan test sonuçları), hastane dışı (sağlıklı varsaydığımız popülasyon) veya hastane popülasyonu olabilir. Hatta daha spesifik değerlere ulaşmak isteniyorsa, hasta grupları bile ayrı popülasyonlar olarak ele alınabilirler(8).

Referans popülasyonu, istatistiksel bir çalışmada genelde varsayılan ve hedef alınan, ancak ulaşılması çok zor ya da imkânsız olan kitleyi temsil eder. İdeal olan; tüm popülasyonun muayene edilmesi ve kriterlere uyanlar arasından rastgele referans bireylerin belirlenmesidir. Fakat bu birçok nedenden dolayı pratikte mümkün değildir(7). Bundan dolayı referans popülasyonunu en iyi şekilde temsil eden referans bireylerin seçiminde birkaç yöntem geliştirilmiştir.

II.2.2.1. Direkt Örnekleme Yöntemi

Bireylerin ana toplumdaki tanımlanmış kriterlere göre seçimidir. IFCC ve NCCLS'nin referans değerlerin hesaplanmasıyla ilgili standartları referans bireylerin direkt örnekleme ile seçilmelerini önermektedir. Bu yöntemde, belirlenmiş kriterlere göre hazırlanan anket formları doldurulup, sonra bireylerin tetkikleri yapılır. Tablo 2'de NCCLS C28-A standartlarına uygun olarak, örnek anket formundan yararlanılarak hazırlanan anket formu görülmektedir(1).

Tablo 2: Referans Aralık Saptama Anket Formu(11).

TÜM BİLGİLER KESİNLİKLE GİZLİ TUTULACAKTIR VE SİZİN KAN ÖRNEĞİNİZDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN KULLANILACAKTIR.					
ÖRNEK NO:	ÖRNEK ALINDIĞI SAAT:	(LABORATUVAR TARAFINDAN DOLDURULACAKTIR)			
YAŞ: (YIL)	CİNSİYET:	IRK:	BOY: (m)	(cm)	AĞIRLIK: (kg)
KENDİNİZİ SAĞLIKLI HİSSEDİYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
DÜZENLİ OLARAK EGZERSİZ YAPIYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EVET İSE NE KADAR SIKLIKTA?					(SAAT/HAFTA)
AKTİVİTENİN DEREJESİ?					(HAFİF) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (AĞIR)
SON ZAMANLARDA HİÇ RAHATSIZLANDINIZ MI?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NE ZAMAN? VE NEDEN?					
REÇETE EDİLMİŞ İLAÇ ALIYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NE? SÜRESİ:					
EN SON İLAÇ NE ZAMAN ALDINIZ? ADI:					
VİTAMİN İLACI ALIYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NE SIKLIKTA?					
İŞİNİZDE TEHLİKELİ KİMYASAL MADDELERE MARUZ KALIYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NE? SÜRESİ:					
SİGARA KULLANIYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NE KADAR? SÜRESİ:					
ÖZEL DİYET UYGULUYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EĞER EVET İSE LÜTFEN TANIMLAYINIZ: SÜRESİ:					
HANGİ TİP TUZ KULLANIYORSUNUZ?					(İYOTLU-İYOTSUZ)
ALKOL KULLANMA ALIŞKANLIĞINIZ VAR MI?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NE ŞEKİLDE? HANGİ SIKLIKTA? SÜRESİ:					
EN SON ALKOL NE ZAMAN ALDINIZ?					
BİR DOKTOR KONTROLÜ ALTINDA MİSİNİZ?					(E) (H)
EĞER EVET İSE NEDEN VE NE SIKLIKTA?					
RAHATLATICI İLAÇ KULLANIYOR MUSUNUZ?					(E) (H)
EVET, İSE NE? HANGİ SIKLIKTA? SÜRESİ:					
SON ZAMANLARDA HASTANEYE YATTINIZ MI?					(E) (H)
NE ZAMAN? NEDEN?					
AİLENİZDE GEÇİRİLMİŞ BİR HASTALIK VAR MI?					(E) (H)

EĞER VAR İSE KİM VE SİZE YAKINLIĞI?	
SON GÜNLERDE ASPİRİN YA DA AĞRI KESİCİ ALDINIZ MI?	(E) (H)
EĞER EVET İSE NE? NE ZAMAN?	
SON GÜNLERDE SOĞUK ALGINLIĞI VE ALLERJİ TEDAVİSİ GÖRDÜNÜZ MÜ?	(E) (H)
EĞER EVET İSE HANGİSİ VE ALDIĞINIZ İLAÇLAR? NE ZAMAN?	
SON GÜNLERDE HIÇ ANTİASİT VEYA MİDE İLACI ALDINIZ MI?	(E) (H)
EĞER EVET İSE NE? NE ZAMAN?	
DIYETE YÖNELİK İLAÇ KULLANIYOR MUSUNUZ?	(E) (H)
EĞER EVET İSE SÜRESİ:	
KADINLAR İÇİN	
ADET GÖRÜYOR MUSUNUZ?	(E) (H)
EĞER EVET İSE, EN SON ADET TARİHİNİZ NEDİR?	
EĞER HAYIR İSE, HORMON REPLASMAN TEDAVİSİ ALIYOR MUSUNUZ?	(E) (H)
EĞER VARSA, BEBEĞİNİZİ EMZİRİYOR MUSUNUZ?	(E) (H)
ORAL KONTRASEPTİF KULLANIYOR MUSUNUZ?	(E) (H)
EĞER EVET İSE HANGİSİ?	

Bireyler seçilirken bu faktörlerin etkisi altında olup olmadığına bakılır, bu kriterler seçim esnasında uygulamanın yönüne göre iki şekilde kullanılabilir;

Test öncesi örneklem (A priori); Örneklem içinden, tanımlanmış katılım kriterlerine uygunluklarına göre bireylerin direkt metotla seçilmesidir(8).

Analiz yöntemi ile ilgili bilgiler çok sayıda ve çok iyi biliniyorsa bu yöntem tercih edilir. İleriye dönük bir ayıklamadır(9).

Test sonrası örneklem (A posteriori); Çok sayıda bireyin sonuçlarını içeren iyi düzenlenmiş, elimizdeki tüm koşulları sağlayan demografik bir veri tabanından tanımlanmış katılım kriterlerine uyan bireylerin direkt metotla seçilmesidir(8). Analiz yöntemi ayrıntılı bilinmiyor ve hakkında yeterli bilgi toplanamıyorsa önce bireylerden örnek alınır. Analiz yapıldıktan sonra, ayırma ve alt gruplara bölme işlemi yapılır(9). Eğer veritabanı iyi düzenlenmemişse, yüzeysel ve kulaktan dolma bilgilerle referans bireyi seçimi yapılamaz. Bu durumda indirekt örneklendirme yapmak ve istatistiksel analiz metodunu da buna göre seçmek daha doğrudur(8). A priori ve A posteriori örneklem yaparken bireyler iki şekilde seçilir:

Rastgele örneklem; Her bireye eşit seçilme şansı veren bir işlemdir. Referans grup oluşturulmasında bireylerin rastgele olması daha uygundur. Çünkü grubun hepsinin referans grubu kriterlerini sağladığı düşünülür. Elde

edilen veriler istatistiksel analiz ile değerlendirilir. Fakat bu şekildeki çalışmanın gerçek hayatta uygulanması zordur. Bu amaçla genellikle kan donörlerinden ve hastane çalışanlarından grup oluşturularak referans aralık hesaplanması sık yapılan, ancak rastgele örneklem tanımına uymayan bir işlemdir(9).

Rastgele olmayan örneklem; Bireylere eşit olmayan seçilme şansı veren bir işlemdir. Bu, çoğunlukla uygulanan bir yöntemdir.

II.2.2.2. İndirekt Örneklem Yöntemi

Bireylere dikkat edilmeksizin, analiz sonuçlarının kayıtlı bulunduğu veritabanından belli kurallara uygun şekilde test sonuçlarının seçimidir. Ancak yukarıdaki ölçütlere göre bir ayıklama yapılmaksızın veriler olduğu gibi alınır. Bu yöntem daha pratik bir yöntem olmakla beraber toplanan veri kitlesinin istatistiksel analizi daha farklı işlemler gerektirir(8).

İndirekt örneklendirmenin temel prensibi şuna dayanmaktadır: Klinik laboratuvarlarda üretilen sonuçların çoğunluğu tam olarak Gaussian bir dağılım göstermeseler bile, normale yakın bir dağılım halinde çıkmaktadır. Çok fazla sapma veya herhangi bir gruplaşma olmamak şartı ile bu dağılımın içindeki gerçekte Gaussian tipe uyan bölümü alınabilir. Bu amaçla, indirekt örneklendirme ile toplanan verileri değerlendirebilen çeşitli istatistiksel analiz yöntemleri tanımlanmıştır. Bu metotlar bilgisayar sistemlerinin yardımı ile de oldukça kolay uygulanır hale gelmiş ve yaygınlaşmışlardır(8). Ancak bu yöntemlerin de bazı dezavantajları bulunmaktadır. Çünkü bu konuda tanımlanmış birden fazla yöntem vardır ve elde edilen alt ve üst referans limitleri tamamıyla o yöntemde kullanılan matematiksel metoda bağlı kalmaktadır. Bir diğer dezavantaj ise özellikle bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir; elde edilen referans aralıkları o hastanenin belli bir dönemini yansıtmakta ve değerler hastaneden hastaneye farklılıklar gösterebilmektedir(12-14). Bu şekilde saptanan referans aralıklarının daha genel bir hasta popülasyonuna uygulanması sakıncalı görülmektedir.

İndirekt örneklendirme yoluyla veri toplanmasında da uyulması gereken bazı hususlar vardır(8); bunları şöyle sıralayabiliriz:

1. Kullanılan örnek dağılım, referans popülasyonunun bir parçası olmalıdır. Bunun için en uygun yöntem hasta verileri seçilirken hastane kayıtlarının kullanılmasıdır. Buradan taburcu edildiği andaki tanısı ve demografik bilgileri elde edilebilir.
2. Örnek referans dağılımı ünimodal olmalıdır, ancak yatık bir dağılım olabilir. Dağılımın içinde homojeniteyi bozacak gruplaşmalar olmamalıdır.
3. Verilerin yoğunlaştığı bölge, dağılımın moduna uymalıdır. Moddan uzak bölgedeki birikmeler büyük olasılıkla hastalıkla ilişkili verilerdir.
4. Total dağılım ile örnek dağılımın modları birbirlerine yakın olmalıdır.

Görüldüğü gibi indirekt yöntem, direkt yöntemden daha kolaydır, sonuçta herhangi bir veri seçimi yapılmamaktadır. Ancak dağılımda bimodal görünüm ortaya çıkarsa, kesinlikle hasta tanısı ve demografisi kullanılarak muhtemel gruplaşmalar engellenmelidir.

Referans değerler belirlenirken projenin amacına göre bu örneklem stratejilerinden biri, diğerlerine üstün olabilir. Buna göre hangi metodun kullanıldığı, uygulama sonrası belirtilmelidir(8).

Sonuç olarak, her iki yolla da örnekleme yapılabilir ve bunlara göre seçilen referans bireyleri de farklı istatistiksel metotlarla değerlendirilebilir. Ne kadar sağlıklı bir veri seçimi yapılırsa daha sonraki basamaklarda, dağılımlarda gruplaşmaya ve uç değerlere o kadar az neden olur. Sıklıkla kullanılan bir diğer kriter de hastanın taburcu olduğu andaki kaydına geçen tanısıdır. Genellikle bu tanı kullanılarak hastanın tüm test sonuçları yerine, bazı test sonuçları dışlanmakta ve o tanıda belirtilen patolojinin etkilemediği test sonuçları örnek referans kitlesine dahil edilmektedir(8). Bu yöntem aslında bir çeşit A posteriori örneklemedir ve yapılan şey hastanın demografik bilgilerinin yanı sıra tanısının da kullanılmasıdır.

II.2.3. Referans Kitesinin Gruplandırılması

Veri setinin gruplandırılması referans aralığı hesaplanmasında önemli bir noktadır. Gaussian dağılımlara uyan ve modülasyona uğramayan verilerde gruplandırmaya gerek yoktur. Elde edilen verilerin Gaussian

dağılıma uyması arzu edilir(15). Ancak biyolojik veriler genellikle Gaussian dağılımlara uymazlar ve sağa ya da sola yatık dağılırlar. Çünkü biyolojik verilerde modülasyona yol açan faktörler çok fazladır. Dağılımlardaki bu gruplaşmanın nedeni olan faktörler Tablo 3'te sıralanmıştır.

Tablo 3: Referans Kitlesindeki Gruplaşmaya Yol Açan Faktörler(7).

Yaş	Örnek alınırkenki vücut postürü
Kan grubu	İrk
Biyoritm	Cinsiyet
Diyet	Menstrüel siklus
Açlık veya tokluk	Gebelik
Egzersiz	Örnek alım saati
Coğrafi yerleşim	Tütün kullanımı

Bu faktörler de ilgili NCCLS dokümanında belirtilmiştir(1). Dikkat edilirse bazı faktörler Tablo 1'de belirtilen dışlama kriterleri ile aynıdır. Bu faktörlerin etkileri değişebilmektedir. Yaş ve cinsiyet en fazla kullanılan kriterlerdir. Bir çalışmada dışlama kriteri kabul edilen bir faktör başka bir çalışmada dağılımları gruplara ayırmada kullanılabilir. Çalışmanın sonunda istatistiksel olarak gruplar arasında önemli bir fark olup olmadığına bakılabilir, bu amaçla Student's t-test kullanılan en yaygın analiz yöntemidir. Bu test iki farklı grubu karşılaştırmada kullanılır; ANOVA (Analysis Of Variance; Varyans Analizi) yöntemi ise ikiden fazla grubun olduğu durumlarda kullanılmaktadır(7).

II.3. Kan Örneklerinin Alınması

Bilindiği gibi kan alımında standardizasyon önemlidir. Her ölçüm öncesi preanalitik faktörlerin tam olarak ele alınması ve tüm aşamaların standardize edilmesi gerekmektedir. Bunlar yapılmadığı takdirde dağılımların gruplaşması kaçınılmaz olacaktır(7). NCCLS bu gibi örnek tiplerinin standardize edilmiş koşullar altında alınması için prosedürler yayımlamaktadır.

Kan alımından bir gün önce:

Yiyecek alımı her zamanki gibi olmalıdır. Saat 22:00'den sonra yiyecek alınmaması gerekmektedir. En fazla bir bardak su içilebilir.

Ayaktan hastalarda sabah kan alımı:

Kan alımından 1-3 saat önce kalkmış olma, en fazla 45 dak. ulaşım süresi veya 500 metre yürüyüş, en az 15 dak. oturma ve ağır kol/kas aktivitesi yapılmaması, kanın 08:00-10:00 saatleri arasında alınması ve alınırken oturma pozisyonunda, kol yatay pozisyonunun 45 derece altında olması gerekmektedir(16).

II.4. Kan Örneklerinin Transferi ve Ayrılması

Alınan kan örneğinin pıhtılaşması beklendikten sonra serumu ayrılmalıdır. Çok erken safhada, bekletilmeden ayrılan serumlarda fibrin oluşumu devam eder, bu da otoanalizörlerde tıkanma veya ölçüm hatalarına yol açabilir. 20-30 dakika beklenildiği takdirde koagülasyon tamamlanacağından bu süre sonunda serumun ayrılması fibrin oluşumunun önüne geçer.

Ayrılan serumlar ışıktan korunmalı ve bekletilmeden analiz edilmelidir. Bu şekilde, bekletilme ile serum analitlerinin hipokonsantre olması engellenecektir. Bu noktaya kadar referans aralıklarının saptanmasında etkili olabilecek preanalitik faktörler gözden geçirilmiştir. Referans bireylerin saptanmasından, kanların ayrılmasına kadar olan her safhada standardizasyon ile referans grupların dağılımlarının olumsuz etkilenmesi engellebilmektedir(4).

II.5. Referans Değerlerin İstatistiksel Analizi

Referans için alınan birey örneklerinin analizinden sonra veriler bir araya toplanarak istatistiksel olarak incelenir. Bu incelemeler referans değerlerin uygun gruplara ayrılmasını, her grubun dağılımının değerlendirilmesini, aşırı uç değerlerin belirlenmesini ve referans aralıkların saptanmasını içerir(7).

II.5.1 Verilerin Toplanması

Analiz sonrası referans verileri tıbbi geçerlilik için tanımlanmış uygun koşullarda elde edilen verilerden hesaplanmalıdır. Referans değerlerin kullanılabilmesi için, aşağıdaki koşullara mutlaka uyulmalıdır(9):

1. Referans bireyler açık ve ayrıntılı olarak tanımlanmalı ve kaydedilmelidir.
2. Klinik karar verilirken, karşılaştırılan parametreden başka, karşılaştırılan grup referans grubuyla benzer olmalıdır. Örneğin: Hastalık var/yok kararında, hasta, sağlıklı olduğuna karar verilmiş olan referans grubuyla karşılaştırılırken, terapötik ilaç izlemede doz ayarlamada aynı hastalığı geçirmiş ve semptomları ilaçla yok edilmiş grup referans alınır.
3. Birey örneklerinin alındığı analiz örneklerinin hazırlandığı koşullar standardize edilmelidir.
4. Ölçü birimleri aynı olmalıdır.
5. Sonuçların elde edildiği analiz yöntemleri mümkün olduğu kadar standardize olmalı ve analitik kalite kontrolü kanıtlanmış olmalıdır.
6. Tüm testlerin tanısallığı, tanısallığı, prevalansı ve yanlış kararlara neden olduğu zaman yol açtığı mali ve klinik zarar mutlaka bilinmelidir.

II.5.2. Referans Değerlerin Gruplara Ayrılması

Referans değerler yaş, cinsiyet ve diğer karakteristiklere göre alt gruplara ayrılabilirler (Tablo 4). Gruplara ayırma tabakalama, kategorizasyon veya alt gruplara ayırma olarak da adlandırılmaktadır. Gruplara ayırmanın amacı bireyler arasındaki varyasyonların en aza indirilmesidir. Sınıf içi varyasyon ne kadar az ise o kadar dar ve duyarlı referans aralık hesaplanır. Genel olarak, sınıflar arasında istatistiksel olarak farklılık varsa referans değerler alt gruplara ayrılmalıdır(8).

Tablo 4: Referans Gruplarını Mümkmn Olan Alt Gruplara Ayırmak İçin Kullanılan Gruplama Kriterleri(7).

Referans Gruplarını Ayırma Kriterleri	
Yaş (eşit aralıklarda kategorize edilmesi gerekmez)	
Cinsiyet	
Genetik faktörler	
	Irk (etnik köken)
	Kan grupları (A,B,O)
	Histokompatibilite antijenleri (HLA)
Fizyolojik faktörler	
	Menstrüel döngü evresi
	Gebelik evresi
	Fiziksel durumlar
Diğer faktörler	
	Sosyoekonomik
	Çevresel
	Kronobiyojik

Gruplara ayırmada en önemli ve en sık kullanılan iki ölçüt cinsiyet ve yaştır. Sıklıkla postnatal, infant, puberte, premenopozal menopozal ve yaşlılık hallerinde değişim daha belirgindir(9). NCBI (National Center for Biotechnology Information; Ulusal Biyoteknoloji Bilgilendirme Merkezi)'in internet sitesinde yaşa göre gruplara ayırma Tablo 5'de gösterilmiştir(11). Birçok araştırmacı bu ayırımı kullanmaktadır.

Tablo 5: Referans Gruplarının Yaşa Göre Sınıflandırılması.

ÇAĞI	YAŞ ARALIĞI
Tüm İnfantlar	Doğum-23 ay
Tüm çocuklar	0 yaş-18 yaş
Tüm yetişkinler	19 yaş ve daha büyük
Yenidoğan:	Doğum-1 aylık
İnfant	1 - 23 ay

Okul öncesi çocuk	2 - 5 yaş
Çocuk	6 - 12 yaş
Adolesan	13 - 18 yaş
Yetişkin	19 - 44 yaş
Orta yaş	45 - 64 yaş
Yaşlı	65 yaş ve üstü
80 ve üzeri	80 yaş ve üstü

Kemik yaşı, boy ve vücut kütle indeksi gibi ölçütler, çocukların sınıflandırılmasında, gerçek yaştan daha iyi belirleyicidirler(8). Ayrıca bir laboratuvar değişkeni büyük ölçüde yaş ve cinsiyet gibi sağlık alanındaki araştırmalar için çok önemli olan demografik değişkenlerle ilişkilidir. Bireyler arasındaki bu çeşitlilikten kaynaklı olarak popülasyona ait referans aralıklarının mümkün olduğu kadar özel bir aralık olarak hesaplanması gerekir. Bu nedenle de referans aralığı oluşturulurken bu özel aralığı oluşturabilmek için popülasyon daha homojen alt gruplara ayrılmalıdır. Bu alt gruplara ayırma işlemi hekimlere bireylerin sonuçlarını bireyin demografik karakterine göre farklı bir aralıkta eşleştirme olanağı sağlar. Fakat laboratuvar verilerini ayırmak için standart istatistiksel tekniklerin kullanılması (iki grup ortalamasının, varyansının karşılaştırılması) uygun değildir.

II.5.3 Referans Gruplardaki Veri Sayısının Önemi

Referans grupları değerlendirilirken elimizde yeterli sayıda veri bulunmalıdır. Çünkü veri sayısının çokluğu kullanılacak metodun güvenilirliğini artırır. Dağılımı etkileyen faktörler uç değerler ve veri sayısıdır. Özellikle uç değerler veri sayısının azlığında dominant hale geçerler ve dağılıma olumsuz etki ederler. Dağılımın iyi tanımlandığı Gaussian dağılımlarda kullanılan veri sayısı daha düşük olabilir. Ancak laboratuvar verileri genelde Gaussian dağılıma uymaz. Bu durumda düşük veri sayıları oldukça anormal sonuçlar verebilmektedir(17).

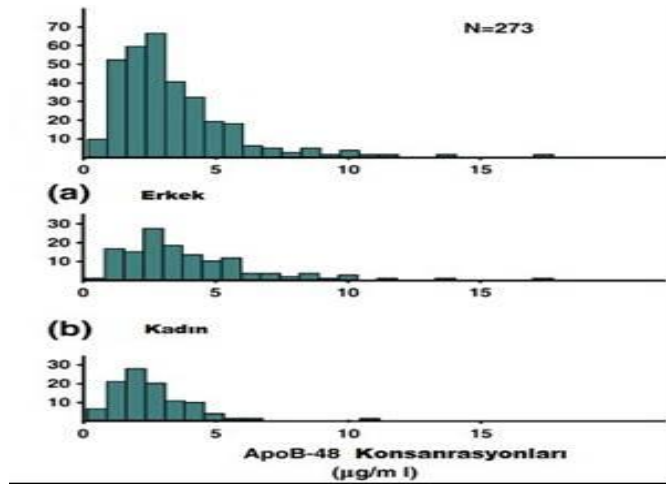
Referans sınırların saptanmasında kullanılan yöntemlerde NCCLS, kaç veri olması gerektiğini ilgili dokümanında belirtmektedir. Buna göre

parametrik olmayan yöntemlerde %90 güven aralığı için 120, %95 güven aralığı için 153, %99 güven aralığında ise 198 verinin yeterli olduğu ileri sürülmektedir(1). 120 verinin altında ise modifiye non-parametrik yöntemler kullanılarak daha iyi sonuçlar alınabilir.

Gaussian dağılım gösteren verilerde uygulanan parametrik yöntemlerde ise minimum 30 veri ile çalışma yapmanın yeterli olacağı ileri sürülmektedir. Veri sayısı arttıkça Gaussian dağılıma uygunluk da artar. Ancak aşırı uç değerler de artar. Bu durum dağılımın iyi analiz edilmesi ve uç değerlerin iyi bir şekilde ayıklanması ile önlenir(8).

II.5.4 Dağılımın İncelenmesi

Referans dağılımın histogramı çizilerek grafiksel olarak gözle değerlendirilmesi önerilir. Şekil 1'deki histogram el ile veya bilgisayar programları ile kolayca çizilebilir ve verilerin görsel olarak kolayca incelenmesini sağlar.



Şekil 1: Histogram Örneği

Histogramın görsel olarak değerlendirilmesi istatistiksel olarak yanlış değerlendirmeleri de ortadan kaldırır. Ayrıca verinin dağılımı hakkında önemli bilgiler verir. Dağılım aşağıda belirtilen maddeler dikkate alınarak değerlendirilmelidir(7):

1. Dağılım sınırlarından çok fazla sapan veriler (aşırı uç değerler) yanlış değerleri gösterebilir. Aşırı uç değerlerin araştırılarak, hesap dışı bırakılması gerekir.
2. Dağılımın bimodal veya polimodal olması, birden fazla alt grubun bulunduğu gösterir. Bu durumda referans bireylerinin seçimindeki kriter yeniden değerlendirilmelidir veya yaş, cinsiyet ve diğer faktörlere göre gruplara ayırma gözden geçirilmelidir.
3. Dağılımda asimetri ve normalden farklı tepeleşmelerde, diklik veya basıklık birlikte değerlendirilmelidir.
4. Görsel incelemenin diğer yararı da hesaplamalardan elde edilecek aralıklar hakkında bilgi vermesidir.

II.5.5 Aşırı Uçlarda Gözlenen Değerlerin (Sapan Değerler) Belirlenmesi

Dağılımlar değerlendirilirken gözlenen, dağılımdan uzaklaşmış aşırı değerler hesaplamalara alındığında sonuçlar olumsuz etkilenir(9). Dağılımlarda aşırı uç değerler bulunabilir. İyi ayıklanmış verilerde dahi bu mümkündür. Referans kitlesinin dağılımında uç değerlerin bulunup, çıkarılması için bazı metotlar geliştirilmiştir(8);

Dixon metodu: Veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır ve dağılımın alt ve üst noktalarındaki uç değerler Dixon formülü ile aranır¹. Burada dikkat edilmesi gereken sondan üç değer de aynı formülle test edilmesidir(4).

Blok prosedürü: Aynı yönde (düşük veya yüksek) ardışık olarak çok sayıda uç değer bulunabilir. Ancak en son uç değer kendisinden önceki değere çok yakın olduğu zaman aşırı uç değerleri bloke edebilir. Bu durumda iki en yüksek veya en düşük değer arasındaki fark, 1/3 oranından daha fazla ise bu değere aşırı uç değer uygulaması yapılır ve bulunan en düşük farklı uç değerden sonra gelen tüm uç değerler atılır(4,8).

Standart Sapma Kullanılarak Aşırı Uç Değerlerin Aranması: Veri sayısının 120'den daha fazla olduğu durumlarda kullanılır. Özellikle nonparametrik testlerde ve indirekt yöntem ile seçilen verilerde kullanılır. Dağılımda ± 4 standart sapmayı aşan değerler dışlanır. Çünkü bu değerlerin normalden çok daha yüksek veya düşük olması hastalıkla ilişkili olabileceğini

veya yanlışlıkla veri setine dahil olabileceğini düşündürür. Bu yöntem GraphROC referans aralığı hesaplama programında da kullanılmakta olup programın yazarı tarafından önerilmektedir(4)

Grubbs T İstatistiği: Veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır. Her bir alt ve üst veri için bir T değeri saptanır ve önceden belirlenmiş T istatistik tablolarına göre alt ve üst T değerlerinin derecesine bakılır. Kritik değerleri aştığı takdirde, veri uç değer olarak kabul edilir(4,8).

Boxplot Grafikleri: Veri setindeki değerlerin %25 ile %75 percentilin dışında kalanlarının atılması prensibine dayanır. Veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır ve aşağıdaki formüller uygulanır(4).

$$(\%75. \text{ percentil} - \%25. \text{ percentil}) * 1,5 = X$$

$$\text{Alt değer} = \%25. \text{ percentil} - X$$

$$\text{Üst değer} = \%75. \text{ percentil} + X$$

II.5.6 Referans Kitlesinin Dağılım Tipinin Değerlendirilmesi

Referans kitlesinin dağılımı Gaussian veya non-gaussian olabilir. Dağılım tipinin belirlenmesi referans kitesine uygulanacak referans aralığı belirleme yönteminin hangisi olacağını bilinmesi açısından önemlidir. Çünkü Gaussian dağılımlarda parametrik, non-gaussian dağılımlarda ise non-parametrik yöntemler kullanılır.

Normal dağılıma uygunluğun belirlenmesi çeşitli istatistiksel yöntemleri kullanmayı gerektirir. Bu yöntemler bilgisayar programları tarafından desteklenip kolaylıkla uygulanabilir hale getirilmiştir. Referans aralığının belirlenmesinde en çok kullanılan normal dağılıma uygunluğun test edildiği yöntemler şunlardır:

Chi-Square (Ki-kare; X^2) Uygunluk testi: İlk olarak 1900'lü yılların başında çok sık kullanılmaya başlanan bu test homojen olmayan ve gruplandırılmış dağılımlarda yetersiz sonuçlar vermektedir(8). Bu yüzden özellikle referans aralığı hesaplamalarında kullanımını terk edilmiştir.

Kolmogorov-Simirnov (K-S) Testi: X^2 uygunluk testlerinin alternatifi olan K-S testi, Kolmogorov tarafından 1933 yılında önerilmiştir. Kolmogorov, tek örnek için uyum iyiliği testini önermiştir. 1939 yılında ise bir Rus

matematikçisi olan Simirnov tarafından iki bağımsız örnek için uyum iyiliği testi geliştirilmiştir.

Kolmogorov ve Simirnov testi benzerlik nedeniyle uygulamada, Kolmogorov–Simirnov uyum iyiliği testleri olarak bilinirler. X^2 testinin uygulanabilmesi için beklenen frekansların 5'den büyük olması istenir. K-S testi böyle bir şarta dayanmadığı için kolayca uygulanabilmektedir. X^2 testinde beklenen frekansların 5'ten büyük olması için ya örneklerin büyük hacimli olması gerekir (bu masraflı bir iştir) ya da sınıflar birleştirilmek suretiyle beklenen frekansların 5'den büyük olması sağlanır. Bu durumda ise bilgi kaybı söz konusudur. Oysa K-S testinde beklenen frekanslar için bir alt limit söz konusu değildir(8). Özellikle yaş, cinsiyet gibi faktörler sonucu dağılım gruplar halinde tanımlanmış ise, K-S testini kullanmamız daha uygun olacaktır. Bu test daha güvenilir ve kuvvetli bir analiz yöntemidir ve dağılımın gruplandırılmasından etkilenmemektedir(8). Her iki test ile dağılımın yatıklığı ve basıklığı değerlendirilebilir.

Shapiro-Wilk testi: Bu test K-S testi ile sadece veri sayısı ihtiyacı bakımından farklılık gösterir. Düşük veri sayılarında iyi sonuçlar üretir ve hatta bu veri miktarlarında K-S testinden daha güvenli sonuçlar üretebilmektedir(8).

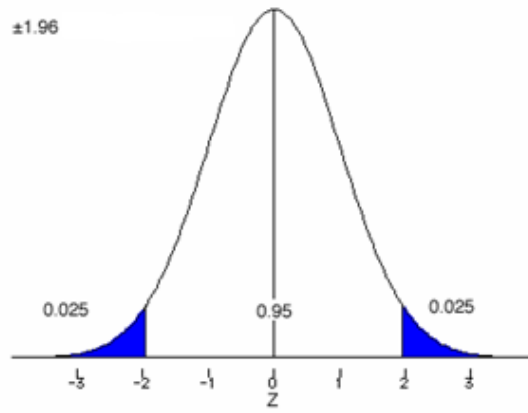
Katsayı tabanlı testler: IFCC normalite uygunluk testlerinin kullanılmasını daha uygun görmektedir; eğer transformasyon yapılıyorsa, bu durumda dağılımdaki değişimin, katsayı tabanlı testler ile takip edilmesini önermektedir. İki şekilde ifade edilir:

1. Yatıklık katsayısı
2. Basıklık katsayısı

Teorik olarak olması gereken normal bir dağılımdır ve bu dağılımın özelliği olarak ortalamanın her iki tarafında homojen ve eşit sayıda dağılmışın değerler bulunur. Oysa yatık dağılımlarda grafiğe bakıldığında bir orta nokta tanımlanamaz, çünkü değerler histogramda eşit olarak dağılmamışlardır. Böyle bir durumda ortalama değer tanımlamak anlamsızdır; bu gibi dağılımları tanımlamanın en iyi yolu medyan değer kullanılmasıdır. Yine çok basık dağılımlar ortaya çıkabilir ve böyle dağılımlarda hemen hemen her

değerin frekansı birbirine çok yaklaşmıştır, en uçtaki değer frekansı, ortadaki değer frekansına oldukça yakındır.

Bu tip dağılımlarda, aynı zamanda yatıklık da varsa, bunun düzeltilmesi için logaritmik transformasyon yapılması sonucunda basıklıkta artış ortaya çıkabilir. Bu nedenle logaritmik transformasyon sonrası dağılımın basıklığı kesinlikle kontrol edilmelidir. Bunun tam tersi çok dik dağılımlar da görülebilir; yatıklığın ve basıklığın yönü katsayının işaretine bağlıdır; Normal dağılımın yatıklık ve basıklık katsayısı sıfırdır. Şekil 2 normal bir dağılım örneğini göstermektedir.



Şekil 2: Normal Dağılım Örneği. (Mavi boyalı alanlar alt ve üst %2.5'lük bölgeleri belirtmektedir. Mavi alanların arasında kalan bölge dağılımın %95'ine eşdeğerdir.)

Bütün bu işlemlerin sonucunda dağılımın tipi saptanmış olur ve veri sayısının da göz önünde bulundurulması ile birlikte kullanılması en uygun olan istatistiksel analiz yöntemi seçilir.

II.5.7 Referans Sınırların Saptanması

Klinik yorumlamalarda hastanın laboratuvar sonuçları iki sınır arasındaki referans aralığıyla karşılaştırılır. Bu aralık farklı yollarla hesaplanabilir. Üç çeşit referans aralık önerilmektedir:

- a) Tolerans aralığı,
- b) Öngörü aralığı,
- c) Yüzdeler arasındaki aralık.

Belirli çok iyi tanımlanmış istatistik problemler için üçünden birinin seçimi önemli olmaktadır(7).

Yüzdellikler arasındaki aralık hesaplanması en kolay olanıdır, oldukça yaygın kullanılır ve IFCC tarafından önerilmektedir. Referans dağılımın iki yüzdeliği ile belirlenen aralık olarak tanımlanır. Yüzdellik referans, dağılımı bölen bir düzeydir. Bu düzeyin yeri temsil ettiği yüzde değerdedir veya onun sınırladığı değer altındadır. Referans aralığın değerleri %2,5 ve %97,5 düzeylerin arasında kalan %95'lik merkezi alandır. Bu alanın neye göre seçildiği tam anlamıyla bir temele dayanmamaktadır, fakat geleneksel olarak kabul görmektedir(7).

Yüzdellikler arasındaki aralık hesaplama iki ana istatistiksel yöntemle belirlenir. Bunlar:

1. Parametrik yöntemler
2. Non-parametrik yöntemler

Bu iki yöntem de kendi içinde birçok modifiye yöntem içerir. Modifikasyonlar yöntemin gücünün artırır ve daha düşük veri miktarlarında anlamlı sonuçlar üretir. Özellikle biyolojik veriler Gaussian forma uymazlar. Bu nedenle biyolojik verilerde non-parametrik yöntemler tercih edilir. Ancak bu yöntemlerde daha yüksek verilere gerek duyulması bir dezavantajdır.

Parametrik yöntemde yüzdellikler ve güven aralıkları hesaplanırken dağılımın belirli tipte olduğu varsayılır ve hesaplamalarda ortalama ve standart sapma (SD) gibi populasyon parametreleri kullanılır. Örneğin, parametrik yöntemde referans verilerinin Gaussian dağılımına uyduğuna inanılır ve referans sınırları (yüzdellikleri) ortalamanın $\pm 2SD$ altında ve üzerinde olarak hesaplanır. Referans dağılım non-gaussian bir dağılım ise, verilerin logaritmik transformasyonu yapılır, transformasyondan sonra dağılımın Gaussian olması beklenir. Parametrik olmayan yöntemde dağılım için hiçbir varsayımda bulunulmaz ve hesaplamalarda dağılım parametreleri kullanılmaz. Yüzdellikler her iki uçtan gereken yüzdeden kesilir.

II.5.7.1 Parametrik Yöntemler

Parametrik yöntem non-parametrik yöntemle göre çok daha komplikedir ve veri sayısı yüksek olunca bilgisayar istatistik programları gerekir. Parametrik yöntemde yüzdelerinin hesaplanmasında dağılımın Gaussian dağılım olduğu varsayılır. Bundan dolayı parametrik yöntemde, kritik aşama, verilerin dağılımının hipotetik Gaussian dağılımına göre uyum iyiliği testi ile değerlendirilmesi gerekliliğidir. En basit test kümülatif dağılım grafiğinin Gaussian olasılık kağıdında çizilmesidir. Gaussian olasılık kağıdında, Gaussian dağılımı temeline dayalı, lineer olmayan dik eksen vardır. Dağılım Gaussian ise eğri düz çizgi olmalıdır. Fakat düz çizgiden sapmaların görsel olarak değerlendirilmesi çok zordur, çünkü grafikteki dik uzaklıklar lineer değildir.

Uyum iyiliği testi yapan birçok istatistik program bulunmaktadır (Çarpıklık ve diklik katsayılarına dayalı test, Kolmogorov-Smirnov testi veya Anderson-Darling testi gibi). Referans dağılım Gaussian dağılımından anlamlı olarak farklı değilse, 2,5 ve 97,5 yüzdeler ortalamasının her iki tarafına iki SD eklenerek hesaplanır. Daha kesin hesaplamak için,

$$2,5 \text{ yüzdeler} = x - 1,96 \times SD$$

$$97,5 \text{ yüzdeler} = x + 1,96 \times SD \text{ formülleri kullanılır.}$$

Referans dağılım Gaussian değil ise, matematiksel transformasyon ile Gaussian dağılımına uyması sağlanabilir. Sıklıkla karşılaşılan bir gözlem sağa çarpık (pozitif çarpıklık) dağılımların logaritmik transformasyonlarının daha çok Gaussian dağılıma uyum gösterdiğidir. Diğer durumlarda karekök transformasyonların daha uyum sağladığı gözlenmektedir. Logaritmik ve karekök transformasyonların daha çok kullanılması bu nedenlerden dolayı önerilmektedir. Bu iki transformasyon ile başarılı olunamazsa başka transformasyonlar denenebilir. Bu konuda çeşitli yayınlar bulunmaktadır(19).

Gaussian dağılımlarda elde edilen güven aralıkları non-parametrik yöntemlerin güven aralıklarından daha dar çıkmaktadır; bu da daha kesin bir yaklaşımda bulunulmasına olanak sağlar(18). Bazı yazarlar referans aralığı tayininde bu yöntemin kullanılmasının daha uygun olacağını ileri sürmektedirler(19).

II.5.7.2 Non-Parametrik Yöntemler

Bu yöntemler non-Gaussian dağılımlarda tercih edilirler. Özellikle hastane kayıtlarının kullanıldığı veri setlerinde tercih edilirler. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta her bir alt grup için gerekli veri sayısı en az 120 olmalıdır. Bu sayının altındaki veri setlerinde ise modifiye yöntemler kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanı “Non-parametrik yüzde tahmini yöntemidir”. Bu yöntem alt ve üst değerleri kesin olarak bildirir. Bu nedenle modifiye yöntemlerin çoğu bu yöntemi baz almaktadır. Burada dağılımın %95'lik kısmını kapsayan %2,5 ile %97,5'lük alana eşdeğer noktalar aranır. Bunun için veriler küçükten büyüğe doğru sıralandıktan sonra aşağıdaki formüller kullanılır:

$$\text{Alt değer} = 0,025 \times (n+1)$$

$$\text{Üst değer} = 0,975 \times (n+1)$$

'n' veri sayısını belirtmektedir. Eğer küsürlü rakamlar çıkarsa yuvarlama yapılır. Örneğin, 10,5 çıkan bir alt değer 11'e yuvarlanır. Böylece 11. sıradaki veri dağılımının alt noktası olarak tanımlanır, aynı şekilde üst nokta da belirlenir(4).

Diğer bir yöntem Wilks tarafından tanımlanan “non-parametrik tolerans aralığı yöntemi”dir. Veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra numaralarına eşdeğer olan değerler veri sayısı ve güven aralığına göre bu tablolardan çıkartılır. Burada yüzde tahmin yönteminde olduğu gibi dağılımın kesin bir yüzdesine uyan sıra değeri yerine, tablodan veri sayısı ve güven aralığına uyan değerler elde edildiği için %95'lik bölge dağılımında değişen bölgelerde lokalize olabilmekte ve güven aralığının derecesine göre fazla geniş ya da dar çıkabilmektedir.

II.6 Veri Transformasyonu

Gaussian forma uymayan dağılımlarda parametrik yöntemler kullanılamaz. Ancak veri transformasyonu ile dağılım Gaussian forma yaklaştırılabilir. Bu yaklaştırma belli ölçüde bir hata payı içereceğinden transformasyon sonrası dağılımın tipi yeniden test edilmelidir. Yeni oluşan dağılımda, yatıklık ve basıklık katsayılarına bakılarak değerlendirme

yapılmalıdır. Veri transformasyonu “logaritmik transformasyon”, “trigonometrik transformasyon” ve “karekök normalizasyonu” gibi metotlarla yapılabilir. Logaritmik transformasyon içlerinde en yaygın kullanılanıdır. Bunların dışında farklı birçok normalizasyon şekli de vardır. Daha önce belirtildiği gibi Gaussian olmayan dağılımlar sağa (negatif yatıklık) ya da sola (pozitif yatıklık) yatık dağılımlar halinde çıkarlar; ayrıca oldukça dik (pozitif basıklık) ya da oldukça basık (negatif basıklık) şeklinde de gözükabilirler. Pozitif yatıklıkta çoğunlukla logaritmik transformasyon ya da karekök normalizasyonu kullanılır. Her ikisi de uygulanması oldukça basit yöntemlerdir ve herhangi bir tablolama yöntemi ile datanın transformasyonu rahatlıkla yapılabilir.

II.7. Referans Aralıklarının Transfer Edilebilirliği

Bir laboratuvarın test listesindeki her test için güvenilir referans aralığının belirtilmesi ana görevlerdendir. Fakat, her laboratuvarın hesaplama kapasitesi bulunmamaktadır. Bundan dolayı, başka bir laboratuvarda hesaplanmış olan referans değer diğer bir laboratuvarda kullanılabilir. Yalnız kullanılabilmesi için aşağıdaki koşullar yerine getirilmelidir:

1. Populasyonlar tanımlanmalı ve özellikleri birbirleriyle örtüşmelidir.
2. Her iki laboratuvar verileri de aralarında analitik bias bulunma durumu açısından kontrol edilmelidir.
3. Her iki laboratuvarın analitik performansı birbirleriyle uyumlu olmalıdır.
4. Örnek alınmadan önce bireylerin hazırlanması ve örneklerin alınması ve işlenmesi her iki laboratuvarda standardize programlarla yapılmalıdır(20).

Son olarak, klinik laboratuvar tarafından üretilen sonuçların referans aralıklarına göre nasıl sunulması gerektiği de önemli bir konudur. Üretilmiş olan bir sonucun raporda tek başına verilmesi yerine, yanında referans aralığı ile birlikte sunulması gerekir. Buna ek olarak raporda, çıkan sonucun referans aralığına göre yüksekliği ya da düşüklüğü de belirtilmelidir. Sonuçlar referans aralıkları ile aynı sırada, o test için kullanılan birimler de mutlaka verilmelidir.

Eğer referans aralığı cinsiyet ve yaş gibi faktörlere göre ayrı ayrı saptanmış ise bu durumda raporda da referans aralıkları bu faktörlere göre gruplandırılarak sunulmalıdır(4).

II.8. Oksidatif Stres

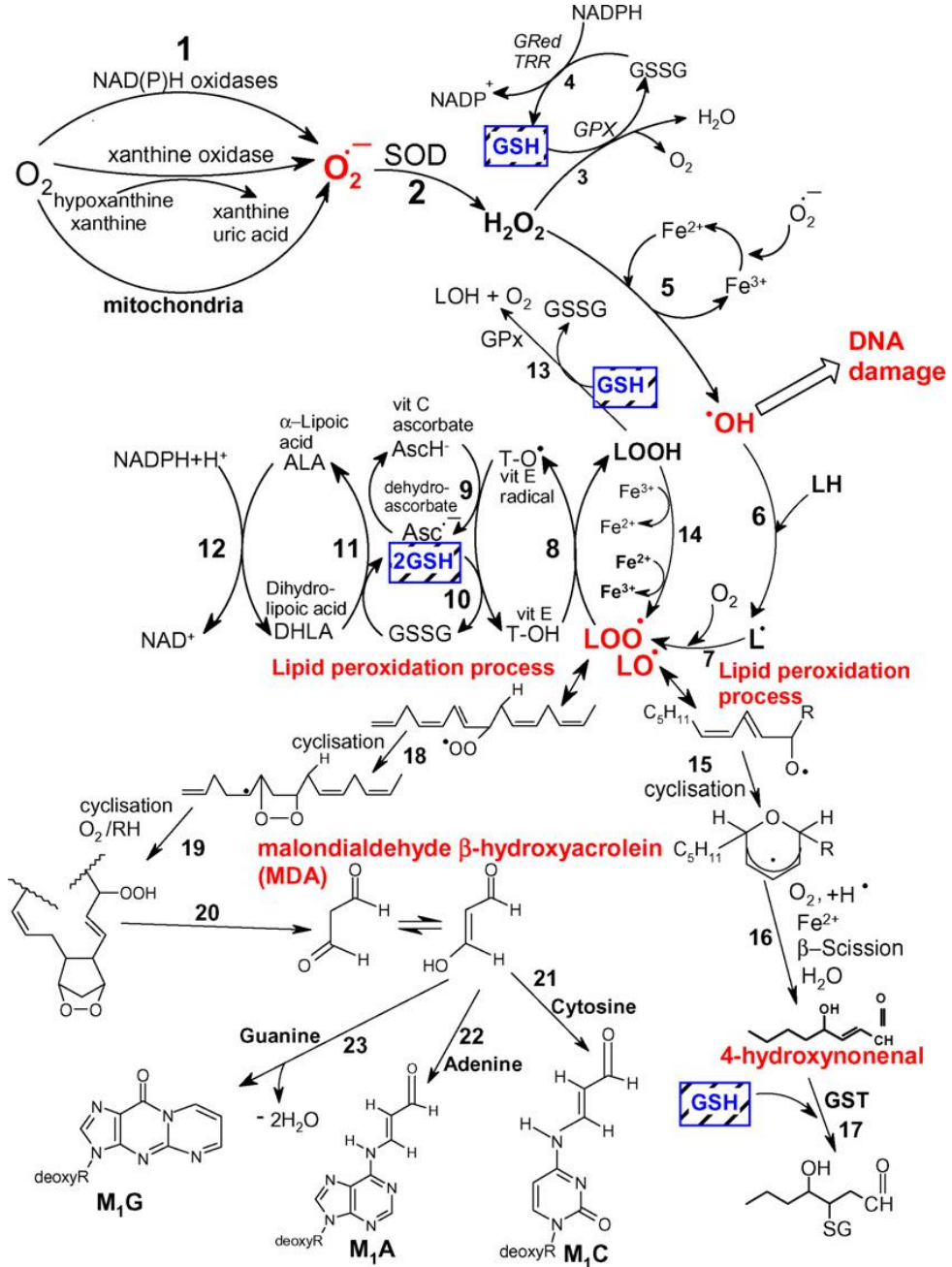
Organizmanın prooksidan-antioksidan dengesinin korunması, sağlıklı bir yaşam sürdürebilmesi için çok önemli ve gereklidir. Oksijenle sürekli temas halinde olmak serbest radikal oluşumunu da beraberinde getirir. Serbest radikal oluşumundaki artışa ve/veya antioksidan sistemdeki yetersizliğe bağlı olarak organizmada oksidatif stres gelişir(21).

II.8.1. Serbest Radikaller

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, atomik yada moleküler yapılarda, dış orbitalinde çiftlenmemiş bir veya birden fazla elektron taşıyan bileşiklerdir(22,23). Ömürleri çok kısa olan ve kararsız yapı gösteren bu tanecikler, etraflarındaki moleküllerle etkileşime girerek elektron almaya çalışır ve bir an önce kararlı hale ulaşmak isterler(21). Serbest radikaller organizmada normal olarak meydana gelebildiği gibi (mitokondride gerçekleşen elektron-transport reaksiyonları, P450 metabolizması, peroksizomlarda gerçekleşen reaksiyonlar, inflamatuvar hücre aktivasyonları vb.), çeşitli dış kaynaklı etkilerle de (UV ışınları, X-ray, sigara, çevresel toksinler, farmakolojik tedaviler) oluşabilir.

Aerobik organizmalar yaşamlarını sürdürebilmek için oksijene mutlak gereksinim duyar. Oksijen hücrede bir dizi reaksiyondan geçerek suya dönüşür ve bu sayede hücre kendisi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Fakat bu süreçte oksijenin %2-3 kadarı suya dönüşmeyip oksijen kaynaklı radikaller oluşur. Oksijenin bir elektron alıp indirgenmesiyle süperoksid radikali, iki elektron alarak indirgenmesiyle hidrojen peroksid, üçüncü elektronu almasıyla yüksek derecede reaktif hidroksil radikali, dördüncü elektronun eklenmesiyle ise su oluşur(21).

Serbest radikaller organizmada mitokondride ve hücrenin diğer fraksiyonlarında membrana bağlı veya serbest halde bulunan pek çok enzimin katalizlediği reaksiyonlar sonucu oluşur. Bunlar arasında mikrozomal karma fonksiyonlu oksidaz sistemi, hücre membranına bağlı NADPH oksidaz ve lipooksijenazlar gibi enzimlerin katalizlediği reaksiyonlar sayılabilir(Şekil 3).



Şekil 3: ROP Oluşum Yolakları, Lipid Peroksidasyon Süreci ve Oksidatif Stres Yönetimi, Glutasyon ve Diğer Antioksidanların Rolü(24).

Serbest radikaller organizma için zararlıdır ve genel olarak “oksidanlar” olarak adlandırılırlar. “Oksidanlar” dediğimiz bu yıkım ürünlerinin yol açtığı biyolojik hasarlar için “oksidatif stres” tanımı kullanılmaktadır. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren serbest radikal olan veya hücrede kolayca bu serbest radikallerine çevrilen oksijen içeren bileşikler tanımlamak için reaktif oksijen partikülleri (ROP) tanımlaması kullanılmaktadır(22,23).

Günümüzde serbest radikallerin birçok hastalığın ve patolojik durumun ortaya çıkışında önemli rolü olduğu kabul edilmektedir. Oksijen radikalleri ile ilgili bu patolojik durumlar çok geniş bir yayılım göstermektedir(Tablo 6). Serbest radikallerin yaşlanma, ateroskleroz, kanser oluşumu, iskemi-reperfüzyon hasarı gibi bir çok hastalıkta etkin rol oynadığı saptanmıştır. Bunlar arasında günümüzde en önemli ölüm nedeni olan ateroskleroz ve kanserin bulunması konunun önemini açıkça ortaya koymaktadır.

Tablo 6: Serbest radikallerle ilgili bazı patolojik durumlar(21).

<ul style="list-style-type: none">• Yaşlanma• Kanser• Romatoid artrit• Akciğer hastalıkları• Karaciğer bozuklukları• Radyasyon hasarı• Diabetes mellitus• Böbrek bozuklukları• Deri bozuklukları	<ul style="list-style-type: none">• Ateroskleroz• İskemi-reperfüzyon hasarı• Otoimmün hastalıklar• Kas hastalıkları• Kan hastalıkları• İnflamasyon• Santral sinir sis. hastalıkları• Göz bozuklukları• Gastrointestinal bozukluklar
--	---

II.8.2. ROP Sınıflandırılması

Serbest radikaller reaktif yapıları nedeniyle başta lipidler, proteinler ve nükleik asitler olmak üzere tüm hücre bileşenlerine zarar verme özelliğindedir. Organizmada birçok türde ROP oluşabilir. Ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile

reaksiyona girer ve lipid peroksi radikalini oluşturur. Lipid peroksi radikali diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve Lipid Hidroperoksidler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malondialdehid(MDA)'dir(22).

Hidrojen peroksid membranlardan kolaylıkla geçip hücreler üzerinde bazı fizyolojik rollere sahip olabilir, fakat çiftlenmemiş elektrona sahip olmadığından radikal olarak adlandırılmaz. Bu nedenle "reaktif oksijen partikülleri", süperoksid gibi radikaller ve hidrojen peroksid gibi radikal olmayan bileşikler için ortak olarak kullanılan bir terimdir. Oksijen molekülü, orbitalinde çiftlenmemiş elektron taşıyorsa süperoksid radikali olarak adlandırılır. Diğer ROP grubunda ise normal oksijenden çok daha hızlı bir biyolojik molekül olan "singlet oksijen" bulunmaktadır. Singlet oksijen molekülü yapısında iki adet çiftlenmemiş elektron taşır. Singlet oksijen hücre membranındaki poliansatüre yağ asitleriyle doğrudan reaksiyona girerek lipid peroksidlerin oluşumuna yol açar(22).

Reaktif Oksijen Partikülleri:

1 - Radikaller:

Süperoksid radikal (O_2^-)

Hidroksil radikal (OH^-)

Alkoksil radikal (LO^-)

Peroksil radikal (LOO^-)

2 - Radikal olmayanlar:

Hidrojen peroksid (H_2O_2)

Lipid Hidroperoksid (LOOH)

Hipoklorik asit (HOCl)

3 - Singlet oksijen

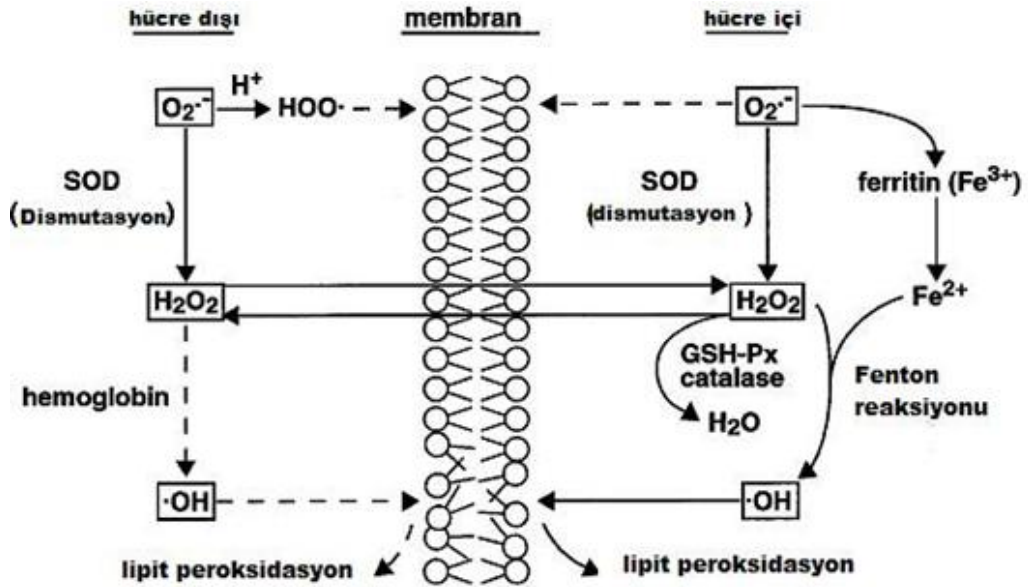
II.8.3. Lipid Peroksidasyonu ve Lipid Hidroperoksid

Serbest radikallerin lipidler üzerine en önemli etkileri lipid peroksidasyonunun uyarılmasıdır. Lipid peroksidasyonu serbest radikaller

tarafından başlatılan ve hücre membranlarında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna yol açan kimyasal bir olaydır. Süperoksit radikali, hidroksil radikali, peroksil radikali ve alkoksil radikali, lipid peroksidasyonunu başlatan başlıca radikallerdir(21).

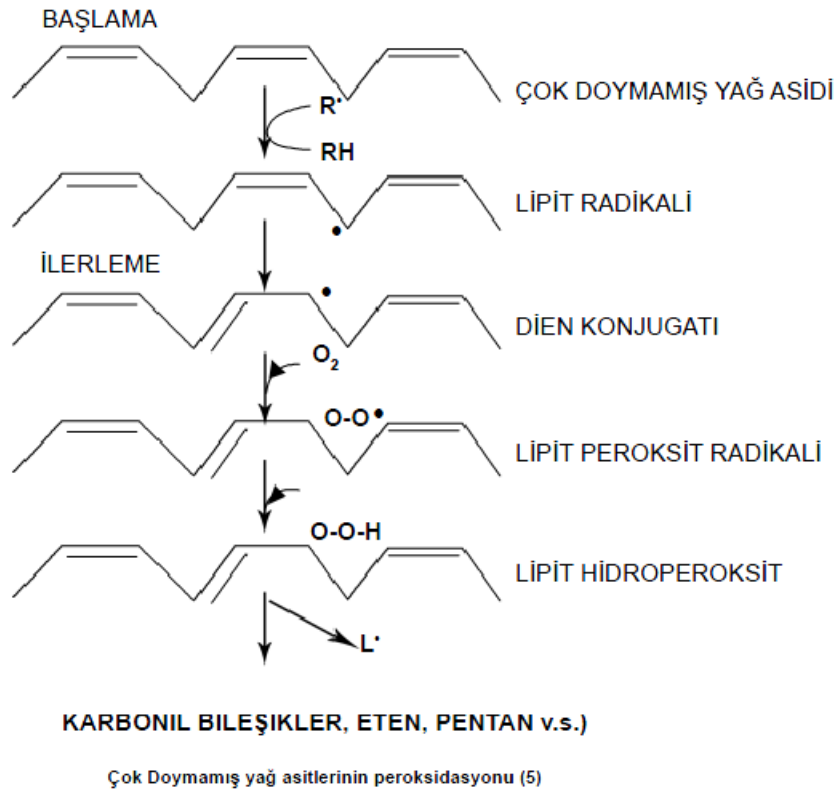
Lipid peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α - metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar ve böylece yağ asidi zinciri bir radikal niteliği kazanır. Bu lipid radikali(L \cdot) dayanıksız bir bileşik olup bir dizi değişikliğe uğrar. İlk önce, molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatı oluşur. Bu yağ asidi radikali oksijen eklenmesiyle hızlı bir şekilde peroksil radikaline(LOO \cdot) dönüşür. Bu lipid peroksil radikalleri membrandaki diğer çoklu doymamış yağ asidi moleküllerinden hidrojen atomları çıkartarak yeni reaksiyonları başlatır, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksitlerine(LOOH) dönüşür. Lipid hidroperoksitlerin aldehit veya karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile lipid peroksidasyonu sona erer(21).

Peroksil radikali çok uzun ömürlüdür. Biyomembranlar ve hücre içi organeller (mitokondri, endoplazmik retikulum, v.b.) membran fosfolipidlerindeki doymamış yağ asitlerinin varlığı nedeniyle oksidatif ataklara duyarlıdır. ROP'leri ile hücre hasarı meydana gelirken lipid-serbest radikaller ve lipid peroksidler de oluşmaktadır(Şekil 4).



Şekil 4: Serbest Oksijen Partikülleri ve Lipid Peroksidasyonu(25)

Bu tip reaksiyonlar “Serbest Radikal Otoksidasyonu” olarak isimlendirilir ve zincirleme reaksiyonun başlatılması için bir tetikleyici (başlatıcı) faktör gereklidir. Sözü edilen bu faktörün $\text{OH}\cdot$ radikali olduğu kabul edilmektedir. Aşağıdaki reaksiyon akışına dikkatli bakıldığında (Şekil 5), lipid peroksidasyonunun kendisini tetikleyerek yeniden lipid radikalleri ve peroksidleri oluşturduğu görülmektedir.



Şekil 5: Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Peroksidasyonu(21)

Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu sonucu lipid peroksidlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır, transport sistemi etkilenir, hücre içi ve dışı iyon dengeleri bozular. Bunun sonucunda hücre içi kalsiyum konsantrasyonu artar ve buna bağlı olarak protezalar aktive olur. Bu olaylar, hücre hasarında etkin bir rol oynar. LOOHs aktif olarak aterosklerotik lezyon ve bunların sonucu olan komplikasyonların ilerlemesine katkıda bulunabilir(21,26).

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bileşiklerden aldehitler en toksik olanlarıdır ve diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olurlar. Nonenzimatik oksidatif lipid peroksid dekompozisyonu sonucu malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE) oluşur. MDA'nın asıl kaynağı ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksidlerdir(27). MDA, protein amino gruplarına, fosfolipidlere ve nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir. Membran bileşenlerinde çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olur. Membranlardan kolaylıkla difüze olarak, DNA yapısında yer alan nitrojen bazlarla reaksiyona girer ve mutajen, karsinojen, genotoksik etkiler gösterir. Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edildiğinden; peroksidasyon sırasında oluşan konjüge dienlerin ölçümü, in vivo lipid peroksid düzeyini yansıtabilecek önemli bir yöntemdir. Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksidler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur(28).

Lipid peroksidasyonu üzerinde yapılan araştırmalar, UV ile indüklenen deri kanseri, ateroskleroz, nörodejenerasyon, ve çeşitli bir çok bozuklukta önemli bir rol oynayabileceği konusundaki farkındalığın artmasıyla son yıllarda bir hayli yoğunlaşmıştır. Lipid hidroperoksidler, peroksidatif reaksiyonların, genellikle diğer serbest radikal prekürsörlerinden daha uzun ömürlü, iyi bilinen ara ürünlerdir. Hücreler arasında veya lipoproteinler ve hücreler arasında, hücre içinde zarlar arasında olası translokasyon yaparlar. Sonuç olarak, LOOH toksisitesi ve efektör eylemi makul LOOH kaynağından uzak bölgelerde ortaya olabilir, ancak bu konuda nispeten az şey bilinmektedir. Benzer şekilde, LOOH, bir taraftan tek elektron indirgenmesiyle toksisiteyi artırmasına karşı, diğer taraftan iki elektron indirgenmesiyle detoksifikasyon yapması sebebiyle indirgeyici kaderini etkileyen faktörler hakkında öğrenilmesi gereken çok şey vardır. Bu faktörlerden bir elektron indirgenmesinde redoks demir ve elektron vericisi durumu, iki elektron indirgenmesinde ise, LOOHs'in GSH ve PHGPX'e erişebilirliği son derece

önemlidir. Ek olarak LOOHs in en heyecan verici yönü sinyal transdüksiyon rolü ile ilgilidir. Bu sinyalizasyon hücrenin hayatta kalmasını veya oksidatif hakarete yenik düşmesini belirlemek olabilir. Bu karmaşık alanların her birinde ilerleme nedeniyle LOOHs'in uzun erimli fizyolojik ve biyomedikal etkileri oldukça önemlidir(29).

II.9. Antioksidan Savunma Sistemleri

Antioksidanlar, radikal oluşumunu sınırlandırma, tetiklenen biyokimyasal reaksiyonların kırılmasını sağlama, oluşan radikalleri ortadan kaldırma ve hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme gibi çeşitli mekanizmalarla kendini gösterir. Reaktif oksijen partiküllerinin (ROP) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Enzim olan endojen antioksidanlar; süperoksid dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-Transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz olarak sınıflandırılabilir.

Bunların yanında Paraoksonaz (PON) enzimi de LDL ve HDL'nin oksidasyondan korunmasında, hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etkide ve anti inflamatuvar süreçte önemli rol oynamaktadır(30).

Enzim olmayan endojen antioksidanlar ise; melatonin, serüloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin olarak sıralanabilir(27).

II.9.1. Paraoksonaz ve Arilesteraz Enzim Grubu

II.9.1.1. Paraoksonaz Enzimi (PON) (EC. 3.1.8.1)

Paraoksonaz, Aldridge sınıflama sistemine göre A grubu arildialkilfosfataz sınıfı ester hidrolaz enzimidir. Önceleri organofosfat bileşiklerini hidroliz etme özelliği nedeni ile toksikoloji alanında çalışılmış, son

yıllarda ise antioksidan etkileri nedeni ile koroner kalp hastalığı riskinden koruyabileceği düşünülerek güncellik kazanmıştır(31).

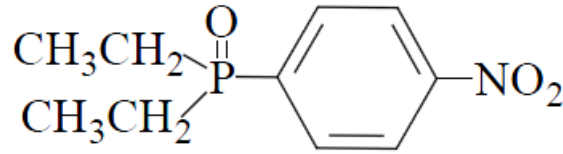
İlk olarak 1946 yılında Abraham Mazur tarafından keşfedilen(27) enzim, insan serumunda ilk kez 1961'de Uriel tarafından elektroforez sonrası HDL immunopresipitatlarında saptanmıştır(30). Mackness ve ark.(34), ilk olarak HDL-ayırımı için santrifuj yöntemini geliştirdikten sonra, koyunlarda paraoksonaz aktivitesinin çoğunlukla Apo-AI içeren partiküllerde HDL ile birlikte bulunduğunu ve insan serumunun ultra santrifujlenmesi ile enzimin kanda HDL yapısında taşındığını ortaya koymuşlardır. Safılaştırılmış sığır serum paraoksonazının lipidlerle ilişkili ve HDL ile aynı moleküler kütleye sahip olduğunu göstermişlerdir. Safılaştırma sırasında Apo-A-I'in paraoksonazdan ayırımının zor olması, ikisinin sıkı ilişkili olduğunu düşündürmüştü ve HDL kolesterol tayini sırasında lipoprotein fraksiyonunda arilesteraz aktivitesine rastlamışlardır(31). Enzim, son derece zehirli organofosfat (OP) tarım ilacı paration'un toksik metaboliti, güçlü kolinesteraz inhibitörü olan paraoksonu (organofosfat substratı) hidroliz edebilmesinden dolayı bu ismi almıştır(32). Enzim, paration dışında diizopropil florofosfat (DFP) gibi organik fosforlu insektisitlerle, yine aynı kimyasal gruptan olan sarin, tabun gibi sinir gazlarının; çeşitli karbamatların; fenilasetat, 4-nitrofenil asetat, 2-naftil asetat gibi birçok aromatik karboksilik asit esterlerinin hidrolizini de katalize etmektedir(33).

Mackness ve ark.(34), PON'un HDL üzerinde Apo A-I'e bağımlı olarak aktivite gösterdiğini ve 1991 yılında LDL üzerindeki lipoperoksid birikimini azalttığını bulmuşlardır. Aynı zamanda Mackness ve ark.(34), farklı populasyonlarda (Fransız, Sudanlı v.b.) polimorfizm analizleri yaparak, allelik formları belirlemiş ve populasyon çalışmaları enzim aktivitesiyle HDL, Apo-AI, Apo-AII arasında istatistiksel ilişkiyi göstermiştir. İmmunoafinite kromatografi çalışmaları insan serum paraoksonazının gerçekte Apo-AI ve klusterin (Apo-J) içeren HDL tipleri ile ilişkili olduğunu ve PON'ın total HDL 'nin çok küçük bir bölümünü oluşturduğunu göstermiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda, farklı kardiyovasküler hastalıklarda enzim aktiviteleri

incelenmiş, lipoproteinlerle ve lipid peroksidasyon arasındaki ilişkisi araştırılmış, enzimin aminoasit dizisi belirlenmiştir(31,35).

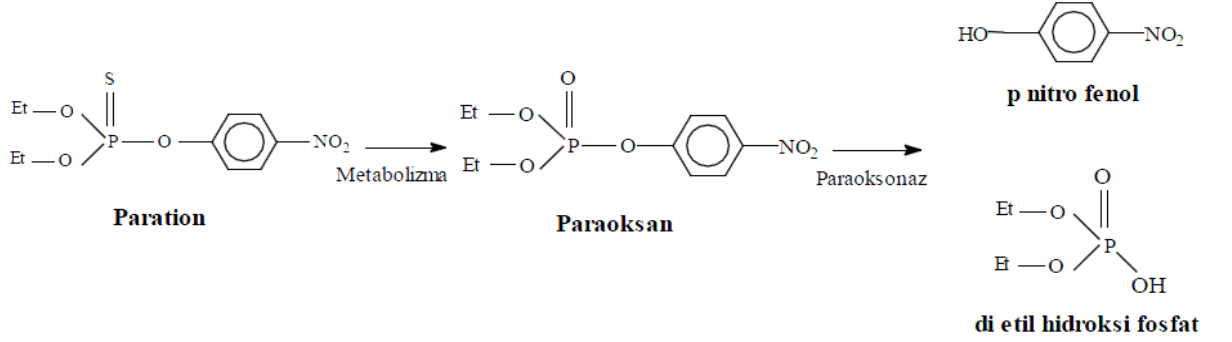
II.9.1.2. Enzimin Adlandırılması

Biyokimya ve Moleküler Biyolojinin Uluslararası Nomenklatur Komitesi'nin (IUBMB) enzim isimlendirmesinde paraoksonaz iki numaraya (EC 3.1.1.2 ve EC 3.1.8.1.) sahiptir. 1990'lı yıllardan sonra, paraoksonazın arilesterazdan farklı olarak yalnız fenolik esterleri değil, fosforik ve fosfinik asit esterlerini de hidroliz ettiği anlaşılmış ve EC 3.1.8.1 ile tanımlanmıştır. Paraoksonaz enziminin, A grubu Arildialkilfosfataz sınıfı bir ester hidrolaz enzimi olması nedeniyle sistematik adı Arildialkilfosfataz'dır. A esteraz grubunda yer alan paraoksonaz enzimi, aktivitesinin ölçümünde ilk olarak paraokson substratı (Şekil 6) kullanıldığı için paraoksonaz adını almıştır(31).



Şekil 6: Paraoksonun Kimyasal Yapısı (O,O-dietil-O-p-nitrofenil fosfat)

Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgüllüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesterazın, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. İnsan serum paraoksonaz enzimi, parationun metabolik ürünü olan paraoksani kataliz etme yeteneğindedir. Paraoksan organizmaya zararlı olup pestisit olarak kullanılmaktadır. Paraoksanın, paraoksonaz enzimi ile yıkımı sonucu paraoksana oranla göreceli olarak daha az zararlı p-nitro fenol ve dietil hidroksi fosfat bileşikleri oluşur (Şekil 7)(35).



Şekil 7: Paraoksonaz Enzim Mekanizması(35)

II.9.1.3. Paraoksonaz Gen Ailesi

Paraoksonaz gen ailesi, insanlarda 7. kromozomun uzun kolunda q21.3 ve q22.1 arasında bulunmaktadır(36). İlk olarak memelilerde tanımlanan PON ve PON ile ilişkili genler sonraları kümes hayvanları, zebra balığı ve omurgasızlardan *Caenorhabditis Elegans*'ta bulunmuştur(37).

Paraoksonaz gen ailesi; PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere bilinen üç üyeye sahiptir. Bu genler büyük yapısal benzerlikler göstermektedir ve ortak evrimsel öncüden, gen dublikasyonlarının meydana gelmesiyle oluşur. Memeli türleri içersinde PON1, PON2 ve PON3 aminoasit düzeyinde % 60, nükleotid düzeyinde % 70 benzerlik gösterir. PON1 ortaya çıkarıldığı süreden beri yıllardır çalışılmaktadır. Son zamanlarda fizyolojik substratları ve ateroskleroz ile ilişkisi ortaya çıkarılmaya çalışılmıştır. PON2'nin gen ürünü biyolojik dokularda henüz tanımlanamamıştır, fakat PON3, tavşan HDL'si üzerinde lokalize olan laktonaz aktivitesi ile tanımlanabilmiştir(31).

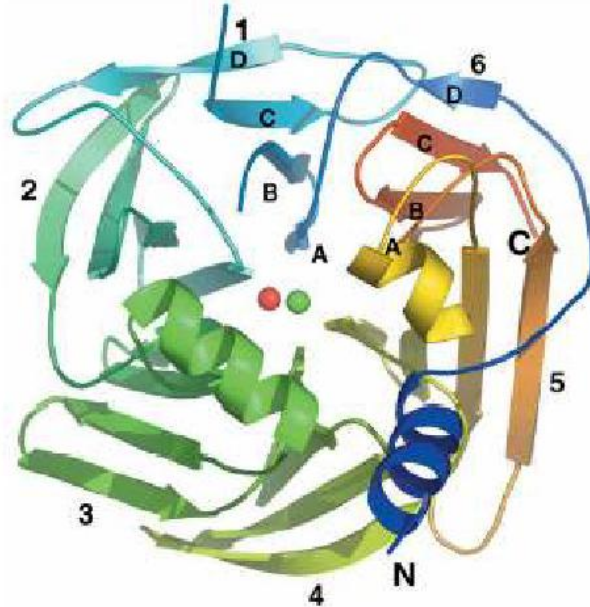
II.9.1.4. PON1

II.9.1.4.1. PON1 Biyokimyasal Yapısı

PON gen ailesi içersinde PON1 yıllardır çalışılan ve PON2 ve PON3'e göre en iyi aydınlatılan enzimdir. Enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır(38). Karaciğer, böbrek, barsak gibi dokulara geniş çapta yayılmıştır. PON1 serumda HDL'ye bağlı olarak bulunur ve PON1'in kararlılığı ve bağlanma ilgisindeki etki HDL içersinde şekil ve büyüklük değişimine neden olur(31). PON1, 43 kDa moleküler ağırlığa sahip, 354 aminoasitten oluşan bir

proteindir(32). Her molekül total ağırlığın %15.8'ini oluşturan üç karbonhidrat zinciri içermektedir. İzoelektrik noktası 5.1'dir. Aminoasit bileşimi yüksek lösin içeriği dışında bir özellik göstermez. Yapısında yer alan 3 sistein (Cys) rezidüsünden 284'teki serbest 42. ve 352. sistein rezidüleri arasında tek disülfid bağı bulunur. PON1'in ince yapısı 4 adet zincirden oluşmuş 6 adet β -kırmalı yapıdan meydana gelmiştir. Enzim 42. ve 353. sistein rezidüleri arasındaki disülfid köprüsü ile sonlanarak üç boyutlu yapısını kazanır(31). N terminal ve C terminal uçlarının bu şekilde kovalent bağlanması β -kırmalı yapıları enzimlerde nadir görülür. Üç boyutlu yapıda; β -kırmalı tabakaların merkezinde iki adet Ca^{+2} iyonu bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi yapısal kalsiyum olup yapıdan uzaklaştırılması dönüşümsüz olarak denatürasyona neden olmaktadır(39). Diğeri ise katalitik etkinlikte görev alan kalsiyumdur. PON1 aktif bölgede diğeri β -kırmalı yapılardan farklı olarak hidrofobik heliks (H2 ve H3) yapıları vardır. Bu yapı aktif bölgenin korunması ve enzimin HDL'ye bağlanması gibi kritik rollere sahiptir(Şekil 8).

PON1 sentezlendiğinde monomerik yapı şeklindedir. Eğer HDL'ye bağlanmazsa oligomerizasyon yapabilir. Bu olay in vitro deterjanlı ortamda H2 ve H3 heliksleri ile deterjan misellerine bağlanarak gerçekleşir(40).

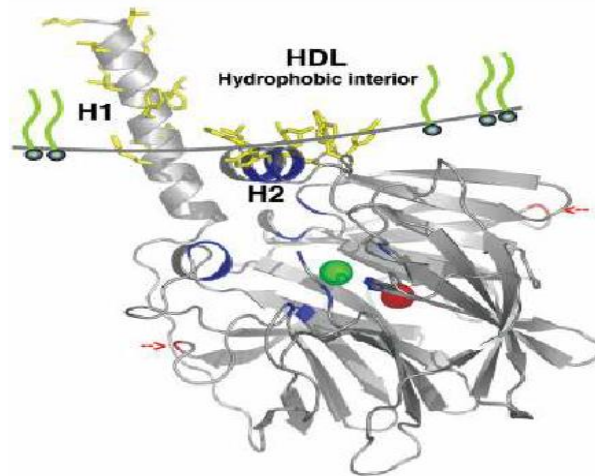


Şekil 8: PON1'in Üç Boyutlu Yapısı(31)

PON1 üzerinde 4 tane potansiyel N-glikozillenme bölgesi vardır. İki tanesi (Asn 227 ve Asn 270) β -kırmalı tabakaların merkezinde, diğer ikisi ise yüzeye bakan bölgede (Asn 253 ve Asn 324) yer almaktadır. PON1 memeli hücrelerinde eksprese edildikten sonra bu noktalardan glikozillenir(31). PON ailesinin hidrolitik aktivitesi için glikozilasyon önemli değildir(31,39). Ancak enzimin yapısında bulunan bu karbohidrat molekülleri spesifik olmayan hücre membranlarına bağlanmada veya kararlılığı ve çözünürlüğü arttırmada etkili olabilir(41).

II.9.1.4.2. PON1'in HDL'ye Bağlanması

PON1 ve PON3 karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. HDL periferik hücrelerden kolesterolün taşınmasını sağlayan ve kendisine bağlı platelet aktive eden faktör, PON1 ve PON3 gibi enzimler ile LDL'nin oksidasyonunu önler. HDL yaklaşık 10 nm çapında kompleks bir yapıdır. Bileşiminde öncelikle membran bileşenleri (fosfolipidler, kolesterol ve kolesterol esterleri), apolipoprotein A1 ve aromatik heliksler yer alır. HDL'ye bağlı olan enzimlerden ilk kez üç boyutlu yapısı aydınlatılan PON1 enzimidir. PON1 hidrofobik N terminal ucuyla sonlanır, H2 ve H1 hidrofobik heliksler bir araya gelerek potansiyel membrana bağlanma yüzeyi oluştururlar (Şekil 9). Heliks yapılar lizin, triptofan ve tirozin yan zincirleri ile oluşturdukları yapı karakteristiği ile HDL ara yüzeyine girebilmektedir(31).



Şekil 9: PON1'in HDL'ye Bağlanması(31)

II.9.1.4.3. PON1'in Sentez ve Salgılanması

PON1 sentezi karaciğerde gerçekleştiğinden dolayı, serumdaki PON1 seviyesini belirleyen başlıca faktör karaciğer fonksiyonlarıdır. Serumdaki PON seviyesi ve aktivitesi bireyler arasında çok değişkendir(42). Bunun nedeni paraoksonazın polimorfizm gösteren bir enzim olup; enzim aktivitesi, yüksek ve düşük aktiviteli iki allelin genetik kontrolü altında olmasıdır. Enzim polimorfizmine ait bu değişkenliğin molekülün 192. pozisyondaki amino asit farklılığından kaynaklandığı bildirilmiştir(31). Paraoksonaz ve Arilesteraz (ARE), aynı gen tarafından kodlanan ve aktif merkezleri benzer olan esterazlardır. PON1'in polimorfik değişim gösterdiği bilinmesine karşın ARE enzimi genetik polimorfik bir değişim göstermemektedir. Yine iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın PON1 enzimi ARE'in doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Yani Paraoksonaz aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir(33). Ayrıca PON1 ve ARE'in iyi bilinen ortak özellikleri organofosfatları, aril ve alkil halojenürleri hidroliz etme yeteneğidir. ARE, PON1'deki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmektedir(38). PON1 sentezinde önemli olan bir diğer faktör karaciğer hücrelerindeki kolesterol dengesidir. PON1'in karaciğerde sentezlendikten sonra serumda HDL'ye veya karaciğerde mikrozomlara bağlanabilmesi için sentez sırasında N-terminal hidrofobik bölgesi olması gerekmektedir. N-terminal hidrofobik bölgesi bağlamada belirleyici olduğu kadar salgılanma prosedüründe de önemli role sahiptir.

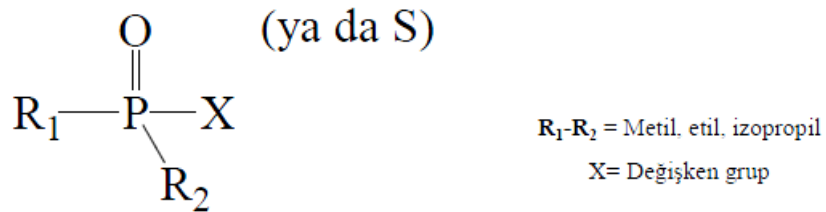
Yapılan çalışmalarda hamster ovaryum hücresi ve insan hepatosit hücrelerine transfekte edilen PON1 sentezlendikten sonra hücre zarının dış yüzeyine bağlandığı gösterilmiştir. PON1'in karaciğerde sentezlendikten sonra da önce mikrozomlara bağlandığı, daha sonra hücrenin dış yüzeyine bağlandığı düşünülmektedir(31,43).

Hücre zarının dış yüzeyinden salınması ve HDL'ye bağlanması tesadüf değildir, bu bağlanmada fosfolipid kompleksi önemli rol oynamaktadır ve LDL, PON1'in hücreden salınması ve kendisine bağlanması için yeterli fosfolipid içeriğine sahip değildir(31,43).

II.9.1.4.4. PON1'in Fonksiyonel Önemi

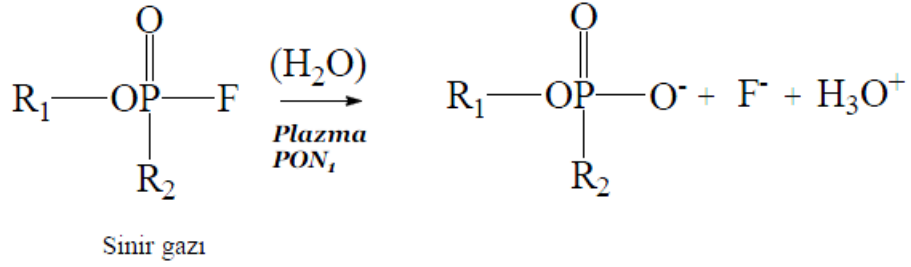
PON1 ve bazı memeli paraoksonazları toksik ajanların hücrel zararlarına, plazmadaki LDL'nin lipidleri oksitlemesine ve bakteri endotoksinlerine karşı koruyucu olarak hareket eder. Ayrıca LDL'nin lipid bileşenlerinin oksidasyonundan oluşan toksik ürünleri de inaktive edebilir(44).

Hidrolitik aktivite: Organofosfatlara karşı koruma Paraoksonazın önemli fonksiyonlarından biridir. OP bileşikler, tarımda pestisit olarak ürün verimini artırma ve veteriner ilaçları yapımında kullanılan fosforik asitlerin triesterleridir. OP'ların etki mekanizması sinir sistemi içerisindeki asetilkolinesteraz (AChE) inhibisyonu ile ilişkilidir. Paraokson, asetil kolinleri yıkan kolinesterazların potent inhibitörüdür. Ardışık nöron uyarılması ile sinaptik bileşelerde asetil kolin birikimine yol açar. Memelilerde karaciğerdeki detoksifikasyondan kaçan herhangi bir okson organofosfat etki alanına ulaşmadan önce kanda serum PON1 enzimiyle hidroliz edilebilir. Bu enzimin inhibisyonu ile OP zehirlenmeleri ve sinir sisteminde bozukluklar meydana gelir(45). Organofosfatlar, tüm bileşiklerinde organik molekülünün bir parçasında fosfat grubu veya fosfat türevlerini içerirler. OP'lerin genel formülü çoğunlukla aynıdır. Merkezde fosfat atomu bulunur ve fosfat atomunun oksijen veya sülfürle çift bağ yapmasına göre farklı adlandırılır (Şekil 10). OP, P=O formunda iken yalnızca asetilkolinesterazları etkileyebilir. Genel olarak kullanıldığı insektisidlerde P=S formun oksijen analoglarına dönüşmesi gereklidir. R1 ve R2 grupları genelde alkil veya aril gruplarıdır. X grubu geniş bir değişkenlik göstermekle birlikte genelde alifatik, aromatik ve heterosiklik grupları tanımlamaktadır(31).



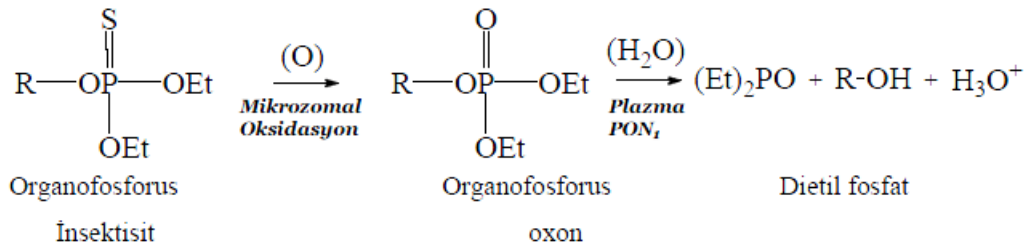
Şekil 10: OP Bileşiği Genel Formülü

Organofosfatlar tarımdaki faydalarının yanı sıra insan hayatını önemli ölçüde tehdit eden toksik kimyasallardır. Paraoksonaz enzimi savunma sistemi oluşturarak OP'lerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Soman, sarin ve tabun gibi organofosfat sinir gazlarını hidroliz ederek bunları daha az zararlı bileşiklere dönüştürmektedir (Şekil 11).



Şekil 11: Sinir Gazlarının Hidrolizi(31).

İnsan serum paraoksonaz enzimi ayrıca paration, diazinon ve klorpirifos gibi çok sayıda insektisitlerin toksik okson metabolitlerini hidrolizleyebilmektedir(Şekil-12)(31).

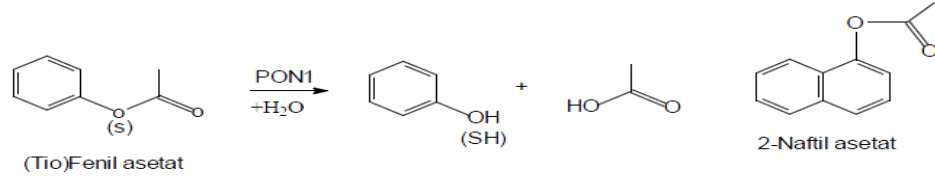


Şekil 12: Organofosfat İnsektisitlerin Detoksifikasyonu(31).

Bu aktivitelerinin yanında PON1 enzimi sınıflandırılmada yer aldığı A esteraz grubunda bulunması ile fenilasetat gibi ester substratları da hidrolizleyebilmektedir(Şekil-13).

PON1 eksikliği gösteren böcekler organofosfat için hedef organizmadır. Memelilere kıyasla kuşlarda organofosfat zehirlenmesine

yatkınlık daha yüksek bulunmuştur; bu da kuşlarda serum PON1 enziminin yokluğuna bağlıdır. Benzer durum sürüngenler ve balıkların zehirlenmeye yatkınlığını da açıklar(31).



Şekil 13: Aromatik Esterlerin Hidrolizi(31).

Lipopolisakkarid İnaktivasyonu: İnsan serumunda HDL'de bulunan bir proteinin bakteriyel lipopolisakkaritleri(LPS) inaktive ederek toksik semptomları önlediği saptanmıştır. Lipopolisakkarit inaktivasyonu immunolojik olmaktan çok enzimatik bir reaksiyondur. Bu reaksiyondan sorumlu enzimin PON1 olduğu saptanmıştır. PON1, bakteriyel lipopolisakkariti lipid A molekülündeki 4' fosfat üzerine fosfataz etkisi ile hidroliz eder. HDL'nin bir subfraksiyonu olan Tripanolitik faktor (TLF) Trypanosoma brucei brucei'e sitotoksiktir ve apo AI, PON, haptoglobulin ile ilişkili bir proteindir. Lizozomal pH'ta aktive olan PON'ın peroksidaz aktivitesi olduğu düşünölmektedir. HDL kompleksinin endotoksin toksisitesine karşı koruyucu olduğu bilinmektedir. Gram(-) bakteriyel enfeksiyon sırasında endotoksemi gelişimine karşı korumayı bir ölçüde sağlar. PON, makrofaj hücre yüzeyindeki CD14 spesifik bağlayıcı proteinle, bakteri yüzeyinden köken alan lipoprotein polisakkaritin etkileşimini önler. Aksi takdirde TNF- α , IL-1, IL-6 gibi sitokinlerin salınımını başlatır. Dr. Standiford(31)'un yaptığı çalışmada; farelere, lipopolisakkarit enjeksiyonundan iki saat önce saflaştırılmış PON1 enjekte edilmiştir ve hayvanların %60'ı hayatta kalmıştır. Buna karşılık farelere LPS enjeksiyonundan 2 saat sonra PON1 verildiğinde farelerin %30'u yaşamıştır. PON1 enjeksiyonu hiç yapılmadan LPS verildiğinde bütün fareler ölmüştür. Bu ve diğer çalışmaların sonucu olarak PON1'in hücreleri LPS'den koruma yeteneğine sahip olduğu anlaşılmaktadır.

Fakat PON1'in tip ve düzeyinin bireylerin endotoksinlerine karşı duyarlılığı ve sensitivitesinde fark yaratıp yaratmadığı tartışmalıdır.

Oksidatif veya peroksidatif aktivite; PON1, LDL oksidasyonunun önlenmesi üzerinde HDL'nin koruyucu etkisinden sorumlu HDL ana bileşenidir. HDL, antioksidan ve antienflamatuvar özelliklere sahiptir ve LDL oksidasyonunu buna bağlı olarak da aterosklerozisi geciktirir. Paraoksonaz aterosklerozise karşı koruyuculuğunu sahip olduğu laktonaz aktivitesi ile göstermektedir. Enzim 4 atomdan 7 atoma kadar değişen lakton halkası ihtiva eden en az 30 çeşit laktonu hidrolizleyebilmektedir(31).

II.9.1.5. PON2

PON2, moleküler ağırlığı yaklaşık 44 kDa olan ve hücre içinde elde edilen büyük bir proteindir(46). Hakkında fazla bilgi bulunmamaktadır. PON2, hemen hemen her insan dokusundan elde edilebilir, yüksek oranda ekspresyon karaciğer, böbrek, plasenta, testis ve kalpte yapılır(47).

PON2 iki polimorfizme sahiptir. Populasyon çalışmalarında PON2 148. pozisyonda alanin veya glisin (A/G148) ve 311. pozisyonda sistein veya serin (C/S311) aminoasitlerinin yer değişimine bağlı olarak polimorfizm göstermektedir. A/G148 polimorfizmi total veya LDL kolestrol seviyeleri, plazmadaki glikoz seviyeleri ve başlangıç ağırlığının değişimleri ile ilişki halindedir(31). C/S311 polimorfizmi ise kalp damar hastalıkları, tip 2 diyabet, alzheimer ve menopoz sonrası kemik ağırlığının düşmesi ile ilişkilidir(48).

PON2 genetik polimorfizmi ile farklı plazma lipoproteinleri arasında bir ilişki bulunduğu belirtilmiştir. Örneğin PON2 polimorfizmi lipoproteinlerin sentez ve salgılanması üzerinde fonksiyonel etki gösterir. İkinci olarak PON2 polimorfizmleri PON aktivitesini etkileyebilir. Lipid metabolizma yolundaki bazı önemli enzimleri (lipoprotein lipaz, hepatik lipaz gibi) aktif ya da inaktif yapabilir. Bunun sonucunda lipoprotein kompozisyonu ve lipid seviyeleri değişikliğe uğrayabilir. PON2'nin fizyolojik ve patofizyolojik fonksiyonları az bilinmesine rağmen, hücresel düzeyde antioksidan etkisi olduğu bilinmektedir. PON2'nin transfer edildiği hücrelerde oksitlenmiş lipidler ya da hidrojen peroksidin neden olduğu hücre içi oksidatif stres seviyesi belirgin

şekilde düşmektedir. Rosenblat ve ark.(49)'nın yaptığı çalışma saflaştırılmış rekombinant PON2'nin, LDL oksidasyonuna karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Ayrıca PON2, minimal oksitlenmiş LDL'nin oksidasyonunu da geciktirebilir (MM-LDL). Sonuç olarak; PON2, hücreleri oksidatif stresten korur ve hücrel antioksidan olarak görev yapar. Bununla birlikte PON2'nin mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır.

II.9.1.6. PON3

PON3, moleküler ağırlığı yaklaşık 40 kDa olan bir proteindir. PON1 ve PON2'ye karşılık PON3, son zamanlarda tanımlanmış karakterizasyonu en az bilinen proteindir. Son zamanlarda İtalya'nın güneyindeki populasyon üzerinde yapılan çalışmalara göre PON3, iki polimorfizm göstermektedir. Fakat bu polimorfizmlerin fonksiyonel önemi belirlenememiştir(31).

PON1'e benzerlik gösteren PON3'te karaciğerde sentezlendikten sonra kana salınır, orada spesifik olarak HDL'ye bağlanır. PON3 arteroskleroza karşı bazal koruma fonksiyonu sağlar. PON3, PON1 ve PON2'ye benzer olarak antioksidan özelliklere sahiptir. Draganov ve ark. (50)'larının yaptığı bir çalışma; tavşan serumundan saflaştırılan PON3'ün in vitro ortamda LDL oksidasyonunu arttıran bakırı inhibe ettiğini göstermektedir. PON3'ün insan dokusunda saflaştırılması ve karakterizasyonu zordur. PON1'e karşın PON3, ne farelerin karaciğerindeki aterojenik diyet ne de HepG2 hücrelerindeki oksitlenmiş fosfolipidler tarafından düzenlenir. Bununla birlikte PON3 oksitlenmiş lipidlerin birikimini önlemez fakat oksitlenmiş LDL'nin neden olduğu monosit kemotaksisi engeller. PON3, PON1 gibi paraokson ve fenilasetata benzer sentetik substratları hidroliz edemez. PON3, PON1'e göre çok az arilesteraz aktivitesine sahiptir, paraoksonaz aktivitesi göstermez. Fakat laktonları çok hızlı hidroliz eder.

II.9.2. Arilesteraz Aktivitesi

İnsan serumunda PON1 geninin ürünü olan paraoksonazın aynı zamanda arilesteraz aktivitesine de sahip olduğu gösterilmiştir(51). PON1'in

polimorfik değişim gösterdiği bilinmesine karşın ARE aktivitesi genetik polimorfik bir değişim göstermemektedir(52). Paraoksonaz enzimi geniş bir substrat özgülüğü gösterirken, fizyolojik substratı tam olarak belirlenmemiştir. Ancak arilesterazın, organofosfataz ve laktonaz aktivitelerine sahip olduğu tespit edilmiştir. Yine iki enzimin doğal substratları farklı olmasına karşın, PON1 enzimi ARE'nin doğal substratı olan fenil asetatı hidroliz edebilme yeteneğine sahiptir. Yani paraoksonaz enzimi aktivite polimorfizmi göstermeyen arilesteraz aktivitesine de sahiptir(33). Ayrıca PON1 ve ARE'nin iyi bilinen ortak özellikleri organofosfatları, aril ve alkil halojenürleri hidroliz etme yeteneğidir. ARE, PON1 aktivitesindeki değişimlerden etkilenmeyen asıl proteinin göstergesi olarak kabul edilmektedir(38).

İnsan serumunda paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesine sahip tek bir enzim bulunduğu kanıtlanmıştır. Plazma örneğindeki enzimin 600 kat saflaştırma basamağı sonrası arilesteraz (substrat olarak fenilasetat kullanılarak ölçülmüş) ve paraoksonaz aktivitelerinin aynı olduğu gösterilmiştir. Paraokson ve diizopropilflorofosfat (DFP), fenilasetat substratı gibi davranarak yarışmalı inhibisyon yapar. Paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri kalsiyum gerektirir ve her ikisi EDTA ile aynı derecede inhibisyona uğrar. Saflaştırılmış arilesteraz/paraoksonaz en az 43 kDa molekül ağırlığında ve glikoprotein yapıdadır. Her molekülde üç şeker zinciri vardır ve karbonhidrat içeriği toplam molekül ağırlığının %15.8'idir. Enzimin izoelektrik noktası 5.1'dir. Enzimin aminoasit içeriğinde çok fazla lösin aminoasiti içermesi dışında bir özellik yoktur. Sonuç olarak insan serumunda organofosfat substratlarını ve birçok aromatik karboksilik asit esterlerini hidrolize eden arilesteraz ve paraoksonaz aktivitesi gösteren tek bir enzim vardır. Genetik çalışmalar, polimorfizmden sorumlu iki allozimik formu tanımlamışlardır(53).

III. ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

III.1. ÇALIŞMA GRUBU

Bu çalışma; Aralık 2011 – Haziran 2012 tarihleri arasında Manisa ve yöresinde yaşayan 20-67 yaşları arasında, Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi (Hafsa Sultan Hastanesi)'ne kontrol için gelen sağlıklı kişiler, sağlıklı kurum çalışanları ve onların yakınlarından oluşan, 115'i erkek,118'si kadın olmak üzere toplam 233 sağlıklı bireyde yapıldı.

Araştırma için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi etik kurulundan onay alındı. Araştırmamız, Helsinki Bildirgesi'ne uygun olacak şekilde yürütüldü. Katılan tüm bireyler araştırma hakkında bilgilendirildi, bu amaçla hazırlanan Aydınlatılmış Onam Formu (EK-1) okutularak onayları alındı.

Hazırlanan Anket Formu (EK-2) katılan bütün bireyler için doldurulduktan sonra dışlama kriterleri göz önüne alınarak kan örnekleri alındı.

Çalışma örnekleme alınan bireylerden 8 ml periferik venöz kan örnekleri, 12 saatlik açlıktan sonra 1 kırmızı kapaklı(antikoagülansız) tüpe alındı. Alınan kan örnekleri pıhtılaşması için 30 dak. oda ısısında bekletildikten sonra 3500 devir/dak.'da (1370 X g) 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışma gününe kadar - 80 °C'lik derin dondurucuda saklandı.

Çalışma gününde oda ısısına getirilen serum örneklerinde PON, ARE ve LOOH düzeyleri, (Relassay, Türkiye) ticari kitler kullanılarak Selectra\ Flexor E, (Vital Scientific, Hollanda) otoanalizöründe çalışıldı.

III.2. ARAÇ ve GEREÇLER

1. Otoanalizör: Selectra \ Flexor E, Vital Scientific, (Hollanda)
2. Santrifüj: (Hettich Universal 32 R) (Almanya)

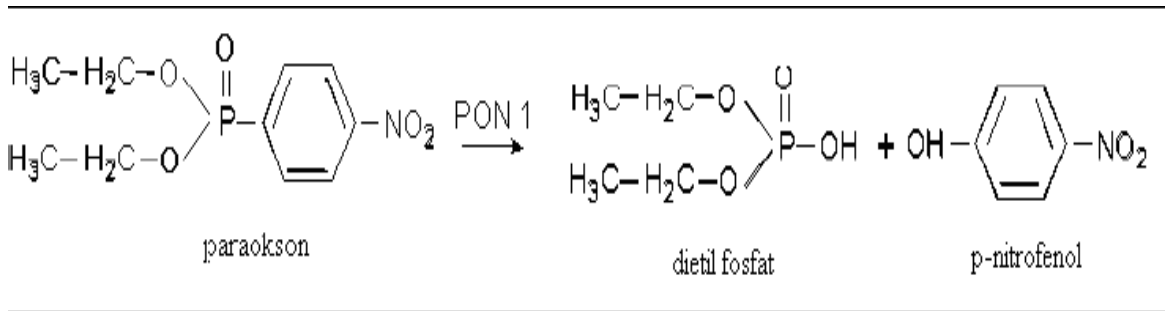
3. Kan alma tüpü: 8 mL'lik düz kan alma tüpü (BD Vacutainer SST II Advance). (U.S.A.)
4. PON Kiti: (Relassay, Türkiye)
5. ARE Kiti: (Relassay, Türkiye)
6. LOOH Kiti: (Relassay, Türkiye)
7. Derin Dondurucu: Nuaire Ultralow Freezer(-80°C)(ABD)

III.3. YÖNTEMLER

III.3.1. Paraoksonaz Ölçümü

Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde, paraokson gibi organofosfatların enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümü esas alınmaktadır.

Paraoksonaz aktivite düzeyleri, ticari kitler (Relassay, Türkiye) kullanılarak, Vital Scientific, Selectra/ Flexor E(Hollanda) otoanalizöründe tayin edildi. Paraoksonaz aktivitesi, paraoksonun, 37 °C de, PON1 enzimi tarafından hidrolizi sonucu oluşan sarı renkli paranitrofenolün neden olduğu absorpsiyon artışı takip edilerek, 412 nm'de ölçüldü. pH 8.5'teki molar absorpsiyon katsayısı $18.290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ kullanılarak oluşan paranitrofenol miktarı üzerinden PON aktivitesi hesaplandı. Paraoksonaz aktivitesi U/L olarak verildi (Şekil 17). Kullanılan PON-1 ticari kitine ait ölçüm prosedürü Tablo 7'de, ölçüm hassasiyet değerleri ise Tablo 8'de verilmiştir.



Şekil 17: Paraoksonaz'ın Paraokson'u Hidroliz Reaksiyonu

Tablo 7: Kullanılan PON-1 Ticari Kitine Ait Ölçüm Prosedürü.

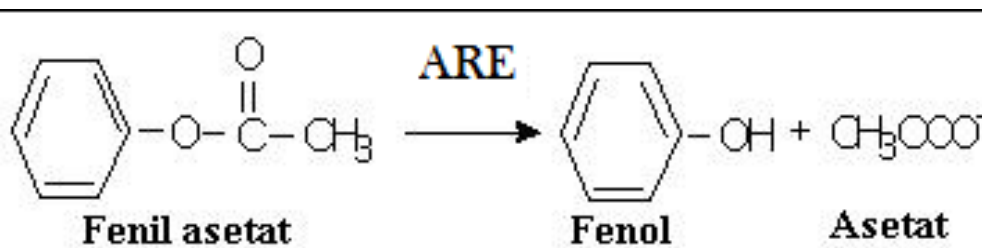
Reaktif 1	500 µL	Tris Tamponu +Kalsiyum
Numune	25 µL	
Reaktif 2	25 µL	Substrat (paraokson)
Dalga Boyu	412 nm	
Okuma	Kinetik(rate-up) ölçüm	
Aktivite	U/L	

Tablo 8: Kullanılan PON-1 Ticari Kitine Ait Ölçüm Hassasiyet Değerleri.

	PON Ölçümü (CV %)
Yüksek Aktivite	4.1
Orta Aktivite	1.7
Düşük Aktivite	1.5

III.3.2. Arilesteraz Ölçümü

Arilesteraz aktivite ölçümü için substrat olarak fenil asetat kullanıldı. Enzim aktivitesi reaksiyon sonucu üretilen, molar absorpsiyon katsayısı $1310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ olan fenol üzerinden hesaplandı. Bir ünite ARE aktivitesi dakikada 1 µmol fenol oluşturan enzim aktivitesi olarak tanımlanmış olup U/L cinsinden ifade edildi (Şekil 18). Kullanılan ARE ticari kitine ait ölçüm prosedürü Tablo 9'da, ölçüm hassasiyet değerleri ise Tablo 10'da verilmiştir.



Şekil 18: Arilesterazın Fenil Asetatı Hidroliz Reaksiyonu

Tablo 9: Kullanılan ARE Ticari Kitine Ait Ölçüm Prosedürü.

Dilue Numune [Dilusyon oranı 1/100 (Sample/Diluent)]	3 µL
Reaktif 1	260 µL
Reaktif 2	10 µL
Reaktif 3	80 µL
İlk Dalga Boyu	548 nm
İkinci Dalga Boyu	700 nm
Metot	End Point – Bikromatik
Ölçüm Noktaları	İlk absorbans numune ile R1 karıştırıldıktan sonra. Son absorbans R2 ve R3 eklenip karıştırıldıktan sonra
Kalibrasyon tipi	Lineer
Faktör	1316

Tablo 10: Kullanılan ARE Ticari Kitine Ait Ölçüm Hassasiyet Değerleri .

	ARE Ölçümü (CV %)
Yüksek Aktivite	4.0
Orta Aktivite	3.3
Düşük Aktivite	3.1

III.3.3. LOOH ölçümü

Lipid Hidroperoksid düzeyleri ticari kit (Relassay, Türkiye) kullanılarak, ksilenol turuncusu yöntemi ile ölçüldü. Yöntem, ilk olarak Jiang ve ark.(54) tarafından tarif edilen asidik bir ortam içerisinde, Fe²⁺ nin Lipid Hidroperoksidler ile Fe³⁺ 'e oksidize olması ilkesine dayanır. Oluşan Fe³⁺, ksilenol turuncusu (o-cresosulfonephtalein-ksilenol 3,30-bismethylimino-diasetik asit; XOF) ile kompleks oluşturarak, 550-570 nm'de maksimum absorbans veren mor bir boya üretir:



LOOH düzeyinin ölçümünde varyasyon katsayısı %5 olup, ticari kit prosedürü Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: Lipid Hidroperoksid Kit Prosedürü

Süre (sn)	Örnek (µL)	Reaktif 1(µL)	Reaktif 2(µL)	Okuma
0	25	-	-	-
5	-	180	-	-
300	-	-	45	+
800	-	-	-	+

III.4. İstatistiksel Analizler

Bu çalışmanın veri analizinde SPSS 15.0 paket istatistik programı kullanıldı. Veriler cinsiyete göre alt gruplara ayrıldı. Referans değer verilerinin histogramları çizildi ve veri dağılımı görsel olarak incelendi.

Tanımlayıcı istatistik ölçütleri (aritmetik ortalama, medyan, standart sapma, minimum değer, maksimum değer, 2.5 ve 97.5 yüzdelik değerleri) hesaplandı.

Üç grupta ortalamaların karşılaştırılmasında ANOVA, post hoc testi olarak da Tukey testi kullanıldı. İki grup arasında sürekli verilerin ortalamalarının karşılaştırılmasında Student’s t testi kullanıldı. Tüm testlerde $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

Çalışmamızın örnek referans kitesini, 20-67 yaşları arasında 115'i erkek ve 118'i kadın olmak üzere toplam 233 kişi oluşturdu. PON ve ARE referans aralığı hesaplamaları için çalışmaya dahil edilen 233 kişinin tamamının verileri kullanıldı. Ancak, LOOH ölçümlerinde 14 numune miktarı yetersiz kaldığı için bu sayı 219'a düştü.

IV.1. Sosyodemografik Bulgular

Çalışmamızı oluşturan referans grubun demografik ve karakteristik bulguları toplu olarak Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Referans Grubunun Demografik ve Karakteristik Bulguları

Parametre	Ort.±SD	Min.-Max.	
Yaş(yıl)	36.15±23.78	20-67	
Boy(cm)	168.31±8.50	150-190	
Ağırlık(kg)	71.07±14.26	40-130	
VKİ(kg/m ²)	25.05±4.64	15.57-54.11	
Parametre	n	% Dağılım	
Cinsiyet			
	Kadın	118	50.4
	Erkek	115	49.6
Yaş Grupları(Yıl)			
	20-29	81	34.8
	30-39	61	26.2
	40-49	55	23.5
	50 ≥	36	15.5

Sigara İçme Durumu			
	Evet	76	32.6
	Hayır	157	67.4
Egzersiz Yapma Durumu			
	Evet	29	12.4
	Hayır	204	87.6
Vücut Kitle İndeksi			
	≤ 25	127	54.5
	25-29	75	32.2
	30 ≥	29	12.4

Tablo 12'nin incelenmesinden anlaşılacağı gibi referans grubu demografik veriler bakımından çeşitli alt gruplara(sigara içen/içmeyen, egzersiz yapan/yapmayan ve vücut kitle indeksi) ayrıldı. Sigara içenler tüm referans grubun % 32.6'sını (n=76), egzersiz yapanlar ise % 12.4'ünü(n=29) oluşturmaktadır. Vücut kitle indekslerine göre gruplandırıldığında; VKİ'i ≤25 olan grup tüm referans grubun % 54.5'ini (n=127), VKİ'i 25-29 arasında olan grup % 32.2'sini (n=75), ve VKİ'i 30≥ olan grup ise % 12.4'ünü (n=29) oluşturmaktadır.

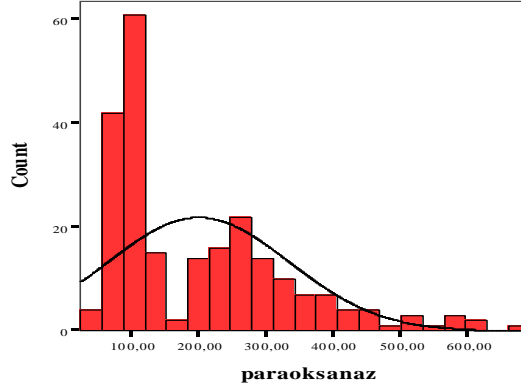
IV.2. Deneysel ve İstatistiksel Bulgular

Çalışmamızı oluşturan referans grubun PON, ARE ve LOOH değerleri toplu olarak Tablo 13'de verilmiştir.

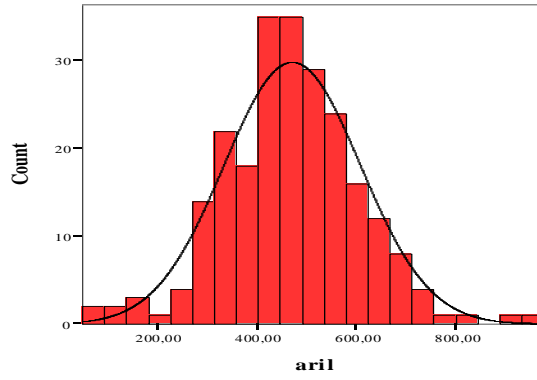
Tablo 13. Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	233	198.2±134.9	24-691	1.15	0.93	1.74
ARE	233	468.8±137.0	50-974	0.97	1.06	8.17
LOOH	219	4.95±3.24	0.1-27.78	2.91	14.09	0.49

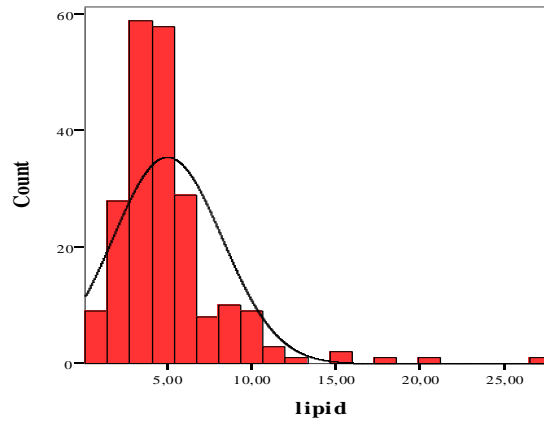
Çalışmamızı oluşturan referans grubun PON, ARE ve LOOH dağılım grafikleri Şekil 18,19 ve 20'de verilmiştir.



Şekil 18. Referans Gruba ait Paraoksonaz Dağılım Grafiği



Şekil 19. Referans Gruba ait Arilesteraz Dağılım Grafiği



Şekil 20. Referans Gruba ait Lipid Hidroperoksid Dağılım Grafiği

Çalışmamızı oluşturan referans grubun PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları Tablo 14'de verilmiştir.

Tablo 14. Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	56.850	157.900	1.076
10	69.400	307.400	2.362
20	87.800	346.000	2.905
25	92.000	376.000	3.116
30	99.200	406.200	3.363
40	110.000	439.200	3.812
50	125.000	472.000	4.228
60	217.600	505.800	4.692
70	263.600	533.000	5.351
75	274.500	555.000	5.744
80	306.000	569.200	6.418
90	389.000	638.600	8.641
97.5	567.350	745.050	13.657

Çalışmamızda elde edilen referans grubuna ait PON, ARE ve LOOH parametrelerine ait referans değerler ve birimleri Tablo 15'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 15. PON, ARE ve LOOH'e ait Referans Değerler ve Birimleri

Parametre(Birim)	Referans Aralık
PON (U/L)	56.8 - 567.3
ARE (U/L)	157.9 - 745.0
LOOH ($\mu\text{mol/L}$)	1.07 - 13.65

Çalışmamızda yaş gruplarına göre bulunan PON, ARE ve LOOH parametrelerine ait referans değerleri ve bu değerlere ait % Persentil dağılım tabloları aşağıda verilmiştir (20-29 yaş grubu için Tablo 16 ve 17, 30-39 yaş grubu için Tablo 18 ve 19, 40-49 yaş grubu için Tablo 20 ve 21, 50 ve üzeri yaş grubu için Tablo 22 ve 23).

Tablo 16. 20-29 Yaş Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	81	174±104	62-511	1.07	0.53	120
ARE	81	472±123	85-727	-0.42	0.46	480
LOOH	78	4.89±3.9	0.26-27.78	3.55	16.86	4.03

Tablo 17. 20-29 Yaş Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	62.150	138.500	1.022
10	75.000	312.600	1.777
20	90.000	347.600	2.704
25	94.500	395.000	2.893
30	99.600	410.600	3.113
40	109.000	441.600	3.593
50	120.000	480.000	4.032
60	194.600	515.000	4.305
70	229.200	537.200	4.874
75	254.000	563.500	5.621
80	271.400	576.600	6.351
90	311.800	631.800	8.842
97.5	442.100	701.200	20.660

Tablo 18. 30-39 Yaş Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	61	184±129	42-691	1.45	2.74	124
ARE	61	462±164	114-974	0.59	1.34	448
LOOH	52	5.15±3.32	0.10-15.36	0.33	1.59	4.47

Tablo 19. 30-39 Yaş Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	44.750	139.300	.225
10	63.000	248.000	2.166
20	87.000	327.600	2.674
25	89.000	360.000	2.958
30	91.000	404.800	3.192
40	106.600	431.400	3.489
50	124.000	448.000	4.479
60	203.000	493.000	4.766
70	242.600	521.000	5.923
75	266.000	554.000	6.631
80	291.800	565.600	7.645
90	346.000	648.400	10.416
97.5	579.350	938.250	15.180

Tablo 20. 40-49 Yaş Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	55	226±161	24-618	0.94	-0.06	199
ARE	55	464±134	50-751	-0.31	0.963	461
LOOH	53	4.9±2.67	0.95-18.12	2.67	10.86	4.4

Tablo 21. 40-49 Yaş Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	31.200	88.400	1.010
10	72.800	327.000	2.594
20	84.200	344.600	3.151
25	93.000	373.000	3.559
30	103.600	379.400	3.759
40	113.400	427.800	4.159
50	199.000	461.000	4.436
60	248.200	497.200	4.754
70	285.600	539.800	5.371
75	324.000	555.000	5.632
80	353.200	579.800	6.212
90	529.800	632.200	7.843
97.5	605.600	748.200	15.419

Tablo 22. 50 ve Üzeri Yaş Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	36	230±151	56-619	0.61	-0.42	240
ARE	36	479±122	278-795	0.35	0.15	476
LOOH	36	4.86±2.1	2.00-10.58	1.13	0.829	4.29

Tablo 23. 50 ve Üzeri Yaş Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	56.000	278.000	1.997
10	63.700	295.100	2.588
20	83.600	372.000	3.193
25	97.000	386.750	3.473
30	103.100	436.500	3.531
40	111.800	459.400	3.916
50	240.500	476.500	4.296
60	274.200	503.600	4.805
70	321.300	531.800	5.428
75	340.250	551.500	5.621
80	367.000	562.000	6.252
90	436.000	668.600	8.243
97.5	619.000	795.000	10.579

Çalışmamızda cinsiyete göre bulunan PON, ARE ve LOOH parametrelerine ait referans değerleri ve bu değerlere ait % persentil dağılım

tabloları (Erkek grubu için Tablo 24 ve 25, Kadın grubu için Tablo 26 ve 27) ve histogramları (Şekil 21, 22, 23) aşağıda verilmiştir.

Tablo 24. Erkek Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	115	182±122	24-691	1.48	3.01	122
ARE	115	661±124	50-823	-0.18	0.86	471
LOOH	109	5.56±3.39	0.10-20.48	1.81	4.51	4.68

Tablo 25. Erkek Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

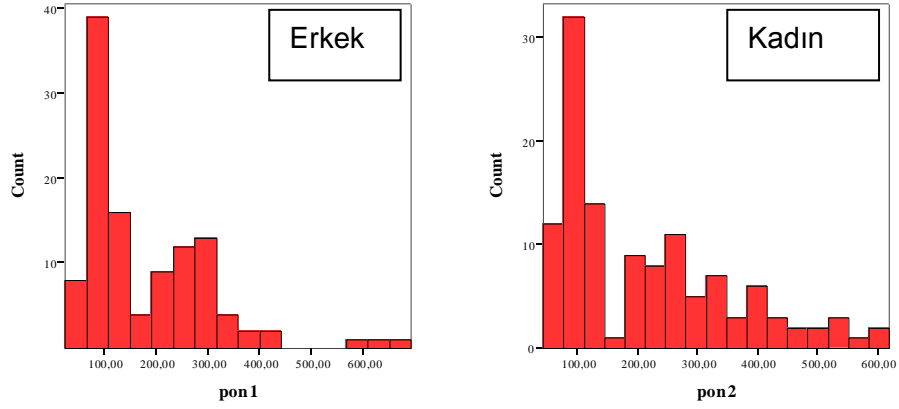
YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	55.100	210.300	.428
10	68.200	308.200	2.715
20	81.400	340.200	3.207
25	92.000	370.000	3.463
30	96.000	409.800	3.658
40	107.000	443.600	4.283
50	122.000	471.000	4.688
60	198.200	483.000	5.016
70	249.000	517.200	5.870
75	269.000	532.000	6.377
80	285.400	560.400	8.109
90	313.800	618.800	10.330
97.5	579.400	729.400	16.049

Tablo 26. Kadın Referans Grubunun PON, ARE ve LOOH Değerleri

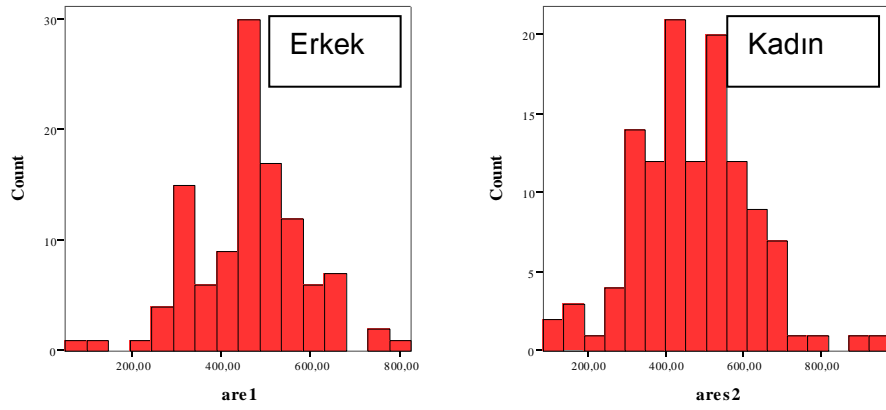
Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
PON	118	214±144	42-618	0.89	-0.14	168
ARE	118	476±148	85-974	0.21	1.03	478
LOOH	110	4.34±2.97	0.95-27.78	4.75	34.9	3.83

Tablo 27. Kadın Referans Grubunda PON, ARE ve LOOH Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

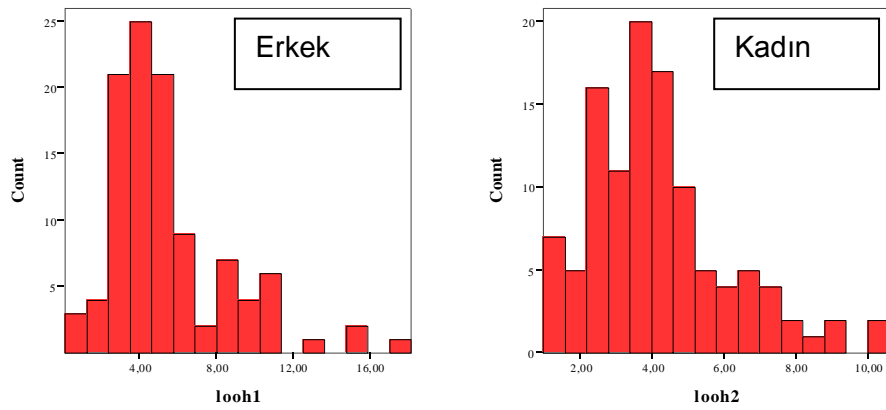
YÜZDELİK	PON	ARE	LOOH
2.5	56.625	145.600	1.094
10	74.400	304.700	2.079
20	88.800	349.200	2.638
25	93.000	380.000	2.744
30	100.700	405.400	3.030
40	112.200	432.000	3.504
50	168.000	478.000	3.832
60	237.000	515.800	4.209
70	270.200	545.100	4.701
75	314.750	566.500	4.919
80	344.400	586.200	5.693
90	443.100	647.700	7.109
97.5	566.525	797.850	10.397



Şekil 21: Paraoksonaz Düzeylerine Ait Dağılım Histogramları



Şekil 22: Arilesteraz Düzeylerine Ait Dağılım Histogramları



Şekil 23: Lipid Hidroperoksid Düzeylerine Ait Dağılım Histogramları

IV.2.1. Alt Gruplara ait PON, ARE ve LOOH Değerlerinin Karşılaştırılması

Cinsiyet, sigara içen/içmeyen ve egzersiz yapan/yapmayan alt gruplarına ait PON, ARE ve LOOH değerlerinin karşılaştırılması Tablo 28'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 28. Alt gruplara ait PON, ARE ve LOOH Değerlerinin Karşılaştırılması

Parametreler	Özellik	n	Ortalama	SD	P
PON	Erkek	115	182	122	0.070
	Kadın	118	214	144	
	Sig. İçen	76	188	122	0.431
	Sig*. içmeyen	157	203	139	
	Egz**. yapan	204	175	95	0.341
	Egz. yapmayan	29	201	139	
ARE	Erkek	115	661	124	0.410
	Kadın	118	476	148	
	Sig. İçen	70	447	439	0.102
	Sig. içmeyen	149	479	143	
	Egz. yapan	190	459	118	0.681
	Egz. yapmayan	29	470	139	
LOOH	Erkek	109	5.56	3.39	0.005
	Kadın	110	4.34	2.97	
	Sig. İçen	70	5.38	4.36	0.180
	Sig. içmeyen	149	4.75	2.88	
	Egz. yapan	190	4.31	3.00	0.255
	Egz. yapmayan	29	5.05	3.27	

*Sigara, ** egzersiz

Tablo 28'in incelenmesinden anlaşılacağı gibi; cinsiyet açısından kıyaslandığı zaman LOOH düzeyleri erkeklerde kadınlara oranla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek ($p=0.005$) bulunurken, PON ve ARE parametrelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (sırasıyla $p=0.07$, $p=0.410$).

Erkek ve kadın gruplarında sigara içme/içmeme ve egzersiz yapma/yapmama bakımından tüm parametreler için istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (hepsi için $p>0.05$).

Referans grubunun yaş ve VKİ alt gruplarındaki parametrelere ait karşılaştırma hesapları One-Way Anova ve Tukey testi ile yapıldı. Yaş grupları ve VKİ grupları arasındaki parametre karşılaştırmaları Tablo 29 ve Tablo 30'de verilmiştir.

Tablo 29. Yaş Gruplarına ait PON, ARE ve LOOH Değerlerinin Karşılaştırılması(One-Way Anova)

Parametre	20-29 (a)	30-39 (b)	40-49 (c)	50≥ (d)	p* (POST Hoc)**
PON	175 (n=81)	185 (n=61)	226 (n=55)	230 (n=36)	0.058
ARE	472 (n=78)	462 (n=52)	464 (n=53)	479 (n=36)	0.932
LOOH	4.8 (n=78)	5.1 (n=52)	4.9 (n=53)	4.8 (n=36)	0.967

*Anova

**Tukey B

Tablo 30. Vücut Kitle İndekslerine Ait PON, ARE Ve LOOH Değerlerinin Karşılaştırılması(One-Way Anova)

Parametre	≤ 25 (a)	25-30 (b)	30 ≥ (c)	p* (POST Hoc)**
PON	186 (n=127)	183 (n=75)	270 (n=29)	0.05 (a=b)>c
ARE	466 (n=122)	451 (n=75)	515 (n=29)	0.096
LOOH	4.65 (n=122)	5.39 (n=67)	5.30 (n=28)	0.277

*Anova

**Tukey B

Tablo 29 ve 30'un incelenmesinden anlaşılacağı gibi; yaş grupları açısından kıyaslandığı zaman PON, ARE ve LOOH parametreleri için yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$). VKİ grupları açısından kıyaslandığı zaman PON değerleri VKİ $30 \geq$ olan grupta VKİ ≤ 30 olan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu($F(2)=5.39$, $p=0.05$). Diğer parametreler içinse VKİ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$).

Çalışmamızdan PON, ARE ve LOOH için elde ettiğimiz ve klinik laboratuvarımızda rutine konulmaları halinde Manisa ve yöresi için kullanabileceğimiz referans değerler Tablo 31'te toplu olarak verilmiştir.

Tablo 31. Çalışmamız Sonucunda Bulduğumuz Manisa Yöresine Ait Referans Aralıkları

Parametre	Birim	Referans Aralığı
PON	U/L	Yetişkin : 56.8-567.3
ARE	U/L	Yetişkin : 157.9-745.0
LOOH	$\mu\text{mol/L}$	Yetişkin Kadın: 1.09-10.39 Yetişkin Erkek: 0.42-16.04

V. TARTIŞMA

Tıbbi kararların büyük bölümü laboratuvar sonuçları tarafından sağlanan bilgilere dayanmaktadır. Bu sonuçlar, testlerin yorumlanabilmesi için gereken uygun bilgiler sunulmadığı takdirde çok az değer taşır. Tipik olarak bu bilgiler referans aralığı ya da tıbbi karar sınırı biçiminde sunulmaktadır(55). Referans aralık kavramı Ceriotti(56) tarafından "laboratuvar tarafından hizmet popülasyonuna uygulandığı zaman doğru referans grubu ile benzer özelliklere sahip konuların çoğunu içeren ve diğerlerini dışlayan bir aralıktır" şeklinde tanımlanır. Referans aralık tamamen doğru ya da yanlış değildir. Bugün kullanılan referans aralıklarının büyük bir çoğunluğu nüfusun %95'ini merkeze alan örneklerden oluşmaktadır(55).

IFCC her laboratuvarın kendi referans değerlerini üretmesi gerektiğini belirtmektedir(57,58). Ancak referans aralıkların hesaplanması zahmetlidir ve bu nedenle her klinik laboratuvar tarafından gerçekleştirilememektedir. Tavsiye edilen hesaplama yöntemlerine göre Ülkemizde klinik değerlendirmede ve araştırmalarda kullanılan çeşitli parametrelerin referans aralıklarını belirleme çalışmaları yapılmıştır. Uygulanabilir referans aralıklarının ortaya konulması ile gelecekte yapılacak araştırmalara yön verilebilecek ve toplum sağlığı açısından riskli durumlar belirlenerek, önlemler alınması sağlanacaktır. Ayrıca hastalıkların tanı ve takibinde kullanılan, daha önceden var olan veya yeni tanımlanıp kullanıma girmesi planlanan testlerin güvenle değerlendirilmesi mümkün olacaktır(10).

Bunlara ek olarak, güncel bir konu olan laboratuvarların akreditasyonu sırasında her laboratuvarın, analizini yaptığı parametreler için referans aralıkların transformasyonunu yapması, ya da IFCC ve NCCLS'nin belirttiği kriterlere göre hesaplanması gerekliliği ortaya konulmuştur(1).

Serbest radikallerin hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederek hücre hasarı oluşturdukları artık açıkça bilinmektedir. Serbest oksijen gruplarının biyolojik sistemlerdeki

en önemli etkileri lipidler üzerine olanıdır(59). Bu olay lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitleri serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek zararlı peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve çeşitli lipid peroksid radikalleri oluşur. Bunlardan biri de LOOH'tir. LOOH yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından diffüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar(7). Paraoksonaz-1 ise karaciğerde sentezlenen, paraoksonaz, arilesteraz ve diazoksonaz aktivitesine sahip, kalsiyum bağımlı bir ester hidrolaz enzimidir(60). Son çalışmalarda HDL kolesterol ile ilişkili olduğu ve LDL kolesterolün oksidatif modifikasyonuna karşı koruyucu bir rol oynayarak lipid peroksidasyonunu engellediği, antioksidan ve antiinflamatuvar özellik gösterdiği belirtilmektedir(61). PON-1'in, hücre membranları ve lipoproteinler üzerine serbest radikallerin yol açtığı lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdiği gözlenmiştir(62). PON, ARE ve LOOH parametreleri son yıllarda araştırılan son derece güncel ve ilgi çekici parametrelerdir.

Ulusal ve uluslar arası düzeyde yapılan araştırmalarda kardiyovasküler hastalıklar(63-66), karaciğer hastalıkları(67,68), romatoid artrit(69), sjögren sendromu(70), behçet hastalığı(71), psöriazis(72) gibi otoimmün hastalıklar, akciğer(73), özofagus(74), meme, kolon kanserleri(75,76), obezite(77), metabolik sendrom(78-80), hipotiroidi(81), diyabet(82) ve diyabet komplikasyonları(52) gibi endokrin hastalıklar, beta talasemi minor (83), demir eksikliği anemisi(60) gibi hematolojik hastalıklar, periferik arter hastalıkları(84), endometriyozis(85), erken gebelik kaybı(86), migren(87), iskemik inme(88), parkinson(89), alzheimer(90), multiple skleroz(91), obstrüktif uyku apne sendromu(92) gibi birçok hastalıktaki düzeyleriyle bu hastalıklar arasındaki ilişki incelenmiştir. Ancak yapılan bu çalışmalarda hastalıklı gruplardaki düzeyleri, geniş bir popülasyonu kapsayan bir referans aralığı olmadığı için kısıtlı sayı ve nitelikteki kontrol gruplarının düzeyleriyle karşılaştırılabilmektedir.

Referans aralıklarının belirlenmesinde ilk aşama referans bireylerin seçimidir. Birey seçimi aşamasında kullandığımız anket bu aşamada çok yararlı oldu. Çalışmamızda referans popülasyonu oluşturan bireyler; herhangi bir sistemik hastalığı ve enfeksiyonu olmayan, hastanede tedavi görmeyen, kan merkezine kan bağıışı yapmak için gelenler, laboratuvara sadece kontrol amacıyla kan vermek için başvuranlar ile hastane personeli ve yakınları, Celal Bayar Üniversitesi'nde okuyan öğrenciler, öğretim görevlileri, çevremizde bulunan, aktif bir hastalığı bulunmayan ve ciddi bir hastalık geçirmemiş kişilerden seçilmiştir. Çalışmamıza erişkin yaş grubundaki (20-67 yaş) bireyler dahil edilmiştir. Güvenilir referans değerleri için en az 120 veri gerekli olduğundan çalışmamızda referans birey sayısının 120'den fazla olmasına özen gösterilmiştir.

Paraoksonaz aktivite ölçümlerine ait metodlar Eckerson ve ark.(93), Furlong ve ark.(94) ve Smolen ve ark.(95) tarafından geliştirilmiştir. Paraoksonaz ve arilesteraz aktivitesi ölçümlerinde kullanılan yöntemler temelde aynı olmakla birlikte farklı pH'lardaki çözeltiler kullanılmakta ayrıca farklı sıcaklıklarda reaksiyon oluşturulmaktadır(93-95). Ölçümlerde tam bir standardizasyon sağlanmadığından çeşitli sorunlarla karşılaşmaktadır. Paraoksonaz enzim aktivitesi ölçümünde, substrat olarak paraokson gibi organofosfatların enzimatik hidrolizi sonucu oluşan 4-nitrofenolün spektrofotometrik ölçümü esas alınmaktadır. Arilesteraz ölçümünde ise substrat olarak paraokson yerine fenil asetat kullanılmakta ve oluşan fenol ölçülmektedir. Eckerson ve ark.(93) paraoksonaz aktivitesi ölçümlerinde Krisch(96)'den modifiye ettikleri bir metod uygulamışlardır. Bu metodda 1 mmol/L paraokson ve 1 mmol/L CaCl₂ içeren pH sı 10.5 olan 0.05 mol/L glisin tamponu kullanılarak bazal aktivite ve aynı solüsyona 1 mol/L NaCl ilâvesi ile NaCl ile stimüle edilen paraoksonaz aktivitesi 25 °C'de 412 nm dalga boyunda ölçümlerle tespit edilmiştir. Krisch(56) ise ölçümlerinde 0.15 mol/L NaCl içeren glisin tamponu kullanmıştır. Zech ve Zurcher(97) pH sı 7.2 olan trietanolamin tamponu kullanarak paraoksonaz ölçümlerini yapmışlardır. Juretic ve ark.(98) ise paraoksonaz aktivite ölçümlerinde glisin tamponu yerine pH sı 8 olan Tris-HCl tamponu kullanmışlardır. Farklı literatürlerde

sunulan metodoloji farklı olduğu için ölçüm sonuçlarının güvenilirliği azalmaktadır(33). Çeşitli tuz solüsyonları paraoksonaz ve arilesteraz aktivitelerini etkilemektedir. Sodyum klorür, potasyum klorür ve amonyum klorür gibi çeşitli tuz ilâvelerinin paraoksonaz aktivitesi üzerindeki stimülan etkileri araştırılmış ve en yüksek oranda stimülasyonun sodyum klorür ile gerçekleştiği tespit edilmiştir(9,17). Sodyum klorürün artan konsantrasyonlardaki ilâveleri PON1 aktivitesinde stimülasyon oluşturmalarına rağmen, ARE aktivitesi üzerinde inhibitör etki göstermektedir(9). Bu nedenle; PON1 aktivite ölçümlerinde 1 M NaCl ilâve edilirken, ARE ölçümlerinde NaCl kullanılmamaktadır. 1M NaCl tarafından enzim aktivitesinde oluşturulan stimülasyon derecesi, PON1 aktivitesinin fenilasetat hidrolizi aktivitesine (ARE aktivitesi) oranı belirlenerek ya da fenilasetatın paraoksonaz A ve B fenotiplerinin aktivitesinde oluşturduğu inhibisyon derecesine göre(17) enzim aktivitesinin fenotipik ayrımı yapılabilmektedir.

Paraoksonaz aktivitesi, NaCl ile uyarılabilmektedir ve bu amaçla ölçüm tamponuna NaCl katmadan (bazal aktivite) ve NaCl katarak (uyarılmış aktivite) enzim aktivitesi belirlenmektedir. Ancak NaCl-stimüle PON aktivitesinin klinik önemi tam olarak açık olmamakla birlikte, PON-1 fenotipinin belirlenmesinde kullanılmaktadır(33). Paraoksonaz enziminin, farklı pH ve tuz konsantrasyonlarında PON-1 ve ARE aktivitelerinin değiştiğinin anlaşılması üzerine yapılan çalışmalar sonucu A ve B şeklinde iki PON fenotipi tanımlanmıştır. NaCl stimülasyonuna yanıt veren B fenotipi paraoksone karşı daha yüksek enzim aktivitesine sahipken, tuz uyarılmasıyla ARE aktivitesinin azaldığı tespit edilmiştir. PON fenotipinin, kardiyovasküler hastalıklar açısından önem arz ettiği ve ARE aktivitesinin, PON-1 aktivitesindeki değişikliklerden bağımsız olarak asıl protein konsantrasyonunun bir göstergesi olduğu bildirilmektedir(10). Bu çalışmada ölçümler tris tamponunun kullanıldığı tam otomatize paraoksonaz ve arilesteraz kitlerini kullanarak yapılmıştır.

İnsanlarda oksidatif stresin değerlendirilmesi, spesifik gaz veya sıvı kromatografik teknikler dışında hala çok zor bir işittir. Bugün en popüler yöntem TBARS yöntemidir, ancak nonspesifiktir; çünkü birçok aldehit ve lipid

olmayan materyal TBA katılım ürünü olabilir(99). Bu yüzden oksidatif stresin başlangıç biyomarkeri olarak lipid hidroperoksid ölçümü için otomatik, basit ve güvenilir yeni yöntemler geliştirilmesine yönelik yoğun çaba gösterilmektedir.

Yeni yöntem ilk olarak Jiang ve ark.(100)'nın tanımladığı asidik ortamda lipid hidroperoksidin Fe^{+2} yi Fe^{+3} 'e oksidize etmesi prensibine dayanır. Oluşan Fe^{+3} ortamdaki ksilenol turuncusu ile, absorbansı 550-570 nm'de maksimum olan menekşe rengi bir kompleks oluşturur. Başlangıçta bu yöntemin iki ana sakıncası dile getirilmiştir. Bunlar; reaksiyondan sonra proteinlerin çökmesi için metanol ilâve edilerek santrifüj etme ihtiyacının olmasıdır. Bu santrifüj basamağı otomasyonun önüne geçmektedir. Aynı zamanda tahmin edilenin altında lipid hidroperoksid bulunmasına yol açmaktadır.

Bu yöntemin iki ana avantajı, analiz sırasında herhangi bir protein çöktürme işlemi gerekmeyecek şekilde optimize edilmiş bir asidik ortamda gerçekleştirilmesidir (protein çöktürmenin olmayışı ölçümü otomatikleştirmek için olanak sağlamaktadır) ve sadece çok düşük bir numune hacmi ile çalışılabilmektedir. Aynı zamanda çöktürme ve santrifügasyon işlemleri olmadığı için analiz kısa sürmektedir(15 dak.)(54). Biz de LOOH ölçümümüzü ksilenol turuncusu yöntemiyle çalışan tam otomatize kitler kullanarak yaptık.

Referans grubumuzu cinsiyetlere göre alt gruplara ayırdığımızda LOOH düzeylerini erkeklerde kadınlara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek ($p=0.005$) bulurken, PON ve ARE parametrelerinde istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulamadık (sırasıyla $p=0.07$ ve $p=0.410$). 2003 yılında Carrera ve ark.(101) İspanya'da yaptıkları çalışmada 2138 kadın ve 753 erkek birey PON aktivite düzeyini karşılaştırdıklarında kadınlarda daha yüksek değerler bulduklarını bildirmişlerdir(K: 70.98 ± 16.8 , E: $68,12\pm 15.7$) (unpaired different size, t test $p<0,0005$).

Yaşlanma tüm yaşayan organizmalarda ortak olan progresif ve zarar verici bir süreçtir. İnsanlarda nörodejeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, bazı kanser çeşitleri, metabolik bozukluklar, diyabet, bazı otoimmün ve kemik hastalıkları gibi rahatsızlıkların gelişimi yaşlanma ile

ilgilidir. Yaşlanmada lipid peroksidasyonuna ve oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türlerinin üretiminde artış, homeostasis ve yaşa bağlı hastalıkların başlamasında önemli rol oynar. Oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu bazı yaşa bağlı hastalıkların nedeni olabilir. Buna rağmen orta dereceli sabit bir oksidatif stres, antioksidan kapasite artışı ile yaşa bağlı hastalıkların başlamasını ve aşırı yaşlanmayı önlemesiyle de yararlı olabileceği düşünülmektedir(102). Yaşlanmanın mekanizması tam olarak bilinmese de nedenini açıklayan teoriler üretilmiştir. Bu teoriler birbirleriyle endojen reaktif oksijen moleküllerinin/radikallerinin neden olduğu hasarlar konusunda örtüşmektedir. Oksidatif stresin, pek çok patolojik durumun yanı sıra yaşlanmada da rolü olduğu ileri sürülmektedir (103,104).

Mehdi ve ark.(105) yaşlanma ile paraoksonazın arilesteraz aktivitesinin azaldığını, okside LDL düzeylerinin arttığını bulmuşlardır. Özbay ve ark.(106)'nın yapmış oldukları bir çalışmada ise çeşitli antioksidan enzimlerin yanı sıra lipid peroksidasyonu son ürünü MDA düzeylerinin de yaşla değişmediğini saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise yaş grupları açısından kıyaslandığı zaman PON, ARE ve LOOH parametrelerinin hiç biri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$). Bu farklılıklar, çalışmaların farklı bölgelerde farklı ırklarla yapılmış olmasına bağlı olabileceği gibi, çevre ve beslenme farklılığından da kaynaklanmış olabilir.

Düzenli olarak yapılan fiziksel egzersizin sağlık üzerine birçok yararlı etkisi olduğu bilinmektedir. Ancak akut egzersizde kasların oksijen kullanımı dinlenme anından yüksek, şiddetli egzersizlerde ise 100-200 kata kadar fazladır(107). Hem fiziksel aktivite için hem de organizmanın hayati fonksiyonlarını sürdürebilmesi için gerekli olan oksijen, organizmayı toksik oksijen ürünlerinin zararlı etkileri ile karşı karşıya bırakır. Akut egzersizin serbest radikal üretimini arttırdığı, antioksidan savunma sistemini farklı şekillerde etkilediği ve oksidatif stres oluşturduğu rapor edilmiştir. Artan oksijen tüketimine bağlı olarak elektron iletiminin bozulduğu, elektron transport zincirinde süperoksid radikal üretiminin arttığı, dolayısıyla makromoleküler oksidasyonun arttığı büyük oranda kabul edilmiş bir görüştür. Akut egzersizlerin oksidatif strese neden olduğu belirlenmiş

olmasına rağmen, düzenli olarak uzun süreli uygulanan aerobik ve/veya direnç egzersizlerin lipid peroksidasyon (MDA, TBARS) seviyesini azalttığı ve antioksidan enzimlerin aktivitesini (SOD, GSH-Px, CAT) hem erkek hem kadınlarda arttırdığı belirlenmiştir. Bu olgu bir çelişki değildir; sadece egzersizin neden olduğu antioksidan savunma sistemin aktive edilmesi ve/veya oksidatif stresi onaran sistemin müdahalesi gibi farklı adaptasyonların bir sonucudur(107-110). Gharakhanlou ve ark.(111) sağlıklı erkeklerde egzersiz yapmanın PON, ARE ve lipid profili üzerine etkisini inceledikleri çalışmada egzersiz yapan ve yapmayan grup enzim aktivite düzeylerinde bizimkine benzer şekilde anlamlı bir fark bulamamışlardır. Goldhammer ve ark.(112) ise, koroner arter hastalığı olan 37 hasta üzerinde yaptıkları çalışma neticesinde, 12 hafta düzenli egzersizin PON aktivite düzeylerinde %16,7 oranında artışla sonuçlandığını saptamışlardır. Çakmak ve ark.(113) amatör adolesan sporcularda LOOH değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır($p < 0.0001$). Bizim çalışmamızda ise PON, ARE ve LOOH seviyelerinde, egzersiz yapan ve yapmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı(hepsi için $p > 0.05$). Bunun sebebi egzersiz yapanların egzersiz süreleri ortalamalarının düşük olması ve/veya farklı şiddetteki egzersizleri yapıyor olmalarından kaynaklanıyor olabilir. Nitekim, bizim çalışmamızda deneklere bir egzersiz programı uygulanmamıştır ve düzenli egzersiz yapanların da haftada ortalama 1-2 saat gibi kısa süreli egzersiz yapıyor olmaları farklı sonuçların nedeni olabilir.

Sigara içmek serbest radikal üretimini şiddetlendirmekte ve in vivo koşullarda oksidatif stresi önemli miktarda arttırmaktadır(114). Sigara içen bireylerde artan oksidatif stres iki şekilde açıklanabilir; doğrudan dumana maruz kalmaya bağlı olarak artan serbest radikal üretimi ve/veya bozulan antioksidan savunma sistemi(115). Sigara içen bir kişi tek bir nefeste sigara içme safhasında 10^{15} 'den daha fazla serbest radikale maruz kalmaktadır. Solunan hava yerine gram başına katran miktarı dikkate alındığında bu değer 10^{17} 'den daha fazla olmaktadır. Son dönemdeki çalışma bulguları düzenli sigara içme alışkanlığı sonucu artan oksidatif stres seviyesi ile kardiovasküler

hastalıkların oluşması ve ilerlemesi arasında mekanik bir bağlantı olduğunu göstermektedir(110). Bloomer(115)'in yaptığı bir çalışmada genç (yaş ortalaması: 24 yıl) ve sigara içen (n=15; ≥ 5 sigara/gün; 3 yıl) bireylerin, sigara içmeyen bireyler (n=13) ile karşılaştırıldığında, düşük plazma antioksidan kapasiteye ve yüksek lipid peroksidasyon seviyesine sahip oldukları belirlenmiştir. Bu çalışmada, olumsuz değişimlere en çok katkıda bulunan faktörün sigara içilen yıl sayısı olduğu vurgulanmıştır(115). Ancak Çimen ve ark.(116)'nın yaptığı bir başka çalışmada yılda içilen sigara paketi sayısı ile lipid peroksidasyon düzeyi arasında orta düzeyde negatif ilişki ($r = -.40$) gözlenmiştir. Solak ve ark.(117) serum MDA düzeylerini sigara içenlerde içmeyenlere oranla yüksek, PON aktivitesini ise düşük bulmuşlardır. Ergüder ve ark.(118)'nin sigarayı bırakmanın PON aktivitesi üzerine kısa dönem etkilerini inceledikleri bir çalışmada, sigara bırakıldıktan 4 hafta sonra PON aktivitelerinin arttığını, MDA düzeyinin azaldığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise erkek ve kadın gruplarında sigara içme/içmeme bakımından tüm parametreler için istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı (hepsi için $p > 0.05$). Bu fark, yapılan birçok çalışmada eritrosit antioksidan düzeylerine bakılması, bizim çalışmamızda ise serum düzeylerine bakılmasından kaynaklanmış olabileceği gibi yine yöntem farklılıklarından veya içilen günlük sigara sayısının farklı olmasından ileri gelmiş olabilir.

İnsulin rezistansına bağlı gelişen metabolik değişikliklerden kaynaklanan oksidatif stresin metabolik sendromun komplikasyonlarının oluşmasına katkıda bulunduğu dair güçlü deliller bulunmaktadır(38). Obez hastalarda, ortaya çıkan ileri dönem komplikasyonlarının en büyük nedenlerinden biri olarak artmış oksidan stres öne sürülmektedir. Birçok çalışmada obezitede, çeşitli oksidan stres parametrelerinin arttığı gösterilmiştir(119-123). Ferretti ve ark.(77) 31 sağlıklı, 12 obez kadını inceledikleri çalışmada, obez kadınlarda sağlıklı kadınlara göre PON aktivitesini anlamlı olarak düşük, lipid hidroperoksid düzeyini ise anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır ($p < 0,001$). Solak ve ark.(78) ise 67 metabolik sendromlu hasta ile 52 sağlıklı kontrol grubunu karşılaştırmış ve PON aktivite

düzeylelerinde anlamlı bir fark bulamamıştır. Bizim çalışmamızda ise VKİ grupları açısından kıyaslandığı zaman PON değerleri, VKİ $30 \geq$ olan grupta $VKİ \leq 30$ olan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu ($F(2)=5.39$, $p=0.05$). Diğer parametreler içinse VKİ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Ancak bu gruplardaki birey sayıları benzer değildi ($30 \geq VKİ$ 75 kişi, $30 \leq VKİ$ 29 kişi).

Yaptığımız kaynak taramalarında çalıştığımız parametreler için ulusal ya da uluslar arası düzeyde yapılmış bir referans aralık çalışmasına rastlayamadık. Ancak bu parametreler yukarıda bahsettiğimiz konulardaki hasta gruplarında ve bu gruplarla eşleştirilmiş sağlıklı kontrol gruplarında incelenerek düzeyleri ortalama \pm SD şeklinde sunulmuştur. Biz de bulduğumuz ortalama değerleri, bu konuda yapılmış yayınlara ait kontrol gruplarının ortalama değerleri ile karşılaştırdık (Tablo 32).

Tablo 32: Bulduğumuz PON, ARE ve LOOH referans değerleri ile ulusal ve uluslar arası çalışmalarda bulunmuş değerler

	PON	ARE	LOOH	N	
Bizim Çalışmamız	56.8-567.3 (U/L)	157.9-745.0 (U/L)	1.07-13.65 (μ mol/L)	233	Hesaplanan Referans aralık
	198 \pm 134	468 \pm 137	4,9 \pm 3,2		Hesaplanan Ort. \pm SD
Ulusal Çalışmalar	238 \pm 99 (U/L)	181 \pm 31 (kU/L)	9.9 \pm 2.0 (μ mol H ₂ O ₂ Eqv./L)	70	Camuzcuoğlu ve ark(60)
	395.8 \pm 116.6 U/mL	167.7 \pm 45 (U/L)		39	Elkiran ve ark(73)
	100.6 \pm 44.4 (U/L)	68.2 \pm 5.2 (U/L)	1.9 \pm 0.9 (μ molH ₂ O ₂)	26	Altındağ ve ark(69)
	831.05 \pm 74.11 (nmol/L)	198.56 \pm 13.79 (μ mol/mL)		49	Çelik ve ark(124)
	377.72 \pm 110.18 (U/L)	234.41 \pm 70.14 (U/mL)		45	Türkoğlu ve ark(79)

	156.2±4.8 (U/mL)			72	Kırbaş(88)
	139.23±81.54 (U/L)			52	Solak ve ark(78)
	91±19 (U/L)	70±7 (U/L)		25	Koç ve ark(125)
	183.7±22.3 (U/L)		11.5±2.3 (mmol/L)	40	Verit ve ark(85)
	149,05±21,32 (U/L)	393,55±42,27 (U/L)	5,99±1,01 (µmol H ₂ O ₂ Eq/L)	23	Işık ve ark(71)
	264.36±39.28 (U/L)	158.15±14.35 (U/L)	6.27±1.50 (µmol/L)	28	Selek ve ark(83)
	189±52 (U/L)	132±20 (U/L)	5,41±0,3 (µmol/L)	43	Aslan ve ark(126)
Uluslar arası Çalışmalar	171 (130–270) (U/mL)	129 6 32 (U ml ⁻¹) ^a aValues are median (quartiles)		17	Szanto ve ark(70)
	68.91±99.51 (U/mL)	39.16±38.03 (U/mL)		100	Gbandjaba ve ark(127)
	283±78 (U/L)			127	Liao ve ark.(67)
	470.5±53.1 (U/mg doku)		0.23–2.11 (nmol/100 µg doku)	31	Ferretti ve ark.(77)
	194.25 ± 131.66 (U/L)	518±222 (U/L)		138	Hashemi ve ark(68)

Referans aralıklar bölgesel olarak hesaplanmalıdır. Çünkü bu değerler bölgeler, coğrafi konum, çevresel şartlar, beslenme veya popülasyona göre değişiklik gösterebilir. Oluşturulacak çalışma grubu veya grupları ile ülke genelinde yaygınlaştırılabilir. Bu şekilde saptanacak referans aralıkları Türk

populasyonu hakkında yararlı bilgiler de sağlayabilir. Ayrıca bu gibi çalışmaların yaygınlaşması klinik laboratuvarların kalitesine katkıda bulunabileceği gibi laboratuvar test sonuçlarında standardizasyonu da sağlayabilecektir. Referans aralık projelerinin ulusal boyutta gerçekleştirilmesi toplum sağlığına olan yararları nedeniyle desteklenmelidir.

Çalışmamızda PON'ın referans aralığını; 56.8-567.3 U/L, ortalamasını 198 ± 134 olarak bulduk. Hashemi ve ark.(68), PON değerlerini 194.25 ± 131.66 U/L olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda ARE'in referans aralığını; 157.9-745.0 U/L, ortalamasını 468 ± 137 U/L olarak bulduk. Hashemi ve ark.(68). İran'da yaptıkları çalışmada 518 ± 222 U/L olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda LOOH'in referans aralığını; 1.07-13.65 $\mu\text{mol/L}$, ortalamasını 4.9 ± 3.2 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulduk. Aslan ve ark.(126) yaptıkları çalışmada LOOH değerini 5.41 ± 0.32 ($\mu\text{mol/L}$) olarak bulmuşlardır.

Tablo 26'nın incelenmesinden anlaşılacağı gibi yurtdışında ve ülkemizde yapılan çalışmalarda, PON, ARE ve LOOH test sonuçları, benzerlikler göstermekle birlikte birbirleriyle bire bir örtüşmediği açıkça görülmektedir ve bu durum normal karşılanmalıdır. Çünkü bahsi geçen parametreleri etkileyen çok sayıda faktör vardır. Örneğin paraoksonaz polimorfizm gösteren bir enzim olup; enzim aktivitesi, yüksek ve düşük aktiviteli iki allelin genetik kontrolü altında olması sebebiyle, aktivitesinin bireyler ve toplumlar arasında çok değişken olmasıdır. Bunun yanında ölçüm yöntemlerinin farklılığı da özellikle PON aktivitesi tuzla uyarılarak değiştirilebildiği için sonuçların farklı olmasına sebep olabilir. Bununla birlikte Talwar ve ark.(128) antioksidan parametre düzeylerinin, biyolojik değişkenliklerinin yüksek olması nedeniyle topluma dayalı referans aralıklar göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiğini söylemişlerdir. Bizim çalışmamızın sonuçları da bu görüşü destekler niteliktedir. Ayrıca aynı çalışmacılar bu parametreler için yapılan çalışmaların az sayıdaki katılımcıyla yapıldığını ve sonuçların genellikle ortalama \pm SD şeklinde verildiğini; bu durumun eksiklik ve yükseklik kararını vermede güvenilir şekilde kullanımı sınırlayacağını belirtmişlerdir(128). Biz de çalışmamızda 233 sağlıklı

bireyden elde ettiğimiz verilerden NCCLS'nin önerdiği parametrik olmayan yöntemlere göre referans aralıkları hesaplayarak sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmayı amaçladık. Bunun yanında diğer çalışmalar referans aralık çalışması değildirler. Dolayısıyla yukarıda çalışma sonuçlarımız ile karşılaştırdığımız değerler kısıtlı sayıdaki kontrol gruplarının sonucunu içerdiği gibi farklı coğrafya, etnik yapı, beslenme ve sosyal yaşam alışkanlıklarını yansıtan değerlerdir. Bu yüzden, bu tür testleri rutin olarak çalışacak laboratuvarların kendi referans değerlerini kendi toplumlarında oluşturması çok daha fazla önem taşımaktadır.

PON ve LOOH referans aralıkları araştırılırken dahil edilen referans bireylerin sayısının nispeten az olması ve bu bireylerin belirli bir tabakaya ait populasyonu temsil etmesidir. Bu tür çalışmalar sahada yapılmalıdır. Sahada yapılacak olan çalışmalar için bu bir ön çalışmadır. Her ne kadar referans grubu oluşturan birey sayısı az da olsa biz gerek cinsiyet gerek yaş gruplarını homojen tutmaya çalıştık. Birey seçiminde oldukça titiz davrandık. Çalışmamız; Manisa ve yöresinde bu konuda yapılmış olan ilk çalışmadır ve bu yönüyle orijinal bir çalışmadır. Ancak daha büyük popülasyonda saha çalışmalarının yapılmasının uygun olacağı kanaatindeyiz.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, referans grubunu Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi'ne başvuran sağlıklı kişiler, sağlıklı kurum çalışanları ve bu kişilerin yakınlarından oluşan 233 sağlıklı birey oluşturmaktadır. Bu projede, Manisa ve yöresinde yaşayan sağlıklı erişkinlerde birçok hastalığın etiolojisinde rolü olduğu düşünülen ve hali hazırda birçok çalışmaya konu olan; PON, ARE ve LOOH parametrelerinin referans aralıklarını belirlemeyi ve rutin olarak çalışılabilmesi için bu testlerin çalışma yöntemlerini laboratuvarımıza kurmayı amaçladık.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Referans grubu, cinsiyet açısından kıyaslandığı zaman PON ve ARE parametrelerinde anlamlı bir fark gözlenmezken($p=0.07$, $p=0,410$), LOOH düzeyleri erkeklerde kadınlara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek($p=0.005$) bulundu.
2. Erkek ve kadın gruplarında sigara içme/içmeme ve egzersiz yapma/yapmama bakımından tüm parametreler için istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı(her biri için $p>0.05$).
3. Referans grubu, yaş grupları açısından kıyaslandığı zaman PON, ARE ve LOOH parametreler için yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$).
4. Referans grubu, VKİ grupları açısından kıyaslandığı zaman PON değerleri VKİ $30 \geq$ olan grupta VKİ ≤ 30 olan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulundu($F(2)=5,39$, $p=0.05$). Diğer parametreler içinse VKİ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$).
5. Çalışmamızda bulduğumuz referans değerler: PON: 56,8-567,3 U/L, ARE: 157,9-745,0 U/L, LOOH: 1.07-13.65 $\mu\text{mol/L}$.

6. Klinik laboratuvarlarda testlerin tıbbi karar amacıyla kullanılabilmesi için her testin referans aralıklarının bilinmesi gerekir.
7. Referans aralık değerleri coğrafi bölge, ırk, cinsiyet, yaş, beslenme ve egzersiz alışkanlıkları gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Bu yüzden, bütün laboratuvarlar hizmet verdikleri topluma uygun şekilde kendi referans aralık değerlerini belirlemelidir.
8. Referans aralık çalışmalarında kullanılan veri sayısı ve dağılımın normalliği uygulanacak istatistiksel yöntem ile yakından ilişkilidir. Bu yüzden veri sayısının yeterli olması ve çalışmaya alınacak bireylerin titizlikle seçilmesi dağılımın modülasyona uğramamasına ve referans çalışmasının daha güvenilir olmasına neden olur. Yanlış bir yöntem seçildiği takdirde ise çalışmaya alınacak bireyler uygun olsa bile yine güvenilir olmayan sonuçlara neden olacaktır. Bu yüzden çalışmanın her aşamasında gerekli dikkat ve özen gösterilmelidir.

VII. ÖZET

MANİSA VE YÖRESİNDEKİ SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM PARAOKSONAZ, ARİLESTERAZ VE LİPİT HİDROPEROKSİT REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ

Amaç: Laboratuvar sonuçlarını verimli bir şekilde yorumlayabilmek için, sonuçların doğru ve güvenilir referans aralıkları ile birlikte sunulması gerekir. Referans aralık değerlerinin cinsiyet, yaş, ırk, beslenme ve çevresel özellikler gibi faktörlere bağlı olarak değişmesi nedeniyle, laboratuvarlar kendi referans aralık değerlerini belirlemelidir. Laboratuvar akreditasyonu sırasında her laboratuvarın, analizini yaptığı parametreler için kabul edilmiş kriterlere göre referans aralıklarını hesaplaması gereklidir. Bu çalışmada, sağlıklı referans bireylerde; oksidan-antioksidan dengesinin önemli parametrelerinden olan, paraoksonaz(PON) ve arilesteraz(ARE) enzim aktiviteleri ile lipid hidroperoksid(LOOH) düzeylerini belirleyerek Manisa ve yöresindeki referans aralıklarını saptamayı amaçladık.

Materyal ve Metot: Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda 20-67 yaşları arasındaki 233 bireyden, 12 saat açlık sonrasında, venöz kan örnekleri toplandı. PON ve ARE enzim aktiviteleri ile LOOH düzeyleri otomatik analizörde hazır kitler kullanılarak ölçüldü. SPSS 15.0 programı kullanılarak, tanımlayıcı istatistik ölçütleri hesaplandı. İki grup arasında sürekli verilerin ortalamalarının karşılaştırılmasında Student's t testi, üç grubun karşılaştırılmasında ANOVA ve post hoc testi olarak Tukey testi kullanıldı.

Bulgular: Çalışma sonuçlarımıza göre PON aktivitesi referans değeri, 56.8-567.3 U/L; ARE aktivitesi referans değeri 157.9-745.0 U/L; LOOH'in referans değeri, kadınlarda 1.09-10.39 $\mu\text{mol/L}$, erkeklerde, 0.42-16.04 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulundu. PON ve ARE aktivitelerinde cinsiyet açısından fark yokken, LOOH düzeyleri erkeklerde kadınlara göre daha yüksek bulundu. Her üç parametre için ise yaş ve vücut kitle indeksi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

Sonuç: Bu çalışma bölgemizde PON, ARE ve LOOH referans aralıkları için yapılan ilk çalışma olması nedeniyle orijinaldir. Bu bağlamda, daha geniş popülasyonda yapılacak olan referans aralık çalışmalarına katkı sağlayabileceği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Paraoksonaz, Arilesteraz, Lipid Hidroperoksid, Referans değer.

VIII. SUMMARY

DETERMINATION OF REFERENCE INTERVALS FOR SERUM PARAOXONASE, ARYLESTERASE AND LIPID HYDROPEROXIDE IN HEALTHY SUBJECTS LIVING IN MANISA REGION

Aim: Reliable reference intervals are important for productive interpretation of laboratory data. Because many analytes vary notably among gender, age, ethnicity, nutritional and environmental factors, each laboratory need to assess their own reference ranges. For the accreditation of laboratories it is needed that every laboratory should calculate according to specified criterion. In this study, we have aimed to assess reference intervals of healthy reference subjects in Manisa region of serum paraoxonase(PON) and arylesterase(ARE) activities and lipid hydroperoxide(LOOH) levels which are among important parameters of oxidant-antioxidant balance.

Materials and Methods: In our study, venous blood samples were obtained after 12 hours of fasting from 233 individuals, who are at the age limit of 20-67 years at Celal Bayar University Medical Biochemistry Laboratory in Manisa. PON and ARE enzyme activities and LOOH levels were analysed using fully automatic analyzers and readymade kits. Descriptive statistical criteria were determined using SPSS 15.0 soft ware. Student t test was used for statistical analyzes of the means in two groups. ANOVA test was used for statistical analyzes of the means in three groups and Tukey test was used for the post hoc test.

Results : According to our study results, the reference value of serum PON activity was 56.8-567.3 U/L; reference value of ARE activity was 157.9-745.0 U/L and reference value of LOOH was 1.09-10.39 $\mu\text{mol/L}$ in women and 0.42-16.04 $\mu\text{mol/L}$ in men. There was no statistical difference in gender for activities of PON and ARE but for LOOH levels the results were higher in the male subjects than the female. PON ARE and LOOH levels were not significantly different for age and BMI.

Conclusion: This study is original, because this is the first study conducted on reference ranges of PON, ARE and LOOH in our region. Therefore, we believe that, this study can contribute to larger population studies.

Key Words: Paraoxonase, Arylesterase, Lipid Hydroperoxide, Reference Interval.

IX. EKLER

EK-1: HASTA BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU ÖRNEĞİ

ARAŞTIRMANIN ADI (ÇALIŞMANIN AÇIK ADI): Manisa Yöresinde Sağlıklı Bireylerde Bazı Biyokimyasal Verilerin Normal Aralıklarının Belirlenmesi

Gönüllünün Baş Harfleri << >>

Bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını bilgilerinizin nasıl kullanılacağını çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını risklerini ve rahatsızlık verebilecek konuları anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız ve eğer istiyorsanız özel veya aile doktorunuzla konuyu değerlendiriniz. Eğer bir başka çalışmada da yer alıyorsanız bu çalışmada yer alamazsınız.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAK ZORUNDAMIYIM?:

Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirseniz imzalanmanız için size bu Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu verilecektir. çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Eğer isterseniz, bu çalışmaya katılımınızla ilgili olarak hekiminiz / aile doktorunuz bilgilendirilecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI NEDİR?

Birçok hastalığın temel nedenlerini ortaya çıkarmakta etkili olan biyokimyasal veriler vardır. Bu biyokimyasal verilerden bazıları için hala normal değerleri saptanmamıştır. Bizde buradan yola çıkarak sağlıklı bireylerden alacağımız kan ile bazı biyokimyasal veriler için normal değerlerini araştırmayı amaçladık.

ÇALIŞMA İŞLEMLERİ:

Hasta öyküsünde ve biyokimyasında değişik hastalıklarından dolayı ilaç kullanan hastalar çalışmaya dahil edilmeyecek. Hastaya herhangi bir ilaç uygulaması yapılmayacaktır. Sadece rutin tedavi prosedürü uygulanıp, rutin analizleri yapmak için alınan kandan 1 cc de bize çalışma amaçlı alınacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIM NE GİBİ OLASI YAN ETKİLERİ, RİSKLERİ VE RAHATSIZLIKLARI VARDIR?

Çalışmamız hasta açısından herhangi bir risk içermemektedir. Fizyolojik olarak herhangi bir rahatsızlık hissetmeyecektir.

ÇALIŞMAYA KATILMANIN OLASI YARARLARI NELERDİR?

Rutin olarak kullanılmaya başlanmamış yeni testleri yaptırma imkanı.

ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Tüm laboratuvar testleri çalışma destekleyicisi tarafından karşılanacak ve size veya bağlı bulunduğunuz özel sigorta veya resmi sosyal güvenlik kurumuna ödetilmeyecektir. Bu çalışmaya katılmış olmanızdan dolayı herhangi bir zarar görürseniz Çalışma destekleyicisi bunu, Türkiye Cumhuriyeti yasalarına uygun olarak karşılayacaktır.

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Kişisel bilgileriniz hiçbir şekilde kullanılmayacaktır.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİLER

Prof. Dr. Zeki Arı: 0236 233 19 20-347

Araş. Gör. Dr. Sezen Irmak: 0236 232 3133-103

Çalışmaya Katılma Onayı

Yukarıdaki bilgileri doktorumla ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyor ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Doktorum saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Hastanın adresi :

Hastanın telefonu :

Hastanın Adı Soyadı İmzası Tarih

Vasinin Adı Soyadı İmzası Tarih

Vasinin adresi ve telefonu :

Rıza alım işlemine başından Sonuna kadar tanıklık eden

Adı Soyadı Görevi İmzası Tarih

Açıklamaları yapan araştırmacının Adı Soyadı İmzası Tarih

EK-2

ANKET FORMU

TÜM BİLGİLER KESİNLİKLE GİZLİ TUTULACAKTIR VE SİZİN KAN ÖRNEĞİNİZDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN KULLANILACAKTIR.

ÖRNEK NO:	ÖRNEK ALINDIĞI SAAT:		
İSİM (ADI SOYADI):	MEDENİ HALİ:	MESLEK:	TELEFON:
YAŞ: (YIL	CİNSİYET:	BOY: (m) (cm)	AĞIRLIK: (kg)
KENDİNİZİ SAĞLIKLI HİSSEDİYOR MUSUNUZ?			(E) (H)
DÜZENLİ OLARAK EGZERSİZ YAPIYOR MUSUNUZ			(E) (H)
EVET İSE NE KADAR SIKLIKTA? (SAAT/HAFTA)			(E) (H)
SON ZAMANLARDA HİÇ RAHATSIZLANDINIZ MI?			(E) (H)
EĞER EVET İSE NE ZAMAN? NEDİR?			
REÇETE EDİLMİŞ İLAÇ ALIYOR MUSUNUZ?			(E) (H)
EĞER EVET İSE HANGİ İLAÇLAR?			SÜRESİ:
EN SON İLAÇ NE ZAMAN ALDINIZ? ADI:			
VİTAMİN İLACI ALIYOR MUSUNUZ?			(E) (H)
EĞER EVET İSE NE?			
İŞİNİZDE TEHLİKELİ KİMYASAL MADDELERE MARUZ KALİYOR MUSUNUZ?(E)			(H)
EĞER EVET İSE NE?			SÜRESİ:
SİGARA KULLANIYOR MUSUNUZ?			(E) (H)
EĞER EVET İSE NE KADAR? (ADET/GÜN)			SÜRESİ:
ÖZEL DİYET UYGULUYOR MUSUNUZ?			(E) (H)
EĞER EVET İSE LÜTFEN TANIMLAYINIZ			SÜRESİ:
ALKOL KULLANMA ALIŞKANLIĞINIZ VAR MI?			(E) (H)
EĞER EVET İSE HANGİ SIKLIKTA?			SÜRESİ:
BİR DOKTOR KONTROLÜ ALTINDA MİSİNİZ?			(E) (H)
EĞER EVET İSE NEDEN?			
SON ZAMANLARDA HASTANEYE YATTINIZ MI?			(E) (H)
NE ZAMAN?			NEDEN?
AİLENİZDE GEÇİRİLMİŞ BİR HASTALIK VAR MI?			(E) (H)
EĞER VAR İSE TANIMLAYIN:			
TANSİYON HASTALIĞINIZ VAR MI?			(E) (H)
ŞEKER HASTALIĞINIZ VAR MI?			(E) (H)
EMZİRDİĞİNİZ BEBEĞİNİZ VAR MI?			(E) (H)
HAMİLE MİSİNİZ?			(E) (H)

X. KAYNAKLAR

1. C28-A How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. NCCLS , 1995; Vol.17: No:18..
2. Baskın Y, Yiğitbaşı T, Afacan G ve ark., Sağlıklı Bireylerde İmmunoglobulin (IGA, IGG, IGM) ve IGG Alt Grupları Referans Aralıkları, Türk Biyokimya Dergisi, 2010;35 (4):325–32.
3. Chan A O K, Lee K C, Leung J N S, Reference intervals of common serum analytes of Hong Kong Chinese, J Clin Pathol 2008;61:632–6.
4. Balcı Y, Laboratuvar Hasta Verileri Kullanılarak Biyokimya Testlerinde Referans Aralıkları Belirlenmesi [Tez]. İstanbul; Dr. Lütfi Kırdar Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2006. 2-16.
5. Motor S, Koca Y, Turhan T, 40 Yaş Ve Üzeri Sağlıklı Türk Bireylerde Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Referans Aralıklarının Belirlenmesi, Türk Biyokimya Dergisi 2009;34 (2):71–81.
6. Laleli Y, Referans Kavramı, Ulusal Referans Politikası Ve Hasta Verilerinin Kullanımı, Türk Biyokimya Dergisi 2003;28 (4):225-7.
7. Burtis A C, Ashwood E R, Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, Palme Yayıncılık 2005;251-61.
8. Kalafat H, Klinik Biyokimya Testlerinin Mersin İli'ndeki Referans Aralıklarının İndirekt Yöntemle Belirlenmesi [Tez], Mersin; Mersin Üniversitesi, 2008.9-36.
9. Enli Y, Aslan D, Akalın N, Denizli'de Yaşayan 18-40 Yaş Arası Bireylerde Farklı Yöntemlerle Referans Aralıkların Saptanması, Türk Biyokimya Dergisi 2003;28 (4):228-45.
10. Hızlı Z B, Bursa İlinde 18 – 45 Yaş Arası Sağlıklı Bireylerde Vitaminlerin Ve Antioksidan Parametrelerin Referans Aralıklarının Belirlenmesi[Tez], Bursa; Uludağ Üniversitesi, 2006, 2-43.

11. İlçöl Y Ö, Aslan D, Bursa İlinde Sağlıklı Bireylerde Kan Biyokimyası Profili Referans Aralıklarının Saptanması, Türk Biyokimya Dergisi 2004;29 (2):183-92.
12. Reed A H, Henry R J, Mason W B, Influence of Statistical Method Used on The Result Estimate Of Normal Range, Clinical Chemistry, 1971;Vol. 17, No. 4.
13. Henry R J, Reed A H Mason W B, Influence of Statistical Method Used on the Resulting Estimate of Normal Range, Clinical Chemistry, 1971;Vol.17, No: 4:275-35.
14. Solberg H E, Using a Hospitalized Population to Establish Reference Intervals: Pros and Cons, CLIN. CHEM. 40/12, 1994; 2205-6.
15. Güngören M S, Mersin Bölgesinde Vitamin B12 ve Folik Asit Düzeylerine Ait Referans Aralıklarının Belirlenmesi [Tez]. Mersin; Mersin Üniversitesi, 2008, 38.
16. Turhan B, Çalık B T, Demirin H, Kanıta Dayalı Tıp Laboratuvar Testleri ve Preanalitik Değişkenler, Konuralp Tıp Dergisi 2010;2(3):29-33.
17. Lott J A, Mitchell L C, Moeschberger M L, Estimation Of Reference Ranges: How Many Subjects Are Needed? Clinical Chemistry, 1992; Vol. 38, No. 5:648-50.
18. Linnet K, Two-Stage Transformation Systems For Normalization Of Reference Distribution Sevaluated, Clin. Chem. 33/3, 1987;381-6.
19. Boyd J C, Lacher D A, A Multi-Stage Gaussian Transformation Algorithm For Clinical Laboratory Data, Clinical Chemistry, 1982;Vol. 28, No:8:1735.
20. Azarsız E, Sözmen E Y, Paraoksonaz Ve Klinik Önemi, Türk Biyokimya Dergisi, 2000; Cilt:25, Sayı:3:109-19.
21. Gürdöl F, Ademoğlu E, Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres, Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevi, 2. Baskı, İstanbul, 2010; 647-52.

22. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T, Reaktif Oksijen Partikülleri Ve Antioksidan Savunma, Türk Nefroloji Diyaliz Ve Transplantasyon Dergisi 1997;3-4:92-5.
23. Öztürk E, Serbest Oksijen Radikalleri, Klinisyen Konu Kitapları; Biyokimya, İzmir 2007;41-4.
24. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 39,2007;44–84.
25. Fujita T, Formation and Removal of Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxides and Free Radicals, and Their Biological Effects, The Pharmaceutical Society of Japan, 2002;122(3):203—18.
26. Verit F F, Erel O, Çelik N, Serum Paraoksonaz-1 Activity In Women With Endometriosis And İts Relationship With The Stage Of The Disease, Human Reproduction 2008 Vol.23, No.1:100–04.
27. Anıl H, Ailesel Akdeniz Ateşi Olan Hastalarda Oksidatif Stres Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması [Tez]. Isparta; Süleyman Demirel Üniversitesi, 2009.18-22.
28. Gümüştaş K, Atukeren P, Oksidatif Ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi, Türkiye’de Sık Karşılaşılan Psikiyatrik Hastalıklar Sempozyum Dizisi No:62, 2008;329-40.
29. Girotti A W, Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems, Journal of Lipid Research, 1998; Volume 39:1529-42.
30. Memişoğlu R, Orhan N, Paraoksonaz Ve Kanser, Konuralp Tıp Dergisi 2010;2(2):22-6.
31. Akçay F, İnsan Serum Paraoksonaz Enzimi (Pon 1) 192 Gln-Arg Gen Polimorfizminin Belirlenmesi [Tez], Balıkesir; Balıkesir Üniversitesi, 2006.2-20.
32. Uysal S, Akyol S, Hasgül R Ve Ark, Çok Yönlü Bir Enzim: Paraoksonaz, Yeni Tıp Dergisi 2011;28(3):136-41.

33. Güçlü F, Gürsu M F, Paraoksonaz Ve Aril Esteraz Aktivite Ölçümlerinin Standardizasyonu, Türk Biyokimya Dergisi 2003;28 (2):45-9.
34. Mackness M, Paul B, Durrington N, Connelly P W, Hegele R A, "Paraoxonase: biochemistry, genetics and relationship to plasma lipoproteins". Current Opinion in Lipidology 7, 1996;69-76.
35. Azarsız E, Sözmen E Y, Paraoksonaz Ve Klinik Önemi, Türk Biyokimya Dergisi, 2000; Cilt:25, Sayı: 3:109-19.
36. Robertson K S, Hawe E, Miller G J Ve Etc. Human Paraoxonase Gene Cluster Polymorphisms As Predictors Of Coronary Heart Disease Risk In The Prospective Northwick Park Heart Study 2, Biochimica Et Biophysica Acta 1639, 2003;203– 12.
37. Draganov D I, La Du B N, Pharmacogenetics Of Paraoxonases: A Brief Review, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2004; 369:78–88.
38. Türkoğlu S, Gülcü Bulmuş F, Parmaksız A Ve Ark. Metabolik Sendromlu Hastalarda Paraoksonaz 1 Ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri Fırat Tıp Dergisi 2008;13(2):110-15.
39. Kuo C L, La Du B N Calcium Binding By Human And Rabbit Serum Paraoxonases Structural Stability And Enzymatic Activity, Drug Metabolism And Disposition, The American Society For Pharmacology And Experimental Therapeutics, 1998; Vol. 26, No. 7:653-60.
40. Josse D, Ebel C, Stroebel D Etc., Oligomeric States Of The Detergent-Solubilized Human Serum Paraoxonase (Pon1), The Journal Of Biological Chemistry, 2002; Vol. 277, No. 36:33386–97.
41. Ng C J, D M Shih, Hama S Y Etc, The Paraoxonase Gene Family And Atherosclerosis, Free Radical Biology & Medicine 38, 2005; 153–63.
42. Blatter G, Abbott C, Messmer S, et al. Quantification Of Human Serum Paraoxonase By Enzyme-Linked Immunoassay: Population

Differences In Protein Concentrations, *Biochem. J.* 1994;304:549-54.

43. Sorenson R C, Bisgaier C L, Aviram M, Human Serum Paraoxonase/Arylesterase's Retained Hydrophobic N-Terminal Leader Sequence Associates With Hdl's By Binding Phospholipids : Apolipoprotein A-I Stabilizes Activity, *Arteriosclerosis, Thrombosis And Vascular Biology*, 1999;19:2214-25.
44. La Du B N, Aviram M, Billecke S, On The Physiological Role(S) Of The Paraoxonases, *Chemico-Biological Interactions* 119–120, 1999;379–88.
45. Costa L G, Cole T B, Vitalone A, Measurement Of Paraoxonase (Pon1) Status As A Potential Biomarker Of Susceptibility To Organophosphate Toxicity, *Clinica Chimica Acta*, 2005;352:37–47.
46. Ng C J, Wadleigh D J, Gangopadhyay A, et al. Paraoxonase-2 Is A Ubiquitously Expressed Protein With Antioxidant Properties And Is Capable Of Preventing Cell-Mediated Oxidative Modification Of Low Density Lipoprotein, *The Journal Of Biological Chemistry*, 2001; Vol. 276, No. 48: 44444–9.
47. Ng C J, D M Shih, Hama S Y et al, The Paraoxonase Gene Family And Atherosclerosis, *Free Radical Biology & Medicine*, 2005; 38:153–63.
48. Yamada Y, Ando F, Niino N, Association Of Polymorphisms Of Paraoxonase 1 And 2 Genes, Alone Or In Combination, With Bone Mineral Density In Community-Dwelling Japanese, *J Hum Genet* 2003;48:469–75.
49. Rosenblat M, Draganov D, Watson C E. Etc, Mouse Macrophage Paraoxonase 2 Activity Is Increased Whereas Cellular Paraoxonase 3 Activity Is Decreased Under Oxidative Stress, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:468-74.
50. Brennan M L, Anderson M M, Shih D M, Increased Atherosclerosis In Myeloperoxidase-Deficient Mice, *The Journal Of Clinical Investigation*, 2001; Volume 107, Number 4:419-30.

51. Suchocka Z, Swatowska J, Pachecka J et al, RP-HPLC determination of paraoxonase 3 activity in human blood serum, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2006;42:113–9.
52. Caner C, Vural Özeç A, Aydın H ve ark, Diyabetik ve Diyabetik Olmayan Katarakt Hastalarında Hümör Aközde ve Serumda Total Oksidatif Stres, Total Antioksidan Kapasite, Paraoksonaz, Arilesteraz ve Lipidperoksidaz Seviyelerinin Karşılaştırılması, TJO 2012;42;1:47-52.
53. <http://dmd.aspetjournals.org/content/19/1/100.abstract>
54. Arab K, Steghens J P, Plasma Lipid Hydroperoxides Measurement By An Automated Xylenol Orange Method, Analytical Biochemistry 2004;325:158–63.
55. Katayev A, Balciza C, Seccombe D W, Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results, Am J Clin Pathol 2010;133:180-6.
56. Krisch, K. Enzymatische hydrolyse von diathyl-p-nitrophenylphosphat (E600) durch menschliches serum. Z Klin Chem Klin Biochem. 1968;1:41-5.
57. Baskın Y, Yiğitbaşı T, Afacan G ve ark., Sağlıklı Bireylerde İmmunoglobulin (IGA, IGG, IGM) ve IGG Alt Grupları Referans Aralıkları, Türk Biyokimya Dergisi, 2010;35 (4):325–32.
58. Köseoğlu M, İşleten F, Dursun S, Çuhadar S, Determination of Reference Intervals of Healthy Adults Aged Between 20-50 Years in İzmir, Türk Biyokimya Dergisi, 2010;35 (3):215–24.
59. Yarsan E, Lipid Peroksidasyon Olayı ve Önlenmesine Yönelik Uygulamalar, Y. Y. Ü Vet. Fak. Derg. 1998, 9 (1-2):89-95.
60. Camuzcuoğlu H, Toy H, Vural M, ve ark Serum paraoxonase and arylesterase activities in iron deficiency anemia during pregnancy, Turk J Med Sci 2011;41(2):185-91.

61. Yıldırım A, Aslan Ş, Ocak T ve ark, Travmalı Hastalarda Serum Paraoksonaz/Arilesteraz Aktiviteleri ve Malondialdehit Düzeyleri, *The Eurasian Journal of Medicine*, 2007;39:85-8.
62. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C, et al. Copper-induced oxidative damage on astrocytes: protective effect exerted by human high density lipoproteins *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003;1635:48–54.
63. Walter M F, Jacob R F, Bjork R E ve ark, Circulating Lipid Hydroperoxides Predict Cardiovascular Events in Patients With Stable Coronary Artery Disease, *Journal of the American College of Cardiology* 2008;Vol. 51, No.12:1196-202.
64. Harper Y, Kennedy D, Britt E et al, Diminished Serum Arylesterase Activity Levels In Pulmonary Hypertension Secondary To Left Heart Disease Is Not Related To Dysregulated Arginine Methylation. *JACC*, 2012; Volume 59: Issue 13.
65. Zhao Y, Ma Y, Fang Y et al, Association between PON1 activity and coronary heart disease risk: A meta-analysis based on 43 studies, *Molecular Genetics and Metabolism* 2012;105:141–8.
66. Précourt L P, Amre D, Denis M C, The three-gene paraoxonase family: Physiologic roles, actions and regulation, *Atherosclerosis* 2011;214:20–36.
67. Liao F, Zhu X, Wang Y et al, Correlation of serum arylesterase activity on phenylacetate estimated by the integrated method to common classical biochemical indexes of liver damage, *J Zhejiang Univ Sci B* 2007;8(4):237-41.
68. Hashemi M, Bahari A, Hashemzahi N et al, Serum paraoxonase and arylesterase activities in Iranian patients with nonalcoholic fatty liver disease, *Pathophysiology* 2012;738.
69. Altındağ Ö, Karakoç M, Soran N ve ark, Romatoid Artrit Hastalarında Paraoksonaz ve Arilesteraz Aktiviteleri, *Romatizma* 2007;22:132-6.

70. Szanto A, Harangi M, Seres I et al, Decreased human paraoxonase-1 activity in patients with Sjogren's syndrome, *International Immunology*, 2010;Vol. 22, No.7:605–9.
71. Işık A, Üstündağ B, Paraoxonase and Arylesterase Levels in Behçet's Disease, *F.Ü.Sağ.Bil.Der.* 2006;20 (4):307–15.
72. Asefi M, Vaisi-Raygani A, Bahrehmand F et al, Paraoxonase (PON1) 55 polymorphism, lipid profiles and psoriasis, *British Journal of Dermatology*, Jul-2012;1-20.
73. Elkiran E T, Mar N, Aygen B ve ark, Serum paraoxonase and arylesterase activities in patients with lung cancer in a Turkish population, *BMC Cancer*, 2007;7:48.
74. Çayır K, Bilici M, Tekin S B, Serum Paraoxonase and Arylesterase Activities in Esophageal Cancer:A Controlled Study, *Eur J Gen Med* 2010;7(4):398-403.
75. Yılmaz S, Temizer Ozan S, Meme Kanserli Hastalarda Lipid Peroksidasyonu ve Bazı Enzim Aktiviteleri Arasındaki İlişki, *Türk Biyokimya Dergisi* 2003; 28 (4);252-6.
76. Balcı H, Genç H, Papila C ve ark, Serum Lipid Hydroperoxide Levels and Paraoxonase Activity in Patients With Lung, Breast, and Colorectal Cancer, *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2012;26:155–60.
77. Ferretti G, Bacchetti T, Moroni C et al, Paraoxonase Activity in High-Density Lipoproteins: A Comparison between Healthy and Obese Females, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2006;90(3):1728–33.
78. Solak A, Tuncel P, Metabolik Sendromda Leptin, Adiponektin Okside LDL Düzeyleri ve Paraoksonaz Aktivitesi, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2009;7(1):22-9.
79. Türkoğlu S, Gülcü Bulmuş F, Parmaksız A ve ark, Metabolik Sendromlu Hastalarda Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri, *Fırat Tıp Dergisi* 2008;13(2):110-5.

80. Aydın C, Saydam G S, Yazihan N, Metabolik Sendromda Paraoksonaz-1 Aktivitesi ve Koroner Arter Hastalığı İlişkisi, Yeni Tıp Dergisi 2008;25:174-7.
81. Santi A, Duarte M M M F, Menezes C C, Loro V L, Association of lipids with oxidative stress biomarkers in subclinical hypothyroidism, International Journal of Endocrinology, 2012;1-7.
82. Nair S P, Shah N C, Taggarsi A, PON1 and its association with oxidative stress in type I and type II diabetes mellitus, Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews 5, 2011;126–9.
83. Selek S, Aslan M, Horoz M ve ark, Oxidative status and serum PON1 activity in beta-thalassemia minor, Clinical Biochemistry, 2007;40:287–91.
84. Köksal C, Konukoğlu D, Ercan M ve ark, Periferik Arter Hastalarında Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Kapasite, GKDC Dergisi 1999;7:244-6.
85. Verit F F, Erel O, Çelik N, Serum paraoxonase-1 activity in women with endometriosis and its relationship with the stage of the disease, Human Reproduction 2008; Vol.23, No.1:100–4.
86. Toy H, Camuzcuoğlu H, Çelik H ve ark, Assessment of serum paraoxonase and arylesterase activities in early pregnancy failure, SWISS MED WKLY 2009;139(5–6):76–81.
87. Erdal N, Altunayak Y, Altunayak E ve ark, Migrenli Hastalarda Oksidatif Stresin Göstergesi Olarak Lipid Peroksidasyonunun İncelenmesi, Düşünen Adam; 2005;18(3):129-35.
88. Kırbaş A, Kırbaş S, Anlar Ö ve ark, Üskemik Ünmeli Hastalarda Serum Malondialdehid ve Paraoksonaz Enzim Aktivitesi, Türk Klinik Biyokimya Derg 2011;9(2):47-51.
89. Belin A C, Ran C, Anvert A et al, Association of a protective paraoxonase 1 (PON1) polymorphism in Parkinson's disease, Neuroscience Letters NSL 2012;29023: 1–6.

90. Dimitriev L F, Shortage of Lipid-radical Cycles in Membranes as a Possible Prime Cause of Energetic Failure in Aging and Alzheimer Disease, *Neurochem Res* 2007;32:1278–91.
91. Kurban S, Akpınar Z, Mehmetoğlu İ, Multiple skleroz hastalarında serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ile oksidatif stresin araştırılması, *Genel Tıp Derg* 2010;20(1):13-7.
92. Baysal E, Taysı S, Aksoy N ve ark, Serum paraoxonase, arylesterase activity and oxidative status in patients with obstructive sleep apnea syndrome (OSAS), *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* 2012;16:770-4.
93. Eckerson H.W, Romson J, Wyte C.M, La Du B.N, Human serum paraoxonase polymorphism: identification of phenotypes by their responses to salts, *Am J Hum Genet.* 1983;35:214-27.
94. Mueller R.F, Hosnung S, Furlong C.E, Anderson et al, Plasma paraoxonase polymorphism. A new enzyme assay, population, family, biochemical and linkage studies. *Am J Hum Genet.* 1983;35:393-408.
95. Smolen A, Eckerson H.W, Gan K.N, Hailat N, La Du B.N. Characteristics of the genetically determined allozymic forms of human serum paraoxonase/arylesterase. *Drug Metab Dispos.* 1991;19:107-12.
96. Krisch, K. Enzymatische hydrolyse von diethyl-p-nitrophenylphosphat (E600) durch menschliches serum. *Z Klin Chem Klin Biochem.* 1968;1:41-5.
97. Zech, R, Zurcher, K. Organophosphate splitting serum enzymes in different mammals. *Comp Biochem Physiol.* 1974;48:427-33.
98. Juretic, D, Tadijanovic, M, Rekić, B, Simean-Rudolf, V, Reiner, E, Baricic, M. Serum paraoxonase activities in hemodialyzed uremic patients: cohort study. *Clin Sci.* 2001;42:146-150.
99. Halliwell B, Chirico S, Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance, *Am J Clin Nut* 1993;57:715-25.

100. Z. Y. Jiang, A.C.S. Wollard, S.P. Wolff, Lipid hydroperoxides measurement of Xylenol Orange, comparison with the TBA assay and iodometric method, *Lipids* 1991;26:853–6.
101. Carrera V, Liopis I, Sastre J et al, Distribution of Serum Paraoxon Hydrolyzing Activity in a Large Spanish Population Using a Routine Automized Method in Clinical Laboratory, *Journal of Analytical Toxicology*, 2003;Vol. 27: 290-3.
102. Wildburger R, Mrakovcic L, Stroser M et al, Lipid Peroxidation and Age-Associated Diseases-Cause or Consequence?: Review, *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2009;29(1):189-93.
103. Marchegiani F, Marra M, Olivieri F, et al. Paraoxonase 1: genetics and activities during aging. *Center of Molecular Biology and Genetics*, 2008;11(1):113-27.
104. Stadtman E R, Importance Of Individuality In Oxidative Stress And Aging, *Free Radical Biology & Medicine*, 2002; Vol. 33, No. 5:597–604.
105. Mehdi M M, Rivzi S İ, Human Plasma Paraoxonase 1 (PON1) Arylesterase Activity During Aging: Correlation with Susceptibility of LDL Oxidation, *Archives of Medical Research* 2012;43:438-43.
106. Özbay B, Dülger H, Lipid Peroxidation and Antioksidant Enzymes in Turkish Population: Relation to age, Gender, Exercise and Smoking, *Tohoku J .Exp. Med.* 2002;197:119-24.
107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15199226>.
108. Çelik A, Varol R, Onat T ve ark, Akut Egzersizin Futbolcularda Antioksidan Sistem Parametrelerine Etkisi, *Spor Bilimleri Dergisi* 2007;V (4):167-72.
109. Tokmakçı H H, Sedanter Ve Aktif Erkek Bireylerin, Oksidatif Stres Ve Antioksidan İndikatör Düzeylerinin Karşılaştırılması[Tez]. Manisa; Celal Bayar Üniversitesi 2007
110. Çakır Atabek H, Sigara içen bireylerde egzersizin oksidatif stresi azaltmadaki etkisi, *S.D.Ü Sağlık Enstitüsü Dergisi* 2012;Cilt 3,Sayı 1:45-50.

111. Gharakhanlou R, Afzalpour M E, Gaeini A A et al, Effects of Aerobic Exercises on the Serum Paraoxonase 1/Arylesterase Activity and Lipid Profile in Non-Active Healthy Men, International Journal of Sports Science and Engineering 2007;Vol.1,No. 2:105-12.
112. Sehayek E, Effect of Aerobic Exercise on Paraoxonase Activity in a Cardiac Rehabilitation Setting, Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention 2007;27:155-6.
113. Çakmak A, Zeyrek D, Kürkçü R ve ark, Evaluation of Systemic Oxidant and Antioxidant Status in Amateur Adolescent Athletes, Türkiye Klinikleri J Med Sci 2009;29(2):367-74.
114. Alberg A J, The influence of cigarette smoking on circulating concentrations of antioxidant micronutrients, Toxicology 2002;180:121-37.
115. Bloomer R J, Decreased blood antioxidant capacity and increased lipid peroxidation in young cigarette smokers compared to nonsmokers: Impact of dietary intake, Nutrition Journal 2007; 6,39:1-6
116. Çimen F, Ulubaş B, Eryılmaz T, Bilgin G, Sigara çenlerde Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Aktivite ve Solunum Fonksiyon Testleri, T Klin J Med Sci 2002;22:292-96
117. <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10238-005-0072-5>.
118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16717029>.
119. Colette C, Percheron C, Pares-Herbute N, Michel F, Pham TC, Birillant L, et al. Exchanging carbohydrates for monounsaturated fats in energyrestricted diets: effects on metabolik profile and other cardiovascular risk factors. İnt J Obes Relat Metab Disord, 2003; 27(6):648-56.
120. Özata M, Mergen M, Oktenli C et al. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. Clin Biochem, 2002;35:627-31.

121. Yesilbursa D, Serdar Z, Serdar A et al. Lipid peroxides in obese patients and effects of weight loss with orlistat on lipid peroxides levels. *Int J Obes(Lond)*, 2005;29:142–5.
122. Dandona P, Mohanty P, Ghanim H et al. The suppressive effect of dietary restriction and weight loss in the obese on the generation of reactive oxygen species by leukocytes, lipid peroxidation, and protein carbonylation. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001;86:355-62.
123. Davi G, Guagnano M, Ciabattini G et al. Platelet activation in obese women. Role of inflammation and oxidant stress. *JAMA*, 2002;288:2008-14.
124. Çelik M, Gülcü F, Ozan G ve ark, Organik Solventler ile Çalışan İşçilerde Paraoksonaz 1 ve Arilesteraz Aktivite Düzeyleri, *Türk Biyokimya Dergisi* 2005;30(2):194-9.
125. Koç S, Aksoy N, Bilinç H ve ark, Paraoksonase and arylesterase activity and total oxidative/anti-oxidative status in patients with chronic adenotonsillitis, *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 2011;75:1364–7.
126. Aslan M, Nazlıgül Y, Horoz M ve ark, Serum paraoksonase-1 activity in Helicobacter pylori infected subjects, *Atherosclerosis* 2008;196:270–4.
127. Gbandjaba N Y, Ghalim N, Hassar M et al, Paraoksonase activity in healthy, diabetic, and hemodialysis patients, *Clinical Biochemistry* 2012; 45:470–4.
128. Talwar DK, AzharuddinMK, Williamson C, Teoh YP, McMillan DC, O'Reilly DSJ. Biological Variation of Vitamins in Blood of Healthy Individuals. *Clinical Chemistry* 2005;51(11):2145-50.