



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÖRNEK SAKLAMA KOŞULLARININ SERUM
OKSİDATİF STRES BİYOBELİRTEÇ
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Mahsa BAYRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. S. Caner KARAHAN

TRABZON-2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÖRNEK SAKLAMA KOŞULLARININ SERUM
OKSİDATİF STRES BİYOBELİRTEÇ
DÜZEYLERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Mahsa BAYRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. S. Caner KARAHAN

TRABZON-2018

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

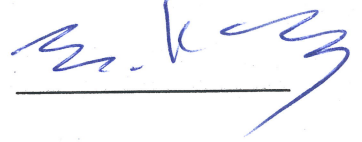
Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



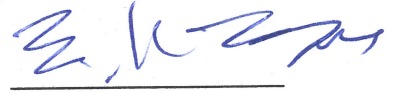
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Mahsa BAYRAMI'nin hazırladığı “**Örnek Saklama Koşullarının Serum Oksidatif Stres Biyobelirteç Düzeyleri Üzerine Etkisi**” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. S. Caner KARAHAN

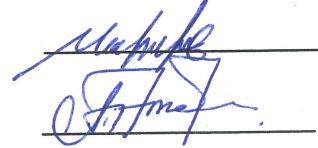


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. S. Caner KARAHAN



Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ



Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE

Tarih:/....../2018

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

Mahsa BAYRAMI

İTHAF

*Beni büyük kararlar almak konusunda cesaretlendiren canım eşim Hosein ve
sevgili ailelerimize...*



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, desteklerini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle yol gösterici olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN'a öncelikle teşekkür etmeyi borç bilirim.

Lisansüstü eğitimime büyük katkıları olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Asım ÖREM, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Birgül V. KURAL, Prof. Dr. Ahmet ALVER ve Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN'a,

Yakın zamanda emekli olan kıymetli hocam Prof. Dr. Eşref Edip KEHA'ya,

Yüksek lisans eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye,

Yanımda çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Doç. Dr. Selim DEMİR ve Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a,

Çalışmanın çeşitli kademelerinde emekleri bulunan Dr. Mustafa TAT, Dr. Mehmet Akif BİLDİRİCİ, Dr. Hatice BOZKURT ve Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalındaki tüm değerli arkadaşlarıma,

Yüksek lisans dönemimde tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli Arş. Gör. Şeniz DOĞRAMACI, grup arkadaşım Mehmet ERDEM, değerli arkadaşlarım Meysam KARİMİ ve Aysan TİZKAR'a,

Hayatımın bu en yorucu ve en keyifli yolculuğu süresince, bana destek, anlayış ve sabırını esirgemeyen, zor günlerimde hep yanımda olan canımdan değerli ağabeyim Reza BAYRAMI'ye sonsuz teşekkür ederim.

Mahsa BAYRAMI

Bu çalışma, Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin 6944 No'lu projesi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
İTHAF	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Oksidatif Stres ve Biyomoleküller Üzerine Etkisi	5
4.2. Oksidatif Stres Kaynakları	9
4.3. Serbest Radikal Türleri	10
4.4. Antioksidan Savunma Sistemleri	12
4.5. Oksidatif Stres Biyobelirteçleri	14
4.5.1. İskemi Modifiye Albümin ve IMAR	15
4.5.2. Total Oksidan Seviye (TOS)	16
4.5.3. Total Antioksidan Seviye (TAS)	16
4.5.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)	16
5. GEREÇ ve YÖNTEM	17
5.1. Gereç	17
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	17
5.1.2. Kullanılan Kitler, Kimyasallar ve Kan Tüpleri	18
5.2. Yöntem	18
5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması ve Örneklerin Hazırlanması	18
5.2.2. İskemi Modifiye Albümin (IMA) Ölçümü	19
5.2.3. Toplam Oksidan Kapasitenin Belirlenmesi (TOS)	20
5.2.4. Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi (TAS)	21
5.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması	23

5.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	23
6. BULGULAR	24
6.1. Farklı Sıcaklıklarda ve Sürelerde Saklanan Serum Örneklerinde Oksidatif Stres Biyobelirteç Düzeyleri	25
7. TARTIŞMA	36
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	41
9. KAYNAKLAR	42
10. ETİK KURUL ONAYI	48
11. ÖZGEÇMİŞ	49



TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Endojen oksidatif stres kaynaklar	9
Tablo 2. Reaktif oksijen türleri	11
Tablo 3. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları	17
Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve üretici firmaları	18
Tablo 5. TOS deney prosedürü	21
Tablo 6. TAS deney prosedürü	22
Tablo 7. Farklı sıcaklıklarda ve sürelerde saklanan serum örneklerinde ölçülen IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI değerleri	25
Tablo 8. Farklı sıcaklıklarda ve sürelerde saklanan serum örneklerinde ölçülen IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI ölçümlerinin tekrarlanabilirliği (% CV)	27
Tablo 9. Saklama süresinin farklı sıcaklıklarda dondurulmuş serum örneklerindeki IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI değerlerine etkisi	29
Tablo 10. Dondurulmuş serum örneklerinde saklama sıcaklıklarının IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI ölçüm değerlerine etkisinin değerlendirilmesi	30

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	Oksidatif stres dengesi	5
Şekil 2.	Serbest radikal türleri	10
Şekil 3.	Çalışmanın iş akış şeması	19
Şekil 4.	Dondurulmamış serum örneklerindeki TOS ile TAS değerleri arasındaki ilişki (Başlangıç ve 4 °C’de 15 gün bekletilen)	28
Şekil 5.	Farklı sıcaklık şartlarında ve sürelerinde saklanan serum örneklerinde ölçülen TOS düzeyleri	31
Şekil 6.	Farklı sıcaklık şartlarında ve sürelerinde saklanan serum örneklerinde ölçülen TAS düzeyleri	32
Şekil 7.	Farklı sıcaklık şartlarında ve sürelerinde saklanan serum örneklerinde ölçülen IMA düzeyleri	33

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AU	Arbitrary Units
CAT	Katalaz
DNA	Deoksiribonükleik asid
Co²⁺	Kobalt +2 iyonu
Fe²⁺	Demir +2 iyonu
Fe³⁺	Demir +3 iyonu
GSH	İndirgenmiş glutatyon
GSSG	Yükseltgenmiş glutatyon
H₂O₂	Hidrojen peroksit
8-OHdG	8-hidroksi-2-deoksiguanozin
4-HNE	4-hidroksi nonenal
IMA	İskemi Modifiye Albümin
IsoPs	İzoprostanlar
MDA	Malondialdehit
OSI	Oksidatif Stres İndeksi
PUFA	Çoklu doymamış yağ asitleri
RNS	Reaktif azot türleri
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBARS	Tiyobarbitürik asid reaktif maddeler
TAS	Toplam Antioksidan Durum (Kapasite)
TOS	Toplam Oksidan Durum (Kapasite)

Simgeler

α	Alfa
γ	Gama
μ	Mikro

Formüller

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Kobalt (II) klorür heksahidrat
DTT	Ditiotreitol
$\text{HO}\cdot$	Hidroksil radikali
NaCl	Sodyum klorür



1. ÖZET

Örnek Saklama Koşullarının Serum Oksidatif Stres Biyobelirteç Düzeyleri Üzerine Etkisi

Oksidan-antioksidan dengenin oksidan yöne değişmesi olarak bilinen oksidatif stres bir çok hastalığın patofizyolojisinde rol oynamaktadır. Buna bağlı olarak bilimsel araştırmalarda kan örneklerinde oksidatif stres parametrelerinin ölçümü oldukça sık yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında, kan örneği (serum) saklanma koşullarının ve süresinin yaygın olarak kullanılan oksidatif stres parametreleri olan TOS, TAS ve IMA ölçümleri üzerine etkisinin araştırması amaçlandı. Bu parametrelerin tayini için kullanılan serum örnekleri Klinik Biyokimya Laboratuvarına gelen ve serum indeksleri (hemoliz, ikter ve lipemi) normal olarak rapor edilen örneklerden seçildi. IMA ölçümleri Bar-Or yöntemiyle, TOS ve TAS kolorimetrik ticari kitler kullanılarak ve albümin tayinleri ise otoanalizörde yapıldı.

Çalışmamızın verilerine göre; hem 4 °C’de 15 gün boyunca hem de -20 °C ve -80 °C’de 2 ay saklanan serum örneklerinde yapılan IMA ölçümleri başlangıç değerlerinden farklı bulunmamıştır. 4 °C’de 15 gün boyunca saklanan serumlarda ölçülen TOS ve TAS değerlerinin 5. günden sonra başlangıç gününden anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. 4 °C’de saklanan örneklerin TOS ve TAS düzeyleri arasında güçlü bir negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir. -20 °C ve -80 °C’de 2 ay saklanan örneklerdeki TOS ve TAS düzeyleri ise başlangıç ölçümlerinden farklı değildi. Ayrıca dondurularak saklanan serum örneklerinde (-20 °C ve -80 °C’de) ölçülen TOS, TAS ve IMA seviyeleri arasında hem saklama sıcaklığı hem de saklama süresi yönünden bir fark tespit edilmemiştir.

Sonuç olarak; serum örneklerinin 4 °C’de IMA ölçümü için 15 gün, TOS ve TAS tayini için ise en fazla 4 gün saklanabildiği görülmektedir. Daha uzun süre gerektiren saklanmalar için serum örneklerinin -20 °C veya -80 °C’de dondurulmasının uygun olacağı kanatine varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan, Oksidatif Stres, Oksidan, Reaktif Oksijen Türleri, Serum

2. SUMMARY

Effect of Sample Storage Conditions on Serum Oxidative Stress Biomarker Levels

Oxidative stress, known as oxidant-antioxidant balance oxidative disruption, plays a role in the pathophysiology of many diseases. Accordingly, the measurement of oxidative stress parameters in blood samples is frequently performed in scientific researches.

In this thesis study, it was aimed to investigate the effect of blood storage (serum) storage conditions and the commonly used oxidative stress parameters on TOS, TAS and IMA measurements. Serum samples used for the identification of these parameters were selected from the samples that came to the Clinical Biochemistry Laboratory and whose serum indices (hemolysis, icterus and lipemia) were reported as normal. IMA measurements were performed using the Bar-Or method, TOS and TAS colorimetric commercial kits, and albumin determinations were performed on the autoanalyzer.

According to the data of our study; IMA measurements on serum samples stored at 4 °C for 15 days and at -20 °C and -80 °C for 2 months were not different from the baseline values. TOS and TAS values measured in sera stored at 4 °C for 15 days were significantly different from baseline after 5th day. It was determined that there was a strong negative correlation between the TOS and TAS levels of the samples stored at 4 °C. The TOS and TAS levels in the samples stored at -20 °C and -80 °C for 2 months were not different from the baseline measurements. There was also no difference between TOS, TAS and IMA levels measured in freeze-dried serum samples (at -20 °C and -80 °C), both in terms of storage temperature and storage time.

As a result; serum samples can be stored for 15 days for IMA measurement at 4 °C and for up to 4 days for TOS and TAS determinations. For long-term storage, it has been shown that freezing serum samples at -20 °C or -80 °C is appropriate.

Key Words: Antioxidants, Oxidant, Oxidative Stress, Reactive Oxygen Species, Serum

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Canlı organizmalar bünyelerinde gerçekleşen her türlü değişikliğe karşı var olan dengelerini korumaya çalışırlar. Homeostazis olarak adlandırılan bu süreç sırasında hücrelerden gereksiz, fazla ve zararlı maddeler uzaklaştırılarak iç çevrenin dengeli bir durumda kalması sağlanır (1). Canlılar metabolik yakıtlarını enerjiye dönüştürürken oksijeni kullanırlar (2). Bunun sonucunda dış elektron kabuğunda eşleşmemiş elektron içeren oldukça reaktif, kısa ömürlü ve kararsız olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Normal şartlarda; antioksidan savunma sistemleri ile dengede olacak şekilde üretilen reaktif oksijen türleri ve diğer reaktif ürünler canlıların patojenik mikroorganizmalara karşı savunmasında, hücre sinyalizasyon yollarında ve redoks reaksiyonlarının düzenlenmesinde kullanılmaktadır. Ancak reaktif molekül düzeylerindeki artış ve/veya antioksidan sistemin yetersizliği sonucu oksidatif stres meydana gelmektedir (3).

Oksidatif stresin kanser, diyabet, akut renal yetmezlik, bronşit, kardiyovasküler bozukluklar ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok patolojik durum ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Vücut sıvı ve doku örneklerinde bu hastalıklarla ilişkili gerek rutin gerekse araştırma amaçlı birçok oksidatif stres biyobelirtecinin düzeyleri ölçülmektedir. Bu biyobelirteçlerden iskemi modifiye albümin (IMA), toplam oksidan seviye (TOS) ve toplam antioksidan seviye (TAS) sıklıkla kullanılmaktadır (4). IMA düzeyleri ölçümü için genelde Bar-Or yöntemi, TOS ve TAS seviyelerini belirlemek için ise kolorimetrik ticari kitler tercih edilmektedir (5, 6).

Kullanım amacına uygun olarak çeşitli vücut sıvılarında veya solid doku örneklerinde oksidatif stres biyobelirteçlerinin tayini yapılabilmektedir. Ancak, kolayca ve yeterli miktarda elde edilmesi nedeniyle bu tayinler için kan örneklerinin daha çok tercih edildiği görülmektedir (5). Analiz sonuçları örneğin alınmasından sonucun elde edilmesine kadar geçen bütün süreçlerden etkilenmektedir. Doğru ve güvenilir ölçüm sonuçlarının üretilmesi bu süreçlerin standardize edilmesi ve oluşabilecek hataların en aza indirilmesi ile sağlanır. Bilimsel araştırmalarda örneklerin toplanma süreleri günler, aylar hatta yıllar alabilmektedir. Ayrıca klinik sağlık hizmetleri sırasında hasta örneklerinin laboratuvarlara gönderilmesi ve örneğin analiz için ön işleminden geçirilmesi belirli bir zaman almakta veya zorunluluk halinde saklanması gerekmektedir. Örnek saklama şartları ve süresinin analiz sonuçlarını anlamlı miktarlarda etkilediği bilinmektedir.

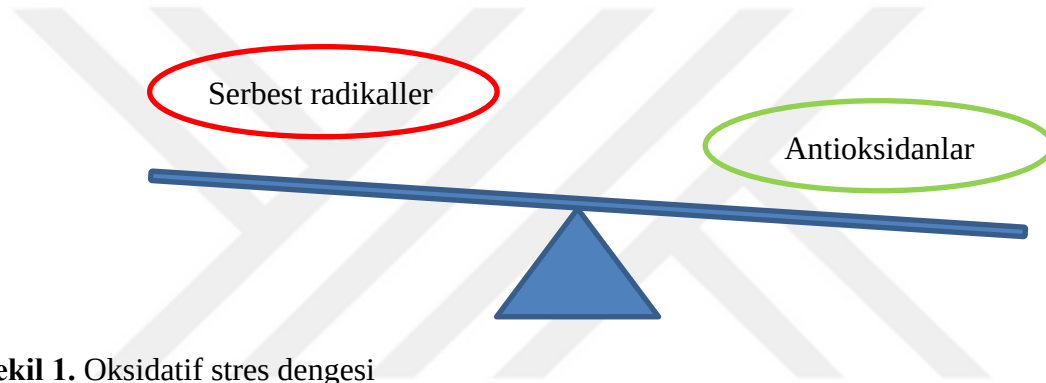
Ancak; literatür verileri incelendiğinde TOS, TAS ve IMA gibi oksidatif stres belirteçlerinin tayininde kullanılan örneklerin saklanma şartlarının ölçüm sonuçlarına etkisini belirleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında, kan örneği saklanma koşullarının ve süresinin TOS, TAS ve IMA düzeyleri üzerine etkisinin araştırması amaçlanmaktadır (4). Çalışmadan elde edilecek sonuçların araştırma veya rutin amaçlı olarak oksidatif stres biyobelirteç analizleri için kullanılan kan örneği saklanma şartlarının standardize edilmesine ve doğru sonuçların elde edilmesine önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



4. GENEL BİLGİLER

4.1. Oksidatif Stres ve Biyomoleküller Üzerine Etkisi

Oksijenli bir ortamda hücrenin hayatını sürdürmek için antioksidanların her zaman olması gerekmektedir. Biyolojik sistemlerde bazen çeşitli nedenlerden dolayı serbest radikallerin aşırı üretimi ve antioksidanların tamamen veya kısmen yetersizliği serbest radikaller arasında olan dengeyi serbest radikaller lehine bozarak oksidatif stres denilen durumu ortaya çıkarmaktadır. Oksidatif stres, aşırı oksidan bileşikler üretimi ve yetersiz antioksidan savunma mekanizmaları arasındaki dengesizlikten kaynaklanan doku hasarı olarak tanımlanabilir (3, 7, 8).



Oksidatif stresin proteinler, karbohidratlar, lipitler, nükleik asitler ve diğer hücresel biyomoleküllere zarar verdiği ve bu hasarın oldukça önemli bir risk oluşturduğu günümüzde ispatlanmıştır (9).

Lipitler Üzerine Etkisi

Membran fosfolipidlerinde bulunan doymamış yağ asitleri, serbest radikal hasarına karşı son derece hassastır. ROS'lar ile hücre hasarı meydana gelirken lipit-serbest radikaller ve lipit peroksitler de oluşmaktadır (10).

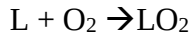
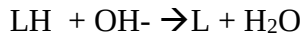
Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller tarafından başlatılır. Membran yapısında bulunan kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren alil grubundan (alfa metilen) bir hidrojen çıkarsa lipit radikali meydana gelir. Bu olay bir kez başladıktan sonra otokatalitik zincir reaksiyonları şeklinde yürümektedir (11).

Membran fosfolipitlerinin yapısında bulunan doymamış uzun zincirli yağ asitleri, araşidonik asit ve dokosaheksaenoik asittir. Lipit peroksidasyonu hücre membranının,

akışkanlığını ve geçirgenliğini bozarak hücre membranına zarar verebilir. Bu olay üç aşamada gerçekleşir:

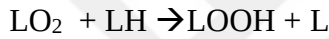
1. Başlangıç

Primer bir serbest radikalın, metilen karbonundan bir hidrojen atomu çıkarması ile başlar ve lipit radikalleri (L $\cdot$) oluşur. Lipit radikalleri O $_2$ ile reaksiyona girerek lipit peroksit radikallerini (LO $_2\cdot$) oluşturur.



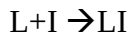
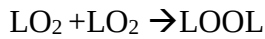
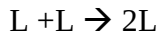
2. İlerleme

LO $_2\cdot$ çevredeki bir doymamış yağ asidi molekülünden bir hidrojen atomu alarak başka bir lipit radikali tepkimesi gerçekleşir ve kendisi lipit hidroperokside indirgenir.



3. Sonlanma

Ya iki L $\cdot$ 'nin birbiriyle tepkimeye girerek tahrip olması ile ya da L $\cdot$ 'nin bir antioksidan ile tepkimeye girmesi ile gerçekleşir.



Serbest radikallerin sebep olduğu lipit peroksidasyonuna "enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu" denir. Lipit peroksidasyonunun son ürünlerinden olan malondialdehit (MDA) biyolojik materyallerde serbest formda veya doku içerisinde kompleks olarak bulunur. MDA, üç karbonlu bir dialdehittir (10).

Proteinler Üzerine Etkisi

Serbest radikaller proteinleri doğrudan etkiler. Proteinlerin hasar görme derecesi içeriğine göre farklıdır. Aromatik amino asitler (triptofan, tirozin, fenilalanin) doymamış bağ içerdiğinden ve sistein, sistin ise kükürt içerdiği için serbest radikaller ile daha yüksek reaktiviteye sahiptir. Bu aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir (11).

Reaktif oksijen türlerinin etkileri sonucu albümin ve immunoglobulin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. Hemoglobinin ferro demiri (Fe^{2+}) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlı olup, oksihemoglobinin süperoksit radikali (O_2^-) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu sonucu oksijen taşımayan methemoglobin oluşumuna neden olur (12).

Serbest radikaller, amino asitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmentasyonu ve agregasyonu gibi yapısal değişikliklere sebep olarak birçok protein hasarına neden olabilir. Oksitlenmiş proteinlerin birçoğu fonksiyonel olarak doğada inaktiftir ve hızlı bir şekilde uzaklaştırılır (13).

DNA Üzerine Etkisi

DNA serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. İyonize edici radyasyonla oluşan radikaller, DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve ölümüne yol açabilirler. Hidroksil radikali ($\text{OH}^\bullet$) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 membranlardan kolayca geçebildiği için hücre çekirdeğine kadar ulaşır burada oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına yol açar (14, 15).

Serbest radikaller DNA ile reaksiyona girerek şeker (Deoksiriboz) parçasından hidrojen atomlarının kaybına veya ilavesine sebep olabilir. Özellikle, pirimidinin C4-C5 çift bağı hidroksil radikalının saldırılarına karşı çok hassastır. Bu saldırılar sonucunda timin glikol, urasil glikol, üre 55 kalıntısı, 5-hidroksideoksiüridin, 5-hidroksideoksisitidin ve hidantoin gibi oksidatif pirimidin hasar ürünleri meydana gelir (15).

Karbohidratlar Üzerine Etkisi

Serbest radikallerin karbohidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve bunlar, çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. Hidroksil gibi serbest radikaller, karbohidratlar ile reaksiyona girer ve karbon atomlarının birinden bir hidrojen atomu çıkararak karbon merkezli radikal üretirler. Bunlar hiyaluronik asit gibi önemli moleküllerde zincir kırılmalarına yol açar (16).

4.2. Oksidatif Stres Kaynakları

Oksidatif stres ve ona sebep olan reaktif oksijen ve azot türleri normal hücresel metabolizma sırasında oluşabildiği gibi, çeşitli dış etkenlerden de meydana gelebilirler ve

insan vücuduna zarar verme potansiyeline sahiptirler (17). Kovalent bağların homolitik kırılması, bir molekülün elektron kaybetmesi ve normal bir moleküle tek bir elektron transferi gibi yollar ROS'ların oluşumuna sebep olmaktadır (18).

Ekzojen Kaynaklar

Hava kirliliği, pestisitler, sigara dumanı, çözücüler, anestezikler, aromatik hidrokarbonlar gibi ekzojen maddeler serbest radikal üretimine yol açabilir. Gama, X ve mikrodalga ışınları gibi iyonize radyasyon ışınları serbest radikallerin kaynaklarından sayılabilir (19).



Endojen Kaynaklar

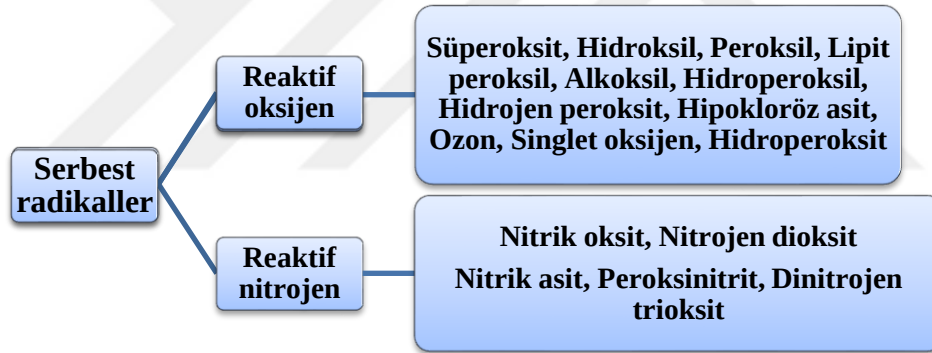
Tablo 1. Endojen oksidatif stres kaynaklar (Sánchez'den, 20, Gupta'dan, 21, Cheeseman'den, 22, Kehrer'den, 23, Donaghy'den, 24)

Mitokondriyal elektron taşıma zinciri	Oksijen sızıntısı submitokondrial zar da yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri ile dört elektron alarak suya indirgenir ve oksijenin % 1-3'ü süperoksit radikalini üretebilir.
Endoplazmik retikulum ve nükleer membranlar	Serbest radikal üretimi, membrana bağlı sitokromların oksidasyonundan kaynaklanır.
Küçük moleküllerin otooksidasyonu	Tiyoller, katekolaminler, tetrahidrofolatlar, flavinler süperoksit radikalinin kaynağıdır.
Enzimler	Ksantin oksidaz, aldehit oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, aminoasit oksidaz, triptofan dioksijenaz gibi enzimlerin aktif yerinde ara ürünler olarak devamlı şekilde serbest radikaller (H_2O_2 ve $O_2^{\bullet-}$) oluşabilir.
Geçiş metaller	Demir ve bakır, oksidoredüksiyon reaksiyonlarında yer aldıklarından dolayı serbest radikal reaksiyonlarında katalizörler olarak iş görürler.
Toksik maddeler	1) Kendisi bir serbest radikaldir. 2) Bir serbest radikale metabolize olur. 3) Metabolizması sonucu serbest oksijen radikali meydana gelir. 4) Antioksidan aktiviteyi düşürür.
Araşidonik asit	Fagositik hücrelerin uyarılması sonucu plazma membranındaki araşidonik asit serbestleşir ve enzimatik oksidasyonla "enzimatik lipid peroksidasyonu" adı verilen çeşitli serbest radikal ana ürünleri meydana gelir.
İmmün sistem hücreleri	Patojenlere yanıt olarak reaktif oksijen türleri üretebilir.

4.3. Serbest Radikal Türleri

Serbest radikaller, atomik ya da moleküler yapılarda dış atomik orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren yüksek enerjili oldukça kararsız yapıda ve kimyasal olarak reaktif bileşiklerdir (16). Eşleşmemiş elektronu bulunmayan moleküller serbest radikaller kadar kararsız ve reaktif değildirler ancak kolayca radikallere dönüşürler (14). Serbest radikal olarak kabul edilen atom ve moleküller, elektron konfigürasyonları, termodinamik yapıları ve lokal kinetik reaktiviteleri ile değerlendirilirler. Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} ve Mo^{5+} gibi geçiş metallerinin de eşleşmemiş elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (17).

Serbest radikaller; reaktif oksijen ve azot türleri olarak iki gruba ayrılırlar (18). Bu türler Şekil 2’de gösterildi.



Şekil 2. Serbest radikal türleri

Reaktif oksijen türleri kendi aralarında radikaller ve radikal olmayanlar olarak iki gruba ayrılırlar (12, 25-27). Reaktif oksijen türleri sınıflaması Tablo 2’de verildi.

Tablo 2. Reaktif oksijen türleri (İşbilir’den, 12, Gürgöze’den, 25, Büyüksu’ndan, 26, Şenerden, 27).

Radikaller		Radikal Olmayanlar	
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
Peroksil	$RO_2^{\cdot}$	Ozon	O_3
Alkoksil	$RO^{\cdot}$	Singlet Oksijen	O_2
Hidroperoksil	$HO_2^{\cdot}$	Hidroperoksit	$L(R)OOH$

Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$)

Aerobik hücrelerde oksijen atomunun bir elektron alarak indirgenmesi sonucu süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) meydana gelir.

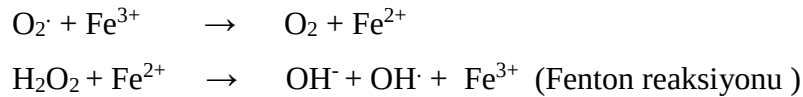


Süperoksit radikalının fizyolojik olarak üretildiği ana noktalardan birisi mitokondriyal taşıma zincirindeki NADH dehidrogenaz ve Koenzim Q gibi elektron taşıyıcılarıdır. Süperoksit radikalının biyomoleküllerle olan reaktivitesi düşüktür (24). İnsan vücudundaki normal metabolizma sırasında tüketilen oksijenin % 1-5 kadarı süperoksit radikalını oluşturmaktadır (7).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 ’in dış yörüngesindeki elektronlar eşleşmiş olduğu için serbest radikal olarak kabul edilmez, ancak kuvvetli bir oksidandır.

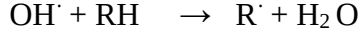
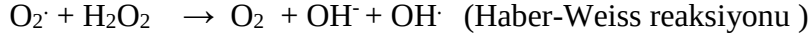
Süperoksit dismutaz enzimi tarafından katalizlenen bir reaksiyonda H_2O_2 bir geçiş metali olan Fe^{2+} ile tepkimeye girerek hidroksil radikalının oluşumuna neden olur.



H_2O_2 biyolojik membranları geçerek hücrelerin arasına veya içine kolayca difüze olabilir ve uzun ömürlü bir oksidan olarak adlandırılır. Fenton tepkimesi vücut sıvılarının iyonize edici radyasyonla karşı karşıya kaldığı durumlarda sıkça görülmektedir (16).

Hidroksil Radikali (OH•)

Süperoksitle reaksiyona giren hidrojen peroksit, Haber-Weiss tepkimesi ile hücrede oldukça toksik olan hidroksil radikalini oluşturmak için parçalanır.



Biyolojik sistemlerdeki en reaktif ve zararlı olan hidroksil radikalının yarılanma ömrü çok kısa (10^{-9} saniye) olmasına rağmen ortamda rastladığı her biyomolekülle tepkimeye girer ve olduğu yerde büyük hasara sebep olur. Özellikle elektronca zengin bileşikler hidroksil radikalının hedefi olarak tercih edilir (19).

Singlet oksijen (1O_2)

Singlet oksijen biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle oluşur. Singlet oksijenin yapısında eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal grubundan sayılmaz. Delta ve sigma olmak üzere iki şekli vardır. Delta şekli daha düşük enerjili (92 kJ) uzun yarı ömürlü ve sigma şekli (155 kJ) daha kısa yarı ömre sahiptir (19).

4.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı organizmalarda metabolizma sırasında veya patolojik yollarla meydana gelen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu kontrol altında tutmak veya oluşuktan sonra hasarlarını engellemek için çeşitli antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Antioksidanlar canlı hücrelerde biyolojik moleküller gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen ve geciktirebilen maddelerdir. Bu maddeler düşük konsantrasyonlarda bile görevlerini yerine getirirler (28). Bu özellikleriyle hücrenin tümör oluşturma riskini ve hücre ölümünü azaltırlar. Hücrelerin hem sıvı hem de membran kısmında bulunan antioksidanlar değişik etki mekanizmalarına sahiptirler. Bu mekanizmalar şu şekilde sınıflandırılabilir (29, 30).

1. Toplayıcı etki: Bu etkiyle serbest oksijen radikallerini tutup veya reaktif olmayan yeni bir moleküle çevirirler.

2. Bastırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltır veya inaktif şekle dönüştürürler.

3. Onarıcı etki: Lipid, protein ve DNA gibi yapılarda olan hasarı onarmaktadır.

4. Zincir kırıcı etki: Serbest oksijen radikallerine bağlanıp zincirlerini kırar ve fonksiyonlarını engellerler.

Antioksidanlar yapılarına, kaynaklarına, çözünürlüklerine ve yerleşimlerine göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir.

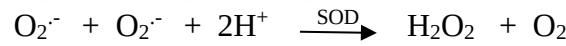
Kaynaklarına göre sınıflandırılan antioksidanların bir kısmını vücut diyetle alırken, diğer bir kısmını vücutta bir savunma sistemi olarak üretir, dolayısıyla, endojen ve ekzojen kaynaklı olarak iki sınıflandırma şekli vardır (31).

Endojen antioksidanlar: Doğal antioksidanlar etki mekanizmalarına göre temel olarak enzimatik antioksidanlar ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki ana grupta toplanmaktadırlar (32, 33).

Enzimatik Antioksidanlar:

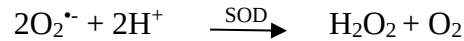
Süperoksit Dismutaz (SOD: EC 1.15.1.1)

Metabolizma sırasında hücreler tarafından üretilen süperoksit SOD sayesinde hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülür (34).



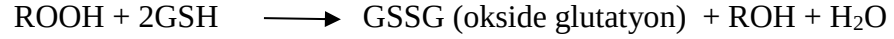
Katalaz (CAT: EC 1.11.1.6)

Katalaz, glutatyon peroksidaz enzimiyle birlikte SOD tarafından oluşan H_2O_2 'yi moleküler oksijene dönüştürür, dolayısıyla hidroksil radikalının oluşumunu engellediği için antioksidan özellik gösterir (35).



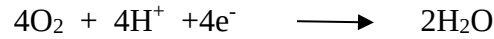
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px: EC 1.11.1.9)

Glutatyon peroksidaz, H_2O_2 'nin detoksifikasyonundan sorumlu olup, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişimini engeller. GSH-Px glutatyonu okside hale getiren reaksiyonu katalizler, bunun sonucunda ise yükseltgenmiş glutatyon meydana gelir.



Glutasyon Redüktaz (GR; EC, 1.6.4.2)

Oksidasyona uğramış glutasyonu (GSSG) tekrar kullanmak için redükte glutatyonla dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (36, 37).



Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan antioksidanlar, insan vücudunda oldukça az miktarlarda bulunmasına rağmen vitaminlerin vücuttaki etkinlikleri oldukça fazladır.

Organizmadaki enzimatik savunma sistemlerine ek olarak, endojen ve ekzojen bir şekilde antioksidan özelliği olan moleküller de vardır. Enzimatik olmayan antioksidanlar lipid fazda ve sıvı fazda (hücre sitozölü veya kan plazmasında) bulunmalarına göre iki gruba ayrılırlar. Lipid fazda, α -karoten ve α -tokoferol; sıvı fazda ise askorbik asit, miyoglobin, hemoglobin, melatonin, ürik asit, ferritin, sistein, metiyonin, seruloplazmin, albümin, laktoferrin, bilirubin, transferrin ve glutasyon bulunabilir (38).

4.5. Oksidatif Stres Biyobelirteçleri

Serbest radikaller yıllar önce tanımlanmasına rağmen, sadece son yirmi yılda hastalıkların gelişimindeki rolleri ortaya çıkmıştır. Böylece birçok oksidatif stres belirteçleri bulunmuştur. Bunlardan bazıları; lipid hidroperoksit, 4-hidroksinonenal (4-HNE), izoprostanlar (IsoPs), 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), malondialdehit (MDA), total antioksidan seviye (TAS), iskemi modifiye albumin (IMA), total oksidan seviye (TOS), oksidatif stres indeksi (OSI), allantoin ve tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS)'dir (4).

4.5.1. İskemi Modifiye Albümin ve IMAR

Albümin karaciğerde sentezlenmektedir. İnsan ve diğer memeli hayvanlarda albümin kan plazmasında en bol bulunan proteindir. Albümin insan serum proteinlerinin % 60'ını oluşturmaktadır. 610 aminoasitlik primer zincirden meydana gelen insan serum albümini 17 disülfid köprüsü içerir (39).

İnsan serum albümininin görevleri:

- Plazma onkotik basıncın ayarlanması,
- Ozmotik basıncı sağlamak,
- Kanda metabolit taşınması,
- Kan pH'sının ayarlanmasında tamponlama görevi yapması,
- Serbest radikallerin temizlemesi,
- Karaciğerde protein sentezini sağlaması,
- Metabolizma için önemli veya toksik olan organik ve inorganik maddelerin taşınmasını sağlamaktadır (40).

İnsan serum albümini, N terminal bölgesinde kobalt, bakır ve nikel gibi metalleri bağlama özelliğine sahiptir. Serbest radikallerin oluşumu bu bölgede yapısal değişikliklere sebep olur dolayısıyla ağır metalleri bağlama kapasitesi kaybolur veya düşer. Modifikasyona uğramış olan bu albümin “İskemi Modifiye Albümin (IMA)” olarak adlandırılır.

İskemi durumunda albüminin N terminal bölgesinin geçiş metalleri bağlama kapasitesinde bazı değişiklikler meydana gelmektedir. Özellikle 3. pozisyonda histidinin bakır bağlamasında etkili olduğu görülmüştür. Modifiye olmuş albümin normal albümine göre daha düşük metal bağlama kapasitesine sahiptir (41).

İskemi modifiye albümin/albümin oranı IMAR olarak tanımlanır ve IMA sonuçlarının standardize edilmesinde kullanılır (42).

4.5.2. Total Oksidan Seviye (TOS)

Oksidan molekülleri bir ortamda birbirlerini etkilediğinden miktarları stabil değildir. Dolayısıyla tek tek ölçümleri araştırmacılar ve klinisyenler tarafından pratik ve ekonomik değildir. Bu nedenle tüm oksidan durumu yansıtan total oksidan seviyesi (TOS) olarak ölçüm yöntemi geliştirilmiş ve kullanılmaktadır. Bu kolorimetrik yöntemde, oksidanlar ferroz iyon-o-dianisidin kompleksini ferrik iyonla kümülatif olarak oksitler. Ferrik iyonlar asidik ortamda “Ksilenol turuncusu” ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla doğru orantılı olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülmektedir ve TOS olarak ifade edilir (43).

4.5.3. Total Antioksidan Seviye (TAS)

TAS, antioksidan durumu yansıtan ve antioksidan kapasiteyi genel olarak belirlemek için kullanılan biyobelirteçtir. Mevcut olan antioksidan moleküller renkli 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) ABTS katyonik radikallerini indirgeyerek, renkli radikalın antioksidan moleküllerinin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak renk şiddetinin açılması esasına dayalıdır. Başlangıç renginin açılması fotometrik olarak saptanır (43).

4.5.4. Oksidatif Stres İndeksi (OSI)

Oksidatif Stres İndeksi (OSI), Toplam Oksidan Seviye (TOS) düzeylerinin Toplam Antioksidan Seviye (TAS) düzeylerine oranının yüzde derecesi olarak ifade edilir. Sonuçlar Arbitrary Units (AU) olarak ifade edilir (44).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmamızda kullanılan cihazlar ve laboratuvar malzemelerinin listesi üretici firmaları ile birlikte Tablo 4’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan cihazlar, laboratuvar malzemeleri ve üretici firmaları

Kullanılan Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	Üretici Firma
Derin dondurucu (-80°C)	Thermo Electron Corporation
Derin dondurucu (-20°C)	Vestel FT 280
Falkon tüp	CAPP 5100015
2 mL hacimli plastik spektrofotometre küvetleri	LP Italiana SPA
Hassas analitik terazi	Mettler Toledo AB204-S
Çeşitli hacimlerde semiotomatik pipet	Eppendorf
Saf su arıtma cihazı	Kros Rent 100
Santrifüj	Eppendorf 5810
Vorteks	IKA Genius 3
Mikropleyt	Biosigma
Manyetik karıştırıcı	ENDA AT411
Mikropleyt okuyucu	Molecular Devices Versa Max
UV-Vis spektrofotometre	Shimadzu UV-1601PC
Albumin ölçüm cihazı	Beckman coulter AU 5800
Çalkalayıcı inkübatör	Nüve SL 350
Cam esnek cam malzemeler	Isolab, Kimax, Isotherm
0.1-10 µL steril pipet uçları	Biologix
10-200 µL steril pipet uçları	Biologix
100-1000 µL steril pipet uçları	Vertex
3 mL hacimli steril pastör pipetleri	LP Italiana SPA

5.1.2. Kullanılan Ticari Kitler ve Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kitler ve kimyasallar üretici firmaları ile birlikte Tablo 5’de verilmiştir.

Tablo 4. Kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve üretici firmaları

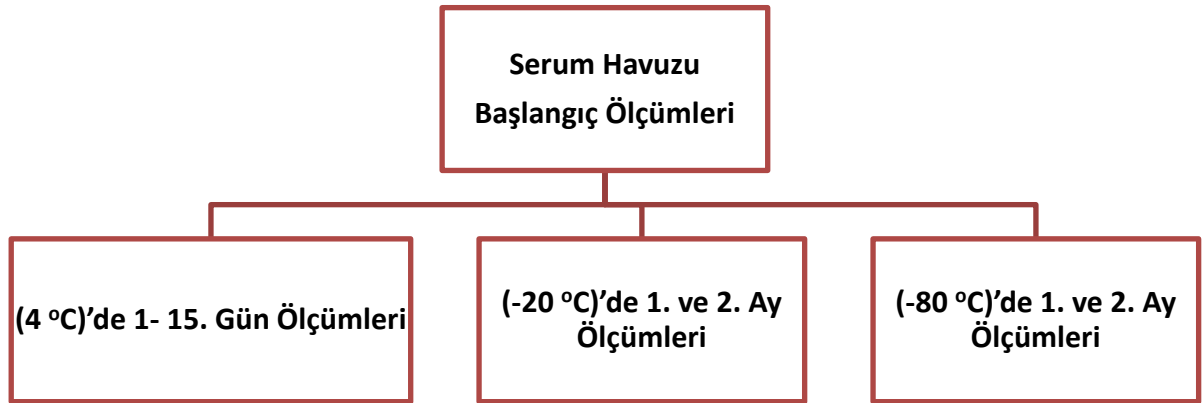
Kullanılan kitler ve kimyasallar	Üretici Firma
TOS kiti	Rel Assay Diagnostics, RL0024
TAS kiti	Rel Assay Diagnostics, RL0017
Kobalt (II) klorür heksahidrat ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	SIGMA, C8661
Dithiotreitol (DTT)	SIGMA, D0632
Sodyum Klorür (NaCl)	MERCK, 567440

5.2. Yöntem

Çalışmamızda TOS, TAS ve IMA tayini için kullanılan serum örnekleri Klinik Biyokimya Laboratuvarına analiz edilmek için gelen ve serum indeksleri (hemoliz, ikter ve lipemi) normal olarak rapor edilen örneklerden seçildi.

5.2.1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması Ve Örneklerin Hazırlanması

Çalışmamız için toplanan serum örneklerinden bir havuz oluşturuldu. Bu havuzda TOS, TAS ve IMA ölçümleri yapıldı ve sonuçlar başlangıç değerleri olarak kabul edildi. Örnek saklama koşullarının ölçümler üzerine etkisini incelemek amacıyla şekil 3’te verilen iş akış şemasına uygun olarak serum havuzu üç eşit alt havuza bölündü. Daha sonra her havuza ait serum örnekleri yeterli sayıdaki 50 mL’lik falkon tüplere (4 °C için 15 adet, -20 °C ve -80 °C için 2’şer adet) ayrılarak uygun saklanma koşullarında ölçüm yapılana kadar muhafaza edildi.



Şekil 3. Çalışmanın iş akış şeması

İş akış şemasında gösterilen her bir havuzda TOS, TAS ve IMA ölçümleri 10 kez tekrarlandı ve ortalama değerleri alındı. Ayrıca; ölçümlerin tekrarlanabilirliği hesaplandı ve % CV olarak verildi.

5.2.2. İskemi Modifiye Albümin (IMA) Ölçümü

Serum örneklerinde IMA ölçümü Bar-Or ve arkadaşları tarafından geliştirilen kolorimetrik tayin yöntemi (albümin kobalt bağlama testi) kullanılarak yapıldı. Bu metoda göre; deney ortamına ilave edilen Co^{2+} iyonlarının örnekteki albümine bağlanamayan kısmı dithiothreitol (DTT) ile etkileşerek kahverengi renk oluşturmaktadır ve bu renk şiddeti spektrofotometrik olarak tespit edilmektedir. Albümine bağlanmadan ortamda kalan serbest Co^{2+} iyonlarının (Co^{2+} -DTT kompleksi) absorbansı IMA ile doğru orantılıdır. Sonuçlar ABSU cinsinden verilir (45).

Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

% 0.1'lik $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi: 25 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ hassas terazide tartıldı ve 15 mL distile su içeren behere ilave edildi. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ tamamen çözüldü, çözelti 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve hacmi distile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Çözelti alüminyum folyo ile sarılı olan behere aktarıldı.

1.5 mg/mL'lik Dithiothreitol (DTT) Çözeltisi: 37.5 mg DTT hassas terazide tartıldı ve 15 mL bir miktar distile su içeren behere konuldu. Beher DTT tamamen çözülünceye kadar

yavaşça çalkalandı ve çözelti 25 mL'lik balon jojeye aktarıldı. Balon jojenin hacmi distile su ile 25 mL'ye tamamlandı. Çözelti alüminyum folyo ile sarılı olan behere aktarıldı.

% 0.9'luk NaCl: 9 g NaCl hassas terazide tartıldı ve bir miktar distile su (600 mL kadar) içeren behere eklendi. NaCl tamamen çözüldükten sonra çözelti 1 L'lik balon jojeye aktarıldı ve hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı.

IMA Tayin Prosedürü

200 µL serum örneği cam tüplere eklenerek, üzerlerine % 0.1'lik 50 µL $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ yavaşça karıştırıldıktan sonra yeterli kobalt albümin bağlanması sağlanması amacıyla 10 dakika bekletildi. Renklendirici ajan olarak 50 µL 1.5 mg/mL'lik Dithiothreitol (DTT) eklendi. 2 dakika bekledikten sonra % 0.9'luk NaCl'den 1 mL renk reaksiyonunu durdurmak amacıyla eklendi ve reaksiyonun durdurulması sağlandı. Her bir numune için numune körü yapıldı. DTT eklenen aşamada 50 µL 1.5 mg/mL'lik DTT yerine 50 µL distile su konarak DTT'siz serum kobalt körü hazırlandı. Numune absorbansları spektrofotometrede 470 nm dalga boyunda ölçülerek kaydedildi. DTT'li örneklerdeki renk oluşumu kör tüplerindeki renk oluşumuyla karşılaştırılarak sonuçlar absorbans ünitesi cinsinden (ABSU) rapor edildi.

Ayrıca her ölçümden önce örneklerdeki albümin düzeyleri Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda (otomatize sistemde AU5800) ölçüldü ve böylece albümin başına IMA değerleri hesaplanarak IMA düzeyleri üzerine albümin miktarının etkisi de değerlendirildi. Bu amaçla IMA ve albümin değerleri aşağıdaki formülü kullanılarak IMAR hesaplandı ve IMA sonuçları standardize edildi.

$$\text{IMAR (ABSU)} = \frac{\text{IMA}}{\text{Albümin}}$$

5.2.3. Toplam Oksidan Seviye Tayini (TOS)

Serum örneklerinde TOS düzeyleri ticari kitler kullanılarak ölçüldü (Rel Assay, RL0024, Gaziantep Türkiye). Kolorimetrik ölçüm prensibine dayalı bu yöntemde; örnekteki oksidanlar Fe^{2+} iyon-o-dianisidin kompleksini Fe^{3+} iyonuna kümülatif olarak oksitler. Fe^{3+} iyonları da asidik ortamda “Ksilenol Turuncusu” ile renkli bir kompleks

oluştururlar. Oluşan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür ve örnekte bulunan oksidan miktarıyla orantılı olarak artar.

Deneyin yapılışı:

TOS ölçümleri Tablo 5'e uygun olarak gerçekleşti.

Tablo 5. TOS deney prosedürü

Reaktifler	Örnek (µL)	Standart (µL)
Standart	-	75
Numune	75	-
Reaktif I (Tampon Çözeltisi, 25 mM, pH 1.75 H ₂ SO ₄)	500	500
30 s sonra 530 nm'de ilk absorbans (A1) okuma		
Reaktif II (Substrat Çözeltisi, 25 mM, pH 1.75 H ₂ SO ₄ , 5 mM Fe ²⁺ iyonu, 10 mM O-dianizidin)	25	25
Oda sıcaklığında 10 dk bekleme ve 530 nm'de ikinci absorbans (A2) okuma		

Hesaplama:

Her bir örnek ve standart için elde edilen A2 absorbansından A1 absorbansı çıkarılarak absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A = A2 - A1$).

$$\text{Sonuç} = \frac{(\Delta A \text{ Örnek})}{(\Delta A \text{ Standart})} \times \text{Standart Konsantrasyonu } (\mu\text{mol/L})$$

Sonuçlar, µmol H₂O₂ Eşdeğeri /L cinsinden verildi.

5.2.4. Toplam Antioksidan Seviyenin Tayini (TAS)

Serum havuzlarında TAS tayini kolorimetrik ticari kitler kullanılarak yapıldı (Rel Assay, RL0017, Gaziantep Türkiye). Bu ölçüm metodunun prensibi, örnekteki antioksidanların koyu mavi yeşil renkli ABTS radikalini renksiz ABTS formuna dönüştürmesi esasına dayanır. Örneğin total antioksidan seviyesi, 660 nm'deki ölçülen

renk şiddeti ile ters orantılıdır. Bu metodun standart çözeltisi troloks eşdeğeri (Vitamin E analog) olarak bilinen en kararlı antioksidan ile hazırlanır. Standart konsantrasyonu 1.0 mmol eşdeğeri/L'dir.

Deneyin yapılışı:

TAS ölçümleri Tablo 6'da verilen deney prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Tablo 6. TAS deney prosedürü

Reaktifler	Örnek (µL)	Standart (µL)	H ₂ O (µL)
Deiyonize su	-	-	30
Standart	-	30	-
Numune	30	-	30
Reaktif I (Tampon Çözeltisi, 0.4 mol/L pH 5.8 Asetat Tamponu)	500	500	500
30 s sonra 660 nm'de ilk absorbans (A1) okuma			
Reaktif II (Prokromojen Çözeltisi, 0.4 mol/L pH 3.6 Asetat Tamponu, 30 mmol/L ABTS)	75	75	75
Oda sıcaklığında 10 dk bekleme ve 660 nm'de ikinci absorbans (A2) okuma			

Hesaplama:

Her bir örnekte, standart ve su için tespit edilen absorbansların (A2 ve A1) farkı alınarak absorbans değişimi hesaplandı ($\Delta A = A2 - A1$). H₂O renksiz olduğu ve antioksidan içermediği için pozitif kontrol olarak kullanıldı.

$$TAS = \frac{(\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{Örnek})}{(\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{Standart})} \times \text{Standart Konsantrasyonu (mmol/L)}$$

Sonuçlar, mmol/L troloks eşdeğeri olarak verildi.

5.2.5. Oksidatif Stres İndeksi (OSI) Hesaplanması

TOS/TAS oranı alınarak OSI değeri hesaplandı. Hesaplama sırasında, TAS değerlerinin birimi, mmol Troloks eşdeğeri /L cinsinden μmol Troloks eşdeğeri/L cinsine dönüştürüldü ve aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (44).

$$\text{OSI} = [(\text{TOS}, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (\text{TAS}, \mu\text{mol troloks eşdeğeri /L}) \times 100]$$

5.3. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

Ölçüm değerleri aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma (SD) olarak verildi. Her grubun normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov Testi ile belirlendi. Sonuçlar normal dağılıma uyduğu için bağımlı iki grubun karşılaştırılmasında Paired-Samples T testi kullanıldı. TOS ve TAS arasındaki ilişki Pearson testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Farklı Sıcaklıklarda ve Sürelerde Saklanan Serum Örneklerinde Oksidatif Stres Biyobelirteç Düzeyleri

Farklı sıcaklıklarda ve sürelerde saklanan serum örneklerinde ölçülen oksidatif stres biyobelirteç düzeylerinin karşılaştırılması Tablo 7, 8 ve 9'da ve Şekil 4, 5, 6 ve 7'de gösterilmiştir.



Tablo 7. Farklı sıcaklıklarda ve sürelerde saklanan serum örneklerinde ölçülen IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI değerleri

Saklama Sıcaklığı	Saklama Süresi	Ölçülen Parametreler ve p Değerleri										
		IMA	P	IMAR	P	Albümin	P	TAS	P	TOS	P	OSI
4 °C	Başlangıç	0.466±0.031		0.109±0.007		4.29±0.03		1.322±0.042		3.544±0.199		0.268±0.007
	1	0.463±0.008	0.751	0.107±0.002	0.609	4.31±0.03	0.168	1.321±0.043	0.843	3.542±0.326	0.977	0.268±0.017
	2	0.460±0.015	0.578	0.105±0.004	0.197	4.38±0.04	0.001	1.327±0.066	0.707	3.539±0.052	0.934	0.267±0.010
	3	0.460±0.017	0.587	0.106±0.005	0.400	4.34±0.06	0.052	1.324±0.068	0.847	3.545±0.177	0.965	0.268±0.006
	4	0.459±0.016	0.512	0.113±0.005	0.177	4.08±0.06	0.0001	1.323±0.020	0.991	3.555±0.105	0.519	0.269±0.005
	5	0.459±0.023	0.570	0.108±0.005	0.721	4.27±0.04	0.343	1.300±0.061	0.017	3.581±0.213	0.046	0.275±0.006
	6	0.459±0.018	0.323	0.109±0.004	0.815	4.21±0.03	0.0001	1.301±0.065	0.039	3.648±0.092	0.018	0.281±0.008
	7	0.458±0.015	0.460	0.108±0.004	0.960	4.22±0.04	0.001	1.303±0.052	0.013	3.690±0.142	0.003	0.283±0.007
	8	0.458±0.019	0.432	0.106±0.005	0.359	4.31±0.03	0.168	1.295±0.059	0.014	3.768±0.051	0.001	0.291±0.010
	9	0.458±0.021	0.467	0.103±0.005	0.075	4.44±0.04	0.0001	1.285±0.034	0.0001	4.106±0.427	0.0001	0.319±0.025
	10	0.457±0.015	0.386	0.110±0.004	0.604	4.16±0.04	0.0001	1.278±0.085	0.036	4.147±0.309	0.0001	0.325±0.017
	11	0.458±0.017	0.387	0.110±0.004	0.507	4.16±0.04	0.0001	1.275±0.089	0.013	4.179±0.177	0.0001	0.328±0.011
	12	0.457±0.022	0.437	0.110±0.005	0.526	4.15±0.05	0.0001	1.268±0.031	0.0001	4.227±0.133	0.0001	0.333±0.004
	13	0.457±0.017	0.478	0.107±0.005	0.644	4.27±0.04	0.343	1.232±0.060	0.0001	4.273±0.099	0.0001	0.347±0.013
	14	0.457±0.022	0.425	0.111±0.005	0.319	4.11±0.03	0.0001	1.223±0.067	0.0001	4.427±0.238	0.0001	0.362±0.014
	15	0.457±0.016	0.308	0.111±0.004	0.312	4.12±0.04	0.0001	1.213±0.074	0.0001	4.557±0.204	0.0001	0.376±0.011
-20°C	1	0.466±0.012	0.931	0.111±0.003	0.851	4.18±0.04	0.0001	1.319±0.038	0.459	3.543±0.144	0.988	0.269±0.005
	2	0.466±0.018	0.968	0.126±0.005	0.625	3.69±0.03	0.0001	1.322±0.010	0.950	3.535±0.050	0.863	0.267±0.002
-80°C	1	0.466±0.018	0.965	0.112±0.004	0.802	4.17±0.06	0.001	1.323±0.053	0.940	3.546±0.105	0.957	0.268±0.008
	2	0.467±0.016	0.935	0.109±0.004	0.176	4.29±0.03	1.000	1.323±0.008	0.960	3.539±0.183	0.809	0.267±0.012

p değerleri, başlangıç gününe ait değerler ile karşılaştırıldı ve “Paired-Samples T Testi” ne göre verildi. IMA: ABSU (Absorbans ünitesi), TAS: mmol troluks eşdeğeri/L ve TOS: µmol H₂O₂ eşdeğeri/L. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Her TOS, TAS ve IMA ölçümleri 10 kez tekrarlandı ve ortalamaları alındı. Ölçümlerin tekrarlanabilirliği % CV olarak bulundu. Kit prospektüsündeki TAS ve TOS için 5 örnekten fazla tekrarlandığında % CV değeri $\pm$ %10 civarında bulunmuştur. IMA düzeylerinin belirlenmesinde manuel bir yöntem çalıştığımız için % CV değerlerinin 10'dan düşük olması sonuçlarımızın güvenilir oluşunu göstermektedir. Hesaplanan % CV Değerleri Tablo 8'de gösterilmektedir.

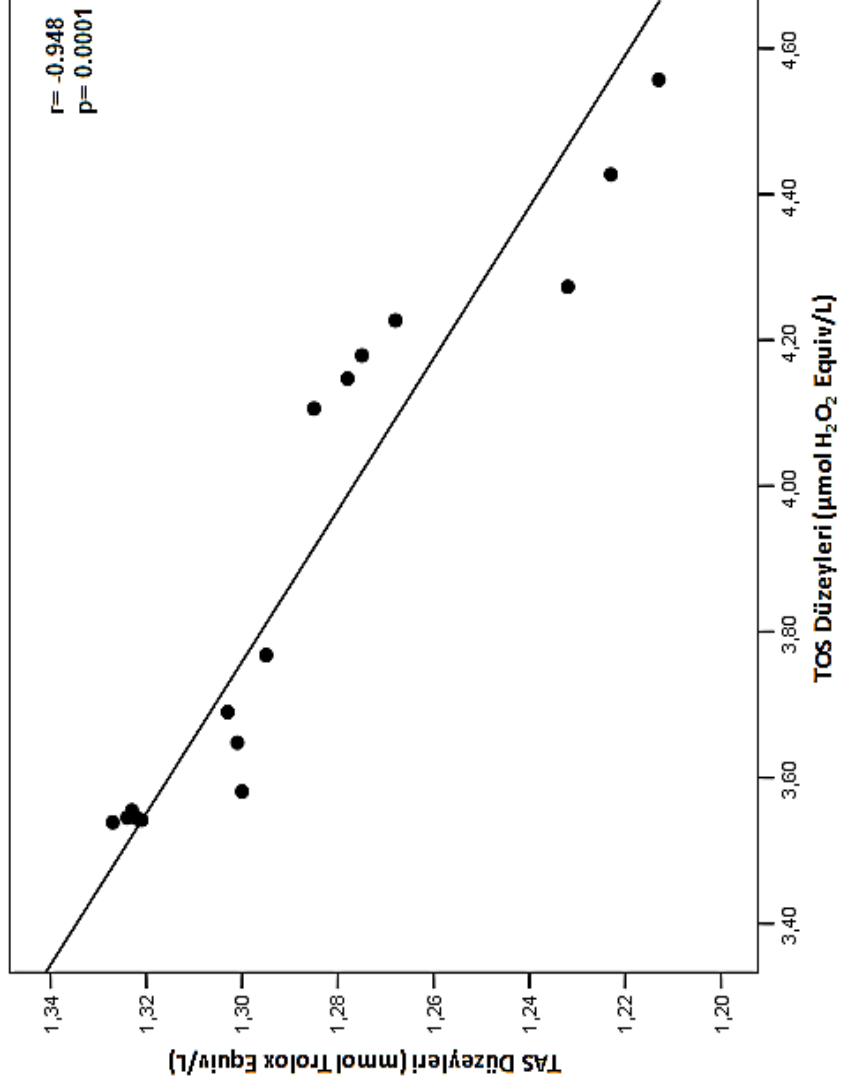


Tablo 8. Farklı sıcaklıklarda ve sürelerde saklanan serum örneklerindeki IMA, Albümin, TAS ve TOS ölçümlerinin tekrarlanabilirliği (% CV)

Saklama Sıcaklığı	Saklama Süresi	Hesaplanan % CV Değerleri				
			TOS	TAS	IMA	Albümin
4 °C	Günler	Başlangıç	5.6	3.1	6.6	0.6
		1	9.2	3.2	1.7	0.6
		2	1.4	4.9	3.2	0.9
		3	4.9	5.1	3.6	1.5
		4	2.9	1.5	3.4	1.4
		5	5.9	4.6	5.0	1.0
		6	2.5	4.9	3.9	0.7
		7	3.8	3.9	3.2	0.9
		8	1.3	4.5	4.1	0.6
		9	10.3	2.4	4.5	1.1
		10	7.4	6.6	3.2	1.1
		11	4.2	6.9	3.7	1.1
		12	3.1	2.4	4.8	1.2
		13	2.3	4.8	3.7	1.0
		14	5.3	5.4	4.8	0.7
		15	4.4	6.1	3.5	0.9
		Ortalama	4.6	4.5	3.7	1.0
-20 °C	Aylar	1	4.0	2.8	2.5	0.9
		2	1.4	0.7	3.8	0.8
		Ortalama	2.7	1.8	3.2	0.8
-80 °C		1	2.9	4.0	3.8	1.5
		2	5.1	0.6	3.4	0.6
		Ortalama	4.06	2.3	3.6	1.1

Dondurulmamış serum örneklerindeki TOS ile TAS değerleri arasındaki ilişki

4 °C’de başlangıç-15 gün bekletilen serum örneklerinin TOS ve TAS değerleri arasında güçlü negatif korelasyon bulundu. ($r=-0.948$, $p=0.0001$) (Şekil 4). Bu örneklerde ölçülen diğer parametreler arasında herhangi anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.



Şekil 4. Dondurulmamış serum örneklerindeki TOS ile TAS değerleri arasındaki ilişki (Başlangıç 4 °C’de 15 gün bekletilen)

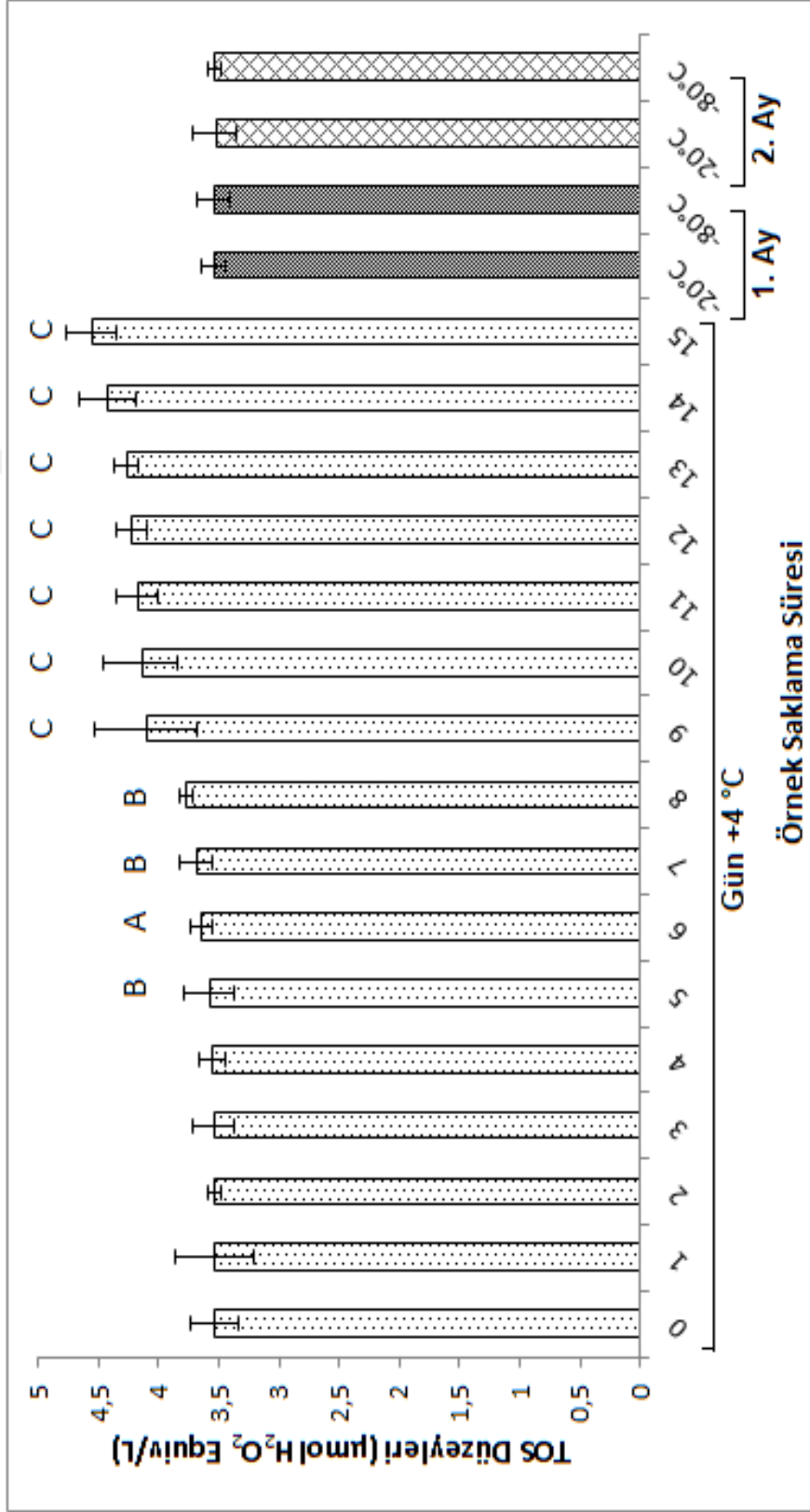
Tablo 9. Saklama süresinin farklı sıcaklıklarda dondurulmuş serum örneklerindeki IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI değerlerine etkisi

Saklama Sıcaklığı	Saklama Süresi	Ölçülen Parametreler ve p Değerleri									
		IMA	P	IMAR	P	TAS	P	TOS	P	OSI	P
-20 °C	1	0.466±0.012		0.111±0.003		1.319±0.038		3.543±0.144		0.269±0.005	
	2	0.466±0.018	0.902	0.126±0.005	0.0001	1.322±0.010	0.781	3.535±0.050	0.808	0.267±0.002	0.531
-80 °C	1	0.466±0.018		0.112±0.004		1.323±0.053		3.546±0.105		0.268±0.008	
	2	0.467±0.016	0.917	0.109±0.004	0.015	1.323±0.008	0.995	3.539±0.183	0.849	0.267±0.012	0.921

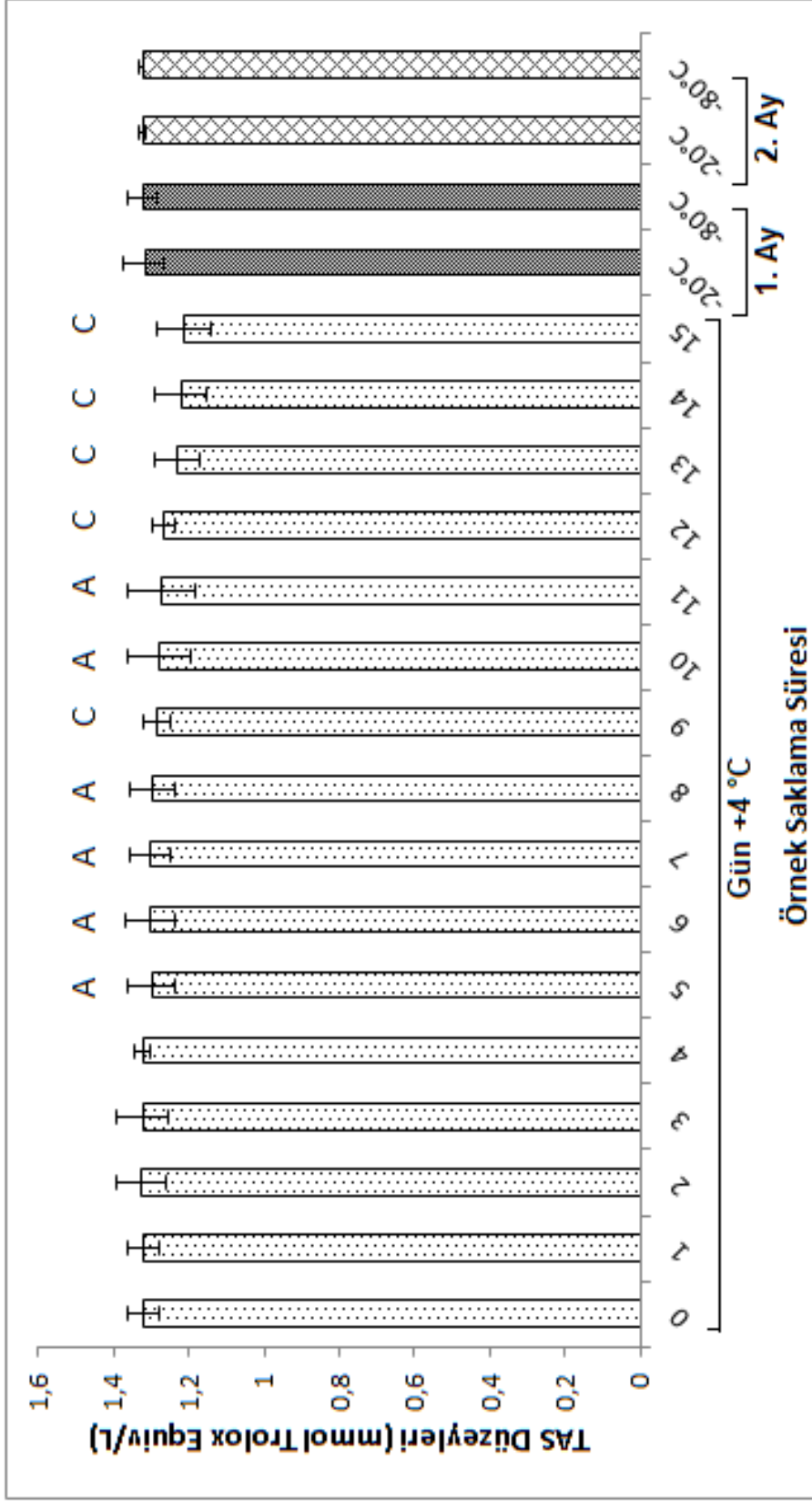
p değerleri, “Paired-Samples T Testi” ne göre verildi. IMA: ABSU (Absorbans ünitesi), TAS: mmol troloks eşdeğeri/L ve TOS: µmol H₂O₂ eşdeğeri/L. p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 10. Dondurulmuş serum örneklerinde saklama sıcaklıklarının IMA, IMAR, TAS, TOS ve OSI ölçüm değerlerine etkisinin değerlendirilmesi

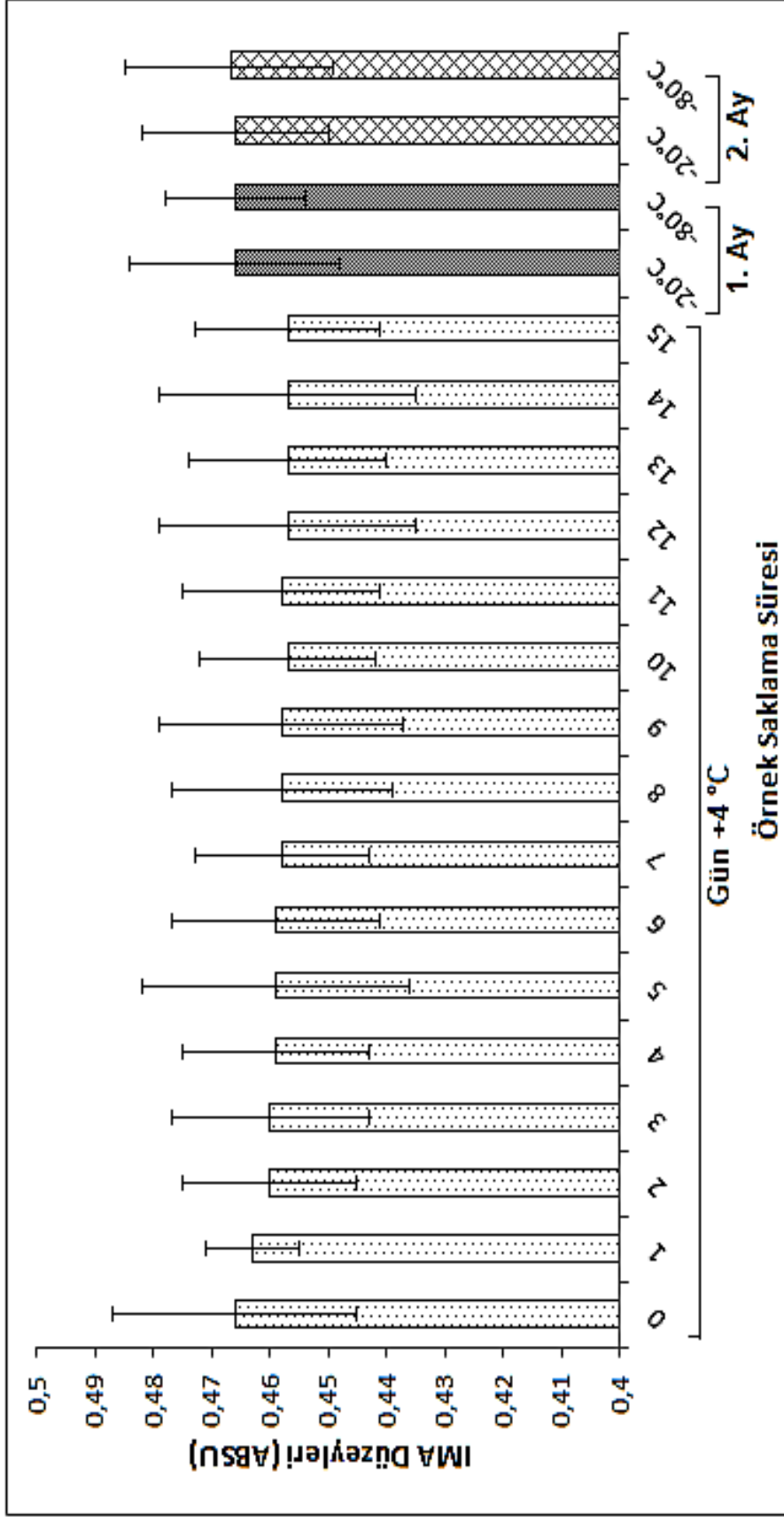
Saklama Sıcaklığı	Saklama Süresi	Ölçülen Parametreler ve p Değerleri									
		IMA	p	IMAR	P	TAS	p	TOS	p	OSI	P
-20 °C	1	0.466 ±0.012		0.111±0.003		1.319±0.038		3.543±0.144		0.269±0.005	
-80 °C	1	0.466±0.018	0.959	0.112±0.004	0.833	1.323±0.053	0.655	3.546±0.105	0.905	0.268±0.008	0.856
-20 °C	2	0.466±0.018		0.126±0.005		1.322±0.010		3.535±0.050		0.267±0.002	
-80 °C	2	0.467±0.016	0.979	0.109±0.004	0.0001	1.323±0.008	0.228	3.539±0.183	0.935	0.267±0.012	0.997



Şekil 5. Farklı sıcaklık şartlarında ve sürelerinde saklanan serum örneklerinde ölçülen TOS düzeyi [A p<0.05, B p<0.01, C p<0.001].



Şekil 6. Farklı sıcaklık şartlarında ve sürelerinde saklanan serum örneklerinde ölçülen TAS düzeyi [A $p < 0.05$, B $p < 0.01$, C $p < 0.001$]



Şekil 7. Farklı sıcaklık şartlarında ve sürelerinde saklanan serum örneklerinde ölçülen IMA düzeyleri

Örnek saklanma koşullarının TOS düzeyleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde elde ettiğimiz sonuçlara göre;

a) 4 °C’de saklanan örneklerde ilk 4 gün boyunca ölçülen TOS değerleri ile başlangıçtaki TOS değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (her bir gün için: $p>0.05$). Ancak; 5-15. günlerde elde edilen ölçüm değerlerinin başlangıç TOS düzeylerinden anlamlı olarak yüksek olduğu görüldü (her bir gün için: $p<0.05$).

b) Hem -20 °C’de hem de -80°C’de saklanan serum örneklerinde 1. ve 2.ayın sonunda tayin edilen TOS sonuçları ile başlangıç değerleri arasında anlamlı bir fark yoktu (her sıcaklık ve her ay için; $p>0.05$)

c) Örnek saklama sıcaklıklarına göre karşılaştırma yapıldığında; birinci ayın sonunda -20 °C’de saklanan serum örneklerinin TOS düzeyleri ile -80 °C’de saklanan örnekler arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.905$). Bu bulgulara benzer şekilde aynı sıcaklıklar için 2.ayın sonunda örneklerde ölçülen TOS düzeyleri arasında da anlamlı fark yoktu ($p=0.935$).

d) Örnek saklama sürelerinin TOS ölçüm sonuçlarına etkisi değerlendirildiğinde; -20 °C’de saklanan serum örneklerinde 1. ve 2.ayın sonunda elde edilen TOS değerleri birbirinden anlamlı olarak farklı değildi ($p=0.808$). Ayrıca -80 °C’de saklanan serum örneklerinde de aylar arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.849$).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre TAS düzeyleri üzerine örnek saklanma koşullarının etkileri değerlendirildiğinde;

a) 4 °C’de 15 gün boyunca saklanan serumlarda ilk 4 günde ölçülen TAS değerleri ile başlangıçta bulunan değerler arasında anlamlı bir fark bulunmadı (her bir gün için; $p>0.05$). Ancak bu örneklerin 5-15. günlerde elde ettiğimiz serum TAS seviyelerinin başlangıçta ölçülen değerlerden anlamlı olarak azalma gösterdiği tespit edildi (her bir gün için; $p<0.05$).

b) -20 °C ve -80 °C’de dondurularak saklanan serum örneklerinde; her bir saklama sıcaklığında 1.ve 2.ay sonunda ölçülen TAS seviyeleri ile başlangıçta bulunan değerler arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (her sıcaklık ve her ay için; $p>0.05$).

c) Dondurulmuş örneklerde saklama sıcaklıklarına göre karşılaştırma yapıldığında; hem -20 °C’de hem de -80 °C’de saklanan serumların birinci ayın sonunda ölçülen TAS

düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.655$). Aynı sıcaklıklar için 2.ayın sonunda bu bulgulara benzer şekilde ölçülen örneklerde elde edilen TAS düzeyleri arasında da anlamlı fark görülmedi ($p=0.228$).

d) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan serum örneklerinde 1. ve 2.ayın sonunda örnek saklama sürelerinin TAS ölçüm sonuçlarına etkisi değerlendirildiğinde bulunan TAS değerleri birbirinden anlamlı olarak farklı değildi ($p=0.781$). Ayrıca $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan serum örneklerinde de aylar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p=0.995$).

TOS ve TAS ölçüm sonuçları kullanılarak hesaplanan OSI değerlerinin TOS bulgularıyla uyum gösterdiği izlendi.

Farklı sıcaklık ve sürelerde saklanan serum örneklerinde ölçülen IMA değerleri ve IMAR düzeyleri incelendiğinde;

a) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 15 gün boyunca saklanan serum örneklerinde IMA ve IMAR düzeyleri ölçüldü ve günlük olarak elde edilen değerler ile başlangıçtaki IMA ve IMAR düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmamıştır (her gün için; $p>0.05$).

b) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hem 1 ay hem de 2 ay boyunca saklanan serum örneklerinde bulunan IMA ve IMAR değerlerini başlangıç değerleriyle karşılaştırdığımızda aralarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (her saklama sıcaklığı ve her ay için; $p>0.05$).

c) Farklı sıcaklıklarda saklanan serum örneklerindeki IMA ve IMAR düzeyleri üzerine saklama süresinin etkisi değerlendirildiğinde; hem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de hem de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de bir ay saklanan serum örnekleri ile 2 ay saklanan serum IMA ve IMAR düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı sonucuna varıldı (her saklama sıcaklığı için; $p>0.05$).

d) İki farklı sıcaklıkta 2 ay süre ile muhafaza edilen ve aylık ölçümü yapılan serum örneklerindeki IMA ve IMAR düzeyleri üzerine örnek saklama sıcaklığının etkisi incelendiğinde; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 1 ay bekletildikten sonra ölçüm yapılan serum örneklerindeki IMA ve IMAR sonuçları arasında anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Ancak; $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ve $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 ay bekletildikten sonra ölçüm yapılan serum örneklerindeki IMA düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0.05$) IMAR sonuçları arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p=0.001$).

7. TARTIŞMA

Oksijen canlı organizmaların büyük bir kısmının metabolik yakıtlarını enerjiye dönüştürme sırasında kullandıkları önemli bir moleküldür (2). Bu metabolik süreçte enerjinin yanında reaktif oksijen türleri ve diğer serbest radikaller oluşmaktadır. Meydana gelen bu moleküller canlı hücrelerindeki hayati öneme sahip nükleik asitler, proteinler, lipitler ve karbohidratlar olmak üzere bir çok molekül üzerine hasarlayıcı ve yıkıcı etkiler gösterebilirler (9). Düşük miktarlardaki serbest radikal türleri canlılarda patojenik mikroorganizmalarla mücadelede, hücre sinyalizasyonunda veya redoks reaksiyonlarının düzenlenmesinde yararlı etkilere sahip iken, yüksek miktarlarda oluştuğunda prooksidan/antioksidan dengenin prooksidan lehine kaymasına ve hücresel hasarlara neden olur (3). Organizmanın antioksidan savunma sistemleri serbest radikal türlerinin oluşumunu engelleyerek veya oluşan radikali ortadan kaldırarak bu hasarlayıcı ve yıkıcı etkiyi dengede tutar (29, 30). Çeşitli nedenlerden dolayı serbest radikallerin aşırı üretimi ve/veya antioksidanların tamamen veya kısmen yetersizliği bu dengeyi serbest radikaller lehine bozar bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır (3). Hücrelerde oksidatif strese bağlı hasarın diyabet, kalp ve damar hastalıkları, alzheimer hastalığı ve kanser gibi bir çok patolojik durumla ilişkili olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı oksidatif stres ve ilişkili hastalıklar günümüzde oldukça ilgi çeken ve üzerinde araştırmalar yapılan bir konudur (46).

Oksidatif stresi belirlemek amacıyla çok sayıda biyobelirteç önerilmekle birlikte bunlardan lipid hidroperoksitleri, 4-hidroksinonenal (4-HNE), 8-hidroksi-2-deoksiguanozin (8-OHdG), izoprostanlar (IsoPs), malondialdehit (MDA), tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (TBARS), iskemi modifiye albumin (IMA), total oksidan seviye (TOS), total antioksidan seviye (TAS) daha yaygın olarak tercih edilmektedir (4, 47-49).

Canlı materyallerinde oksidatif stres belirteçlerinin her biri ayrı ayrı olarak tayin edilebilir. Fakat bu ölçümler yoğun iş gücü, aşırı zaman, karmaşık teknikler, maliyet ve tecrübe gerektirmektedir. Bu nedenle; oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki redoks dengeyi ifade eden TOS, TAS ve IMA gibi daha pratik testler oksidatif stresin değerlendirmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (46, 50). Dolayısıyla bu tez çalışmasında oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla TOS, TAS ve IMA ölçümleri kullanılmıştır.

Oksidatif stres ile ilgili çalışmalar gözden geçirildiğinde kan, idrar, beyin-omurilik sıvısı ve solid dokular gibi çok çeşitli örnek tiplerinin kullanıldığı görülmektedir. Bununla birlikte; kolayca ve yeterli miktarda elde edilmesi nedeniyle kan örnekleri daha çok tercih edilmektedir (51). Hem “Farklı Tüplere Alınan Kan Örneklerinde Tayin Edilen Oksidatif Stres Biyobelirteçlerinin Değerlendirilmesi” başlıklı tez çalışmasında hem de kullanılan kitlerin protokolünde oksidatif stres belirteçlerinin ölçümü için serum örneklerinin öncelikli olarak önerilmesi nedeniyle bu tez çalışmasında TOS, TAS ve IMA tayinleri için serum örnekleri tercih edildi (51).

Bir analiz sürecinde doğru ve güvenilir ölçüm sonuçlarının elde edilmesi, uygun örneğin seçilmesi ve hassas ölçümlerin yapılmasının yanı sıra örneklerin uygun şartlarda ve sürede saklanması ile de yakından ilişkilidir. Bundan dolayı ölçüm süreçlerinin ve şartlarının standardize edilmesi hassas ve doğru sonuçların elde edilmesi için hayati öneme sahiptir. Oksidatif stres ile ilişkili bu parametreler çoğunlukla araştırma amaçlı olarak kullanıldığı için genellikle örneklerin belli bir süre (günler, aylar hatta yıllar) boyunca saklanması gerekmektedir. Ayrıca klinik sağlık hizmetleri sırasında hasta örneklerinin laboratuvarlara gönderilmesi ve örneğin analiz için ön işlemden geçirilmesi belirli bir zaman almakta veya zorunluluk halinde saklanması gerekmektedir. Örnek saklama şartları ve süresinin analiz sonuçlarını anlamlı miktarlarda değiştirebileceği bilinmektedir. Oksidatif stres belirteçlerinin tayini için kullanılacak örneklerin saklanma şartlarını ortaya koyan yeterli sayıda çalışmanın bulunmadığı görülmektedir (52, 53). Literatüre katkı sağlamak amacı ile planlanan bu tez çalışmasında oksidatif stres biyobelirteçlerinden TOS, TAS ve IMA tayini için kullanılan serum örneklerinin saklanma sıcaklığının ve süresinin ölçüm sonuçları üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

Bar-Or ve arkadaşları tarafından geliştirilen kolorimetrik yöntem kullanılarak başlangıçta ve belirli şartlarda saklanan serum örneklerinde IMA ölçümleri gerçekleştirildi. Bu serumlarda albumin tayinleri de yapılarak her örnek için IMAR değeri hesaplandı.

4 °C’de 15 gün boyunca saklanan ve günlük olarak ölçümleri yapılan serum örneklerindeki IMA ve IMAR düzeyleri ile bu parametrelerin başlangıçta ölçülen değerleri karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı fark bulunamadı. Bu örneklerdeki günlük albümin değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu görülmesine rağmen aynı örneklerin IMAR düzeyleri arasında bir fark saptanmamıştır. Bu bulgular bize albumin ölçümünden kaynaklanacak olan IMA

değişikliklerinin standardize edilmesinde IMAR değerlerinin önemli bir katkı sağladığını göstermektedir. Dolayısıyla IMA ölçümünün yanı sıra IMAR değerinin de verilmesi IMA sonuçlarının daha güvenilir olmasını sağlayacağı fikrini desteklemektedir (54, 55). Ayrıca; bulgularımız IMA ve IMAR serum değerlerinin 4 °C’de 15 gün boyunca stabil kaldığını göstermektedir. Yaptığımız literatür incelemelerinde bu verilerin karşılaştırılabileceği başka bir çalışmaya raslanmamış olması çalışmamızı bu yönü ile özgün kılmaktadır.

4 °C’de bekletilen serumlarda ilk 24-48 saat sonrasında bir çok biyokimyasal parametreye ait değerlerin anlamlı olarak değiştiğini ortaya koyan çalışmalar dikkate alındığında sonuçlarımız, araştırmacıların IMA ve IMAR ölçümünde kullanılacak serum örneklerini

4 °C’de 15 gün kadar süre ile muhafaza edebileceklerini göstermektedir (56). Ölçüm sonuçlarının stabilitesi ve ihtiyaç halinde tekrarlanabilirliğinin değerlendirilmesi imkanı için bir serum örneğinin 4 °C’de 15 gün boyunca bekletilmesi tatminkar bir süre olarak görüldüğü için çalışmamızda 15 günden daha uzun süreli bir ölçüme gerek duyulmamıştır.

Hem -20 °C’de hem de -80 °C’de 2 ay süreyle saklanan serum örneklerindeki IMA ölçüm değerlerinin başlangıçta elde ettiğimiz sonuçlardan farklı olmadığını tespit ettik. Ayrıca, saklanma sıcaklığının etkisini değerlendirdiğimizde; -20 °C ve -80 °C’de bekletilen serum örneklerindeki IMA sonuçları arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak; -20 °C ve -80 °C’de bekletilen serum örneklerine ait 2. ay IMAR sonuçları arasında anlamlı bir fark görüldü. Bu fark -20 °C’de 2. ayda ölçülen albümin düzeylerinin hem başlangıç hem de -80 °C’deki değerlerden anlamlı olarak düşük bulunmasından kaynaklanmış olabilir (her iki karşılaştırma için $p=0.0001$). Bu bulgularımız IMA ölçümünde kullanılacak serum örneklerinin hem -20 °C’de hem de -80 °C’de en az 2 ay süreyle saklanabileceğini göstermektedir.

Jansen ve arkadaşlarının insan serum örneklerinde oksidatif stress ve antioksidan durumla ilişkili TAS, reaktif oksijen metabolitleri ve biyolojik antioksidan potansiyel biyobelirteçlerinin kısa süreli stabilitesini araştırdıkları çalışmalarında; 32 gönüllüden aldıkları -80 °C’de dondurmuş serum örneklerini 4 °C’de çözdükten sonra 1. ve 2. günlerde bu biyobelirteçler ölçülmüş. Elde edilen değerler başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında sonuçlar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (57). Örnek saklanma koşullarının serum TOS düzeyleri üzerine etkisini elde ettiğimiz sonuçlara göre değerlendirildiğimizde;

4 °C’de 15 gün süreyle saklanan örneklerde ilk 4 günlük TOS değerleri ile başlangıçta ölçülen düzeyler arasında anlamlı bir fark olmadığı görüldü. Ancak;

5-15.günün arasında elde edilen TOS ölçüm değerlerinin her birinin başlangıç değerinden anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edildi (her bir gün için: $p<0.05$). Elde ettiğimiz bu sonuçlara göre ölçüm yapılması planlanan örneklerde 4 °C’de dört gün boyunca stabilitesini koruduğu görülen TOS düzeylerinin beşinci günden sonra anlamlı olarak değiştiği ve bu değişimin de 15. gün itibari ile yaklaşık %35 oranına ulaştığı anlaşılmaktadır. Bu bulgularımız TOS ölçümü yapılacak ve dondurulmamış örneklerin

4 °C’de en fazla 4 gün süreyle saklanabileceğini, bu süreden daha uzun bekletilen örneklerde ölçüm yapılmasının uygun olmadığını göstermektedir.

-20 °C ve -80 °C’de dondurularak saklanan serum örneklerinde hem sıcaklığın hem de saklama süresinin TOS ölçüm sonuçlarına anlamlı bir etkisi olmadığı gözlemlendi. (her sıcaklık ve her ay için; $p>0.05$). Bu bulgumuza göre TOS ölçümü yapılacak serum örnekleri hem -20 °C’de hem de -80 °C’de en az 2 ay süreyle güvenli bir şekilde muhafaza edilebilir.

TAS düzeyleri üzerine örnek saklanma koşullarının etkileri değerlendirildiğinde;

4 °C’de saklanan serumlarda TOS ölçümlerine benzer şekilde ilk 4 günlük sürede ölçülen TAS değerleri ile başlangıçta bulduğumuz seviyeler arasında bir fark yok iken (her bir gün için; $p>0.05$); seviyelerin 5. günden itibaren 15. güne kadar anlamlı olarak azalma gösterdiği bulundu (her bir gün için; $p<0.05$). 2 ay süreyle dondurulmuş (hem -20 °C hem de -80 °C’de) serumlarda saklama sıcaklığı ve süresinin TAS seviyeleri üzerine bir etkisi olmadığı görüldü. Bu bulgularımız; dondurulmamış bir serum örneğinin TAS tayini için

4 °C’de en fazla 4 gün boyunca saklanabileceğini daha uzun süre saklama ihtiyacı halinde serumların -20 °C veya -80 °C’de 2 ay saklanabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca; başlangıç ölçümleri ile 4 °C’de 15 gün bekletilen serumların TOS ve TAS değerleri arasında güçlü negatif korelasyon bulundu ($r=-0.948$, $p=0.0001$) (Şekil 4). Diğer saklama şartlarında da (-20 °C ve -80 °C’de) benzer yönde korelasyon tespit edilmesine rağmen veri sayısının (1. ve 2. ay) azlığı nedeniyle sunulmamıştır. Literatürde total antioksidan ölçümlerinin saklanma stabilitesi ile ilgili yayınlar çok değildir. Bir çalışmada insan serum örneğinde TAS parametresini de içeren antioksidan durum parametrelerinin uzun dönem stabilitesini araştırdıkları çalışmalarında; 34 gönüllüden aldıkları kan örneklerinde elde

ettikleri serum örneklerini -20 °C ve -80 °C'de 12 ay saklamışlardır. 1. ay sonunda yaptıkları ölçümlerde -20 °C ve -80 °C'de saklanan serum örneklerinde TAS değerlerinin başlangıç değerlerinden % 11-16 oranında istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğunu bulmuşlardır. Ancak 3. ay sonunda yaptıkları ölçüm sonucunda elde edilen sonuçların başlangıç değerlerinden farklı olmadığını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar 1. ay sonunda elde ettikleri değerlerdeki artışın hatalı olduğunu bu hatasında kalite kontrol ölçümlerindeki ölçümsel hatadan kaynaklanmış olabileceğini düşündüklerini belirtmişlerdir. Aynı çalışmada biyolojik antioksidan potansiyel, horseradish peroksidaz kullanan enzimatik yöntem, ürik asit, kreatinin düzeylerini -20 °C ve -80 °C'de saklanan serum örneklerinde ölçmüşlerdir. 12 ay boyunca yapılan ölçümlerde (1, 2, 3, 6, 9, 12 ay) herhangi bir noktada başlangıç gününde elde edilen değerlerden bir fark bulamamışlardır. Üstelik her iki sıcaklık arasında da bir fark bulunmamıştır (58). Farklı bir çalışmada serum ve plazma örneklerinde vitaminler ve karotenoidler gibi bağımsız antioksidanların -20 ve -70 °C'de stabilitesi incelenmiş ve karotenoidlerin yalnızca 6 ay -20 °C'de stabil kaldığı oysa ki -70 °C'de retinol, tokoferol, askorbik asit ve karotenoidler gibi bütün antioksidan vitaminlerin 4 yıldan daha fazla stabil kaldığı bilgileri yer almaktadır (59- 60). Bortolin ve arkadaşları 6 adet rattan heparinli tüplere aldıkları kanlardan elde ettikleri eritrosit paketlerini -20 ve -80 °C'de saklamışlar ve 0, 15, 30 ve 60. günlerde katalaz, SOD, protein karbonil ve tiyol gruplarını ölçmüşlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre oksidatif stres biyobelirteçlerinin ölçüleceği eritrosit örneklerinin -80 °C'de uzun süreli saklanması daha uygun olacağını ifade etmişlerdir (61).

Bu tez çalışması KTÜ-BAP birimi tarafından desteklenen bir projenin (6944) bir kısmını kapsamaktadır. Bu proje kapsamında -20 °C ve -80 °C'de saklanan örneklerde 12 ay süreyle oksidatif stres parametrelerinin (TOS, TAS ve IMA) aylık stabilite değişimlerinin tespiti ve takibi planlanmaktadır. Tez çalışması dışındaki 3-12. ay verileri bu proje sonunda ortaya çıkacaktır.

8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında farklı şartlarda muhafaza edilen serum örneklerinde TOS, TAS ve IMA düzeyleri ölçülmüş ve aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

1. Hem 4 °C’de 15 gün boyunca hem de -20°C ve -80 °C’de 2 ay saklanan serum örneklerinde yapılan IMA ölçümleri başlangıç değerlerinden farklı bulunmamıştır.

2. 4 °C’de 15 gün boyunca saklanan serumlarda ölçülen TOS ve TAS değerleri 5.günden sonra başlangıç gününden anlamlı derecede farklı olduğu görülmüştür. Buna rağmen, -20 °C ve -80 °C’de 2 ay saklanan örneklerin TOS ve TAS düzeyleri başlangıç ölçümlerinden farklı değildi.

3. Ölçümü yapılan her biyobelirtecın -20 °C ve -80 °C’deki saklanan serumlardan elde edilen değerleri arasında hem sıcaklıklar hem de saklama süresi yönünden bir fark tespit edilmemiştir.

4. 4 °C’de saklanan örneklerin TOS ve TAS düzeyleri arasında güçlü bir negatif korelasyon olduğu belirlenmiştir.

5. Bu sonuçlara göre; serum örnekleri 4 °C’de IMA ölçümü için 15 gün, TOS ve TAS tayini için ise en fazla 4 gün saklanabilir. Serum örneklerinin daha uzun süreli saklanması için -20 °C veya -80 °C’de dondurulması uygundur.

6. Oda sıcaklığında saklanan serum örneklerinde saatlik veya günlük TOS, TAS ve IMA düzeyleri ölçülerek bu parametrelerin ne kadar süre ile stabil kaldığı araştırılabilir. Ayrıca 4 °C’de 15 gün süre ile ölçümünü anlamlı olarak değişmediği görülen IMA için 15 günden daha uzun süreli ölçümler ile bu şartlarda IMA stabilitesindeki değişiklikler ortaya konabilir.

7. Bu tez çalışmasına benzer çalışmalar ile TOS, TAS ve IMA dışındaki diğer oksidatif stres belirteçlerinin tayininde kullanılacak örneklerin saklama şartları ortaya konabilir.

9. KAYNAKLAR

1. Cecarini V, Gee J, Fioretti E, Amici M, Angeletti M, Eleuteri AM, Keller JN (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773(2): 93-104.
2. Srivastava KK, Kumar R (2015). Stress, oxidative injury and disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 30(1): 3-10.
3. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 30(1): 11-26.
4. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W (2015). Today's oxidative stress markers. *Medycyna Pracy* 66(3): 393-405.
5. Dogan D, Ocal N, Aydogan M, Tasci C, Arslan Y, Tapan S, Yetkin S, Bilgic H (2016). Assessment of the role of serum ischemia-modified albumin in obstructive sleep apnea in comparison with interleukin-6. *Postgraduate Medical* 128(6): 603-608.
6. D'Souza JM, D'Souza RP, Vijin VF, Shetty A, Arunachalam C, Pai VR, Shetty R, Faarisa A (2016). High predictive ability of glycated hemoglobin on comparison with oxidative stress markers in assessment of chronic vascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 76(1): 51-57.
7. Sezer K, Keskin M (2014). Serbest oksijen radikallerinin hastalıkların patogenezisindeki rolü. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 28 (1): 49-56.
8. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T (1997). Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Nephrology* 3-4: 92-95.
9. Eker B, Aydın M, Kuşcu M. K, Sungur M. Z, Yalçın A. S (2012). Measurement of urinary malondialdehyde levels as an indicator of oxidative stress and free radical injury in schizophrenic patients. *Marmara Medical Journal* 25: 64-8.
10. Repetto M, Semprine J, Boveris A (2012). Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. (Ed: Dr. Angel Catala). Argentina, 3-30.

11. Gümüştas MK, Atukeren P (2008). Oksidatif ve nitrozatif stresin psikiyatrik bozukluklarla ilişkisi. Sempozyum Dizisi 62: 329-340.
12. İşbilir ŞS (2008). Yaprakları salata-baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Doktora Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.
13. Delibaş N, Özçankaya R (1995). Serbest radikaller. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2: 11-17.
14. Atmaca E, Aksoy A (2009). Oksidatif DNA hasarı ve kromatografik yöntemlerle tespit edilmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 20(2): 79-83.
15. Burçak G, Andican G (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. Cerrahpaşa Tıp Dergisi 35: (4) 159-169.
16. Karabulut H, Gülay MŞ (2016). Serbest radikaller. Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4(1): 50-59.
17. Dündar Y, Aslan R (2000). Hekimlikte oksidatif stres ve antioksidanlar. Cerrahi Tıp Bilim Dergisi 134-142.
18. Aslan R, Şekeroğlu MR, Bayıroğlu F (1995). Serbest radikal türlerinin membrane lipid peroksidasyonuna etkileri ve hücrel antioksidan savunma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2: 137-142.
19. Pisoschi AM, Pop A (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. European Journal of Medicinal Chemistry 5(97): 55-74.
20. Sánchez C (2016). Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. Synthetic and Systems Biotechnology 24; 2(1): 13-22.
21. Gupta SC, Hevia D, Patchva S, Park B, Koh W, Aggarwal BB (2012). Upsides and downsides of reactive oxygen species for cancer: the roles of reactive oxygen species in tumorigenesis, prevention, and therapy. Antioxid Redox Signal 1; 16(11): 1295–1322
22. Cheeseman KH, Slater TF (1993). An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin 49(3): 481-93.

23. Kehrer JP, Klotz LO (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical Reviews in Toxicology* 45(9): 765-98.
24. Donaghy L, Hong HK, Jauzein C, Choi KS (2015). The known and unknown sources of reactive oxygen and nitrogen species in haemocytes of marine bivalve molluscs. *Fish and Shellfish Immunology* 42(1): 91-7.
25. Gürgöze S, Şahin T, Durak M.H (2007). Memelilerde ortalama yaşam süresi ve Yaşlanma sürecinde serbest radikallerin rolü. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 33(1): 43-49.
26. Büyüksulu N, Yiğitbaşı T (2015). Reaktif oksijen türleri ve obezitede oksidatif stres. *Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 5(3): 197-203.
27. Şener F (2009). Akciğer karsinomlarında oksidatif stres biyogöstergelerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
28. Percival M (1998). Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights* 96(1): 1-4.
29. Kasnak C, Palamutoğlu R (2015). Doğal antioksidanların sınıflandırılması ve insan sağlığına etkileri. *Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi* 3(5): 226-234.
30. Berköz M, Yalın S, Güler GV, Yalçın A (2008). Akut lösemilerde lipid peroksidasyonu ve antioksidan enzim aktivitesi. *Erciyes Medical Journal* 30(3): 157-162.
31. Yılmaz İ (2010). Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 17(2): 143-153.
32. Usta B, Yılmaz Ersan L (2013). Sütün antioksidan enzimleri ve biyolojik etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 27(2): 123-130.
33. Büyük İ, Soydam- Aydın S, Arası S (2012) Bitkilerin stres koşullarına verdiği moleküler cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 69(2): 97-110.
34. Özdemir Ç (2013). Süperoksit dismutaz enziminin nardan (*punica granatum L.*) saflaştırılması ve karakterizasyonu. *Çukurova Üniversitesi fen ve mühendislik bilimleri dergisi* 29(4): 14-23.

35. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G (1991). Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clinical Chemistry* 37(11): 1932-7.
36. Aktafl M, Değirmenci U, Kul Ercan S, Tamer L, Atik U (2005). The comparison of spectrophotometric and HPLC methods in reduced glutathione measurements. *Türk Klinik Biyokimya Derg* 3(3): 95-99.
37. Memişoğulları R (2005). Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 3: 30-39.
38. Halifeoğlu İ, Karataş F, Çolak R, Canatan H, Telo S (2005). Tip 2 diyabetik hastalarda tedavi öncesi ve tedavi sonrası oksidan ve antioksidan durum. *Fırat Tıp Dergisi* 10(3): 117-122.
39. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, Yang J, Ortega-Lopez AM, Shinoda H, Honda SA, Rios CN, Sugiyama CE, Ha CE (2003). Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clinical Chemistry* 49(4): 581-585.
40. Quinlan G J, Martin G S, Evans T W (2005). Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology* 41(6): 1211-1218.
41. Türedi S, Karahan SC, Menteşe A, Gündüz A, Topbaş M, Koşucu P, Oztuna F, Tatlı O (2010). Investigation of relationship between the D-dimer and ischemia-modified albumin levels with the radiological imaging-based pulmonary embolism severity score in acute pulmonary embolism. *Anadolu kardiyoloji dergisi* 10(4): 346-352.
42. Kumar PA, Subramanian K (2016). The role of ischemia modified albumin as a biomarker in patients with chronic liver disease. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 10(3): BC09-BC12.
43. Erel O (2005). A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical Chemistry* 38(12): 1103-1111.
44. Huang Q, Feng J, Wu R, Yang Y, Dai C, Li J, Liao Y, Xiang M, Wang D, Du XB (2017). Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with esophageal cancer. *Med Sci Monit* 4(23): 3789-3794.

45. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV (2000). A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia-a preliminary report. *J Emerg Med* 19: 311-315.
46. Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A (2017). Oxidative stress: Harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017: 8416763.
47. Noori S (2012). An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Sci Rep* 1: 1-8.
48. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid peroxidation: Production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014: 360438.
49. Kara I, Pampal HK, Yildirim F, Dilekoz E, Emmez G, U FP, Kocabiyik M, Demirel CB (2017). Role of ischemic modified albumin in the early diagnosis of increased intracranial pressure and brain death. *Bratislava Medical Journal* 118(2): 112-117.
50. Erel O (2004). A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clinical Biochemistry* 37(2): 112-119.
51. Erdem M (2017). Farklı tüplere alınan kan örneklerinde tayin edilen oksidatif stres biyobelirteçlerinin değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
52. Yarcı Gursoy A, S.G Caglar, Demirtas S (2017). Ischemia modified albumin in perinatology. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 210: 182-188.
53. Chawla R, Navendu G, Rajneesh C, Shweta G (2006). Ischemia modified albumin: a novel marker for acute coronary syndrome. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 21(1): 77-82.
54. Yavuzi F, Bıyık M, Asıl M, Dertli R, Demir A, Polatı H, Uysal S, Ataseven H (2017). Serum ischemic modified albumin (IMA) concentration and IMA/albumin ratio in patients with hepatitis B-related chronic liver diseases. *Turkish Journal of Medical Sciences* 47: 947-953.

55. Jalan R, Schnurr K, P. Mookerjee R, Sen S, Cheshire L, Hodges S, Muravsky V, Williams R, Matthes G, A. Davies N (2009) Alterations in the functional capacity of albumin in patients with decompensated cirrhosis is associated with increased mortality. *Hepatology* 50(2): 555-64.
56. Oddoze C, Lombard E, Portugal H (2012). Stability study of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. *Clinical Biochemistry* 45(6): 464-9.
57. Jansen EH, Beekhof PK, Cremers JW, Viezeliene D, Muzakova V, Skalicky J (2013). Short-term stability of biomarkers of oxidative stress and antioxidant status in human serum. *International Scholarly Research Notices* 2013: 1-5.
58. Jansen EH, Beekhof PK, Cremers JW, Viezeliene D, Muzakova V, Skalicky J (2013). Long-term stability of parameters of antioxidant status in human serum. *Free Radical Research* 47(6-7): 535-540.
59. Mathews-Roth MM, Stampfer MJ (1984). Some factors affecting determination of carotenoids in serum. *Clinical Chemistry* 30(3): 459-461.
60. Nomura AM, Stemmermann GN, Heilbrun LK, Salkeld RM, Vuilleumier JP (1985). Serum vitamin levels and the risk of cancer of specific sites in men of Japanese ancestry in Hawaii. *Cancer Research* 45(5): 2369-2372.
61. Bortolin RC, Gasparotto J, Vargas AR, da Silva Morrone M, Kunzler A, Henkin BS, Chaves PR, Roncato S, Gelain DP, Moreira JCF (2017). Effects of Freeze-thaw and storage on enzymatic activities, protein oxidative damage, and immunocontent of the blood, liver, and brain of rats. *Biopreservation and Biobanking* 15(3): 182-190.

10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ TIP FAKÜLTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL
BAŞKANLIĞI

Sayı : 24237859- 191
Konu: Etik Kurul onay belgesi

24/03/2017

Sayın; Prof. Dr. S. Caner KARAHAN
Tıbbi Biyokimya ABD.

“Örnek Saklama Koşullarının Serum Oksidatif Stres Biyobelirteç Düzeyleri Üzerine Etkisi” başlıklı etik kurul 2017/ 47 protokol numaralı tez çalışması raporör ve etik kurul görüşleri doğrultusunda; tıbbi etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilginizi ve gereğini rica ederim.


Prof. Dr. Faruk AYDIN
Etik kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

11. ÖZGEÇMİŞ

A. KİŞİSEL BİLGİLER

A.1.	Adı soyadı: Mahsa BAYRAMİ
A.2.	Doğum tarihi ve yeri: 30.01.1991 Poldasht/ IRAN
A.3.	Yabancı dil bilgisi: İngilizce
A.4.	İletişim bilgileri (e-posta adresi / telefon): mahsabayrami23@gmail.com / 0537 978 7133

B. EĞİTİM BİLGİLERİ

B.1.	Mezun olduğu üniversite / fakülteyi lütfen belirtiniz: Sağlık bilimleri fakültesi, IRAN, Azad Ünivesitesi
B.2.	Mezuniyet tarihini lütfen belirtiniz (yıl olarak): 2012