

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

**MANİSA VE YÖRESİNDEKİ SAĞLIKLI BİREYLERDE
SERUM TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE, TOTAL
OKSİDAN KAPASİTE VE SÜPEROKSİT DİSMUTAZ
REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ
Dr. Aysun BİLGİ YEDEKÇİ**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Zeki ARI**

Manisa, 2012

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	V
KISALTMALAR	VI
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	
II.1.Referans Aralığı Kavramı	3
II.1.1. Referans Aralığı	3
II.1.2. Normal Değer	5
II.1.3. Referans Birey	6
II.1.3.1. Referans Bireyin Tanımı	6
II.1.3.2. Referans Bireylerin Seçilmesi	6
II.1.3.2.1. Direkt Örneklemeye Yöntemi	7
II.1.3.2.2. İndirekt Örneklemeye Yöntemi	10
II.1.3.3. Referans Kitlesinin Gruplandırılması	11
II.1.3.4. Birey Örneklerinin Toplanması ve Analitik Prosedür	12
II.2. Deneysel Süreç	12
II.2.1. Preanalitik Evre	12
II.2.1.1. Kan örneklerinin Alınması	14
II.2.1.2. Kan Örneklerinin Transferi ve Serumların Ayrılması	14
II.2.2. Analitik Evre	14
II.2.3. Postanalitik Evre	15
II.3. Referans Değer Hesaplamaları	15
II.3.1. Referans Değerlerin İstatistiksel Analizi	15
II.3.2. Referans Gruplardaki Veri Sayısının Önemi	15
II.3.3. Referans Dağılımının İncelenmesi	16
II.3.4. Aşırı Uçlarda Gözlenen Değerlerin Belirlenmesi	17
II.3.5. Referans Kitlesinin Dağılım Tipinin Değerlendirilmesi	18
II.3.6. Referans Aralık Tayininde İstatistiksel Yöntemler	18
II.3.6.1. Parametrik Yöntemler	19
II.3.6.2. Parametrik Olmayan Yöntemler	20

II.3.7. Referans Değerlerin Transfer Edilebilirliği	21
II.4. Oksidatif Stres	22
II.4.1. Serbest Radikaller	22
II.4.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri, Reaktif Oksijen Türleri ve Reaktif Nitrojen Türleri	23
II.4.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları	24
II.4.1.3. Serbest Radikaller ile Oluşan Hücresel Hasarlar	25
II.4.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	30
II.4.2.1. Antioksidan Enzimler	32
II.4.2.1.1. Süperoksit Dismutaz(SOD)	32
II.4.2.1.2. Katalaz(CAT)	33
II.4.2.1.3. Glutasyon Peroksidaz(Gpx)	33
II.4.2.1.4. Glutasyon Redüktaz(GR)	34
II.4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	34
II.4.2.2.1. Askorbik Asit	34
II.4.2.2.2. β -Karoten(Vitamin A ön maddesi)	35
II.4.2.2.3. Vitamin E(α-Tokoferol)	35
II.4.2.2.4. Transferin ve Laktoferrin	35
II.4.2.2.5. Seruloplazmin	35
II.4.2.2.6. Albümin	35
II.4.2.2.7. Ürik Asit	36
II.4.2.2.8. Bilirubin	36
II.4.3. Total Antioksidan Kapasite, Total Oksidan Kapasite ve Oksidatif Stres İndeksi	36
III. GEREÇ VE YÖNTEM	
III.1. Araç ve Gereçler	38
III.2. Yöntem	38
III.2.1. Çalışma Grubu	38
III.2.2. Total Antioksidan Kapasite Tayini	39
III.2.3. Total Oksidan Kapasite Tayini	40
III.2.4. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması	40
III.2.5. Süperoksit Dismutaz Tayini	40

III.3. İstatistiksel Analiz	41
IV. BULGULAR	
IV.1. Sosyodemografik Bulgular	42
IV.2. Deneysel ve İstatistiksel Bulgular	43
IV.2.1. Alt Gruplara ait TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerinin Karşılaştırılması	52
V. TARTIŞMA	56
VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	66
VII. ÖZET	68
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	69

ÖNSÖZ

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda sürdürdüğüm uzmanlık eğitimim süresince verdikleri destek ve katkılarından, gösterdikleri sevgi ve anlayıştan 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, iyi ve kötü zamanlarda birbirimize destek olduğumuz asistan arkadaşlarım Dr. Derya Güleç'e, Dr. Gürol Şahin Ulutaş'a, Dr. Ferda Doğan Bozyiğit'e, Dr. Nurser Arifoğlu'na, Dr. Esat Kılıç'a, Dr. Turgut Aktaş'a, Dr. Mehmet Çalkan'a, Dr. Ferhunde Pulular'a, Dr. Soner Erdin'e, Dr. Sezen Irmak'a, Dr. Sema Bilge'ye, Dr. Ceyhun Gözükara'ya, Dr. Arzu Oran'a ve tüm teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen sevgili anneme, babama ve ağabeylerime,

Bu sürecin her aşamasında fikirleri, özverisi ve desteği ile yanımda olan hayat arkadaşım Serhat'a,

En içten teşekkür ve şükranlarımı bir borç bilirim.

Dr. Aysun BİLGİ YEDEKCI

KISALTMALAR

IFCC: Uluslararası Klinik Kimya Fedarasyonu

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü

NCCLS: ABD Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi

TOS: Total Oksidan Kapasite

TAS: Total Antioksidan Kapasite

OSI: Oksidatif Stres İndeksi

SOD: Süperoksit Dismutaz

WHO: Dünya Sağlık Teşkilatı(World Health Organisation)

HLA: İnsan Lökosit Antijen(Human Leukocyte Antigen)

SD: Standart Deviasyon

DM: Diabetes Mellitus

DNA: Deoksiribonükleik asit

FAD: Flavin adenin dinükleotid

GSH-Px: Glutasyon peroksidaz

GSH: Glutasyon(redükte)

GSSG: Glutasyon(okside)

GST: Glutasyon-S-Transferaz

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

HOCl: Hipoklorik Asit

NADPH: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat(redükte)

O₂^{•-} : Süperoksit radikali

OH[•]: Hidroksil radikali

PUFA: Çoklu doymamış yağ asidi

RNT: Reaktif nitrojen türleri

ROO[•]: Peroksil radikali

ROT: Reaktif oksijen türleri

SPSS: Statistical Package for Social Sciences(istatistik programı)

SD: Standart sapma

MDA: Malondialdehid

4-HNE: 4- hidroksinonenal

ESR: Elektron spin rezonans

I. GİRİŞ

Referans değerler, laboratuvar test sonuçlarının yorumlanmasında klinisyenlere hasta ve sağlıklı birey ayırımını yapmada yardımcı olan tıbbi karar araçlarıdır. Dolayısıyla doğru bir şekilde belirlenmesi çok önemlidir.

Referans aralığı, referans bireylerin oluşturduğu örnek referans dağılımından belli istatistiksel yöntemlerin kullanılması ile elde edilen referans değerlerinin tanımlandığı aralıktır(1).

Popülasyon, diyet, teknik ve referans grubun seçimine bağlı olarak laboratuvarlar ve bölgeler arası farklılıklardan dolayı her laboratuvarın kendi referans aralıklarını belirlemesi en ideal olandır(2). Uluslararası Klinik Kimya Fedarasyonu(IFCC) ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü(CLSI) her laboratuvarın kendi referans aralığını belirlemesini tavsiye etmektedir(3). Teknolojinin ilerlemesiyle analiz teknik ve yöntemlerinin çeşitliliğinin artması pratik, güvenilir hesaplama yöntemlerinin gerekliliğini de artırmaktadır(4). Ancak, referans değerler için kullanılacak uygun referans grup bulmak zaman alıcı ve fazla sayıda numunede ölçüm yapmak pahalıdır(3). Değişen teknoloji ve klinik ihtiyaçlar nedeniyle uygulama ve değerlendirmede değişiklikler olabilirse de her laboratuvarın kendi normal referans aralığını belirlemesine veya en azından kullandığı kitin önerdiği referans aralığının geçerliliğini onaylamasına gereksinim vardır(5).

Referans değer belirlenmesinin gereklilikleri:

- Yeni bir analitik ölçümün yapılmaya başlanması,
- Daha önce referans veya fizyolojik değerleri bilinen bir analitin farklı veya yeni bir metotla ölçümlenmeye başlanması,
- Referans değeri başka laboratuvarlarca(üretici de olabilir) belirlenmiş bir analitin aynı veya mukayese edilebilir başka metotlarla ölçülmesi durumunda mevcut verinin transferi(5).

Referans değer çalışması her laboratuvar için gerekli olmakla birlikte maliyeti yüksek bir işlemdir. Bir laboratuvarda her test için böyle bir işlemin olabildiğince fazla sayıda, her iki cinsiyette ve belirli yaş aralıklarında yapılması gerektiği düşünüldüğünde bu işlemin zorluğu ve

ne kadar masraflı olacağı kolaylıkla anlaşılabilir. Bu nedenle referans değer çalışması yapan laboratuvar sayısı çok azdır.

Son yıllarda bu konuda yapılan çalışmalar artmaktadır. Bu amaçla 2010 yılında IFCC'nin öncülüğünde tüm Avrupa'yı kapsayan ve biyokimyasal(rutin, hormon ve tümör marker) testleri içine alan bir çalışma başlatılmıştır. Bu çalışmanın Ülkemizi de içine alan bölümü 2012 yılında tamamlanmış bulunmaktadır.

Serbest radikaller dış yörüngelerinde paylaşılmamış bir veya birden çok elektron taşıyan atom veya moleküllerdir. Bu moleküllerin çoğu oksijen veya nitrojen merkezli bileşiklerdir ve oldukça kararsız olan bu moleküller çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve hatta son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedir(6). Reaktif oksijen türlerini ve bunların meydana getirdiği hasarı sınırlandırmak için vücutta birçok savunma mekanizması gelişmiştir. Bunlar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu engelleyerek ve/veya reaktif oksijen türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu inhibe ederler(7).

Vücuttaki oksidatif stresi ve antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için oksidan ve antioksidan moleküllerin bireysel ölçümü yerine total olarak ölçümünü sağlayan yöntemler yaygınlaşmaktadır(8,9). Total oksidan status(TOS) düzeyinin, total antioksidan status(TAS) düzeyine oranlanmasıyla hesaplanan oksidatif stres indeksi(OSİ), vücutta oksidan-antioksidan dengesinin yönünü belirtir. Oksidatif stres günümüzde birçok hastalığın patofizyolojisinde(kardiovasküler hastalıklar, pulmoner hastalıklar, diabetes mellitus(DM), nörodejeneratif hastalıklar ve kanser) suçlanmaktadır(10).

Bu projede, Manisa ve yöresinde yaşayan sağlıklı erişkinlerde TAS, TOS ve süperoksid dismutaz(SOD) parametrelerinin referans aralıklarını belirlemeyi ve rutin olarak çalışılabilmesi için bu testlerin çalışma yöntemlerini laboratuvarımıza kurmayı amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

II.1. REFERANS ARALIĞI KAVRAMI

II.1.1. Referans Aralığı

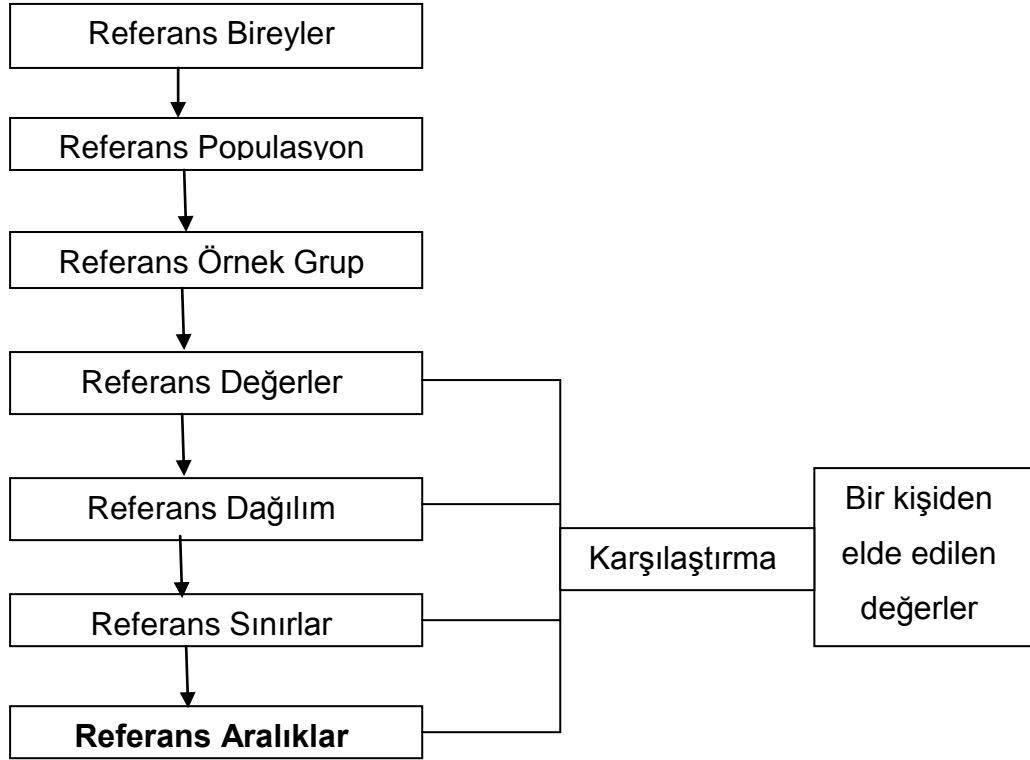
Dünya Sağlık Teşkilatı(WHO) sağlığı; sadece hastalık durumunun yokluğu şeklinde değil, “fiziksel, mental, sosyal refah durumu” olarak tanımlamaktadır(11).

Bir bireyde sağlıklı olma veya hastalık durumunun tanımlanmasında referans verilere başvurularak karar verilir. Bu referans veriler tıbbi anamnezlerden, klinik muayenelerden ve destek incelemelerden elde edilir(11).

Referans aralıklar, tıpta en çok kullanılan karar verme aracıdır(12). Günümüzde klinik biyokimya laboratuvarlarında kullanılan biyokimya testlerinin yorumlanmasında ilgili testin referans aralığına başvurulmaktadır. Bu sebeple öncelikle ‘referans aralığı’ tanımını yapmak yerinde olacaktır: Bir referans bireyinde belirli bir fenotipin gözlemlenmesi ya da ölçülmesi yolu ile elde edilen değere referans değer denir(13). Başka bir tanım yapacak olursak, referans bireylerin oluşturduğu örnek referans dağılımından belli istatistiksel yöntemlerin kullanılması ile elde edilen referans değerlerinin tanımlandığı aralıktır(1)(Tablo 1). Referans aralığı yalnızca sağlıklı bireyleri belirlemek için değil, belirli fizyolojik ve patofizyolojik durumları temsil etmek üzere de yapılabilir(5).

Popülasyon, diyet, teknik ve referans grubun seçimine bağlı olarak laboratuvarlar ve bölgeler arası farklılıklardan dolayı her laboratuvarın kendi referans aralıklarını belirlemesi en ideal olanıdır(2,14). Her laboratuvarın referans aralıklarını hesaplaması zor olduğu için bir çok laboratuvar kendi referans aralıklarını kullanmak yerine, üretici firmanın referans aralıklarını kullanmaktadır(2,15). En yararlı yaklaşım belirli kriterlere göre seçilen laboratuvarların belirli bölge halkını temsil edecek şekilde referans aralıklarını hesaplamasıdır(2).

Tablo 1. Referans Aralık Teorisi(12,13,16)



Referans aralıklarının saptanmasında önemli bir sorun, bu değerlerin bölgeler arası ve kaynak popülasyona göre, laboratuvar ve teknik şartlara bağlı değişkenlik göstermesidir. Genel bir ilke olarak her laboratuvar kendi referans aralığını kendi belirlemelidir(17). Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu(IFCC-International Federation of Clinical Chemistry) her laboratuvarın kendi değerlerini belirlemesini önermektedir(15). Bunun için uygun kişinin seçilme kriterlerinin, örnek toplama ve analiz koşullarının, metod seçiminin belirlenmesi ve referans aralığının doğrulanması(validation of reference intervals) gereklidir(18). Her popülasyonun kendi referans aralıklarını hesaplaması gerektiği dikkate alındığında, her laboratuvar için zor olacağı da fark edilmektedir. Bu zorluğun yenilebilmesi için belirli bölgeleri temsil eden laboratuvarlar seçilebilir(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 sıralanabilir(1).

II.1.2. Normal Değer

Geçmişte kullanılan normal değerler teriminin, normal sözcüğünün çeşitli anlamları olmasından dolayı karışıklık yarattığı gözlenmiş ve kullanılmaması gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle IFCC “referans değer” terimini ve bununla ilişkili olarak “referans birey”, “referans sınır”, “referans aralık” ve “gözlenen değer” terimlerini önermiştir(19).

“Normal” terimini açıklamak için bazı tanımlamalar yapılmıştır. Bu tanımlamalar:

1. Şahsın kendi normali: Belirtilen kişiden sağlıklı döneminde elde edilmiş değer.
2. Optimum sağlık kondisyonundaki şahıslardan elde edilmiş verilere dayanan değerler.
3. Cohort(eş grupları) normalleri: Hastanın grubunu temsil eden sağlıklı toplumdaki elde edilmiş değerler.
4. Genel toplum normalleri: Hastanın geldiği toplumun tüm fertlerini temsil eden gruptan elde edilmiş normaller.
5. İstatistiksel anlamıyla normal dağılım ya da Gaussian dağılıma uyan veriler grubu(biyolojik veriler her zaman normal dağılım gösteren çan eğrisi grafiğine uymaz)(20).

Bireyin hangi sağlık durumlarında normal olduğunu belirlemek yine çok zor bir işlemdir; bunu belirlediğimiz takdirde bile, o kişiden elde edilen değerlerin bir başka kişinin değerleri ile uyuşması oldukça düşük bir olasılıktır. Kaldı ki aynı kişinin bile hayatının farklı dönemlerinde farklı sağlık kondisyonlarında bulunabildiğini gözlemlemekteyiz. İstatistiksel olarak düşünmek gerekirse de, normal değerleri bir popülasyona uygulamak anlamsızdır. Bu açıdan yukarıda elde edilen dağılımı referans dağılımı olarak nitelendirmek daha doğru olacaktır. Bu zorluklar göz önünde bulundurulduğunda, referans aralıklarını belirlerken de normal bireylerin

değil, referans bireylerin değerlerinin kullanılmasının daha uygun olacağı anlaşılmaktadır(13).

II.1.3. Referans Birey

II.1.3.1. Referans Bireyin Tanımı

Referans birey, klinik araştırma yapılan bireylerle karşılaştırılmak üzere tanımlanmış kriterlere göre seçilmiş bireydir(20).

II.1.3.2. Referans Bireylerin Seçilmesi

Referans bireyler grubuna hangi bireylerin seçileceği bir dizi kriter ile belirlenir. Bu seçme kriterleri kaynak popülasyonun tanımını, sağlık veya ilgilenilen hastalık için spesifikasyonları içerir. Tablo 2’de sağlıkla ilişkili referans bireylerin seçimi için önemli olan dışlama kriterleri belirtilmektedir(19,20).

Tablo 2. Sağlıkla İlişkili Referans Değerleri İçin Dışlama Kriterlerine Örnekler(19,20)

Hastalık
Risk Faktörleri Obezite Hipertansiyon Mesleki veya çevresel riskler Genetik olarak belirlenen riskler
Farmakolojik olarak aktif ajanların alınması Hastalık ve rahatsızlık için ilaç tedavisi Oral kontraseptifler Suistimal edilen ilaçlar Alkol Sigara
Belirgin Fizyolojik Durumlar Gebelik Stres Yoğun egzersiz

Çalışmanın planlanmasında en önemli aşama referans bireylerin seçimidir. Klinik laboratuvarlarda referans aralıkları hesaplanmasında NCCLS(parametrik olmayan) ve IFCC'nin(parametrik ve parametrik

olmayan) önerdiği yöntemler en yaygın kullanılanlardır. NCCLS istatistik kullanılmasına gerek bırakılmayan parametrik olmayan yöntemi önermekte; IFCC hem parametrik hem de parametrik olmayan yöntemleri önermektedir(2,4).

Referans bireylerin seçiminde anketler kullanılarak kriterlere uyan bireylerden veriler toplanabildiği gibi, belirlenen toplumdaki rastgele seçilen bireylerin verileri değerlendirilerek de seçim yapılması önerilmektedir. Referans aralıkları topluma dayalı veya bireye dayalı da değerlendirilebilmektedir. Laboratuvara başvuran bireylerden hesaplama yöntemleri denenmekte, hastane popülasyonundan seçme de önerilmektedir(2).

İdeal olan, seçme kriterlerini sağlayan kaynak popülasyondaki tüm bireyler arasından rastgele seçmektir. Fakat, çok sıkı yapılan seçme programı bir çok durumda çeşitli nedenlerden dolayı pratikte mümkün olmaz. Çok sıkı yapılacak olsa, öncelikle tüm popülasyonun(binlerce ve milyonlarca birey) muayene edilmesi ve kriterlere uyanlar arasından piyango çeker gibi bireylerin belirlenmesi gerekir. Bundan dolayı en iyi yol referans bireylerin seçiminde tüm pratik yolların dikkate alınmasıdır. Rastgele seçilmemesinden ötürü oluşabilecek bias nedeniyle elde edilen verilerin dikkatli değerlendirilmesi gerekmektedir(19).

IFCC ve NCCLS'nin referans değerlerin hesaplanmasıyla ilgili standartları referans bireylerin direkt yöntemle seçilmelerini önermektedir. Fakat, masraflı ve pratikte zor olması nedeniyle başka yollar da önerilmektedir. Bu yollar da dikkate alınarak, üç temele göre altı seçme yöntemi önerilmektedir(5,13).

- Direkt - indirekt
- Test Öncesi Örneklem(Priori) - Test Sonrası Örneklem(Posteriori)
- Rastgele - Rastgele Olmayan

II.1.3.2.1. Direkt Örneklem Yöntemi

Bireylerin ana toplumdaki tanımlanmış kriterlere göre seçimidir. IFCC ve NCCLS'nin referans değerlerin hesaplanmasıyla ilgili standartları referans bireylerin direkt örneklem ile seçilmelerini önermektedir(13,19).

Dezavantajları sadece referans gruptan temsilci grubu seçme ve maliyetidir(19). Bu yöntemde, belirlenmiş kriterlere göre hazırlanan anket formları doldurulup, sonra bireylerin tetkikleri yapılır. Tablo 3'de NCCLS C28-A standartlarına uygun olarak, örnek anket formundan yararlanılarak hazırlanan anket formu görülmektedir(13).

Anket formları sağlıklı olduğu düşünülen bireylerin seçilmesine ve referans aralığı saptanacak analiti etkileyen preanalitik etkenlerin hesaba katılmasına olanak sağlamalıdır(4).

Tablo 3. Örnek Anket Formu(4)

TÜM BİLGİLER KESİNLİKLE GİZLİ TUTULACAKTIR VE SİZİN KAN ÖRNEĞİNİZDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN KULLANILACAKTIR.									
ÖRNEK NO:		ÖRNEK ALINDIĞI SAAT:			(LABORATUVAR TARAFINDAN DOLDURULACAKTIR)				
İSİM (ADI,SOYADI):		MEDENİ HALİ:			MESLEK:		TELEFON:		
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 DERECESİ? (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?									
İŞİNİZDE TEHLİKELİ KİMYASAL MADDELERE MARUZ KALIYOR MUSUNUZ? (E) (H)									
EĞER EVET İSE NE? SÜRESİ:									
SİGARA KULLANIYOR MUSUNUZ? (E) (H)									
EĞER EVET İSE NE ŞEKİLDE? 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 MISINIZ? (E) (H)									
EĞER EVET İSE NEDEN?									
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 TANIMLAYIN:									
SON GÜNLERDE ASPİRİN YADA 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 NE? NE ZAMAN?									
SON GÜNLERDE HİÇ ANTİASİT VEYA MİDE İLACI ALDINIZ MI? (E) (H)									
EĞER EVET İSE NE? NE ZAMAN?									
DİYET HAPİ KULLANIYOR MUSUNUZ? (E) (H) 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)									
HAMİLE MİSİNİZ? (E) (H) EĞER EVET İSE, TAHMİNİ DOĞUM TARİHİNİZ NEDİR?									
ORAL KONTRASEPTİF KULLANIYOR MUSUNUZ? (E) (H) EĞER EVET İSE HANGİSİ?									

Referans aralığının saptanmasında önerilen protokol şu şekildedir(2,13):

1- Tıbbi ve bilimsel literatürlerden analitik interferanslar ve biyolojik değişkenlerin uygun bir listesi saptanır.

2- Potansiyel referans bireylerden referans toplumuna seçilmeyi veya referans toplumundan dışlanmayı belirleyecek olan kriterleri saptamak için uygun sorular ve özel kriterler oluşturulur.

3- Referans aralık çalışmasının yazılı prosedürü hazırlanır ve referans bireylerinin tamamına anket uygulanır.

4- Anket bulguları üzerinden potansiyel referans bireyler kategorize edilir.

5- Dışlama kriterlerine göre belirlenen bireyler referans örnek grubundan çıkarılır.

6- İstenen özelliklere sahip yeterli sayıda referans bireyine karar verilir.

7- Seçilen referans bireyler hazırlanır, biyolojik örnekler belirlenmiş koşullarda toplanır, analitik değişkenlerin kontrolleri yapılır ve örnekler çalışılır.

8- Belirlenmiş analitik metodlara göre referans değerleri elde edilir.

9- Referans değer verileri incelenir ve histogramları çizilir.

10- Olası veri hataları ve/veya aşırı uç değerler saptanır:

- Parametrik olmayan yöntemlere göre D/R kuralına göre belirlenir.
- Parametrik yöntemlere göre aritmetik ortalamanın ± 3 standart sapma sınırları dışındaki değerlerdir.

11- Verilerin histogramları hazırlanır, dağılımları incelenir ve gerekirse bu veriler alt gruplara ayrılır.

12- Referans aralık hesaplama yöntemi seçilir.

NCCLS önerilerine göre hesaplama parametrik olmayan yöntemlerle yapılır.

IFCC önerilerine göre ise verilerin dağılımı değerlendirilerek hesaplama yöntemine karar verilir:

a. Verilerin dağılımı normal dağılıma uyuyorsa parametrik yöntem seçilir.

b. Verilerin dağılımı normal dağılıma uymuyorsa verilerin logaritmik transformasyonu yapılır ve tekrar değerlendirilir. Transformasyondan sonra dağılımı normal dağılıma uyanlara parametrik yöntem uygulanır ve geri transformasyon yapılarak sınırları hesaplanır. Veri transformasyonu sonrası dağılımı normal dağılıma yine uymuyorsa parametrik olmayan yöntemle hesaplamalar yapılır.

13- Referans aralığı, referans sınırları ve bu sınırların güven aralıkları belirlenirken bütün belirtilen basamak ve prosedürler kaydedilir.

Test öncesi örneklem(A priori); Örneklem içinden, tanımlanmış katılım kriterine uygunluklarına göre bireylerin direkt metotla seçilmesidir(20). Bu yöntemde; analiz yöntemi ile ilgili bilgiler çok sayıda ve çok iyi biliniyorsa bireyler tanımlanmış kriterlere göre seçilir ve örnekler toplanır, ileriye dönük bir ayırım işlemidir(21). A priori örneklem laboratuvar testlerini içerebilir, örneğin diyabet için glukoz bakılması gibi. Bu durumda, kabul kriterlerinin dışında kalan herhangi bir birey referans aralığının belirlenmesinde kullanılmayacaktır(12).

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(20). Bu yöntemde; analiz yöntemi ayrıntılı bilinmiyor ve hakkında yeterli bilgi toplanamıyorsa, bireylerden örnekler alınır. Analiz yapıldıktan sonra ayırma yapılır ve alt gruplara bölünür. A posteriori açıklamada elimizde çok iyi düzenlenmiş bir demografik veri tabanı olması gerekir(21).

II.1.3.2.2. İndirekt Örneklem Yöntemi

İndirekt yöntemde laboratuvara başvuran hastalarda elde edilen sonuçlar kullanılarak referans aralıkları hesaplanır. Bu yöntem tüm koşulları sağlayan bir veri tabanını kullanarak ve geriye dönük olarak referans aralıklarını tespit eder(22). Bireylere dikkat edilmeksizin, analiz sonuçlarının kayıtlı bulunduğu veri tabanından belli kurallara uygun şekilde test sonuçlarının seçimidir(20).

Direkt örneklendirme yöntemi uygulama zorluğu nedeniyle fazla popülerite kazanmamış, birçok araştırmacıyı kullanılabilirliği kolay yöntemler bulmaya zorlamıştır. İlk olarak 1999 yılında Ferré-Masferrer ve arkadaşları hasta verilerinin istatistiksel olarak aşırı karışık ve geniş dağılım göstermediği takdirde, referans aralığı belirlemede kullanılabileceğini göstermişlerdir(5,23).

IFCC direkt yöntemi önermektedir, ancak maliyetler ve zorluklar göz önüne alındığında; özellikle pediatrik ve geriatric gruplarda, indirekt yöntem de kullanılabilir(24).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda hastane verileri kullanılarak referans aralıklarının indirek yöntem ile daha kolay hesaplanabildiği gösterilmiştir(14).

II.1.3.3. Referans Kitlesinin Gruplandırılması

Referans bireyler yaş, cinsiyet ve diğer karakteristiklere göre alt gruplara ayrılabilirler(Tablo 4)(19). Yaş ve cinsiyet en fazla kullanılan kriterlerdir. Bir çalışmada dışlama kriteri kabul edilen bir faktör başka bir çalışmada dağılımları gruplara ayırmada kullanılabilir(21). 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(eşit dağılımların 0 hipotezinin inkar edildiği durumlar)(19).

Tablo 4. Referans Gruplarını Mümkün Alt Gruplara Ayırmak İçin Kullanılan Gruplama Kriterlerine Örnekler(19)

Yaş(eşit aralıklarla kategorize edilmesi gerekmez)
Cinsiyet
Genetik faktörler
Irk(etnik orjin)
Kan grupları(ABO)
Histokompatibilite antijenleri(HLA)
Fizyolojik faktörler
Menstrüel döngü evresi
Gebelik evresi
Fiziksel durumlar
Diğer faktörler
Sosyo ekonomik
Çevresel
Kronobiyolojik
HLA, Human leukocyte antigen: insan lökosit antijeni

Çalışmanın sonunda istatistiksel olarak gruplar arasında önemli bir fark olup olmadığına bakılabilir, bu amaçla Student's t-testi kullanılan en yaygın analiz yöntemidir. Bu test iki farklı grubu karşılaştırmada kullanılır; ANOVA yöntemi ise ikiden fazla grubun olduğu durumlarda kullanılmaktadır(21).

Hastane şartları göz önünde bulundurulduğunda iyi hazırlanmış formlar kullanılarak bu kriterler tek tek uygulanabilir. Bu formların A priori örneklendirmede kullanılması birey seçimini olumlu yönde etkileyecektir. Ancak bu işlemlerin kan alımından önce gerçekleştirilmesi gerekir(11,25, 26).

II.1.3.4. Birey Örneklerinin Toplanması ve Analitik Prosedür

Referans bireylerinin seçimi ve kan örneklerinin toplanması çalışmanın en çok iş gücü gerektiren ve en yoğun kısmıdır. Genel bir kural olarak kan toplama konusundaki iyi belirlenmiş standart prosedürlerin uygulanması gerekmektedir(21).

Laboratuvar koşulları, analitin özellikleri, analiz yöntemi ve analiz cihazına göre düzenlenmelidir(27). Genel olarak ölçüm sonuçlarını etkileyen faktörler üçe ayrılır, bunlar preanalitik, analitik ve postanalitik faktörlerdir(28). Testi etkileyebilecek olan bu etkenler standardize edilmelidir(27).

II.2. DENEYSEL SÜREÇ

II.2.1. Preanalitik Evre

Analiz sonuçlarını etkileyen faktörler gözönüne alınarak preanalitik koşullar sonuçların en az etkileneceği duruma getirilir. Bunlar örnek alınırken hastaya verilecek pozisyon, örnek alınacak bireyin hazırlanması, örnek alınırken dikkat edilecek koşullar ve örneğin analize hazırlanması aşamasındaki işlemlerdir(Tablo 5 ve 6). Varyasyonun preanalitik kaynakları analitlere göre farklılık gösterirler. Bundan dolayı referans aralığı hesaplanacak analit için koşullar bilinmeli ve özellikle istenmeyenler dikkate alınmalıdır. Örneğin referans değerler belirlenirken, vücut postürü diffüze analitler için çok önem arz ederken, sodyum gibi diffüze olmayanlar için o kadar önemli değildir(19).

Tablo 5. Preanalitik Biyolojik Faktörler(20)

Preanalitik Biyolojik Faktörler	
İnternal Faktörler	<ul style="list-style-type: none">▪ Kişisel değişimler▪ Yaş▪ Irk▪ Cinsiyet
Eksternal Faktörler	<ul style="list-style-type: none">▪ Egzersiz, fiziksel aktivite▪ Hastaneye yatma ve hareketsizlik▪ Gebelik, menstrüel siklus▪ Diyet ve yenilen şeylerin etkisi▪ Kahve, tütün, alkol kullanımı▪ İlaç etkileşimleri▪ Başka hastalıklarla etkileşim▪ Sirkadiyen değişiklikler▪ Ateş, şok, travma, stres▪ Transfüzyon ve infüzyon▪ Seyahat▪ Çevre şartları▪ Mevsimsel değişimler▪ Şişmanlık▪ Örnek alınırkenki vücut postürü

Tablo 6. Preanalitik Metodolojik Faktörler(20)

Preanalitik Metodolojik Faktörler	
Örnek Alınırken Etki Eden Faktörler	<ul style="list-style-type: none">• Örnek alınmadan önceki dinlenme süresi• Örneğin alındığı zaman• Ekipman• Kullanılan malzemenin temizliği• Örnek alındığı yer ve alınma şekli• Kan alınan tüp ve kullanılan antikoagulan• Örneğin etiketlenmesi
Örneğin Analize Hazırlık Aşamasındaki Faktörler	<ul style="list-style-type: none">• Örneğin taşınma şekli• Pıhtılaşma süresi• Serum / plazmanın ayrılması• Örneğin korunma ve saklanması• Analize Hazırlık

II.2.1.1. Kan Örneklerinin Alınması

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(21).

II.2.1.2. Kan Örneklerinin Transferi ve Serumların Ayrılması

Kan örneği alındığı andan itibaren 2 saat içinde mutlaka serumu ayrılmalıdır. Serumun zamanından önce ayrılması, fibrin oluşumunun devam etmesi nedeniyle, analiz cihazındaki örnek problemlerinin tıkanmasına yol açabilir. Düz veya silikon kaplı cam tüplerde pıhtılaşma 20-30 dakika içinde tamamlanırken, plastik tüplerde bu süre uzundur. Kan örneği 2 saat içinde santrifüj edilemeyecekse, hemoliz riskini azaltmak için örnek 4 °C’de değil, oda sıcaklığında saklanmalıdır. Örnek, aynı gün içinde analiz edilecekse, ayrılan serum analize kadar ağzı kapatılmış bir tüpün içinde, 4 °C’de tutulmalıdır. Aynı gün içinde analiz edilmeyen örnekler -20 °C’de saklanmalıdır(19,21).

II.2.2. Analitik Evre

Referans değerlerin kullanılabilmesi için; (a) Analiz yöntemi, ekipmanın tanımlanması, reaktifler, kalibratörler, ham verinin tipi ve hesaplama yöntemleri de dahil analiz yöntemi, (b) Kalite kontrol ve (c) Uygunluk kriterleri gibi koşul olan spesifikasyonların açıklanması gereklidir(19). Referans değerlerin elde edilme çalışmaları süresince, laboratuvarın analitik sisteminin geçerliliği kanıtlanmalıdır. Gün içi ve günler arası değişkenlikler belirlenmelidir(29).

Analitik performansı etkileyen diğer faktörler de (ekipman, enstrümantasyon, su dahil reaktifler, kalibrasyon standartları ve hesaplama yöntemleri) sürekli olarak kontrol edilir. “Eksternal Kalite Değerlendirme Programları” sonuçları ile doğruluk verileri de değerlendirilebilir veya doğruluğu kanıtlayıcı bilgiler kaydedilir(29).

Analitik kalitenin, referans aralıklarının tanısal ve klinik yararlılığı için analitik geçerlilik ön koşuldur. Laboratuvarın kendi referans aralıklarını

saptamış olduğu durumda, referans aralıklarının saptanmasından kullanımlarına kadar geçen zamanda “analitik stabilite” son derece önemlidir. Laboratuvarlardan elde edilen bilgilerin geçerli olabilmesi için analitik yöntem ayrıntılı olarak değerlendirilmiş olmalıdır. Doğruluk, kesinlik, hassasiyet, doğrusallık, geri elde, interferans karakteristikleri belirlenmiş olmalı ve izlenebilirliği günlük kalite kontrol verileriyle kanıtlanmalıdır. Günlük rutin performansta analitik stabilite önem taşımaktadır(29). İç kalite kontrol sistemlerinin kontrol materyalleri ve kontrol kuralları, James Westgard tarafından geliştirilmiş olup, kalitenin monitorizasyonunda büyük değere sahiptir(30).

II.2.3. Postanalitik Evre

Postanalitik evre, test sonuçlarının çıkmasından klinisyene veya araştırmacıya ulaşmasına kadar geçen süredir. Bu evrede otomatize cihazlarla donatılmış laboratuvar bilgi sistemleri bulunan laboratuvarlarda hata olasılığı oldukça düşüktür. Ancak çıkan sonuçlar el ile kayıt ediliyorsa laboratuvar çalışanın dikkatsizliği veya dalgınlığı hata oranını artırmaktadır.

II.3. REFERANS DEĞER HESAPLAMALARI

II.3.1.Referans Değerlerin İstatistiksel Analizi

Referans örneklerin analizinden sonra veriler istatistiksel olarak incelenir. Bu incelemeler alt gruplara ayrılmasını, dağılımın incelenmesini, aşırı uç değerlerin belirlenmesini ve referans aralıkların saptanmasını içerir(19).

II.3.2. Referans Gruplardaki Veri Sayısının Önemi

Referans grupları değerlendirilirken elimizde yeteri kadar verinin olması gerekir. Çünkü veri sayısının çokluğu kullanılacak metodun güvenilirliğini artırır. Dağılımı etkileyen faktörler uç değerler ve veri sayısıdır. Özellikle uç değerler veri sayısının azlığında belirleyici hale geçerler ve dağılıma olumsuz etki ederler. Dağılımın iyi tanımlandığı Gaussian dağılımlarda kullanılan veri sayısı daha düşük olabilir. Ancak laboratuvar verileri genelde

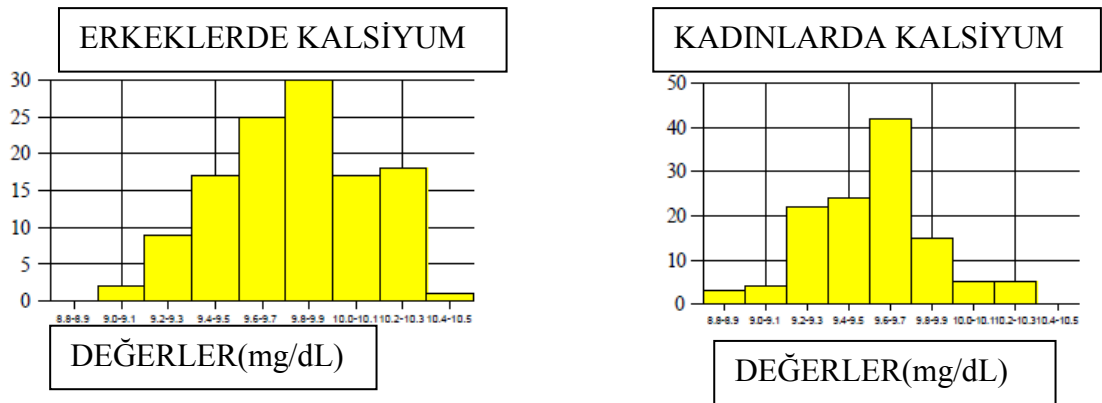
Gaussian dağılımına uymaz. Bu durumda düşük veri sayıları oldukça anormal sonuçlar verebilmektedir(31).

Hem NCCLS hem de IFCC referans aralık analizinde verilerin istatistiksel olarak değerlendirilebilmesi için en az 120 verinin yeterli olacağını belirtmiştir. Yaş ve cinsiyet gibi ana alt gruplar için de bu sayı geçerlidir. Fakat yenidoğan, pediatrik ve geriatric gibi popülasyonlarda alt gruplar için bu sayıda birey bulmak zor olabileceğinden böyle durumlarda ne kadar veri elde edilirse edilsin referans aralık analizleri yapılabilir(12,13,19).

Yapılan bir çalışmada belli istatistiksel metotlarla hangi veri sayılarının kullanılması gerektiği ortaya konmuştur. Bu çalışmada Gaussian ve Gaussian olmayan dağılımlar çeşitli denek sayılarında incelenmiştir. Gaussian dağılımlarda kullanılan veri sayısı daha düşük olabilmektedir, ancak dağılımın iyi tanımlanması gerekmektedir. Çünkü Gaussian olmayan dağılımlar düşük veri sayılarında oldukça anormal sonuçlar verebilmektedirler. Sonuçta, non-parametrik testler kullanıldığı takdirde en az 120 veri ile çalışılması gerektiği vurgulanmaktadır. Böyle bir analiz ile dağılımın %2.5-%97.5'inci noktaları saptanmış olacaktır. Bu da %95'lik bir dağılım aralığını tanımlamaktadır. Aynı çalışmada yaklaşık 200 verinin referans aralığı tayininde optimal sonuç vereceği ileri sürülmektedir(31).

II.3.3. Referans Dağılımının İncelenmesi

Histogram haline getirilen veriler görsel olarak kolayca incelenebilmektedir(Şekil 1).



Şekil 1. Örnek Histogramlar(13)

Histogramın incelenmesi istatistiksel tekniklerin yanlış kullanımını engelleyebilmektedir. Dağılım aşağıda belirtilen hususlar dikkate alınarak değerlendirilmelidir(11):

1. Dağılım sınırlarından çok fazla sapan aşırı uç değerler araştırılmalıdır. Aşırı uç değerlerin hesap dışı bırakılması gereklidir.

2. İki tepeli veya “bimodal” veya çok tepeli “polimodal” dağılımlar, seçilen grubun homojen olmadığına göstergesidir. Referans verileri alt gruplara bölme kriterlerine göre yeniden değerlendirilmelidir.

3. Dağılım eğrisinin görüntüsü değerlendirilir. Çan eğrisi şeklinde olan Gaussian dağılım eğrisine göre daha sağa çarpık($g_s > 0$) veya sola çarpık($g_s < 0$) ve daha dik($g_k > 0$) veya daha basık($g_k < 0$) olabilir. Asimetri ve normalden farklı tepeleşmelerde diklik veya basıklık birlikte değerlendirilmelidir.

4. Dağılım grafiğinin öncelikle değerlendirilmesi hesaplamaların geçerliliği kararının verilmesinde yardımcı olabilmektedir.

II.3.4. Aşırı Uçlarda Gözlenen Değerlerin Belirlenmesi

Dağılımlar değerlendirilirken gözlenen dağılımdan ayrılmış aşırı uç değerler hesaplamalara alındığı zaman sonuçlar olumsuz etkilenmektedir(32).

Aşırı uçlarda gözlenen değerlerin belirlenmesinde birçok istatistiksel yöntem kullanılır(13).

Parametrik istatistik kullanılacaksa dağılımın normal dağılıma uygunluğu kabul edildikten sonra, aritmetik ortalamanın ± 3 SD veya ± 4 SD sınırları dışındaki değerler atılır ve hesaplamalara katılmaz(21). NCCLS nonparametrik metod kullanılarak hesaplanan referans aralıklarda Dixon testini kullanmayı önermektedir. Dixon testi: “D değeri” aşırı uç olup olmadığı test edilen değerle ona en yakın değer arasındaki farktır. “R değeri” ise test edilen gözlemler de dahil tüm veriler arasındaki aralık değeridir. Bu kurala göre D değeri R değerinin $1/3$ 'üne eşit veya $1/3$ 'ünden yüksek ise test edilen veri hesaba alınmaz(12,13).

Sapan değerler aşırı uç eğiliminde olsalar da hemen aşırı uç uygulaması yapılmamalıdır. Değerlerin hesaplamaya alınması veya hesaplamaya alınmaması kararı mantığa dayalı olmalıdır. Şüpheli değerlerin kayıtları kontrol edilmeli, hata var ise düzeltilmelidir(19).

II.3.5. Referans Kitlesinin Dağılım Tipinin Değerlendirilmesi

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

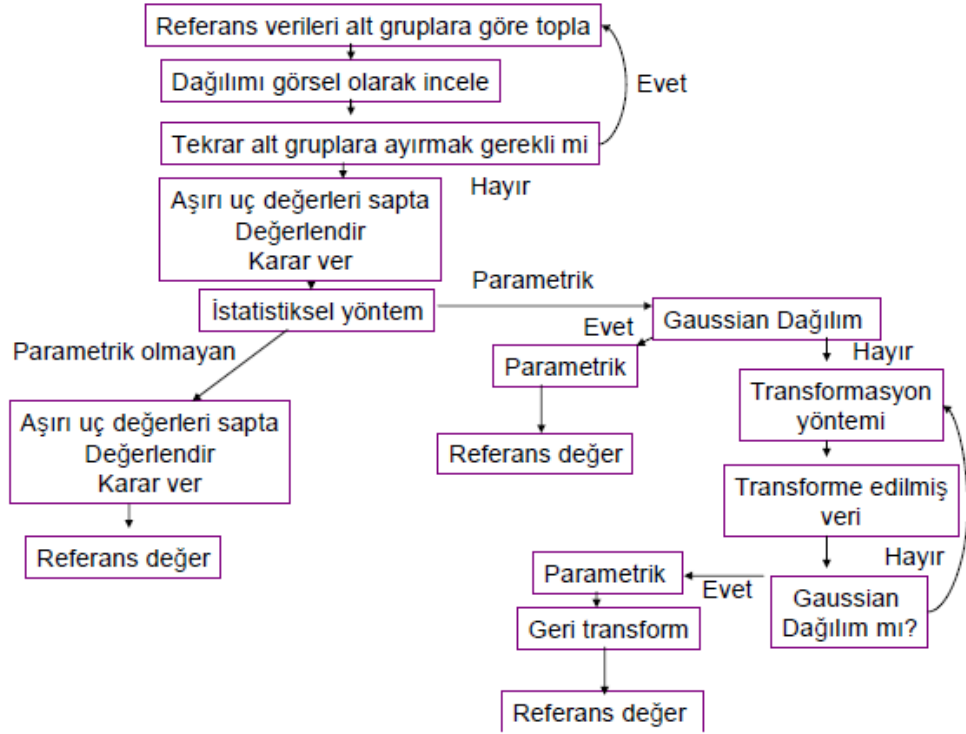
Referans dağılımın grafiksel gösterilmesi ve grafiğin görsel incelenmesi her zaman önerilmektedir. Histogramın incelenmesi istatistik tekniklerinin yanlış kullanımını engelleyebilmektedir, ayrıca veri hakkında çok değerli bilgiler sağlamaktadır.

II.3.6. Referans Aralık Tayininde İstatistiksel Yöntemler

Parametrik yöntemler ve non-parametrik yöntemler referans aralık tayininde kullanılır(11)(Tablo 7).

Parametrik yöntemde yüzdeler ve güven aralıkları hesaplanırken dağılımın belirli tipte olduğu varsayılır ve hesaplamalarda ortalama ve SD gibi populasyon parametreleri kullanılır. Örneğin, parametrik yöntemde referans verilerinin Gaussian dağılımına uyduğuna inanılır ve referans sınırları ortalamanın 2 SD altında ve üzerinde olarak hesaplanır. Parametrik olmayan yöntemde dağılım için hiçbir varsayımda bulunulmaz ve hesaplamalarda dağılım parametreleri kullanılmaz(21).

Tablo 7. Referans Aralıkların Hesaplanma Algoritması(11)



II.3.6.1. Parametrik Yöntemler

Parametrik yöntem parametrik olmayan yöntemlere göre çok daha komplikedir ve veri sayısı yüksek olunca bilgisayar istatistik programları gerektirir. Parametrik hesaplamada referans değerlerin dağılımları gaussian olduğu varsayılır(19). Gaussian dağılımlar belli parametreler tarafından tanımlanır; bunlar ortalama, SD, medyan gibi dağılımın şeklini tanımlayan parametrelerdir. Bu tip dağılımlarda referans aralıklarının saptanmasında parametrik yöntemler kullanılır ve non-parametrik yöntemlere göre daha komplikedir. Ancak elde edilen güven aralıklarından daha dar çıkmaktadır; bu da daha kesin bir yaklaşımda bulunulmasına olanak sağlar(19,33).

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)(19). Eğer transformasyon yapılmasına rağmen grup dağılımı yine non-Gaussian profil sergiliyor ise non-parametrik metodlar kullanılabilir(34).

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,

$$2.5 \text{ yüzdeler} = x - 1.96 \times SD$$

$$97.5 \text{ yüzdeler} = x + 1.96 \times SD$$

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 gösterdiği görülmüştür. 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(19).

II.3.6.2. Parametrik Olmayan Yöntemler

Çeşitli sayıda parametrik olmayan yöntem bulunmaktadır. Sıralanmış ve numaralanmış verilerle hesaplanan daha basit ve güvenilir bir yöntemdir. Yüzdelerinin güven aralıklarının hesaplanma yollarını gösterir(19,21).

Bu yöntemler son zamanlarda oldukça popüler olmuştur, non-parametrik yöntemleri de kendi içerisinde gruplara ayırabiliriz:

- 1- Non-parametrik yüzde tahmini yöntemi
- 2- Non-parametrik tolerans aralığı yöntemi
- 3- Modifiye non-parametrik yöntemler

Bu yöntemlerin en büyük avantajı non-Gaussian dağılımlarda işleyebilir olmalarıdır. Bu sayede referans bireylerinin seçimi daha da kolaylaşmakta ve özellikle hastane veri tabanlarında kayıtlı hasta test sonuçları rahatlıkla kullanılabilir. Öyle ki, hasta örnekleri dolaylı örneklendirme yöntemi

ile hiç ayıklanmaksızın olduğu gibi alınmakta ve istatistiksel olarak değerlendirmeye tabi tutulabilmektedir. Örneklendirmenin tipi ne olursa olsun, eğer dağılımımız non-Gaussian çıkıyorsa, o zaman non-parametrik yöntemleri kullanmamız gerekmektedir. Ancak daha önce de belirtildiği gibi nonparametrik yöntemler için denek sayısının en az 120 olması gerekir, düşük denek sayılarında ise oldukça yetersizdirler. Bu problemin aşılması için birçok modifiye yöntem tasarlanmıştır ve bunlara genel olarak dolaylı yöntemler denilmektedir. Non-parametrik yüzde tahmini yöntemi, alt ve üst değerleri kesin bildirmesi açısından daha fazla tercih edilmektedir; bu nedenle modifiye yöntemlerin çoğu bu yöntemi baz almaktadır. Burada dağılımın %95'ini içine alan yani %2.5 ile %97.5' e tekabül eden noktaları aramaktayız. İlgili formüller aşağıda verilmektedir:

$$\text{Alt değer} = 0.025 \times (n+1)$$

$$\text{Üst değer} = 0.975 \times (n+1)$$

'n' veri sayısını belirtmektedir. Öncelikle veriler en küçük değerden başlayarak büyüklüklerine göre sıralanır; yukarıdaki sonuçlar ise sıra numarasına tekabül ederler. Bazı durumlarda küsüratlı rakamlar çıkabilir, bu durumda rakamlar yuvarlanarak küsürat kaldırılır. Alt değer için 12.5 sonucu örnek verilecek olursa, yuvarlanarak 13 olur ve 13. sıradaki veri dağılımının alt noktası olarak tanımlanır; aynı şekilde üst nokta da tayin edilir(35).

II.3.7. Referans Değerlerin Transfer Edilebilirliği

Her laboratuvarın test listesindeki tüm analitler için güvenilir referans aralıklarını belirlemesi ana görevlerindendir. Güvenilir referans aralıkların hesaplanması analit sayıları ve yeni yöntemlerin gün geçtikçe arttığı göz önüne alındığında zor ve yüksek maliyetli bir işlemdir. Bu nedenle laboratuvarlar daha çok üretici firmaların belirlemiş olduğu veya başka laboratuvarlarda hesaplanmış değerleri kullanmaktadırlar. Ancak bu değerleri kullanıma sokmadan önce her laboratuvarın kendi koşullarına göre veri transferini sağlaması gerekir. NCCLS veri transferinin yapılabilmesi için bu koşulları şöyle sıralamıştır(13,19):

- 1- Populasyonlar tanımlanmalı ve özellikleri birbiriyle 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- Preanalitik, analitik ve postanalitik uygulamalar her iki laboratuvarda standardize programlarla yapılmalıdır.

II.4.OKSİDATİF STRES

Sağlıklı aerobik organizmada, reaktif oksijen türlerinin oluşması ile antioksidan sistemlerin buna karşı savunması yaklaşık olarak dengededir(36,37). Bu dengeyi sağlayan kompleks olaylardan herhangi birinin etkilenmesi inflamatuvar reaksiyonlar ve otoimmünite gibi patolojik olayların uyarılmasını başlatabilir(38). Oksidan stres; hücresele antioksidan savunmanın reaktif oksijen türlerinin seviyesini toksik eşik altında tutmakta yetersiz kalması olarak tanımlanabilir(36). Başka bir şekilde tanımlayacak olursak; doku veya hücrede oluşan serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonunun antioksidan kapasiteyi aşması olarak tanımlanır(39).

Oksidan stres, aşırı ROS üretimi, antioksidan savunmanın yetersizliği ya da her iki durumun birlikte bulunması ile oluşur(36).

II.4.1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, en dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla çiftleşmemiş elektron içeren reaktif atom veya moleküllerdir(40). 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(41). Oksijen türevi radikaller, biyolojik sistemin en iyi bilinen serbest radikalleridir ve canlı hücrelerde, normal süreçte fizyolojik miktarlarda üretilirler. Aşırı oluştuklarında hücre ve dokuların hasarına neden olurlar(40,42). Yapılarındaki ortaklanmamış elektronlardan dolayı oldukça reaktiftirler ve tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliği gösterirler(40). Dolayısıyla 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. İleri derecede tepkici serbest radikal olan veya hücrede kolayca bu serbest radikallerine çevrilen oksijen içeren bileşikleri tanımlamak için reaktif oksijen türleri (ROS) tanımlaması kullanılmaktadır(41). Canlı organizmada oksidanların zararlı etkilerine karşı “antioksidanlar” dediğimiz savunma düzenekleri vardır(43-45). Oksidatif stres de oksidan ve antioksidan sistemlerin dengeye ulaşmadığı; yani serbest radikal üretiminin, sistemin reaktif araçları detoksifiye etmekteki kabiliyetini aştığı durumlarda oluşmaktadır(46).

Oksidatif stres günümüzde birçok hastalığın patofizyolojisinde(kardiyovasküler hastalıklar, pulmoner hastalıklar, diabetes mellitus, nörodejeneratif hastalıklar ve kanser) suçlanmaktadır(47). Oksidatif stresin genellikle protein, lipid ve DNA metabolizması üzerindeki toksik etkilerinden dolayı hastalıklara yol açtığı savunulmuştur(48). ROS aşırı miktarda üretildiğinde veya enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri yetersiz kaldığında zincirleme tepkimelerle hücre hasarı veya ölümü gerçekleşebilir(49). Ayrıca artmış ROS’lar nörotransmitterlere, hormonlara ve birçok mediatöre etki ederek homeostatik mekanizmayı bozabilirler(44).

II.4.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri(SOR), Reaktif Oksijen Türleri(ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri(RNS)

Serbest radikallerin biyolojik ortamlardaki türleri Reaktif Oksijen Türleri(Reactive Oxygene Species - ROS) ve Reaktif Nitrojen Türleri(Reactive Nitrogene Species - RNS)’dir. Bunlardan ROS; oksijen radikallerini ve radikal olmayan reaktif oksijen türevlerini kapsayan genel bir terimdir. RNS’ler de, fizyolojik önemi olan serbest radikal türleridir(50,51).

Yüksek konsantrasyonlarda serbest radikaller ve radikal türevi, radikal olmayan reaktif türler; canlı organizmalar için tehlikelidir ve tüm hücre yapılarına hasar verir. Bununla birlikte, düşük konsantrasyonlarda nitrik oksit, süperoksit anyonu ve reaktif oksijen türleri sinyal iletiminde düzenleyici medyatör olarak önemli rol oynarlar. ROS’ların aracılık yaptığı bir çok cevap,

aslında hücreleri oksidatif strese karşı korur, redoks homeostazını yeniden oluştururlar(52).

Reaktif Oksijen Türleri(ROS)

Hidroksil Radikali(OH[•])
Süperoksit Anyonu(O₂^{•-})
Hipoklorik Asit(HOCl)
Singlet O₂
Hidrojen Peroksit(H₂O₂)
Peroksil Radikali(ROO[•])

Reaktif Nitrojen Türleri(RNS)

Nitrojen dioksit(NO₂[•])
Nitrik Oksit(NO)
Peroksinitrit(ONOO⁻)

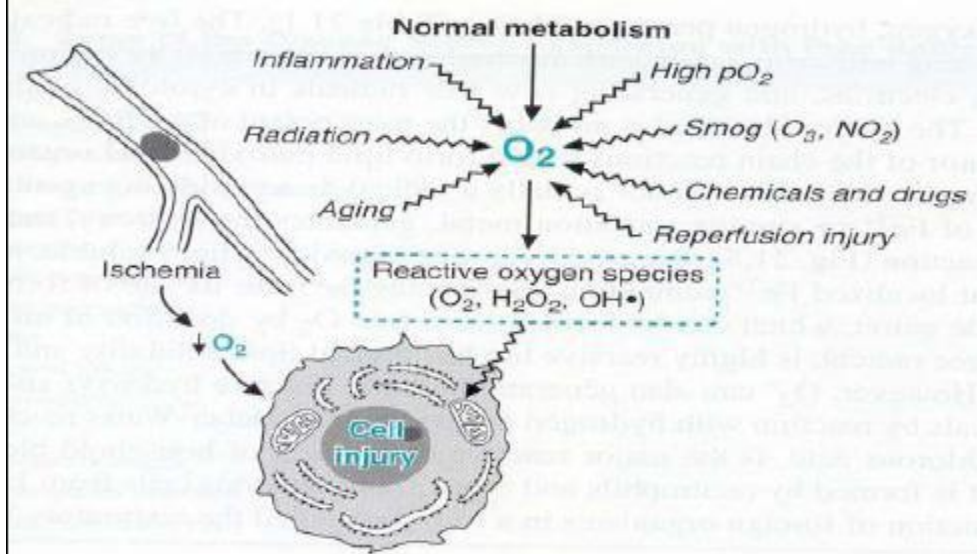
Serbest radikallerin en önemli tepkimeleri, moleküler oksijen ve onun reaktif türlerinin olduğu tepkimelerdir(39)(Tablo 8).

Tablo 8. Radikal ve Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri(39)

Reaktif Türleri	
Radikal	Non-Radikal
Hidroksil ([•] OH)	Peroksinitrit (ONOO ⁻)
Alkoksil (L(R)O [•])	Hipoklorit (-OCl)
Hidroperoksil (HOO [•])	Hidroperoksit (L(R)OOH)
Peroksil (L(R)OO [•])	Singlet oksijen (1O ₂)
Nitrik oksit (NO [•])	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Süperoksit (O ₂ ^{•-})	Ozon (O ₃)

II.4.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları

Serbest radikal oluşturan kaynaklar ekzojen ve endojen olmak üzere iki gruba ayrılabilir(Şekil 2, Tablo 9). Serbest radikaller, ekzojen nedenlerle oluşabilir. Diyet faktörleri, çevresel faktörler(hava kirliliği), ilaçlar, ksenobiyotikler ve zararlı ışınlar(X-ray, UV.) en önemli ekzojen serbest radikal üretim kaynaklarıdır. Endojen serbest radikal üretim kaynakları ise endoplazmik retikulum, redoks döngüsü, mitokondriyal elektron transport sistemi, araşidonik asit metabolizması, fagositoz, otooksidasyon, oksidan enzimlerin reaksiyonlarıdır(39,43,44,53-55).



Şekil 2. Reaktif Oksijen Türleri Oluşturan Bazı Uyarılar(56)

Tablo 9. Serbest Oksijen Radikalleri Oluşturan Kaynaklar(39)

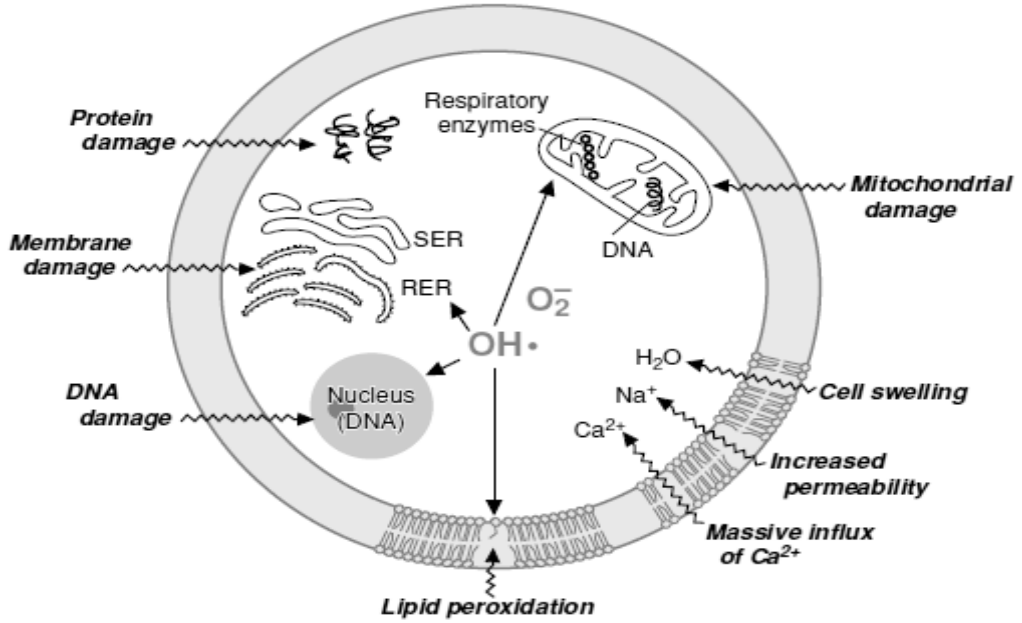
Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
1.Mitokondriyal ve mikrozomal elektron transport sistemler	1.Çevresel ajanlar
2.Fagositik hücreler	2.Radyasyon
3. Otooksidasyon	3.Antineoplastik ajanlar
4.Oksidan enzimlerin reaksiyonları	4. Stres
5. İskemi-reperfüzyon	
6. Prostaglandinler	

II.4.1.3. Serbest Radikaller İle Oluşan Hücresel Hasarlar

Serbest radikaller hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine etki ederler. Mitokondrideki aerobik solunumu ve kapiller geçirgenliği bozarak, bir yandan hücrenin potasyum kaybına neden olurken öte yandan trombosit agregasyonunu artırırlar(Şekil 3)(40).

Oksijen, endoplazmik retikulumda, mitokondride, plazma membranında, peroksisomlarda ve sitozollerde oksidatif enzimler tarafından süperoksit anyonuna dönüştürülmektedir. Oluşan süperoksit anyonları, SOD enzimi ile hidrojen perokside dönüştürülmektedir. Cu^{2+}/Fe^{2+} ile katalize olan Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikalleri oluşmaktadır. Burada ayrıca

süperoksit anyonları, Fe^{3+} ü Fe^{2+} ye indirgenmesini katalize eder ve Fenton reaksiyonu sayesinde hidroksil oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar(57).



Şekil 3. Serbest Radikal Aracılı Hücre Harabiyeti(39,41)

Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Serbest radikallere karşı en hassas olan, lipid molekülleridir(55). Membranda bulunan yağ asitleri(araşidonik asit) ve kolesterolün doymamış bağları serbest radikallerle reaksiyona girip peroksidasyona neden olabilir(Şekil 4). Serbest radikallerin hücre zarlarındaki yağ asitleri ile reaksiyona girerek sonuçta zar bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanan reaksiyon dizisine lipid peroksidasyonu denir. Bu sürecin başladığını gösteren en iyi gösterge malondialdehid(MDA) dir(55,58,59).

MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar, ancak spesifik değildir. Aynı zamanda membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağlanmasına neden olabilir(60).

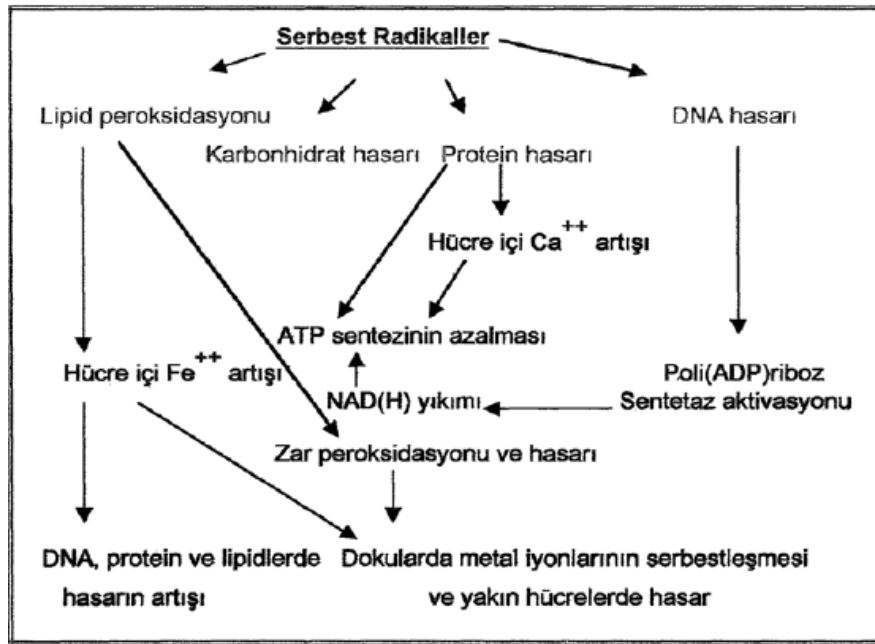
İlk önce yağ asidi hidrojen ve kendi üzerinde birer elektron kalacak şekilde parçalanır ve 'lipid radikalini' oluşturur. Lipid radikali de oksijenle reaksiyona girerek 'lipid peroksil radikalini' oluşturur. Lipid peroksil radikali de diğer doymamış yağ asitleriyle reaksiyona girer. Böylece zincirleme bir reaksiyon başlamış olur(59,61).

Lipid peroksidasyonu hücre membranı, lipoproteinler ve diğer lipid içeren yapıların oksidatif hasarının iyi bilinen bir örneğidir. Hücre membranındaki ve diğer organize sistemlerdeki doymamış fosfolipidler, glikolipidler ve kolesterol oksidan hasarın önde gelen hedefidir(62).

Serbest radikallerin oluşturduğu hasarlar arasında en önemlilerinden olan lipid peroksidasyonu, membran yapısında yer alan çoklu doymamış yağ asitlerinin(PUFA) oksijen radikallerine maruz kalması sonucunda ve dört aşamada oluşur.

Lipid peroksitlerinin konsantrasyonları arttıkça, membranların akışkanlıkları azalır ve kalsiyum gibi iyonların hücre içine geçişi kolaylaşır ve hücre fonksiyonlarında bozukluklar ortaya çıkar.

Lipid peroksidasyonu sırasında oluşan bileşiklerden aldehitler en toksik olanlarıdır ve diğer hücre bölümlerine de yayılarak hasara neden olurlar. Nonenzimatik oksidatif lipid peroksit dekompozisyonu sonucu malondialdehit(MDA) ve 4-hidroksinonenal(4-HNE) oluşur.

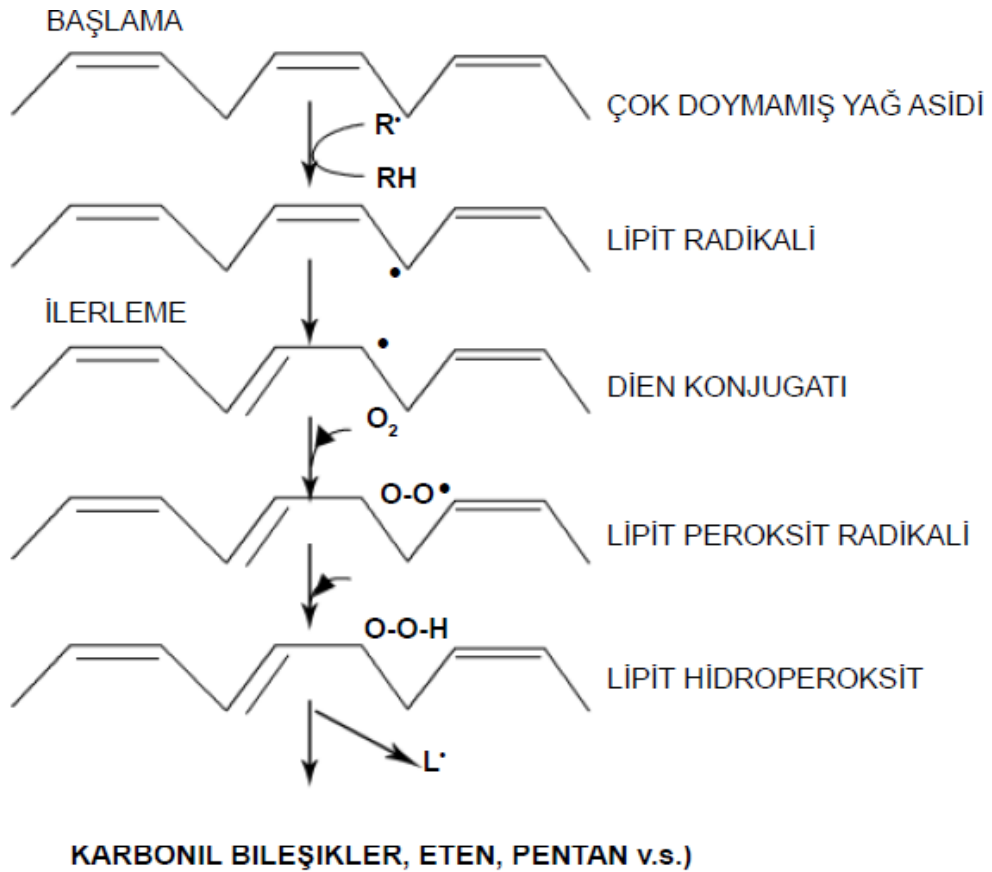


Şekil 4. Serbest Radikallerin Hasar Oluşturma Mekanizmaları(40).

MDA'in asıl kaynağı ikiden fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin otooksidasyonunda ve eikozanoid sentezinde serbestleşen endoperoksitlerdir. 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.

Şekil 5'deki reaksiyon akışına dikkatli bakıldığında, lipid peroksidasyonunun kendisini tetikleyerek yeniden lipid radikalleri ve peroksitleri oluşturduğu görülmektedir(53).



Şekil 5. Çoklu Doymamış Yağ Asitlerinin Peroksidasyonu

Lipid peroksidasyonunun ölçümü doku hasarının iyi bir göstergesi kabul edildiğinden; peroksidasyon sırasında oluşan konjüge dienlerin ölçümü, in vivo lipid peroksit düzeyini yansıtabilecek önemli bir yöntemdir. MDA miktarının tiyobarbitürik asit testi ile ölçümü bu amaçla kullanılmaktadır(53).

Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Serbest radikallerin proteinlere etkisi proteinlerin aminoasit içeriğine göre değişir. Protein molekülleri üzerindeki sülfhidril veya amino gruplarıyla serbest radikallerin etkileşmesi sonucu proteinlerde oluşan yapısal değişiklikler üçe ayrılır:

- 1- Aminoasitlerin modifikasyonu,
- 2- Proteinlerin fragmantasyonu,
- 3- Proteinlerin agregasyonu veya çapraz bağlanmalarıdır(40).

Transport proteinleri, reseptörler ve enzimler, oksidan hasarın erken hedefleri olarak özellikle önemlidirler. Proteinlerde meydana gelen hasar ekstraselüler sıvı ve hücre içi arasında temel iyon gradiyentinin sağlanmasını etkileyebilir. Birçok hücrel süreç için önemli bir uyarıcısı olan Ca^{2+} iyonları, hücre içinde çok düşük düzeylerde bulunmaktadır. Ca^{2+} -ATP az ve Ca^{2+}/Na^{+} değiştiricisi hücre içi Ca^{2+} 'u bu fizyolojik sınırlarda tutmayı sağlar. Serbest radikaller ile bu yapılar hasarlandığında Ca^{2+} düzeylerindeki artış önemli metabolik olaylara neden olacaktır. Hücrel iyon dengesindeki değişimler çoğu hücrel fonksiyonu etkileyen hücre hacminin değişmesine de neden olabilir(63).

Serbest Radikallerin DNA'ya Etkileri

Normal metabolizma tarafından ya da ekzojen kaynaklarla oluşan serbest radikaller oksidatif DNA hasarına yol açarak mutageneze, karsinogeneze ve yaşlanmaya neden olurlar. DNA hasarlarının oluşumunda büyük oranda hidroksil radikali; baz ve şeker modifikasyonları, dizi kırıkları ve DNA-protein çapraz bağları mekanizmalarını kullanarak görev alır(64-68).

Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu hidrojen peroksid, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelmektedir. Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu katarakt, diyabet ve sigara içimi ile ilişkili kronik hastalıkların, inflamatuvar eklem hastalıklarının oluşumuna katkıda bulunabilirler(40).

II.4.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbonhidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Oksidanları tutarak daha zayıf bir moleküle dönüştürmektedirler. Antioksidan savunma elemanları hücre içi ve hücre dışı ortamda farklıdır. İnsanda belli başlı hücre içi antioksidanlar süperoksit dismutaz(SOD), katalaz(CAT) ve glutatyon peroksidaz(GPx) enzimleridir. SOD'un yapısında bakır, çinko ve manganez; GPx'de ise selenyum iyonu bulunduğu için bu enzimler 'metalloenzim' olarak da adlandırılırlar. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda antioksidan savunmadan E ve C vitamini, transferrin, haptoglobin, seruloplasmin, albumin, bilirubin, P karoten ve α -I antitripsin sorumludur(Şekil 6)(69,70).



Şekil 6. Antioksidan Sistemler

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisizleştirirler:

1. Scavenging(Temizleme) Etkisi: Oksidanları zayıf bir moleküle çevirme şeklinde olan bu etki enzimler tarafından yapılır.

2. Quencher(Baskılama) Etkisi: Oksidanlara bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirme şeklinde olan bu etki vitaminler ve flavonoidler tarafından yapılır.

3. Onarma Etkisi(Repair Etki): Onarıcı etki üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Oksidatif hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir(71).

4. Zincir Koparma Etkisi: Oksidanları bağlayarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan bu etki hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılır(58).

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak ikiye ayrılır.

A. Enzimatik Antioksidanlar

1. Glutasyon Peroksidaz(GSH-Px)
2. Süperoksit Dismutaz(SOD)
3. Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz
4. Katalaz
5. Glutasyon-S-Transferazlar(GST)
6. Glutasyon Redüktaz

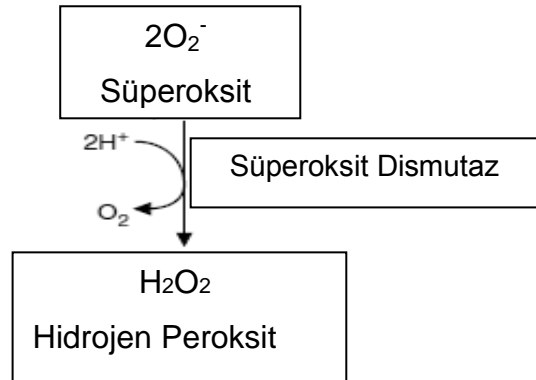
B. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

1. Vitamin C(Askorbik Asit)
2. Karoten(Vitamin A ön maddesi)
3. Vitamin E(α -Tokoferol)
4. Melatonin
5. Diğerleri; Seruloplazmin, albumin, ürik asit, bilirubin, haptoglobulin, transferrin, selenyum vs.(53).

II.4.2.1. Antioksidan Enzimler

II.4.2.1.1. Süperoksit Dismutaz(SOD)

Süperoksidin hidrojen perokside dismutasyonunu katalize eden bir metalloenzimdir(Şekil 7). Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan SOD ve GPx enzimleri serbest oksijen radikal toksisitesine karşı önemli defans mekanizmalarını oluştururlar(53,69). SOD organizmada mitokondri, sitozol ve ekstraselüler alanda bulunur ve tek bilinen substratı süperoksit radikalidir(72). SOD, GPx ve CAT gibi enzimler serbest radikallerin oluşmasını ve lipid peroksidasyonunun başlamasını önleyen enzimlerdir. Vücutta üretilen bir serbest radikal olan O_2^- anyonu SOD tarafından H_2O_2 'e çevrilir. H_2O_2 'nin kendisi serbest radikal olmadığı halde OH^- radikali üretimine yol açtığından toksik etki gösterir. H_2O_2 , CAT ve GPx tarafından temizlenir. Bu enzimler, enzimatik antioksidan savunma sistemini oluştururlar(53,69).



Şekil 7. Süperoksit Radikalinin SOD Tarafından Dismutasyonu(41)

Süperoksit radikaline bağlı yıkıma karşı savunmada ilk adım olarak bilinen SOD enzimleri aktif bölgelerinde transisyon metali(Fe, Mn, Cu) içerirler.

SOD'un üç temel formu vardır:

SOD-1: Cu-Zn bağımlı SOD, sitoplazmada bulunur.

SOD-2: Mn bağımlı SOD, mitokondride bulunur

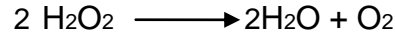
SOD-3: Ekstraselüler SOD(72).

Lösemi, iskemi, hepatit, müsküler distrofi, respiratuar distres sendromu, böbrek yetmezliği, Fankoni anemisi, akciğer enfeksiyonları ve motor nöron

hastalıkları gibi serbest radikal açığa çıkaran olaylarda ve hastalıklarda koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. SOD aktivitesi yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD'ın ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür(40).

II.4.2.1.2. Katalaz(CAT)

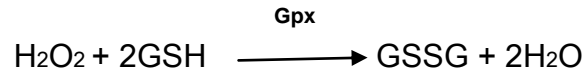
CAT enzimi hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene çevrildiği reaksiyonu katalizler. Enzim hücre içinde peroksizomlarda yerleşmiştir ve bir hemoproteindir. Dört tane hem grubu içerir. CAT'ın etkisi de SOD'a benzerdir(40).



GPx'in H_2O_2 'e karşı K_m 'i katalaza göre daha düşüktür. Yani düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i GPx parçalar, yüksek konsantrasyonlarda ise CAT aktivite kazanır. Katalaz aktivitesi eritrosit, karaciğer ve böbrekte yoğundur(58,73,74).

II.4.2.1.3. Glutatyon Peroksidaz(Gpx)

Redükte glutatyonu(GSH) yükseltirken H_2O_2 'i de suya çevirir ve böylece membran lipidlerini ve hemoglobini oksidan strese karşı korur.

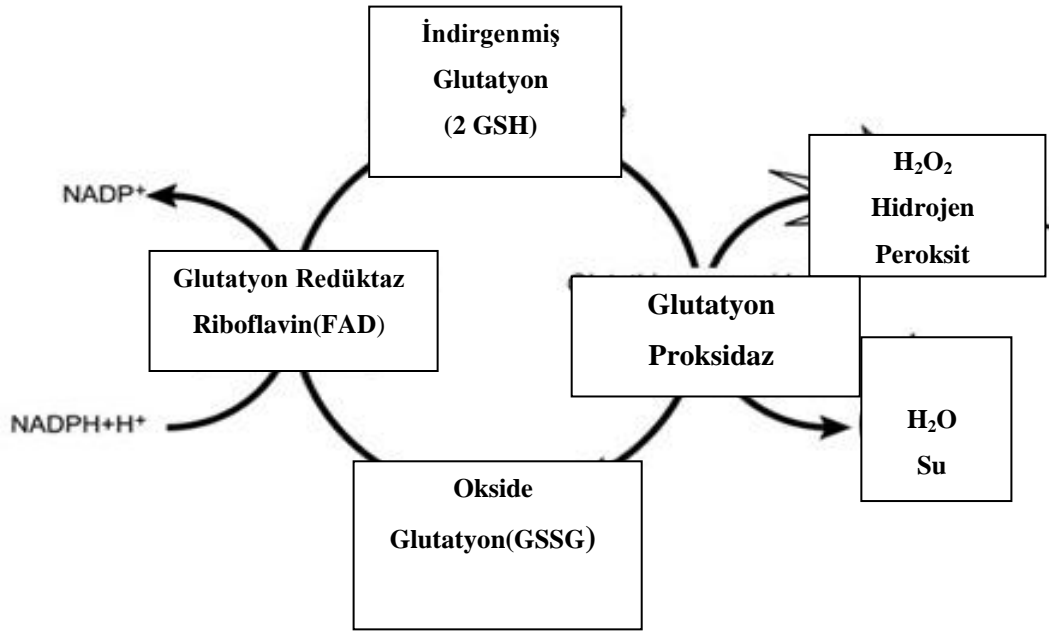


E vitamini yetersiz olursa membranı peroksidasyona karşı korur. Eritrositlerde en kuvvetli antioksidandır. GPx yetersizliği selenyum eksikliği sonucu olabilir. Çünkü selenyum bu enzimin integral parçasıdır. GSH enzimatik olmayan savunma sistemi elemanlarından olup GPx aktivitesi için gereklidir. GPx iyi bilinen doğal bir antioksidandır. GPx organik peroksitleri indirgenmiş GSH ile elimine eder. GPx toksik hidroperoksitlerin alkol ve suya indirgenmesini GSSG ile meydana getirir. GSSG tekrar NADPH yardımı ile GSH'a dönüşür.

Antioksidan enzimlerin aktivitesi ile zararlı oksijen kaynaklı hidroksil radikalının oluşumu engellenir(61,75).

II.4.2.1.4. Glutatyon Redüktaz(GR)

Yükseltgenmiş(okside) glutatyonu indirgenmiş hale çevirir. Glutatyonun indirgenme reaksiyonu sırasında sıklıkla elektronlar NADPH'dan FAD'ye transfer edilir. Daha sonra GSH'un iki sisteini arasında bulunan disülfid köprüsüne transfer edilmek suretiyle okside glutatyona aktarılmış olur(Şekil 8)(59,76).



Şekil 8. Glutatyon Oksidasyon-Redüksiyon(redoks) Döngüsü

II.4.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

II.4.2.2.1. Askorbik Asit

C Vitamini pek çok biyolojik fonksiyon için gerekli suda çözünebilen bir mikronutrienttir. Birçok enzimin kofaktörü olarak görev yapar. Bunlar; kollajenin posttranslasyonel hidroksilasyonu, karnitin biyosentezi, dopaminin norepinefrine dönmesi, peptid amidasyonu ve tirozin metabolizmasında görev alan enzimlerdir.

Anti-skorbutik fonksiyonu yanında C vitamini potent bir indirgeyici ajan ve biyolojik sistemlerde serbest radikal toplayıcısıdır. Biyolojik sıvılarda en çok bulunan ve suda çözünen bir antioksidandır. Süperoksit, hidroperoksit radikalleri ve singlet oksijen ile peroksinitrit, nitrojen dioksit ve nitroksit

radikallerini toplayabilme özelliğine sahiptir. Paradoksik olarak C vitamini in vitro koşullarda bir prooksidan gibi davranabilir. C vitamininin demir ve bakır ile birlikteliği lipidlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif modifikasyonunu indüklemek için kullanılmaktadır(40).

II.4.2.2.2. β-Karoten(Vitamin-A Ön Maddesi)

β-karoten, vücutta A vitamini prekürsörü olması yanında hücre düzeyinde antioksidan etkinlik de gösterir; lipidlerin peroksidasyonunu engeller. Yağda çözünür olması nedeniyle bu etkisini sitoplazmadan daha çok lipid fazı antioksidanı olarak hücrenin ve subsellüler yapıların membranında gösterir. β-karoten, serbest radikaller biyolojik hedeflerle interaksiyonuna girmeden önce direkt olarak onları yakalayabilir ve aynı zamanda zincir kıran bir antioksidan olarak etki ederek de peroksit radikallerin oluşumunu önler(77).

II.4.2.2.3. Vitamin-E(α-Tokoferol)

α-Tokoferol yağda çözünen ve zincir-kırıcı bir antioksidandır. En önemli görevi oksijen serbest radikallerinin ataklarına karşı membran lipidlerindeki yağ asitlerini korumaktır(78).

II.4.2.2.4. Transferin ve Laktoferrin

Demiri bağlayarak lipid peroksidasyonu ve demir katalizli Haber-Weiss reaksiyonlarına katılımını durdurur veya yavaşlatır(78).

II.4.2.2.5. Seruloplazmin

Plazma antioksidan aktivitesinin önemli bir kısmı, bakır içeren ve taşıyan akut faz proteini seruloplazminden kaynaklanır. Demir ve bakır bağımlı lipid peroksidasyonu inhibe eder. Daha az önemli olmakla birlikte süperoksit radikali ile reaksiyona da girer(40).

II.4.2.2.6. Albumin

Albümin kuvvetli şekilde bakır ve zayıf olarak da demiri bağlar. Albumin yüzeyinde oluşacak olan OH⁻ radikali albumin tarafından temizlenir. Aynı

zamanda myeloperoksidaz türevi bir oksidan olan HOCl'yi hızlı bir şekilde temizler(78).

II.4.2.2.7. Ürik Asit

Kuvvetli olarak demir ve bakır bağlama yeteneği, antioksidatif rolünün önemli bir parçasıdır. Lipid peroksidasyonunu inhibe etme ve radikalleri temizleme görevine sahiptir(78).

II.4.2.2.8. Bilirubin

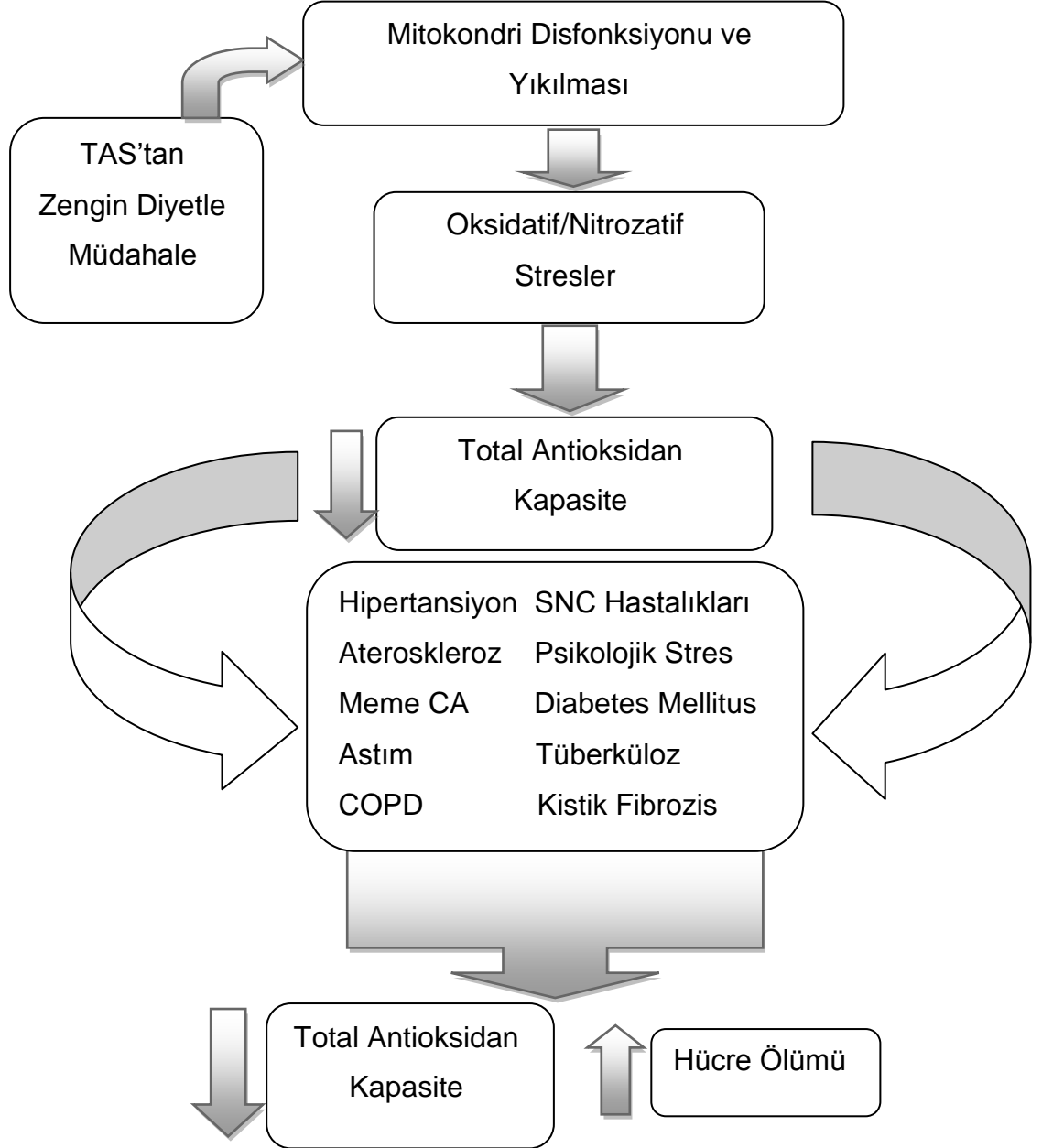
Yağ asitlerini peroksidasyona karşı koruma görevine sahiptir(78).

II.4.3. Total Antioksidan Kapasite(TAS), Total Oksidan Kapasite(TOS) ve Oksidatif Stres İndeksi(OSİ)

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan defans sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan çok önemlidir. Çünkü kan antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirmektedir. Total oksidan kapasiteye en büyük katkıyı endojen olarak vücutta sentezlenen serbest oksijen moleküllerinin yan ürünleri sağlamaktadır. Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller üretilir. Bu ürünler hemen sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezler ise zararlı etkilerini oluştururlar. Total antioksidan kapasiteye en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada bilirubin, serbest demiri toplayan transferrin ve seruloplazmin, ürik asit, E vitamini, C vitamini gibi proteinler yanında serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Plazmada antioksidanlar bir etkileşim içinde bulunurlar. Genel olarak bu maddeler sinerjist olarak çalışmaktadırlar. Bu etkileşimden dolayı, bileşenlerin tek başlarına yaptıkları etkinin toplamından daha fazla bir etki oluşmaktadır. Bu sinerjizme örnek glutatyonun askorbatı, askorbatında tokoferolün yeniden aktifleşmesini sağlaması gösterilebilir. Ayrıca bir antioksidandaki azalma diğerindeki artış ile kompanse edilebilmektedir. Vücuttaki oksidatif stresi ve antioksidan

kapasiteyi değerlendirmek için oksidan ve antioksidan moleküllerin bireysel ölçümü yerine total olarak ölçümünü sağlayan yöntemler yaygınlaşmaktadır(8,9). TOS düzeyinin, TAS düzeyine oranlanmasıyla oksidatif stres indeksi(OSİ) hesaplanmaktadır. OSİ vücudun oksidan antioksidan dengesinin yönünü belirler.

Total antioksidan kapasitenin patofizyolojisi Şekil 9'da gösterilmiştir.



Şekil 9. Total Antioksidan Kapasitesinin Patofizyolojisi(79)

III. GEREÇ VE YÖNTEM

III.1. Araçlar ve Gereçler:

1. **ELISA Okuyucu:** Biotek ELx800 (ABD)
2. **Otomatik Pipetler:** Thermo, Socorex (Almanya)
3. **Santrifüj:** Nüve NF 1200 R (Türkiye)
4. **Derin Dondurucu:** Nuair Ultralow Freezer(-80°C) (ABD)
5. **Cam Pipetler:** Precicolor HBG (Almanya)
6. **Otoanalizör:** Vital Scientific, Selectra/ Flexor E (Hollanda)

III.2. Yöntem

III.2.1. Çalışma Grubu

Araştırmanın çalışma örnekleme Aralık 2011 – Haziran 2012 tarihleri arasında Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi'ne kontrol için gelen sağlıklı kişiler, sağlıklı kurum çalışanları ve onların yakınları dahil edildi. Çalışma öncesinde Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulu'ndan çalışmanın yapılmasında tıbbi etik açısından sakınca olmadığına dair onay alındı. Çalışmaya katılmak isteyen sağlıklılar çalışma hakkında bilgilendirildi ve yazılı onamları alındı.

Çalışma örnekleme alınan kişilerden 8 mL periferik venöz kan örnekleri, 12 saatlik açlıktan sonra sabah saatlerinde bir kırmızı kapaklı (antikoagülansız) tüpe alındı. Alınan kan örnekleri pıhtılaşması için 30 dakika oda ısısında bekletildikten sonra 3500 devir/dakikada (1500 X g) 10 dakika santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve çalışma gününe kadar - 80 °C'lik derin dondurucuda saklandı. Çalışma gününde oda ısısında çözülen serum örneklerinde TAS, TOS ve SOD analizleri yapıldı ve OSİ hesaplandı.

Bu çalışmaya Manisa ve yöresinde yaşayan, 20-67 yaş arasında 115 erkek ve 118 kadından oluşan toplam 233 birey dahil edildi.

Referans bireylerin seçiminde, NCCLS C28-A standardı önerilerine göre anket formu hazırlandı(Şekil 10). Her bireye kan alımı öncesinde hazırlanmış olduğumuz anket uygulandı. Analitlerin düzeylerini etkileyebilecek olan faktörler dışlama kriteri olarak uygulandı.

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)	
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 KALIYOR MUSUNUZ?	(E)			(H)	
EĞER EVET İSE NE?				SÜRESİ:	
SİĞARA 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)	

Şekil 10. Çalışmamızda Uygulanan Anket Formu

III.2.2. Total Antioksidan Kapasite Tayini

Serum TAS düzeyleri otomatik ölçüm yöntemi ile hidroksil radikali üreten Rel Assay (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye) kiti ile Vital Scientific, Selectra/ Flexor E (Hollanda) otoanalizöründe tayin edildi. Bu ölçüm yönteminde 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radikali kullanıldı. ABTS radikali, antioksidan konsantrasyonuna ve

antioksidan kapasiteye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliğinin absorbans değeri 660 nm'de ölçülerek değerlendirme yapıldı. Bu ölçüm metodunun prensibi hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün ABTS⁺ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. 30 mmol/L asetat tamponu ve pH:3.6'da koyu yeşil renkte olan radikalın, asetat tamponu 0.4 mol/L, pH:5.8 olduğunda rengi açılmaktadır. Renk değişimi ile örnek içindeki antioksidan miktarı arasında ters ilişki bulunmaktadır. Reaksiyon hızı standart yöntem olan Trolox ile kalibre edildi. Ölçüm tekrarlanabilirliği %3'ün altında mükemmelere yakın idi. Sonuçlar mmol Trolox equivalent/L cinsinden verildi(80).

III.2.3. Total Oksidan Kapasite Tayini

Erel(81) tarafından geliştirilen tam otomatik Rel Assay (Rel Assay Diagnostics kit, Mega Tıp, Gaziantep, Türkiye) kiti ile kolorimetrik bir yöntemle Vital Scientific, Selectra/ Flexor E (Hollanda) otoanalizöründe ölçüldü.

Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine bileşimini ferrik iyon oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir bileşik oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edildi. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L cinsinden verildi(81).

III.2.4. Oksidatif Stres İndeksinin Hesaplanması

Oksidatif stres indeksini hesaplamak için TAS sonuçları mmol/L'ye çevrilerek aşağıdaki formüle göre hesaplandı(82,83).

$$\text{OSI} = \text{TOS}(\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}) / \text{TAS}(\mu\text{mol Trolox equivalent/L})$$

III.2.5. Süperoksit Dismutaz Tayini

Serum örneklerinde SOD düzeyleri ELISA yöntemi ile Cayman Chemical Company, Michigan (ABD) kitleri ile çalışıldı. Kitin çalışma prensibi, ksantin oksidaz ile oluşturulan süperoksit radikalının tetrazolium tuzu ile ölçümünden

oluşmaktadır. SOD'un bir ünitesi, süperoksit radikalinin % 50 dismutasyonu için gereken enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. Kite ait intra-assay varyasyon katsayısı(CV) değeri % 3.2; inter-assay CV değeri % 3.7 olarak bulundu. Kitin ölçüm aralığı 0.025-0.25 U/mL değerleri arasındadır. Örneklere çalışılmadan önce 5 dilusyon yapıldı. Sonuçlar 5 ile çarpıldı.

III.3. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmanın veri analizinde SPSS 15.0 paket istatistik programı kullanıldı. Veriler cinsiyetlere 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

IV.1. Sosyodemografik Bulgular

Çalışmamızı oluşturan referans grubun demografik ve karakteristik bulguları toplu olarak Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Referans Grubunun Demografik ve Karakteristik Bulguları

Parametre	Ort. \pm SD	Min.-Max.
Yaş(yıl)	36.15 \pm 23.78	20-67
Boy(cm)	168.31 \pm 8.50	150-190
Ağırlık(kg)	71.07 \pm 14.26	40-130
VKİ(kg/m ²)	25.05 \pm 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 \geq	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		
\leq 25	127	54.5
25-29	75	32.2
30 \geq	29	12.4

Tablo 10'un 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 $30 \geq$ olan grup ise % 12.4'ünü (n=29) oluşturmaktadır.

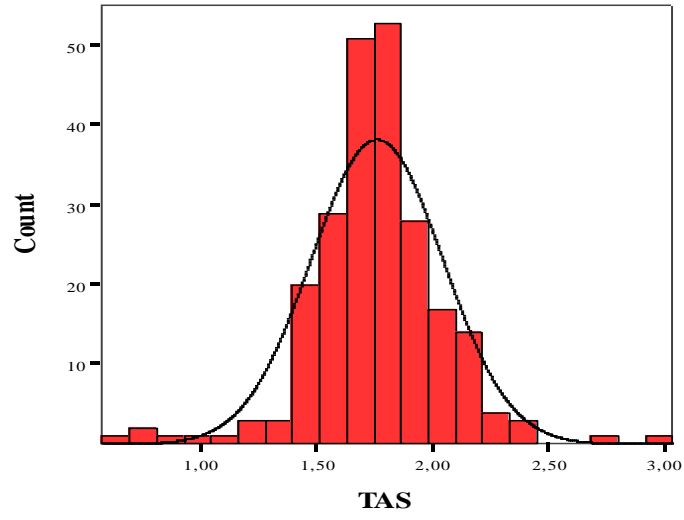
IV.2. Deneysel ve İstatistiksel Bulgular

Çalışmamızı oluşturan referans grubun TAS, TOS, OSİ ve SOD değerleri toplu olarak Tablo 11'de verilmiştir.

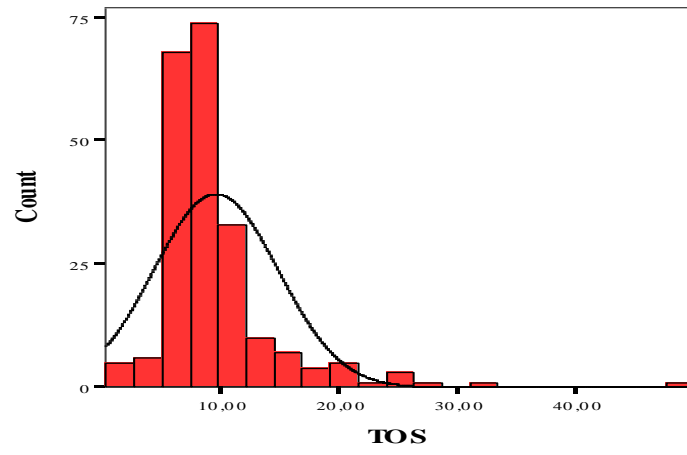
Tablo 11. Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	233	1.75±0.28	0.57-3.03	-0.11	3.96	1.74
TOS	219	9.40±5.26	0.19-49.89	3.25	17.83	8.17
OSİ	219	0.53±0.23	0.01-2.07	2.36	10.45	0.49
SOD	233	0.10±0.05	0.00-0.52	4.02	29.08	0.10

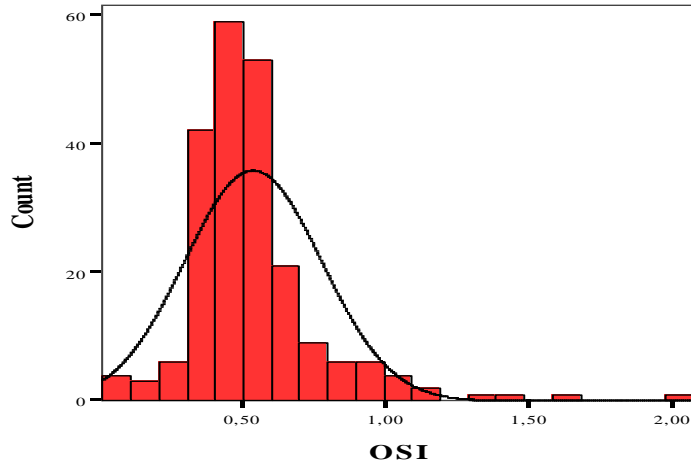
Çalışmamızı oluşturan referans grubun TAS, TOS, OSİ ve SOD dağılım grafikleri Şekil 11,12,13 ve 14'de verilmiştir.



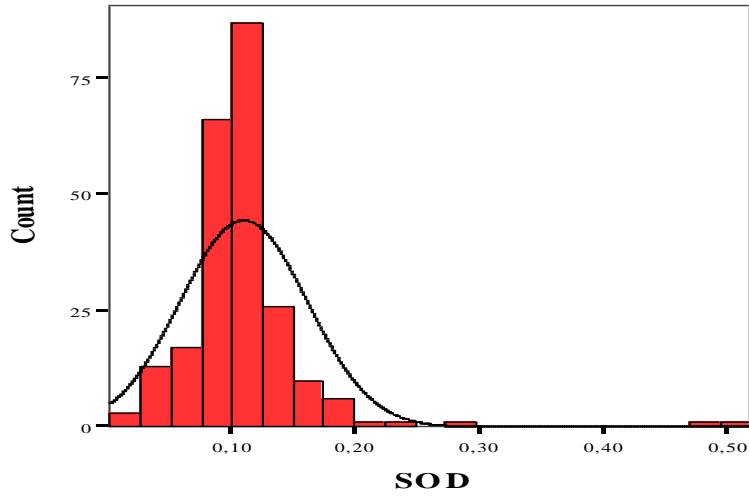
Şekil 11. Referans Gruba ait Total Antioksidan Kapasite Dağılım Grafiği



Şekil 12. Referans Gruba ait Total Oksidan Kapasite Dağılım Grafiği



Şekil 13. Referans Gruba ait Oksidatif Stres İndeksi Dağılım Grafiği



Şekil 14. Referans Gruba ait Süperoksid Dismutaz Dağılım Grafiği

Çalışmamızı oluşturan referans grubun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Percentil Dağılımları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Percentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	1.108	2.736	0.155	0.033
10	1.456	5.720	0.346	0.063
20	1.554	6.430	0.382	0.081
25	1.611	6.619	0.399	0.087
30	1.650	6.910	0.421	0.091
40	1.695	7.437	0.448	0.099
50	1.749	8.171	0.495	0.107
60	1.795	8.859	0.524	0.114
70	1.852	9.726	0.566	0.119
75	1.898	10.432	0.593	0.121
80	1.935	11.115	0.649	0.125
90	2.094	15.161	0.796	0.147
97.5	2.320	25.451	1.111	0.196

Çalışmamızda elde edilen referans grubuna ait TAS; TOS; OSİ ve SOD parametrelerine ait referans değerler ve birimleri Tablo 13.'de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 13. TAS; TOS; OSİ ve SOD'a ait Referans Değerler ve Birimleri

Parametre(birim)	Referans Aralık
TAS(mmol Trolox equivalent/L)	1.11-2.32
TOS(μ mol H ₂ O ₂ equivalent/L)	2.74-25.45
OSİ	0.15-1.11
SOD(U/mL)	0.03-0.20

Çalışmamızda yaş gruplarına göre bulunan TAS; TOS; OSİ ve SOD parametrelerine ait referans değerleri ve bu değerlere ait % Percentil dağılım tabloları aşağıda verilmiştir (20-29 yaş grubu için Tablo 14 ve 15, 30-39 yaş grubu için Tablo 16 ve 17, 40-49 yaş grubu için Tablo 18 ve 19, 50 ve üzeri yaş grubu için Tablo 20 ve 21).

Tablo 14. 20-29 Yaş Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	81	1.68±0.28	0.57-3.03	0.38	9.251	1.67
TOS	78	9.36±6.18	1.44-49.89	4.40	25.31	8.09
OSİ	78	0.53±0.22	0.08-1.65	2.46	9.535	0.49
SOD	81	0.11±0.06	0.03-0.52	4.65	24.995	0.10

Tablo 15. 20-29 Yaş Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Percentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	0.800	2.325	0.141	0.042
10	1.453	5.931	0.388	0.066
20	1.518	6.579	0.415	0.081
25	1.522	6.708	0.422	0.084
30	1.563	6.929	0.431	0.088
40	1.636	7.422	0.470	0.095
50	1.674	8.091	0.497	0.100
60	1.728	8.420	0.525	0.107
70	1.785	9.200	0.553	0.114
75	1.806	9.562	0.580	0.120
80	1.832	10.418	0.595	0.123
90	1.938	15.651	0.799	0.145
97.5	2.304	31.622	1.353	0.472

Tablo 16. 30-39 Yaş Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	61	1.78±0.28	0.74-2.43	-0.62	2.58	1.78
TOS	52	9.99±5.63	0.19-26.22	1.19	1.97	8.99
OSİ	52	0.57±0.33	0.01-2.07	2.01	7.03	0.53
SOD	61	0.10±0.41	0.01-0.23	0.37	0.96	0.10

Tablo 17. 30-39 Yaş Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	0.959	0.351	0.020	0.009
10	1.494	4.403	0.260	0.047
20	1.641	6.268	0.357	0.068
25	1.657	6.572	0.382	0.077
30	1.668	6.637	0.403	0.083
40	1.727	8.286	0.460	0.091
50	1.787	8.992	0.530	0.097
60	1.830	10.319	0.584	0.107
70	1.885	11.145	0.651	0.116
75	1.941	11.806	0.680	0.120
80	2.005	13.066	0.699	0.125
90	2.150	18.209	0.957	0.163
97.5	2.403	26.215	1.874	0.205

Tablo 18. 40-49 Yaş Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	55	1.74±0.27	0.91-2.26	-0.91	1.57	1.77
TOS	53	9.07±3.71	5.27-23.53	1.96	4.36	7.67
OSİ	53	0.51±0.16	0.34-1.09	1.61	3.14	0.48
SOD	55	0.10±0.03	0.03-0.19	-0.26	1.26	0.11

Tablo 19. 40-49 Yaş Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	0.930	5.343	0.342	0.028
10	1.394	5.970	0.352	0.064
20	1.555	6.295	0.379	0.086
25	1.587	6.430	0.389	0.098
30	1.662	6.762	0.396	0.101
40	1.729	7.351	0.439	0.107
50	1.772	7.675	0.480	0.115
60	1.849	8.812	0.519	0.117
70	1.902	9.380	0.562	0.121
75	1.924	10.176	0.575	0.124
80	1.934	11.182	0.649	0.125
90	2.049	14.729	0.744	0.144
97.5	2.235	22.098	1.079	0.190

Tablo 20. 50 ve Üzeri Yaş Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	36	1.85±0.28	1.25-2.74	0.67	1.94	1.80
TOS	36	9.14±4.58	3.14-27.76	2.46	7.58	7.97
OSİ	36	0.48±0.18	0.17-1.01	1.06	1.29	0.46
SOD	36	0.11±0.04	0-0.29	1.37	7.35	0.11

Tablo 21. 50 ve Üzeri Yaş Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	1.249	3.140	0.167	0.002
10	1.475	5.451	0.268	0.084
20	1.693	6.462	0.352	0.094
25	1.707	6.790	0.359	0.100
30	1.721	7.171	0.374	0.102
40	1.749	7.424	0.434	0.110
50	1.808	7.977	0.461	0.117
60	1.901	8.524	0.501	0.119
70	1.978	9.186	0.521	0.122
75	1.998	10.163	0.538	0.123
80	2.094	10.776	0.600	0.131
90	2.179	15.359	0.800	0.170
97.5	2.739	27.764	1.014	0.286

Çalışmamızda cinsiyete göre bulunan TAS; TOS; OSİ ve SOD parametrelerine ait referans değerleri ve bu değerlere ait % Persentil dağılım tabloları aşağıda verilmiştir.(erkek grubu için Tablo 22 ve 23, kadın grubu için Tablo 24 ve 25)

Tablo 22. Erkek Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	115	1.85±0.25	0.74-2.43	-0.94	3.96	1.83
TOS	109	10.57±5.14	0.19-31.15	1.33	2.78	9.33
OSİ	109	0.56±0.24	0.01-1.47	0.97	1.92	0.52
SOD	115	0.10±0.03	0-0.29	0.99	5.56	0.10

Tablo 23. Erkek Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Percentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	1.212	1.248	0.011	0.069
10	1.638	6.222	0.060	0.344
20	1.688	7.010	0.078	0.390
25	1.733	7.376	0.084	0.413
30	1.754	7.705	0.088	0.434
40	1.795	8.45	0.095	0.487
50	1.839	9.335	0.100	0.523
60	1.889	10.432	0.108	0.555
70	1.95	11.419	0.116	0.610
75	1.996	11.855	0.119	0.668
80	2.039	14.090	0.122	0.735
90	2.156	17.946	0.134	0.929
97.5	2.349	26.207	0.191	1.185

Tablo 24. Kadın Referans Grubunun TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerleri

Test	n	Ort.±SD	Min-Max.	Çarpıklık	Sivrilik	Ortanca
TAS	118	1.65±0.28	0.57-3.03	0.64	7.92	1.65
TOS	110	8.25±5.15	1.47-49.89	5.70	41.36	7.32
OSİ	110	0.49±0.22	0.10-2.07	4.15	24.66	0.45
SOD	118	0.11±0.06	0.03-0.52	4.33	26.23	0.10

Tablo 25. Kadın Referans Grubunda TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerine ait % Persentil Dağılımları

YÜZDELİK	TAS	TOS	OSİ	SOD
2.5	0.954	3.136	0.036	0.180
10	1.443	5.484	0.063	0.350
20	1.495	6.066	0.084	0.381
25	1.518	6.413	0.090	0.392
30	1.522	6.560	0.095	0.405
40	1.591	6.763	0.104	0.430
50	1.657	7.329	0.109	0.453
60	1.704	8.006	0.116	0.495
70	1.747	8.483	0.121	0.537
75	1.772	8.864	0.125	0.549
80	1.803	9.184	0.134	0.576
90	1.918	10.527	0.165	0.659
97.5	2.132	25.389	0.229	1.156

IV.2.1. Alt Gruplara ait TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerinin Karşılaştırılması

Cinsiyet, sigara içen/içmeyen ve egzersiz yapan/yapmayan alt gruplarına ait TAS, TOS, OSİ ve SOD değerlerinin karşılaştırılması Tablo 26'da topluca verilmiştir.

Tablo 26. Alt gruplara ait TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerinin Karşılaştırılması

Parametreler	Özellik	N	Ortalama	SD	P
TAS	Erkek	115	1.85	0.25	0.000
	Kadın	118	1.65	0.28	
	Sig. İçen	76	1.74	0.25	0.650
	Sig. içmeyen	157	1.76	0.30	
	Egz. yapan	204	1.76	0.29	0.420
	Egz. yapmayan	29	1.71	0.21	
TOS	Erkek	109	10.57	5.14	0.001
	Kadın	110	8.26	5.15	
	Sig. İçen	70	10.01	5.53	0.252
	Sig. içmeyen	149	9.13	5.13	
	Egz. yapan	190	9.56	5.43	0.289
	Egz. yapmayan	29	8.44	3.96	
OSİ	Erkek	109	0.10	0.24	0.042
	Kadın	110	0.12	0.23	
	Sig. İçen	70	0.56	0.24	0.209
	Sig. içmeyen	149	0.52	0.24	
	Egz. yapan	190	0.54	0.24	0.288
	Egz. yapmayan	29	0.49	0.20	
SOD	Erkek	115	0.57	0.04	0.030
	Kadın	118	0.50	0.06	
	Sig. İçen	76	0.10	0.35	0.074
	Sig. içmeyen	157	0.11	0.06	
	Egz. yapan	204	0.11	0.05	0.202
	Egz. yapmayan	29	0.12	0.04	

Tablo 26'nın incelenmesinden anlaşılacağı gibi; cinsiyet açısından kıyaslandığı zaman TAS, TOS ve SOD parametreleri erkeklerde kadınlara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek(sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.001$, $p=0.03$) bulunurken, OSİ ise anlamlı olarak düşük($p=0.042$) bulundu.

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 27 ve Tablo 28’de verilmiştir.

Tablo 27. Yaş Gruplarına ait TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerinin Karşılaştırılması(One-Way Anova)

Parametre	20-29 (a)	30-39 (b)	40-49 (c)	50≥ (d)	p* (POST Hoc)**
TAS	1.682 (n=81)	1.785 (n=61)	1.746 (n=55)	1.856 (n=36)	0.013 a>d
TOS	9.361 (n=78)	9.999 (n=52)	9.078 (n=53)	9.149 (n=36)	0.81
OSİ	0.538 (n=78)	0.572 (n=52)	0.515 (n=53)	0.488 (n=36)	0.391
SOD	0.111 (n=81)	0.100 (n=61)	0.108 (n=55)	0.117 (n=36)	0.390

*Anova

**Tukey B

Tablo 28. Vücut kitle indekslerine ait TAS, TOS, OSİ ve SOD Değerlerinin Karşılaştırılması(One-Way Anova)

Parametre	≤ 25 (a)	25-30 (b)	30 ≥ (c)	p* (POST Hoc)**
TAS	1.678 (n=127)	1.834 (n=75)	1.857 (n=29)	0.00 a>(b=c)
TOS	8.870 (n=122)	10.465 (n=67)	9.417 (n=28)	0.140
OSİ	0.520 (n=122)	0.574 (n=67)	0.497 (n=28)	0.228
SOD	0.113 (n=127)	0.099 (n=75)	0.110 (n=29)	0.177

*Anova

**Tukey B

Tablo 27 ve 28'in incelenmesinden anlaşılacağı gibi; yaş grupları açısından kıyaslandığı zaman TAS değerleri 20-29 yaş grubunda 50 ve üstü yaş grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulundu($F(3)=3.65$, $p=0.013$). Diğer parametreler içinse yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$). VKİ grupları açısından kıyaslandığı zaman TAS değerleri VKİ ≤ 25 olan grupta VKİ $30 \geq$ olan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük bulundu($F(2)=10.05$, $p=0.00$). Diğer parametreler içinse VKİ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$).

Çalışmamızdan TAS, TOS, OSİ VE SOD için elde ettiğimiz ve klinik laboratuvarımızda rutine konulmaları halinde Manisa ve yöresi için kullanabileceğimiz referans değerler Tablo 29'da toplu olarak gösterilmiştir.

Tablo 29. Manisa ve Yöresi için TAS, TOS, OSİ ve SOD Referans Aralıkları

Parametre	Birim	Referans Aralığı
TAS	mmol Trolox equivalent/L	20-49 yaş Kadın: 0.95-2.13 20-49 yaş Erkek: 1.21-2.35 50 yaş ve üzeri: 1.25-2.74
TOS	$\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L	Yetişkin Kadın: 3.14-25.39 Yetişkin Erkek: 1.25-26.20
OSİ		Yetişkin Kadın: 0.04-0.23 Yetişkin Erkek: 0.01-0.19
SOD	U/mL	Yetişkin Kadın: 0.18-1.16 Yetişkin Erkek: 0.07-1.18

V. TARTIŞMA

Tıpta, laboratuvar analiz sonuçlarına göre hastalığın olup olmadığı, iyileşmenin derecesi veya terapötik yarar konusundaki kararlar tek bir değere göre alınır. Bu değerler bir yandan hekimin kararını etkilerken bir yandan da hastanın durumunu etkiler. Bu sebeplerle laboratuvar test sonuçlarının özellikle kritik karar düzeyleri konusunda tereddütlere neden olmaması gerekmektedir. Referans aralıklarının hesaplanması oldukça zahmetlidir. Bu yüzden her laboratuvar tarafından hesaplanamamaktadır. Fakat hastayı ve hekimi doğru karar vermek konusunda etkilediğinden her toplum için referans değerleri hesaplanmalıdır(21).

Oksidatif stres serbest radikallerin ya oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında düşme sonucunda ortaya çıkmaktadır. Bu durum serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır(84).

Tüm oksidan maddeler direkt ve indirekt olarak serbest radikallerin oluşmasına neden olur(40). Çeşitli klinik, epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, serbest radikallerin başta kanser olmak üzere birçok hastalıkla ilişkisinin olduğunu göstermektedir(85-89). Güçlü oksidan seviyenin olması düşük antioksidan seviyelere neden olur. Düşük antioksidan seviyenin oluşması birçok hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır(40,90). Plazmada birçok antioksidan madde bulunmaktadır. TAS'nin antioksidanların hepsini temsil ettiği bildirilmiştir(40).

Total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite ve süperoksit dismutaz gibi oksidatif stres belirteçlerinin referans aralıklarını belirlemek amacı ile yaptığımız çalışmaya, Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi'ne başvuran sağlıklı kişiler, sağlıklı kurum çalışanları ve onların yakınlarından oluşan 20-67 yaş arasında 115 erkek, 118 kadından oluşan toplam 233 birey dahil edildi.

Farklı antioksidanların ve oksidanların serum(veya plazma) konsantrasyonları ayrı ayrı ölçülebilir. Fakat, bu işlem zaman alıcı, yoğun

emek isteyen ve karmaşık teknikler gerektirir. Farklı antioksidanları ölçmek pratik değildir ve bu antioksidanların antioksidan etkileri additif özellik gösterir. Örneklerin total antioksidan kapasitesi ölçülür. Yine aynı şekilde ayrı ayrı tüm oksidanları ölçmek yerine total oksidan kapasite ölçümü hem daha ucuz hem daha kolay ve güvenilirdir(80,81,91,92).

Oksidatif stresi belirlemek için parametrelere ayrı ayrı bakılan birçok çalışma olduğu gibi(93-95) , son zamanlarda popüler yöntem olan TAS ve TOS ölçümlerini kullanan çok sayıda çalışma mevcuttur(96-99).

TAS ölçümü için en çok kullanılan yöntemler, kolorimetrik, floresans ve kemilüminisan yöntemlerdir. Floresans ve kemilüminesans yöntemler karmaşık yöntemler olduğu için birçok biyokimya laboratuvarında bu yöntemler mevcut değildir. Bizim çalışmamızda da kullanmış olduğumuz ABTS yöntemi en çok kullanılan kolorimetrik yöntemdir(80). Diğer yöntemler; ferrik indirgeme kapasitesini ölçen FRAP ve total radikal tuzağı yöntemi TRAP yöntemleridir(100).

Reaktif oksijen türlerinin ölçümü için ise en çok kullanılan yöntemler, kolorimetrik, floresans, kemilüminesans ve elektron spin rezonans(ESR) yöntemleridir. Floresans, kemilüminesans ve ESR yöntemler karmaşık yöntemlerdir ve birçok rutin biyokimya laboratuvarında çalışılabilecek durumda değildirler. Ölçümde en çok kullanılan yöntem kolorimetrik yöntemdir(81).

Çalışmamızda Erel tarafından geliştirilen ve günümüzde en popüler metotlar olarak kabul edilen yöntemlerle total antioksidan ve total oksidan kapasite çalışıldı(80,81). Bu metod ucuz, sensitif ve güvenilir olup, aynı zamanda bilirubin, lipidler, heparin ve okzalat gibi bileşenlerden etkilenmez(80).

Total antioksidan yöntemle serumda bulunan total –SH, vitamin C, ürik asit, vitamin E, Bilirubin ve diğer birçok antioksidan hassas bir şekilde ölçüldü.

Total oksidan yöntemle de serumda bulunan hidroksil, hidrojen peroksit, singlet oksijen, lipid hidroperoksit, superoksit gibi serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stres ölçüldü.

Oksidatif stresin dengede olup olmadığını saptamak için ise oksidatif stres indeksi hesaplandı.

SOD, substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan ve süperoksiti hidrojen perokside ve moleküler oksijene dismutasyonunu katalize eden bir enzimatik antioksidandır. Oluşan reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da adlandırılmaktadır. Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da inhibe etmektedir. Çalışmamızda SOD parametresini son dönemlerde oldukça yaygın olarak kullanılan ELİSA yöntemi ile çalıştık.

Referans grubunu cinsiyetlere göre alt gruplara ayırdığımızda TAS, TOS, OSİ ve SOD kadın ve erkek alt grupları açısından kıyaslandığı zaman TAS($p=0.000$), TOS($p=0.001$), OSİ($p=0.042$) ve SOD($p=0.03$)’da istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Buna göre TAS, TOS ve SOD erkeklerde kadınlara kıyasla anlamlı olarak yüksek, OSİ ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Hermann ve ark.(101) yaptıkları bir çalışmada TAS düzeylerini cinsiyetin etkilediğini bulmuşlardır. Wang ve ark.(102) 2012’de yapmış oldukları bir çalışmada TAS düzeylerini bizim çalışmamızda olduğu gibi erkeklerde kadınlara kıyasla, istatistiksel olarak yüksek bulmuşlardır($p<0.001$).

Oksidatif stres biyolojik molekülleri etkilediği için yaşlılık ile ilgili en önemli olgulardan biri olarak düşünülmektedir. Bokov ve ark.(103), yaşlılığın oksidatif teorisi/serbest radikaller ve yaşlılık için bir belirleyici olarak alınan oksidatif stresin temel kabullerdeki kritik değerlerini ortaya koymuşlardır. Oksijen metabolizması bir taraftan yaşam için temel bir oluş iken, diğer taraftan uzun vadede toksik etkilere sahiptir.

Birçok çalışma, yaşa bağlı olarak antioksidan enzim aktivitesinin değişebileceğini göstermiştir(104). Özbay ve ark.(105)’nın 2002’de Van’da yapmış oldukları bir çalışmada SOD değerlerini gençlerde yaşlılara kıyasla anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır($p<0.05$). Yine, İnal ve ark.(106) ise yaptıkları bir çalışmada SOD aktivitesi ve yaş arasında önemli negatif korelasyon olduğunu bulmuşlardır($p<0.001$). Biz çalışmamızda SOD düzeyleri için yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulamadık. Bu uyumsuzluk SOD seviyesini belirlemek için kullanmış olduğumuz yöntem farklılığından veya örneklemelerin yaşadığı bölgelerin farklı olmasından

kaynaklanmış olabilir. Gaetta ve ark.(107) 2002'de İtalya'da yapmış oldukları çalışmada antioksidan enzim seviyelerini yaşa göre karşılaştırdıklarında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde, yaş grupları ve SOD düzeyleri arasında anlamlı bir ilişki bulamadık($p>0.05$).

Biz çalışmamızda TAS seviyesini, 50 ve üstü yaş grubuna göre 20-29 yaş grubunda anlamlı olarak düşük bulduk($p<0.013$). Mecocci ve ark.(108) bizim çalışmamızda olduğu gibi antioksidan enzim aktivitelerinin yaşla birlikte arttığını bulmuşlar ve bunun yaşlanmayla birlikte artan oksidantlara karşı adaptif bir mekanizma olabileceğini savunmuşlardır. Wang ve ark.(102) ise yapmış oldukları çalışmada bizim çalışmaya zıt olarak TAS düzeylerinin özellikle erkeklerde yaşla birlikte azaldığını bulmuşlardır. Bu uyumsuzluk, çalışmaların farklı bölgelerde farklı ırklarla yapılmış olmasına bağlı olabileceği gibi, beslenme farklılığından da kaynaklanmış olabilir.

Sigara dumanı ile ilişkili artmış reaktif oksijen ürünlerinin üretiminin oksidan savunma sistem kapasitesini aşarak proteinler, lipidler ve DNA'da oksidatif hasarla sonuçlandığı bilinmektedir(40). Sigara içenlerde oksidan-antioksidan dengenin bozulduğu yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir(109,110). Sigara içimi ile ortaya çıkan, reaktif nitrojen ve serbest oksijen radikallerinin inaktivasyonu ve ortadan kaldırılmaları antioksidan defans sistemi ile olmaktadır. Artmış olan serbest oksidanların aynı zamanda, alt solunum yollarındaki makrofajlardan salınan antioksidan defansı da arttırdığı bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda, sigara içenlerde alveoler makrofajlarda total SOD, katalaz aktivitesi ve glutatyon düzeylerinin sigara içmeyenlere göre yüksek olduğu saptanmıştır(111). Çalışmamızda referans grubu bireylerin sigara içip içmemesine göre alt gruplara ayrıldı. TAS, TOS, OSİ ve SOD sigara içen ve içmeyen altgrupları açısından kıyaslandığı zaman ortalama TAS ve SOD düzeyleri sigara içenlerde daha düşük, TOS ve OSİ düzeyleri daha yüksek olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi(Hepsi için $p>0.05$). Garg ve ark.(110) yapmış oldukları çalışmada, SOD düzeylerini sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla anlamlı olarak düşük bulmuşlar ve SOD'daki bu anlamlı düşüşü oluşan hidrojen peroksitin SOD'u inaktive etmesine bağlamışlardır ($p=0.0000$). Yine Orhan ve ark.(112) yapmış oldukları çalışmada önemli

antioksidan enzimlerden SOD ve Gpx'i sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla anlamlı olarak düşük bulmuşlardır. Leonard ve ark.(113) yaptıkları bir çalışmada sigara içenlerle içmeyenlerin SOD düzeyleri arasında, bizim çalışmamızda olduğu gibi, anlamlı bir fark bulamamışlardır($p>0.05$). Bu sonuçların yanısıra Pasupathi ve ark.(114) ile Jain ve ark.(115) SOD düzeylerini sigara içenlerde içmeyenlere göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır(hepsi için, $p<0.001$). Biz çalışmamızda bu çalışmalara benzer şekilde TAS ve SOD'u sigara içenlerde içmeyenlere kıyasla, istatistiksel açıdan önemli olmamakla birlikte, düşük bulduk. Bu fark, yapılan birçok çalışmada eritrosit antioksidan düzeylerine bakılması, bizim çalışmamızda ise serum düzeylerine bakılmasından kaynaklanmış olabileceği gibi yine yöntem farklılıklarından veya içilen sigara miktarlarının farklı olmasından da kaynaklanmış olabilir. Örneğin, Orhan ve ark.(112) yapmış oldukları çalışmada eritrosit içi Gpx aktivitesini sigara içenlerde düşük bulmalarına rağmen plazma Gpx aktivitesinde bir değişiklik bulamamışlardır. Buico ve ark.(116) yaptıkları çalışmada TOS seviyelerini sigara içenlerde sigara içmeyenlere kıyasla anlamlı olarak düşük bulmuşlardır($p=0.0003$). Buico ve ark.(116) ile Onyesom ve ark.(117) da yapmış oldukları çalışmalarda TAS düzeylerini sigara içenlerde sigara içmeyenlere göre anlamlı olarak düşük bulmuşlardır(sırasıyla $p=0.0252$, $p<0.05$). Yine bu uyumsuzluğun nedeni içilen günlük sigara sayısının farklı olmasına bağlı olabilir.

Obezite varlığında, ileri dönemlerde ortaya çıkan komplikasyonların en önemli nedenlerinden biri olarak artmış oksidan stres öne sürülmektedir(118). Obezite ile oksidatif stres parametreleri arasında pozitif ilişki vardır(119). Birçok çalışmada çeşitli oksidan stres parametrelerinin obezitede arttığı gösterilmiştir(120-123). Yine birçok çalışmada; GSH, Cu/Zn-SOD gibi çeşitli antioksidan parametreler obezlerde anlamlı olarak düşük bulunmuştur(124). Brown ve ark.(125)'nin yaptıkları bir çalışmada TAS, SOD ve GSH düzeylerinde; normal, fazla kilolu ve obezler arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır($p>0.05$). Bizim çalışmamızda da bu araştırma sonuçları ile uyumlu olarak, TOS, OSİ ve SOD parametrelerinde VKİ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır(Hepsi için $p>0.05$). Ancak biz TAS değerlerini VKİ 25 ve altı olan grupta 30 ve üstü olan gruba göre anlamlı olarak düşük

bulduk($F(2)=10.05$, $p<0.05$). Bunun sebebi, obezite süresinin göz önüne alınmamasından kaynaklanabileceği gibi antioksidan düzeylerinin obez olup olmamakla ilgili olması ve obezite derecesi ile değişmemesinden de kaynaklanıyor olabilir. Söylemez ve ark.(119) 'nın yaptıkları bir çalışmada ise VKİ artışı ile birlikte, bizim bulgularımıza zıt olarak, TAS düzeyleri azalırken TOS ve OSİ değerleri artmaktadır. Bunun nedeni bizim referans grubumuzda obez sayısının az olması ve beslenme alışkanlıklarının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Egzersiz sırasında artan metabolik hız sonucunda iskelet kası, kalp ve diğer dokularda oksijen tüketimi belirgin olarak artmaktadır. Akut egzersiz tüm vücutta oksidan strese neden olurken, kronik egzersizin antioksidan savunmayı güçlendirdiği bilinmektedir(126).

Kronik egzersiz, sahip olduğu ikili etkiyle oksidan oluşumunu ve oksidatif stresi ortaya çıkarırken, bir yandan da antioksidan maddelerin sentezini artırmaktadır. Fiziksel egzersizin hücre içi sinyal iletimi, apoptozis, antimikrobiyal savunma, kas hasarı ve yorgunluğu, yaşlanma, ateroskleroz, miyokard infarktüsü ve iskemi/reperfüzyon hasarı gibi hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerdeki rolü bilinen oksidan/antioksidan dengenin değişmesine yol açtığı bildirilmektedir. Fiziksel egzersiz, metabolik aktivite ve oksijen tüketiminde artışla karakterizedir. Oksijen tüketimindeki bu artışa, reaktif oksijen türlerinin oluşumundaki önemli bir artış eşlik eder. Egzersiz sırasında meydana gelen birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerden reaktif oksijen türlerindeki bu büyük artışın sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Egzersizin oksidatif stres, antioksidan kapasite ve lipit profili üzerinde etkilerini araştırmak üzere çok sayıda araştırma yapılmıştır. Bu araştırmaların önemli bir kısmı kontrol grubu olarak kabul edilen egzersiz öncesi örneklerinde çalışılan biyokimyasal parametrelerin egzersiz sonrası örneklerindekiyle karşılaştırılması biçiminde yapılmıştır(127-129).

Bazı çalışmalarda egzersizin hemen öncesi ve sonrası birbiriyle kıyaslanırken; bazılarında belirli bir egzersiz programı belirli bir dönem uygulandıktan sonra ortaya çıkan etkileri incelenmiştir(130,131). Bizim çalışmamız bir referans çalışması olduğu için, grupların yaşam biçimleri haline getirdikleri alışkanlıkları, yani düzenli egzersiz yapanlarla

yapmayanları kıyasladık. Çakmak ve ark.(132) amatör adolesan sporcularda yapmış oldukları bir çalışmada TAS, TOS ve OSİ değerlerini kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır($p<0.0001$). Bizim çalışmamızda ise TAS, TOS, OSİ ve SOD seviyelerinde, egzersiz yapan ve yapmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı(hepsi için $p>0.05$). Bunun nedeni egzersiz yapanların egzersiz yapma sürelerinin ortalamalarının düşük olmasından ve yapılan egzersizlerin farklı oluşundan kaynaklanıyor olabilir. Sonuçta bizim çalışmamızda deneklere bir egzersiz programı uygulanmamıştır ve düzenli egzersiz yapanların da haftada ortalama 1-2 saat gibi kısa süreli egzersiz yapıyor olmaları sonuçları etkiliyor olabilir.

Talwar ve ark.(133) antioksidan parametrelerin ve vitamin düzeylerinin, biyolojik değişkenliklerinin yüksek olması nedeniyle topluma dayalı referans aralıklar göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiğini söylemişlerdir. 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.

Yurdumuzda ve dünyada yapılan çalışmalarda elde edilen TAS, TOS, OSİ ve SOD düzeyleri karşılaştırma amacıyla toplu olarak Tablo-29'da verilmiştir.

Tablo 29. Türkiye’de ve Dünyada Yapılan Çalışmalarda TAS, TOS, OSİ ve SOD Düzeyleri

Bizim Çalışmamız	ANALİT	n	TAS	TOS	OSİ	SOD
	Birim		mmol Trolox egiivalent/L	µmol H ₂ O ₂ equivalent/L		U/mL
	Hesaplanan Referans Aralık	233	1.11-2.32	2.74-25.45	0.16-1.11	0.03-0.20
	Hesaplanan Ort.±SD	233	1.75±0.28	9.40±5.26	0.53±0.23	0.10±0.05
Türkiye’de Yapılan Çalışmalar	Baysal ve ark(82)	25	1.13±0.14	11.19±2.11	1.68±0.85	
	Çakmak ve ark(132)	32	0.92±0.12	8.11±2.27	9.0±2.93	
	Demirbağ ve ark(136)	82	1.46±0.26		2.71±0.80	
	Altındağ ve ark(137)	26	0.5 ± 0.1	9.7±0.6	0.7±0.1	
	Öztürk ve ark.(96)	30	1.08±0.21	6.35±3.21	0.57±0.21	
	Demirbağ ve ark.(138)	42	1.38± 0.20			
	Sarban ve ark.(139)	20	1.43±0.26			
	Gök ve ark.(140)	20	0.97±0.13			
	Gur ve ark.(141)	24	1.53±0.02			
Dünyada Yapılan Çalışmalar	Martha ve ark.(134)	105	1.28±0.27			1.75±11.3 (U/L)
	Buico ve ark(116)	50	675±61 µmol Trolox equiv./L)	5.96±2.30	0.89±0.35	
	Wang ve ark(142)	50	1.67±0.15	14.87±1.01	0.89±0.07	
	Lee ve ark.(143)	87	1.28±0.10 (nmol/L)			

Bizim bu çalışmada temel amacımız; dünyada ve ülkemizde çok sayıda araştırmaya konu olan oksidan-antioksidan parametrelerin bölgemizdeki referans aralıklarını yaş ve cinsiyet gruplarına göre belirlemek, bu referans aralıkların uygulanabilirliğini değerlendirmek, bu parametreler arasındaki korelasyonları incelemek ve bu testlerin laboratuvarımızda rutin olarak çalışılabilirliğini sağlamaktır.

Referans aralıklarının belirlenmesinde ilk aşama referans bireylerin seçimidir. Referans grupları oluşturan bireyleri herhangi bir sistemik

hastalığı, enfeksiyonu olmayan, hastanede tedavi görmeyip, laboratuvara sadece kontrol amacıyla kan vermek için başvuranlar ile hastane personeli ve onların yakınları gibi çevremizde bulunan, aktif bir hastalığı bulunmayan ve hiç ciddi bir hastalık geçirmemiş kişilerden seçtik. İstatistiksel hesaplamaların güvenilirliği için en az 120 veri gerekli olduğundan referans birey sayısının 120'den fazla olmasına özen gösterdik(12,13).

Çalışmamızda TAS'ın referans aralığını;1.11-2.32 mmol Trolox equivalent/L, ortalamasını 1.75±0.28 mmol Trolox equivalent/L olarak bulduk. Martha ve ark.(134), TAS değerlerini 105 genç(<60 yaş) sağlıklıda ortalama 1.28 ± 0.27 mmol/L, 126 yaşlı(60-85 yaş) sağlıklıda ortalama 1.16 ± 0.21 mmol/L olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda TOS'ın referans aralığını; 2.74-25.45 µmol H₂O₂ equivalent/L, ortalamasını 9.40±5.26 µmol H₂O₂ equivalent/L olarak bulduk. Buico ve ark.(116) 2009'da İtalya'da yaptıkları çalışmada plazmada ortalama TOS değerini 5.96±2.30 µmol TBH equiv./L olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda OSİ'nin referans aralığını; 0.155-1.111, ortalamasını 0.53±0.23 olarak bulduk. Yine Buico ve ark.(116) 2009'da İtalya'da yaptıkları çalışmada plazmada ortalama OSİ değerini 0.89±0.35 olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda SOD'un referans aralığını; 0.033-1.196 U/mL, ortalamasını 0.10±0.05 U/mL olarak bulduk. Martha ve ark.(134), 105 genç(<60 yaş) sağlıklıda ortalama 175±11.3 U/L, 126 yaşlı(60-85 yaş) sağlıklıda ortalama 173±17.6 U/L olarak bulmuşlardır. Casado ve ark.(135)'nin 2007'de İspanya'da yaptığı bir çalışmada, 1212 olguyu yaş gruplarına göre bölmüş, yenidoğanlarla genç yetişkinlerin eritrosit bakır/çinko SOD düzeylerini karşılaştırmışlardır. 18 ve üzeri yaş grubunun(n=369) SOD ortalamasını 4.14±0.79 U/ml olarak bulmuşlardır.

Gerek yurtdışında ve gerekse yurdumuzda yapılan, oksidan ve antoksidan durum belirteci test sonuçlarının benzerlikler göstermekle birlikte birbirleriyle birebir örtüşmediği görülmektedir ve bu durum normal karşılanmalıdır. Çünkü sözü edilen bu parametreleri etkileyen çok sayıda faktör vardır. Dolayısıyla yukarıda çalışma sonuçlarımız ile karşılaştırdığımız referans değerler bizim coğrafyamızı, etnik yapımızı, beslenme ve sosyal yaşam alışkanlıklarımızı göstermeyen yurtdışında yapılmış çalışmaların bir

sonucu olup farklı coğrafyada yaşayan farklı etnik yapılara sahip farklı beslenme standartları olan kişilere özgü değerlerdir. Bu sebeptir ki, bu tür testleri rutin olarak çalışacak laboratuvarların kendi referans değerlerini oluşturması çok daha fazla önem taşımaktadır.

Çalışmamızın kısıtlılıklarından birisi, dahil edilen referans bireylerin sayısının nispeten az olmasıdır ve bu bireyler belirli bir tabakaya ait popülasyondur. 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 daha doğru olacağı kanaatindeyiz.

VI. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, referans grubu Celal Bayar Üniversitesi Hafsa Sultan Hastanesi'ne başvuran sağlıklı kişiler, sağlıklı kurum çalışanları ve onların yakınlarından oluşan 233 sağlıklı birey oluşturmaktadır. Bu projede, Manisa ve yöresinde yaşayan sağlıklı erişkinlerde birçok hastalığın etiolojisinde rolü olduğu düşünülen ve birçok çalışmaya konu olan; TAS, TOS ve SOD parametrelerinin referans aralıklarını belirlemeyi ve rutin olarak çalışılabilmesi için bu testlerin çalışma yöntemlerini laboratuvarımıza kurmayı amaçladık.

Çalışmadan elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Çalışma sonuçlarımıza göre TAS'ın referans değerini, 20-49 yaş kadınlarda 0.95-2.13, 20-49 yaş erkeklerde 1.21-2.35, 50 yaş ve üzeri yetişkinlerde 1.25-2.74 mmol Trolox equivalent/L; TOS'un referans değerini yetişkin kadınlarda 3.14-25.39, yetişkin erkeklerde 1.25-26.20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L; OSİ'nin referans değerini yetişkin kadınlarda 0.04-0.23, yetişkin erkeklerde: 0.01-0.19 ve SOD'un referans değerlerini yetişkin kadınlarda 0.18-1.16, yetişkin erkeklerde 0.07-1.18 U/mL olarak bulduk.
2. Referans grubu, cinsiyet açısından kıyaslandığı zaman TAS, TOS ve SOD parametreleri erkeklerde kadınlara kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek(sırasıyla; $p=0.000$, $p=0.001$, $p=0.03$) bulunurken, OSİ ise anlamlı olarak düşük($p=0.042$) bulundu.
3. Referans grubu, yaş grupları açısından kıyaslandığı zaman TAS değerleri 20-29 yaş grubunda, 50 ve üstü yaş grubuna göre istatistiksel olarak düşük($F(3)=3.65$, $p<0.05$) bulundu. Diğer parametreler içinse yaş grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$).
4. Referans grubu, VKİ grupları açısından kıyaslandığı zaman TAS değerleri VKİ ≤ 25 olan grupta VKİ $30 \geq$ olan gruba göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak düşük($F(2)=10.05$, $p<0.05$) bulundu. Diğer parametreler içinse VKİ grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı($p>0.05$).

5. Erkek ve kadın gruplarında sigara içme/içmeme ve egzersiz yapma/yapmama bakımından tüm parametreler için istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı(hepsi için $p>0.05$).
6. Klinik laboratuvar testlerinin tıbbi karar amacıyla kullanılabilmesi için her testin referans aralıklarının bilinmesi gerekir.
7. Referans aralık değerleri coğrafi bölge, ırk, cinsiyet, yaş ve beslenme alışkanlıkları gibi faktörlere bağlı olarak değişir. Her laboratuvar kendi referans aralık değerlerini belirlemesi gerektiği için Manisa ve Yöresinde bu çalışma yapılmıştır.
8. Bu çalışma Manisa ve Yöresinde yapılan ilk referans çalışma olması bakımından orijinaldir ve bu çalışma ile TAS, TOS ve SOD testlerini tam otomatik olarak çalışabilecek yöntemler laboratuvarımızda kurulmuştur.
9. Referans aralık çalışmalarında veri sayısı ve dağılımın normalliği uygulanacak istatistiksel yöntem ile çok alakalı olduğu için veri sayısının yeterli olması ve çalışmaya alınacak bireylerin iyi seçilmesi dağılımımızın modülasyona uğramamasına ve referans çalışmasının daha güvenilir olmasına neden olur. Kullanılacak yanlış bir yöntemde ise çalışmaya alınacak bireyler uygun olsa bile yine güvenilir olmayan sonuçlara neden olacaktır. Bu yüzden çalışmanın her aşamasında gerekli dikkat ve özen gösterilmiştir.

VII.ÖZET

MANİSA VE YÖRESİNDEKİ SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE, TOTAL OKSİDAN KAPASİTE VE SÜPEROKSİT DİSMUTAZ REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ

Amaç: Bu çalışmada, sağlıklı bireylerde; oksidan-antioksidan dengesinin önemli göstergelerinden olan, total antioksidan kapasite(TAS), total oksidan kapasite(TOS) ve süperoksit dismutaz(SOD) düzeylerini ölçerek Manisa ve yöresindeki referans aralıklarını belirlemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Manisa ve yöresinde yaşayan, 20-67 yaşları arasında sağlıklı 219 bireyden 12 saatlik açlık sonrasında serum örnekleri Celal Bayar Üniversitesi, Hafsa Sultan Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda alındı. TAS ve TOS düzeyleri spektrofotometrik, SOD düzeyleri ise ELİSA yöntemi ile ölçüldü. İstatistiksel analizde SPSS 15.0 programı kullanılarak kikare ve oneway anova testleri yapıldı.

Bulgular: 20-67 yaş aralığındaki kadın ve erkeklerde referans değerleri TOS için sırasıyla 3.14-25.39 ve 1.25-26.20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L; oksidatif stres indeksinin(OSİ) için referans değerlerini sırasıyla 0.04-0.23 ve 0.01-0.19 olarak ve SOD için referans değerlerini sırasıyla 0.18-1.16 ve 0.07-1.18 U/mL olarak bulduk. TAS'ın referans değerlerini ise 20-49 yaş kadınlarda 0.95-2.13, 20-49 yaş erkeklerde 1.21-2.35, 50 yaş ve üzeri yetişkinlerde ise istatistik olarak anlamlı farkla 1.25-2.74 mmol Trolox equivalent/L olarak bulduk.

Sonuçlar: Birçok hastalığın etiyolojisinde rolü olan antioksidan ve oksidan parametreler, yöresel, çevresel, besinsel ve yaşam tarzı gibi faktörlerle sıkı ilişkisinden dolayı topluma dayalı referans aralıklarının belirlenmesi önemlidir. Çalıştığımız parametreler cinsiyet ve TAS için 50 yaş üzeri grupta istatistiksel olarak fark göstermektedir. Bu çalışma Manisa ve yöresinde yapılan ilk çalışma olması nedeniyle orijinaldir. Çalışmamızın, daha geniş popülasyonda yapılacak olan benzer çalışmalara ışık tutacağı ve katkı sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite, süperoksit dismutaz, referans değerler.

VIII. SUMMARY

THE REFERENCE RANGES OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY, TOTAL OXIDANT CAPACITY AND SUPEROXYDE DISMUTASE IN HEALTHY SUBJECTS LIVING IN MANISA REGION

Aim: In this study, we evaluated the levels of total antioxidant capacity(TAS), total oxidant capacity(TOS) and superoxide dismutase(SOD) which are the major components of oxidant-antioxidant systems in healthy adults and we aimed to determine reference ranges of these parameters in Manisa region.

Material and Method: In this study, serum specimens from 219 healthy adults aged between 20-67 years were collected after 12 hours of fasting. TAS and TOS levels are measured with spectrophotometric, and SOD levels with ELISA method are measured in Clinical Biochemistry Laboratory of Celal Bayar University Hafs Sultan Hospital in Manisa. Our results calculated with one-way anova and X² tests by using SPSS 15.0 statistical program.

Results: The reference ranges of TOS for 20-67 aged women were 3.14-25.39, and for men were 1.25-26.20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L; reference ranges of OSI for women were 0.04-0.23 and for men were 0.01-0.19; reference ranges of SOD for women were 0.18-1.16, and for men were 0.07-1.18 U/mL. However, the reference ranges of TAS in 20-49 aged women were 0.95-2.13 and in 20-49 aged men were 1.21-2.35, with statistically difference reference to over 50 years of adults which were 1.25-2.74 mmol Trolox equivalent/L.

Conclusion: The antioxidant and oxidant parameters involved in the etiology of many diseases, due to a tight relationship with regional, environmental, nutritional and lifestyle factors becomes even more important in determining population-based reference ranges. TAS, TOS, OSI and SOD levels were evaluated as significantly different in gender and also for TAS with reference to age over 50 years. Our study defined in Manisa region is the first report in our region and therefore original. We believe that our study will be helpful for the same studies which done in wider populations.

Keywords: Total antioxidant capacity, total oxidant capacity, superoxide dismutase, reference ranges.

KAYNAKLAR

1. Motor S, Koca Y, Turhan T, Erdoğan S, Erden G, Sezer S, Bulut F. 40 Yaş ve Üzeri Sağlıklı Türk Bireylerde Rutin Biyokimyasal Parametrelerin Referans Aralıklarının Belirlenmesi. Türk Biyokimya Dergisi(Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem) 2009; 34(2): 71-81.
2. İlçöl YÖ, Aslan D. Bursa İlinde Sağlıklı Bireylerde Kan Biyokimyası Profili Referans Aralıklarının Saptanması. Türk Biyokimya Dergisi(Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem) 2004; 29(2): 183-92.
3. Erdoğan S, Erden G, Yıldırım kaya MM. 18-60 Yaş Arası Türklerde Elecsys 2010 İnsülin Testinin Referans Aralığının Belirlenmesi. Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 2009; 66(2): 67-72.
4. Enli Y, Aslan D, Akalın N, Aydın Y, Yılmaztürk CG, Göçhan İ, Tekintürk S, Demir S. Denizli'de Yaşayan 18-40 Yaş Arası Bireylerde Farklı Yöntemlerle Referans Aralıkların Saptanması. Türk Biyokimya Dergisi(Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem) 2003; 28(4): 228-45.
5. Laleli Y. Referans Kavramı, Ulusal Referans Politikası ve Hasta Verilerinin Kullanımı. Türk Biyokimya Dergisi(Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem) 2003; 28(4): 225-7.
6. Özgöçmen S. Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. Türk Fiz. Tıp Rehab. Dergisi 2007; 53(2): 33-5.
7. Gültekin F, Gürbilek M, Vatansev H, Akkuş İ, Karaeren Z, Kalak S, Alkolün indüklediği Oksidatif Stresin bazı Antioksidanlar üzerine Etkileri. Genel Tıp Dergisi 1998; 8(3):105-9.
8. Erel Ö. A New Automated Colorimetric Method For Measuring Total Oxidant Status. Clinical Biochemistry 2005; 38: 1103-11.

9. Erel Ö. A Novel Automated Method to Measure Total Antioxidant Response Against Potent Free Radical Reactions. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 112-9.
10. Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1865-79.
11. Burtis CA. Ashwood ER. Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Elsevier Saunders; Fourth Edition; 2006: 427.
12. Horn PS. Pesce AJ. Reference Intervals: An Update. *Clinica Chimica Acta* 2003; 334: 5-23.
13. C28-A How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. NCCLS , 1995; Vol.17: No:18.
14. Akbayır S, Fidancı ŞB, Şen F, Bakır AY, Temel GO, Ünal N, Gümüş LT. Mersin Bölgesinde Homosistein Vitamin A ve Vitamin E Düzeylerine Ait Referans Aralıklarının Belirlenmesi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2011; 4(1): 7-11.
15. Baskın Y, Yiğitbaşı T, Afacan G, Akgün F, Dere R. Sağlıklı Bireylerde İmmunglobulin (IGA, IGG, IGM) ve IGG Alt Grupları Referans Aralıkları. *Türk Biyokimya Dergisi* 2010; 35(4): 325-32.
16. Geffre A, Friedrichs K, Harr K, Concordet D, Trumel C, Braun JP. Reference values: a review. *Veterinary Clinical Pathology* 2009; 38(3): 288-98.
17. İnal BB, Usta M, Aral H, Tuhral C, Bilgi PT, Güvenen G. Vitamin B12 Ölçümlerinin Kısa Dönemli Analitik Performansının Değerlendirilmesinde Normallerin Ortalaması (AON) Uygulaması. *Türk Biyokimya Dergisi (Turkish Journal of Biochemistry - Turk J Biochem)* 2010; 35(1): 67-71.
18. Aral H. Analiz Öncesi Değişkenlerin Test Sonuçlarına Etkisi. *İstanbul Tıp Dergisi* 2009; 3: 150-5.
19. Burtis CA. Ashwood ER. Bruns DE. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Palme Yayıncılık; Beşinci Baskı; 2004.

20. Kutay FZ. Laboratuvar Verilerinin İstatiksel Değerlendirilmesi. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi Kitabı 2004. Ed. Tağa Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ; 53-70.
21. Dalgıç M. Kocaeli İlinde Sağlıklı Bireylerde Kan Biyokimyası Profili Referans Aralıklarının Saptanması. Uzmanlık Tezi. Kocaeli; 2011.
22. Baadenhuijzen BH, Smit JC. Indirect Estimation of Clinical Chemical Reference Intervals From Total Hospital Patient Data: Application of a Modified Bhattacharya Procedure. *Clinical Biochemistry* 1985; 23: 829-39.
23. Masferrer MF, Arderiu XF, Ane RP. Indirect Reference Limits Estimated From Patients Results By Three Mathematical Procedures. *Clinica Chimica Acta* 1999; 279: 97-105.
24. Schnabl K, Chan MK, Gong Y, Adeli K. Closing the Gaps in Pediatric Reference Intervals: The Caliper Initiative. *Clinical Biochemistry* 2008; 29: 89.
25. Zurakowski D, Canzio JD, Majzoub JA. Pediatric Reference Intervals for Serum Thyroxine, Triiodothyronine, Thyrotropin and Free Thyroxine. *Clinical Chemistry* 1999; 45: 7.
26. Davey R. Thyroxine, thyrotropin and age in a euthyroid hospital population. *Clinical Chemistry* 1997; 43:11: 2143-8.
27. Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlation* 3rd Edition 1996, Mosby, USA.
28. Kemoun G, Breque C, Carette P, Dugue B. Preanalytical factors and reference values in posturographics studies. Much remains to be done and explored. *Clinical Neurophysiology* 2010; 40: 209-10
29. Rustad P, Petersen PH. Effect of analytical quality on establishing common reference intervals and their use. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64:399-406.
30. Westgard JO. Within-subject and between-subject CV values of analytes. <http://www.westgard.com/lesson.html>.
31. Lott JA, Mitchell LC, Moeschberger ML, Sutherland DE. Estimation of Reference Ranges: How Many Subjects Are Needed?. *Clinical Chemistry* 1992; 38(5): 648-50.

32. Kouri T, Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Rajamaki A, Finneman H, Juva K, Koivula T, Nantö V. Reference Intervals Developed From Data for Hospitalized Patients: Computerized Method Based on Combination of Laboratory and Diagnostic Data. *Clinical Chemistry* 1994; 40(12): 2209-15.
33. Linnet K. Two- Stage Transformation Systems for Normalization of Reference Distributions Evaluated. *Clinical Chemistry* 1987; 33(3): 381-6.
34. Usta M. Koagülasyon Testlerinin Referans Aralıklarının İndirek Belirlenmesinde Bhattacharya ve Hoffmann Metotlarının Kalite Kontrol Prosedürleri Olarak Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul; 2009.
35. Lumsden JH., On establishing reference values. *Can. J. Comp. Med.* 1978; 42: 293-301.
36. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, Oxidative Stress and Neurodegeneration. *European Journal of Biochemistry* 2000; 267: 4904-11.
37. Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived Species: Their Relation to Human Disease and Environmental Stress. *Environmental Health Perspectives* 1994; 102(10): 5-12.
38. İyidoğan Y, Genç S, Koçak Y, Akkuş E. Seminal Plazma Superoksid Dismutaz ve Total Antioksidan Düzeylerinin Erkek İnfertilitesine Etkileri. *Türk Üroloji Dergisi* 2003; 29(3): 296-300.
39. Hamidanoğlu M. Osteomiyelitli Hastalarda Oksidan ve Antioksidan Kapasitelerin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa; 2011.
40. Yıldırım F. Sigaraya Maruz Kalan Çocuklarda İdrarda Kotinin Düzeyi ile Total Oksidan ve Antioksidan Kapasitelerin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Şanlıurfa; 2010.
41. H.I. Kaplan BJS. *Synopsis of Psychiatry*. Baltimore: Williams&Wilkins; 1998.
42. Çakmak A, Zeyrek D, Kürkçü R, Ataş A, Çimen E, Ocak AR, Erel Ö. Evaluation of Systematic Oxidant and Antioxidant Status in Amateur

- Adolescent Athletes. Türkiye Klinikleri Journal of Medical Science 2009; 29(2): 367-74.
43. Öztürk MO. Ruh Sağlığı ve Bozuklukları. Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 1994.
44. D.W. Black NCA. Synopsis of Psychiatry. Washington: American Psychiatric Press; 1996.
45. Akiskal Hagop S. JLL-I, Norma Sartorius. Bipolar Disorder. Chichester: John Wiley&Sons Ltd; 2002.
46. Öztürk MO. Ruh Sağlığı ve Bozuklukları. Ankara: Ruh Sağlığı ve Bozuklukları; 2004.
47. Amerikan Psikiyatri Birliği. Psikiyatride Hastalıkların Tanımlanması ve Sınıflandırılması El kitabı, Yeniden Gözden Geçirilmiş Dördüncü Baskı(DSM-IV-TR). Ankara: Hekimler Yayın Birliği; 2001.
48. H. Kaplan BS. Klinik Psikiyatri 2004.
49. Bebbington P, Ramana R. The epidemiology of bipolar affective disorder. Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol 1995; 30: 279-92.
50. Usmar VD, Wiseman H, Halliwell B. Nitric Oxide and Oxygen Radicals: A Question of Balance. Federation of Biochemical Societies 1995; 369: 131-5.
51. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Psikology 2006; 141: 312-22.
52. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. American Physiological Society 2002; 82: 47-95
53. Vahip S. Bipolar Depresyon. Klinik Psikiyatri 2004; Ek1:41-4.
54. Gümüştaş MK, Atukeren P. Oksidatif ve Nitrozatif Stresin Psikiyatrik Bozukluklarla İlişkisi. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri 2008; 62: 329-40.
55. Öztop A, Demir A, Saydam N, Öztop İ, Çelikten E. Astım Bronşiyale Olgularında Serum Glutatyon Peroksidaz, Superoksid Dismutaz ve Malonil Dialdehid Düzeyleri ve Astım Şiddeti ile İlişkisi. Solunum Hastalıkları 2002; 13: 239-45.

- 56.Emecen Ö. Astımlı Hastalarda Serum Total Oksidan/ Antioksidan Status ve ECP Düzeylerinin Değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. İstanbul; 2009.
- 57.Raha S, Robinson B, Mitochondria, Oxygen Free Radicals, Disease and Ageing. Elsevier Science 2000; 25: 502-8.
- 58.Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif Oksijen Partikülleri ve Antioksidan Savunma. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1997; 3-4: 92-5.
- 59.Köksal C, Korukoğlu D, Ercan M, Arslan C, Kazımoğlu K, Bozkurt K. Periferik Arter Hastalarında Lipid Peroksidasyonu ve Antioksidan Kapasite. GKDC Dergisi 1999; 7: 244-6.
- 60.Memişoğulları R. Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. Düzce Tıp Fakültesi Dergisi 2005;3: 30-39.
- 61.Memişoğulları R, Taysı S, Bakan E, Capoğlu I. Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Type II Diabetes Mellitus. Cell Biochemistry and Function 2003; 21: 291-6.
62. Girotti A. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover and Effector Action in Biological Systems. Journal of Lipid Research 1998; 39:1529-42.
- 63.Hausinger D. The Role of Cellular Hydration in the Regulation of Cell Function. Biochemical Journal 1996; 313: 697-710.
- 64.Craddock N, Jones I. Molecular genetics of bipolar disorder. Br J Psychiatry 2001; 178:S128-33.
- 65.Kocabıyık A. Bipolar bozuklukda duygu dışavurumu ile relaps ilişkisi. Uzmanlık Tezi; 2001.
- 66.Çubukçuoğlu Z. Bipolar Bozuklukta Nörobilişsel Testlerin Özgüllüğü ve Dutarlılığı Üzerine Karşılaştırmalı Bir Çalışma. Uzmanlık Tezi. Manisa; 2011.
- 67.İşık E. Depresyon ve Bipolar Bozukluklar: Görsel Sanatlar Yayınevi; 2003.
- 68.Totter J. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. Proc Natl Acad Sci. 1980;77:1763-7

69. Bayraktar M, Kılıç S, Özdemir İ, Aydemir S, Ulu R, The Investigation of Serum Malondialdehyde Levels and Erythrocyte Antioxidant Enzymes in Hypertension Patients. *J Health Sci.* 2005;14(2):76-81.
70. Iqbal M, Cawthon D, Beers K. Antioxidant enzyme activities and mitochondrial fatty acids in pulmonary hypertension syndrome in broilers. *Poult Sci.* 2002;81:252-60.
71. Cros CE, Halliwell B, Borish E. Oxygen Radicals And Human Disease. *Ann Intern Med,* 1987;107:526-45.
72. Michael Lieberman ADM. Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach: Lippincott Williams & Wilkins; Third, North American Edition edition 2008.
73. Redon J, Oliva MR Tormos C. Antioxidant activities and oxidative stress by products in human hypertension. *Hypertension.* 2003;41:1096-101.
74. Johnson P. Antioxidant enzyme expression in health and disease: effects of exercise and hypertension. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 2002;133:493-505.
75. Memişoğulları R. The Role of Free Radicals and the effect of Antioxidant in Diabetes. *Düzce Tıp Fakültesi Tıp Dergisi.* 2005;3:30-9.
76. Padurariu M, Ciobica A, Dobrin I, Stefanescu C. Evaluation of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation in schizophrenic patients treated with typical and atypical antipsychotics. *Neurosci Lett* 2010; 479:317-20.
77. Guidetti M, Sforzini A, Bersani G, Corsini C. Vitamin A and vitamin E isoforms stability and peroxidation potential of all-in-one admixed for parenteral nutrition. *Int J Vitam Nutr Res,* 2008;78(3):156-66.
78. Yazıcıoğlu Ç. Fetal Hidrosefali ve Nöral Tüp Defekti olan Gebelerde Total Oksidan Seviye - Total Antioksidan Kapasite - Oksidatif Stres İndeksinin Değerlendirilmesi: Prospektif Kontrollü Klinik Çalışma. Uzmanlık Tezi. Gaziantep; 2008.
79. Kusano C. Ferrari B. Total Antioxidant Capacity: A Biomarker in Biomedical and Nutritional Studies. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2008; 7(1) :1-15.

80. Erel Ö. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation 2004; 37: 277-85.
81. Erel Ö. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status 2005; 38: 1103-11.
82. Baysal E, Aksoy N, Kara F, Taysi S, Taşkın A, Bilinç H, Cevik C, Celenk F, Kanlıkama M. Oxidative Stress in Chronic Otitis Media Eur Arch Otorhinolaryngol. 2012.
83. Harma M, Harma M, Erel Ö. Increased oxidative stress in patients with hydatidiform mole. Swiss Med Wkly 2003; 133: 563-6.
84. Kocabaş V, Kocabaş H, Başaralı MK, Sezer İ, Kaçar C, Büyükbaş S. Ankilozan Spondilit Hastalarının Serum Oksidan-Antioksidan Seviyeleri. Selçuk Üniv. Tıp Derg 2010;26(3):79-83.
85. Sabitha KE, Shyamaladevi CS. Oxidant and antioxidant activity changes in patients with oral cancer and treated with radiotherapy Oral Oncology 1999; 35: 273-7.
86. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. International Journal of Obesity 2002; 26: 1159-64.
87. Ray G, Batra S, Shukla NK, Deo S, Raiina V, Ashok S, Husain SA. Lipid peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. Breast Cancer Research and Treatment ; 59: 163-70.
88. Berköz M, Yalın S, Güler VG, Yalçın A. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activity in Acute Leukemias. Erciyes Tıp Dergisi(Erciyes Medical Journal) 2008;30(3):157-62.
89. Türkalp I, Şahinoğlu S, Özkazancı D. Diabetes Mellitus Olgularında Total Antioksidan Status ve Süperoksit Dismutaz Düzeyleri. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi 2003; 13(1): 15-9.
90. Özel Ü, Bilgihan A, Dolapçı M, Saryal M, Yastı Ç, Kama NA. Kolelityazisli Olgularında Serum Bakır, Çinko Düzeyleri ve Süperoksit Dismutaz Aktivitesi. T Klin Tıp Bilimleri 2001; 21: 488-92.
91. Harma M, Harma M, Erel Ö. Measurement of the total antioxidant response in preeclampsia with a novel automated method. European

- Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 2005; 118: 47–51.
92. Sarban S, Kocyigit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 981-6.
93. Cemek M, Dede S, Bayiroğlu F, Çaksen H, Cemek F, Mert N. Relationship between antioxidant capacity and oxidative stress in children with acute hepatitis A. *World J Gastroenterol* 2006; 12(38): 6212-5.
94. Kulkarni SR, Ravindra KP, Dhume CY, Rotaboli P, Rodrigues E. Levels of plasma testosterone, antioxidants and oxidative stress in alcoholic patients attending de-addiction centre. *Biology and Medicine* 2009; 1(4):11-20.
95. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, Pagliarani S, Benvenuti F, Canestrari F. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen. *Clinical Biochemistry* 2004; 37: 312-7.
96. Öztürk E, Balat Ö, Uğur MG, Yazıcıoğlu Ç, Pençe S, Erel Ö, Kul S. Effect of Ramadan fasting on maternal oxidative stress during the second trimester: A preliminary study. *Obstetrics and Gynaecology* 2011; 37(7): 729-33.
97. Öztürk E, Balat Ö, Açılmış YG, Özcan Ç, Pençe S, Erel Ö. Measurement of the placental total antioxidant status in preeclamptic women using a novel automated method. *Obstetrics and Gynaecology* 2011; 37(4): 337-42.
98. Kavaklı HS, Erel Ö, Delice O, Görmez G, Işıkoğlu S, Tanrıverdi F. Oxidative stress increases in carbon monoxide poisoning patients. *Human and Experimental Toxicology* 2011; 30(2) 160-4.
99. Ercan S, Cakmak A, Kosecik M, Erel O. The oxidative state of children with cyanotic and acyanotic congenital heart disease. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi* 2009; 9: 486-90.

100. Vural H, Demir CV, Yılmaz N, Eren İ. Alzheimer hastalığında total antioksidan kapasitenin araştırılması. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2007; 5(2): 63-6.
101. Herrmann W, Schorr H, Purschwitz K, Rassoul F, Richter V. Total Homocysteine, Vitamin B12, and Total Antioxidant Status in Vegetarians. *Clinical Chemistry* 2001; 47(6): 1094-101.
102. Wang XL, Rainwater DL, VandeBerg JF, Mitchell BD, MahaneyMC. Genetic Contributions to Plasma Total Antioxidant Activity. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasular Biology*. 2001; 21:1190-5.
103. Kaur IP, Kapila M, Agrawal R. Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing *Ageing Research Reviews* 2007; 6: 271-88.
104. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative Stress in Human Aging and Mitochondrial Disease–Consequences of Defective Mitochondrial Respiration and Impaired Antioxidant Enzyme System. *Chinese Journal of Physiology* 2011; 44(1): 1-11.
105. Özbay B, Dülge H. Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Turkish Population : Relation to Age, Gender, Exercise and Smoking. *Tohoku J. Exp. Med.* 2002; 197: 119-24.
106. İnal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinica Chimica Acta* 2001; 305: 75-80.
107. Gaeta LM, Tozzi G, Pastore A, Federici G, Bertini E, Piemonte F. Determination of superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities in blood of healthy pediatric subjects. *Clinica Chimica Acta* ; 322 : 117-20.
108. Junqueira VBC, Barros SBM, Chan SS, Rodrigues L, Giavarotti L, Abud RL, Deucher GP. Aging and oxidative stres. *Molecular Aspects of Medicine* 2004; 25 : 5-16.
109. Demirci N, Beytut E, Kamiloğlu NN. Sporcularda Sigaraya Bağlı Oluşan Oksidatif Hasar Üzerine A ve E Vitaminlerinin Koruyucu Etkileri. *Kafkas J Med Sci* 2011; 1(3):109-13.

110. Garg N, Singh R, Dixit J, Jain A, Tewari V. Levels of lipid peroxides and antioxidants in smokers and nonsmokers. *J Periodont Res* 2006; 41: 405-10.
111. Çimen F, Uluba B, Eryılmaz T, Bilgin G. Sigara İçenlerde Lipid Peroksidasyonu, Antioksidan Aktivite ve Solunum Fonksiyon Testleri. *T Klin J Med Sci* 2002; 22 : 292-6.
112. Orhan H, Evelo CTA, Şahin G. Erythrocyte Antioxidant Defense Response Against Cigarette Smoking in Humans the Glutathione S-Transferase Vulnerability. *J.Biochem molecular Toxicology* 2005; 19(4): 226-33.
113. Leonard MB, Lawton K, Watson ID, MacFarlane I. Free radical activity in young adult cigarette smokers. *J Clin Pathol* 1995; 48 : 385-7.
114. Pasupathi P, Saravanan G, Farook J. Oxidative Stress Bio Markers and Antioxidant Status in Cigarette Smokers Compared to Nonsmokers. *J. Pharm. Sci. & Res.* 2009; 1(2) : 55-62.
115. Jain A, Agrawal B K, Varma M, Jadhav A A. Antioxidant status and smoking habits: relationship with diet. *Singapore Med J* 2009; 50(6): 624-7.
116. Buico A, Cassino C, Ravera M, Betta PG, Osella D. Oxidative stress and total antioxidant capacity in human plasma. *Redox Report* 2009; 14(3): 125-31.
117. Onyesom I, Osioma E, Ighodayenwho OK. Serum Total Antioxidant Capacity Of Some Nigerian Cigarette Smokers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 2012; 18(14): 1-2.
118. 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. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2003; 27(6): 648-56.
119. Söylemez N, Demirbağ R, Sezen Y, Yıldız A, Akpınar O. Vücut kütle indeksine göre leptin ve adiponektin seviyeleri ve bunların

- oksidatif parametrelerle ilişkisi. Anadolu Kardiyoloji Dergisi 2010; 10: 391-6.
120. 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.
121. Özata M, Mergen M, Oktenli C *et al.* Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem*, 2002;35:627-31.
122. Davi G, Guagnano M, Ciabattini G *et al.* Platelet activation in obese women. Role of inflammation and oxidant stress. *JAMA*, 2002; 288: 2008-14.
123. 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.
124. Olusi SO. Obesity is an independent risk factor for plasma lipid peroxidation and depletion of erythrocyte cytoprotective enzymes in humans. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2002;26:1159-64.
125. Brown LA, Kerr CJ, Whiting P, Finer N, McEneny J, Ashton T: Oxidant stress in healthy normal-weight, overweight, and obese individuals. *Obesity(Silver Spring)*, 2009 ;17(3):460-6.
126. Aksu İY. Egzersizin Sıçan Beyninde Oksidan-Antioksidan Denge Üzerine Etkilerinin Araştırılması. Doktora Tezi. İzmir; 2006.
127. Shephard RJ, Balady GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation* 1999; 99 : 963-72.
128. Ignarro LJ, Balestrieri ML, Napoli C. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease: An update. *Cardiovascular Research* 2007;73 : 326-40.
129. İlhan N, Kamanlı A, Özmerdivenli R, İlhan N. Variable Effects of Exercise Intensity on Reduced Glutathione, Thiobarbituric Acid Reactive Substance Levels, and Glucose Concentration *Archives of Medical Research* 2004; 35 : 294-300.

130. Tanasescu M, Leitzmann MF, Rimm EB, Willett WC, Stampfer MJ, Hu FB. Exercise type and intensity in relation to coronary heart disease in men. *JAMA* 2002; 288 : 1994-2000.
131. Blumenthal JA, Matthews K, Fredrikson M, Rifai N, Schniebolk S, German D, Steege J, Rodin J. Effects of Exercise Training on Cardiovascular Function and Plasma Lipid, Lipoprotein, and Apolipoprotein Concentrations in Premenopausal and Postmenopausal Women. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 1991; 11 ; 912-7.
132. Çakmak A, Zeyrek D, Kürkçü R, Ataş A, Çimen E, Ocak AR, Erel Ö. Evaluation of Systemic Oxidant and Antioxidant Status in Amateur Adolescent Athletes. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29(2) : 367-74.
133. 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.
134. Martha A, Rodríguez S, Retana-Ugalde R, Ruiz-Ramos M, Mendoza-Núñez VM. Antioxidant capacity in relationship to serum lipid peroxides levels in healthy elderly of Mexico City. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2004; 38(2): 193-8.
135. Casado A, Torre R, López-Fernández ME. Copper/zinc superoxide dismutase activity in newborns & young people in Spain. *Indian J Med Res* 2007; 125 : 655-60.
136. Demirbağ R, Gür M, Yılmaz R, Kunt AS, Erel Ö, Andaç MH. Influence of oxidative stress on the development of collateral circulation in total coronary occlusions. *International Journal of Cardiology* 2007; 116 : 14–9.
137. Altındağ Ö, Koçyiğit A, Çelik N, Çelik H, Soran N. DNA Damage and Oxidative Stress in Patients with Osteoarthritis: a Pilot Study. *Rheumatism* 2007; 22: 60-3.
138. Demirbağ R, Yılmaz R, Koçyiğit A. Relationship between DNA damage, total antioxidant capacity and coronary artery disease. *Mutation Research* 2005; 570; 197–203.

139. Sarban S, Koçyiğit A, Yazar M, Isikan UE. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 981-6.
140. Gök M, Yapıcı İ, Uzun K, Erdem S, Ünlü A, Büyükbaş S. Aktif Tüberküloz hastalarında total antioksidan kapasitesi ve malondialdehit(MDA) seviyeleri. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2006; 4(2): 22-4.
141. Gür M, Yıldız A, Demirbağ R, Yılmaz R, Koçyigit A, Çelik H, Aksoy N. Relationship between left ventricle geometric patterns and lymphocyte DNA damage in patients with untreated essential hypertension. *Clinical Biochemistry* 2007; 40 : 454–9.
142. Wang D, Feng J, Zeng P, Yang Y, Luo J, Yang YW. Total oxidant/antioxidant status in sera of patients with thyroid cancers *Endocrine-Related Cancer* 2011; 18: 773-82.
143. Lee JY, Park JM, Hong JA, Lee DC, ImJA, Lee JW. Serum Ferritin Is Differentially Associated with Anti-oxidative Status and Insulin Resistance in Healthy Obese and Non-obese Women. *Korean J Fam Med.* 2012; 33 : 205-10.