

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BEYİN OMURİLİK SIVISINDA NİTROTİROZİN, NİTRAT VE NİTRİT İÇİN
TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Muharrem ÖZTÜRK

Kimya Anabilim Dalı

**EYLÜL 2012
SAMSUN**

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİMYA ANABİLİM DALI

**BEYİN OMURİLİK SIVISINDA NİTROTİROZİN, NİTRAT VE NİTRİT İÇİN
TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Muharrem ÖZTÜRK
(09210128)**

Tezin Savuma Tarihi : 18 Eylül 2012

Tez Danışmanı : Prof. Dr. A. Nur ONAR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalında

Muharrem ÖZTÜRK Tarafından Hazırlanan

**BEYİN OMURİLİK SIVISINDA NİTROTİROZİN, NİTRAT VE
NİTRİT İÇİN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ**

**başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 18/09/2012 tarihinde yapılan sınav ile
YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Başkan : Prof. Dr. Fatma AYGÜN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. A. Nur ONAR
Ondokuz Mayıs Üniversitesi**

**Prof. Dr. B. YAVUZ ERDOĞAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi**

18/09/2012

Prof. Dr. Recep TAPRAMAZ

Enstitü Müdürü

BEYİN OMURİLİK SIVISINDA NİTROTİROZİN, NİTRAT VE NİTRİT İÇİN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

ÖZ

Oksidatif stres, serbest radikallerin hücrede hasar oluşturdukları bir durumu tanımlamaktadır.

Oksidatif stresin belirlenmesinde işaret molekülleri önem taşımaktadır. Tirozin molekülünün, aktif nitrojen türleri ile tepkimesi sonucunda oluşan 3-nitrotirozin bu işaret moleküllerinden biridir. Nitrat ve nitrit iyonları ise, bir serbest radikal olan NO'un inaktif metabolitleridir.

Bu araştırmanın amacı, insan sağlığı üzerinde önemli etkileri olan oksidatif stresin belirlenmesinde işaret molekülü olarak kullanılan 3-nitrotirozin'in ve nitrat, nitrit iyonlarının beyin omurilik sıvısı içerisinde tayinini gerçekleştirebilecek yöntemler geliştirmektir. Bu amaçla voltametrik yöntem ile 3-nitrotirozin, kapiler elektroforez ile de nitrat ve nitrit iyonlarının tayini geliştirilmiştir. Her iki yöntem için kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında, literatürde daha evvel rastlanmayan sentetik BOS kullanılmıştır.

3-nitrotirozin'in voltametrik tayini için, adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi ve adsorptif sıyırma diferansiyel puls voltametrisi ile çalışılmış, kare dalga voltamogramların türevi de alınmıştır. Destek elektrolit olarak sentetik BOS içeren 100mM fosfat tamponu (pH 7,24) seçilmiştir. 3-nitrotirozin 500mV civarında (Ag/AgCl karşı) gözlenen indirgenme piki, sentetik veya gerçek BOS'tan kaynaklanan pikler nedeniyle engellendiğinden alt tayin sınırı istenen 10^{-9} M düzeyine inememiş, 10^{-7} M da kalmıştır.

Kapiler elektroforez ile nitrat ve nitrit iyonlarının tayini düşük pH yürütücü tampon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Düşük pH tamponu ile anorganik iyonların ayrılması son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Yürütücü tampon olarak pH 3,5 fosfat tamponu (100mM), kolon sıcaklığı 27 °C seçilmiş, numune verme işlemi ise hidrodinamik yol ile 75s süreyle sıkıştırma yapılarak uygulanmıştır. Geliştirilen yöntem gerçek BOS örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Serbest Radikal, Oksidatif Stres, Beyin Omurilik Sıvısı, 3-Nitrotirozin, Nitrat, Nitrit

DEVELOPMENT OF QUANTIFICATION METHOD FOR NITROTYROSINE, NITRATE AND NITRITE IN CEBROSPINAL FLUID

ABSTRACT

Oxidative stress defines a condition that causes cell damage.

The marker molecules are important for detecting oxidative stress. 3-NT is one of the marker molecules that is produced as a result of reaction of tyrosine molecule with active nitrogen species. On the other hand, nitrate and nitrite ions are inactive metabolites of the free radical NO.

In this work it is aimed to develop methods for determination oxidative stress markers; 3-NT and NO_3^- , NO_2^- ions in cerebrospinal fluid (CSF). For this purpose voltammetric method to determine 3-NT and capillary electrophoretic method to determine NO_3^- and NO_2^- were studied.

For both methods, calibration curves were prepared in the presence of artificial CSF which was not seen in the literature before. For voltammetric analysis of 3-NT; adsorptive stripping square wave voltammetry and adsorptive stripping differential pulse polarography were studied. Besides the derivative of square wave voltamograms were also obtained. As supporting electrolyte artificial CSF containing phosphate buffer (100mM, pH 7,24) was chosen. The reduction peak potential of 3-NT was appeared at about 500mV (vs Ag/AgCl) was blocked by peaks those arise from artificial or real CSF. Due to this the limit of detection (LOD) was not at desired level (10^{-9} M) but achieved at 10^{-7} M level.

Nitrate and nitrite ions were determined by using low pH running buffer solution. Separation of small inorganic ions with low pH buffer is novelty and used in recent years. As running buffer, phosphate solution (100mM, Ph 3,5) was selected and the capillary temperature was set to 27°C. Sample was introduced hydrodynamically for 75s by sample stacking. Developed method was successfully applied to real CSF.

Keywords: Free Radikal, Oxidative Stress, Cerebrospinal Fluid, 3-Nitrotyrosine, Nitrate, Nitrite

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmalarım boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam sayın Prof. Dr. A. Nur ONAR’a en derin saygılarımla kalpten sonsuz şükran ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezin hazırlanması sırasında yardımlarını gördüğüm, örnek bir kişiliğe sahip olan değerli hocam Prof. Dr. Fatma AYGÜN’e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince her konuda desteğini esirgemeyen ve sohbetlerini paylaştığım, sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Behice Y. ERDOĞAN’a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında verdikleri destek, gösterdikleri anlayış ve hoşgörü için Araş. Gör. Onur DUMANLI ve değerli eşi Araş. Gör. Rukiye DUMANLI’ya, ayrıca uzun seneler arkadaşlığını paylaştığım Araş. Gör. Seyhan ÖZTÜRK’e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte laboratuvarı paylaştığım kıymetli arkadaşlarım Özge ÖZEN, Belgin AKSU ve Caner UYSAL’a çalışmalarında başarılar dilerim.

Maddi ve manevi desteğini esirgemeyen eşim CEYLAN’a, bana göstermiş olduğu anlayış ve sabır nedeniyle çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	iv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Oksidatif Stres	3
2.2 Oksidatif Stres Oluşumuna Neden Olan Sebepler	3
2.3 Oksidatif Stresin Yol Açtığı Hastalıklar	4
2.4 Oksidatif Stresin Belirtileri	5
2.5 Oksidatif Stresten Korunma	5
2.6 Serbest Radikaller	5
2.7 Serbest Radikallerin Özellikleri	6
2.8 Serbest Radikallerin Görevleri	6
2.9 Serbest Radikal Oluşumunu Etkileyen Faktörler	6
2.10 Serbest Radikallerin Oluşum Biçimleri	7
2.11 Serbest Radikallerin Yarılanma Süreleri	8
2.12 Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikallerin Oluşumu	8
2.13 Serbest Radikallerin Etkileri	9
2.13.1 DNA ve nükleikasilere etkileri	9
2.13.2 Proteinlere etkileri	9
2.13.3 Karbonhidratlara etkileri	10
2.13.4 Lipitlere etkileri	10
2.14 Antioksidan Sistemler	11
2.15 Oksidatif Stresin Belirlenmesinde Kullanılan Analitik Yöntemler	12
2.16 3-Nitrotirozin	14
2.17 3-Nitrotirozin'in Kimyasal Özellikleri	15
2.18 3-Nitrotirozin Tayin Yöntemleri	15
2.19 Nitrat ve Nitrit	16
2.20 Beyin Omurilik Sıvısı	17
2.21 BOS'un Genel Özellikleri	17
2.22 BOS'un Bileşimi	18
2.23 BOS'un Fonksiyonları	18
2.24 Kullanılan Yöntemler	19
2.24.1 Voltametri	19
2.24.1.1 Civa elektrot	20
2.24.1.2 Voltamogram	20
2.24.2 Voltametri'de kullanılan uyarma sinyalleri	20
2.24.2.1 Doğrusal taramalı voltametri	20
2.24.2.2 Diferansiyel puls voltametri	21
2.24.2.3 Kare dalga voltametri	21
2.24.2.4 Dönüşümlü voltametri	22
2.24.2.5 Adsorptif sıyırma voltametri	23

2.24.3 Elektroforez	23
2.24.3.1 Elektroforez türleri	24
2.24.4 Kapiler elektroforez	24
2.24.4.1 Kapiler zon elektroforez	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM	26
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler	26
3.2 Tampon Hazırlanması	26
3.3 Standart Çözeltilerin Hazırlanması	26
3.4 Sentetik BOS	27
3.5 Sentetik BOS Hazırlanışı	27
3.6 Kullanılan Cihazlar	27
3.7 Voltametri Yönteminde Uygulanan Deneysel İşlem	28
3.8 Kapiler Elektroforez Yönteminde Kullanılan Deneysel İşlem	28
3.9 Cihazlardan Alınan Cevapların Değerlendirilmesi	29
3.10 Geri Alınabilirlik Çalışmaları	29
4. BULGULAR	30
4.1 Voltametrik Çalışmalar	30
4.1.1 Karşılaştırmalı çalışmalar	34
4.2 Kapiler Elektroforez ile Nitrat ve Nitrit İyonu Tayini	38
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR	45
8. ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif azot türleri
3-NT	3-Nitrotirozin
DNA	Deoksiribonükleik asit
UV-vis	Ultraviyole ve görünür ışık
AAS	Atomik absorpsiyon spektrometresi
HPLC	Yüksek basınç sıvı kromatografisi
GC	Gaz kromatografisi
MS	Kütle spektrometresi
EC	Elektrokimyasal belirlemeli
DNPH	Dinitrofenilhidrazin

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Oksidatif stresin vücut dengesine etkisi	4
Şekil 2.2.	Oksidatif stres oluşumu ve yol açtığı hastalıklar	5
Şekil 2.3	Serbest radikal oluşum şeması	7
Şekil 2.4.	Hücrede serbest radikal oluşum mekanizması	10
Şekil 2.5.	Serbest radikallerin etkilediği biyolojik moleküller	11
Şekil 2.6.	3-Nitrotirozinin kimyasal yapısı	14
Şekil 2.7.	3-Nitrotirozinin oluşum mekanizması	15
Şekil 2.8.	3-Nitrotirozinin tayin yöntemleri sınıflandırılması	16
Şekil 2.9	Doğrusal taramalı voltametri sinyali	21
Şekil 2.10.	Diferansiyel puls voltametri sinyali	21
Şekil 2.11.	Kare dalga voltametri sinyali	22
Şekil 2.12.	Dönüşümlü voltametri sinyali	22
Şekil 3.1.	Kapiler elektroforezde analiz öncesi ve analiz uygulamalarını gösteren şema	29
Şekil 4.1.	3-Nitrotirozinin standartının $9,54 \cdot 10^{-9}$ - $5,21 \cdot 10^{-8}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga voltametri yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar	31
Şekil 4.2.	3-Nitrotirozinin standartının $9,54 \cdot 10^{-9}$ - $5,21 \cdot 10^{-8}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga voltametri yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	31
Şekil 4.3.	3-Nitrotirozin standartının $9,54 \cdot 10^{-9}$ - $5,21 \cdot 10^{-8}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga voltametri yöntemi ile oluşturulan 1. Türev grafiği	32
Şekil 4.4.	3-Nitrotirozinin standartının, $1,98 \cdot 10^{-7}$ - $3,34 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar	33
Şekil 4.5.	3-Nitrotirozinin standartının, $1,98 \cdot 10^{-7}$ - $3,34 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	33
Şekil 4.6.	Karşılaştırmalı çalışmada, 3-nitrotirozinin standartının $6,00 \cdot 10^{-8}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar	34
Şekil 4.7.	Karşılaştırmalı çalışmada, 3-Nitrotirozinin standartının $1,61 \cdot 10^{-6}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar	35
Şekil 4.8.	Karşılaştırmalı çalışmada, 3-Nitrotirozinin standartının $5,85 \cdot 10^{-6}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	35
Şekil 4.9.	Karşılaştırmalı çalışmada, 3-Nitrotirozinin standartının $1,60 \cdot 10^{-6}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi	36
Şekil 4.10.	Karşılaştırmalı çalışmada, gerçek bos örneğinin, $9,53 \cdot 10^{-6}$ - $8,91 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar	37

Şekil 4.11.	Karşılaştırmalı çalışmada, gerçek bos örneğinin, $9,53 \cdot 10^{-6}$ - $8,91 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar	37
Şekil 4.12.	Sentetik BOS içeren nitrat ve nitrit iyonlarının standart karışımlarına ait elektroferogramlar	38
Şekil 4.13.	Nitrat iyonunun $7,43 \cdot 10^{-8}$ - $1,18 \cdot 10^{-6}$ M derişim aralığında, kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 4.14.	Nitrit iyonunun $3,62 \cdot 10^{-7}$ - $1,81 \cdot 10^{-6}$ M derişim aralığında, kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi	39
Şekil 4.15.	Nitrat ve nitrit iyonlarının kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen elektroforegramı	40
Şekil 4.16.	Nitrit iyonu içermeyen gerçek BOS örneğine ait elektroforegram (2 nolu örnek)	40
Şekil 4.17.	Nitrit ve nitrit iyonu içeren gerçek BOS örneğine ait elektroforegram (1 nolu örnek)	41

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 2.1.	Serbest radikallerin yarılanma süreleri	8
Çizelge 2.2.	DNA hasarı işaret molekülleri	12
Çizelge 2.3.	Protein hasarı işaret molekülleri	13
Çizelge 2.4.	Lipit işaret molekülleri	13
Çizelge 2.5.	Antioksidatif kapasite işaret molekülleri	14
Çizelge 2.6.	3-Nitrotirozin ve tirozinin pKa değerleri	15
Çizelge 4.1.	3-Nitrotirozin'in kare dalga voltametrisi yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin karakteristik performans verileri	32
Çizelge 4.2.	3-Nitrotirozin'in diferansiyel puls voltametrisi yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin karakteristik performans verileri	34
Çizelge 4.3.	Kare dalga ve diferansiyel puls yöntemlerinin kalibrasyon eğrilerinin performans verilerinin karşılaştırılması	36
Çizelge 4.4.	Nitrat ve nitrit iyonlarının, kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin performans verileri	39
Çizelge 4.5.	Çalışılan gerçek bos örneklerinde nitrat ve nitrit iyonlarının derişimleri	41

1. GİRİŞ

Demirin paslanması veya dışarıda bırakılan tereyağının bozulması gibi hücrelerimiz de oksidasyona uğramakta ve yaşlanmaktadır. Hızlı yaşlanmamak ve ciddi hastalıklara kolay yakalanmamak için vücudumuzun geliştirdiği koruma kalkını sayesinde serbest radikallerin zararlı etkileri kontrol altına alınmaya çalışılmaktadır. Bu sistem oluşturduğu antioksidanlar sayesinde serbest radikalleri dizginlenmektedir (Ivkovic ve Schubert, 2004).

Serbest radikaller reaktif türler oldukları için biyolojik sıvılarda saptanmaları ve tepkimelerinin izlenmesi güçtür. Bu nedenle serbest radikallerin saldırısı sonucu oluşan maddelerin izlenmesi tercih edilmektedir. Bunlara işaretleyici moleküller denilmektedir. Bu moleküllerden birisi de biyolojik sistemlerde serbest radikallerin proteinleri yükseltgemeleri sonucunda oluşan 3-nitrotirozin'dir (http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67fIHRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf, 12.06.2011).

3-Nitrotirozin; biyolojik sistemlerde radikal hasarı belirleyicisi olarak önerildiğinden tayini, hem hastalıkların izlenmesi hem de radikalik tepkimelerin mekanizmasının incelenmesi açısından önemlidir. Ayrıca oksidatif sürecin nihai ürünlerinden olan nitrat ve nitrit iyonları, oksidatif stresin belirlenmesinde kullanılan belirteçlerdendir.

3-Nitrotirozin molekülünün voltametrik davranışları daha önce incelenmiştir (Türköz Acar, 2008). Ancak geliştirilen tayin yönteminin geri alınabilirliği başarısız olmuştur. Bu çalışmada, 3-nitrotirozin molekülünün, biyolojik sıvılardan beyin omurilik sıvısında doğru, duyar ve kesin tayininin gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla daha önce geliştirilmiş olan elektrokimyasal analiz yöntemi (Türköz Acar, 2008) denenecek ve geliştirilecektir. Bunun yanı sıra kapiler elektroforez yöntemi ile beyin omurilik sıvısında nitrat ve nitrit iyonlarının düzeyleri incelenerek oksidatif stresin incelenmesine destek verilecektir.

3-Nitrotirozin molekülünün voltametrik yöntem ile beyin omurilik sıvısında tayininin gerçekleştirilmesi literatür için yeniliktir. Yöntemin çok düşük düzeyde tayin yapabilmesi nedeniyle biyolojik sistemlerde istenen düzeye inmesi beklenmektedir. Voltametrik yol ile belirlenen 3-nitrotirozin miktarı ile kapiler elektroforetik nitrat ve nitrit iyonlarının derişimleri bir arada değerlendirilmesi planlanmaktadır. 3-Nitrotirozin

molekölünün nörodejeneratif (sinir dokusu hasarı) hasta örneklerindeki düzeylerinin belirlenmesi planlanmaktadır.

3-Nitrotirozin tayini farklı voltametrik yöntemler kullanılarak çalışılacaktır. Biyolojik sıvıda 3-nitrotirozinin doğrudan tayini denenecektir. Gerçek örnek çalışması aşamasında kapiler elektroforez ile nitrat ve nitrit iyonlarının miktarı da belirlenecektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Oksidatif Stres

Doğa saldırgan serbest radikallerle onlara karşı vücudu savunan antioksidanlar arasında bir denge kurmuştur. Bu dengenin serbest radikallerin lehine bozulması sonucu canlı oksidatif stresin etkisi altında girmiş demektir. Bu durum sağlık açısından ciddi bir tehlike oluşturmaktadır (Ivkovic ve Schubert, 2004).

20. yüzyıl ortalarında Amerikalı Profesör Denham Harman hücrelerin yaşlanmasının serbest radikallerin aşırı oluşumuna bağlı olduğunu ileri sürdü. Yediğimiz gıdaları yakıp, enerji bağlamamız için oksijenle yanmaları gerekir. Oksijen molekülünün diğer moleküllerin kimyasına müdahale yeteneği vardır. Onlardan bir elektron çalarak süperoksit radikale dönüşür, ya da onlara bir elektron verebilir. Oksijenin bu reaktif potansiyeli tüm biyolojik enerji yapımını mümkün kılar. Ancak bu enerjinin de bir bedeli vardır. Oksijenin bu aktivitesi ile bir elektronunu kaybetmiş, ya da bir fazla elektrona sahip çok büyük sayıda moleküller (serbest radikaller) oluşur. Serbest radikaller elektron dengesi bozulmuş moleküller olarak düşünülebilir. Tekrar dengeyi kurmak için başka moleküllere saldırarak elektron alır ya da verir. Böylece saldırılan molekül serbest radikal haline gelir ve zincirleme tepkimelerle vücutta saniyede yüzlerce normal molekül değişikliğe uğrar.

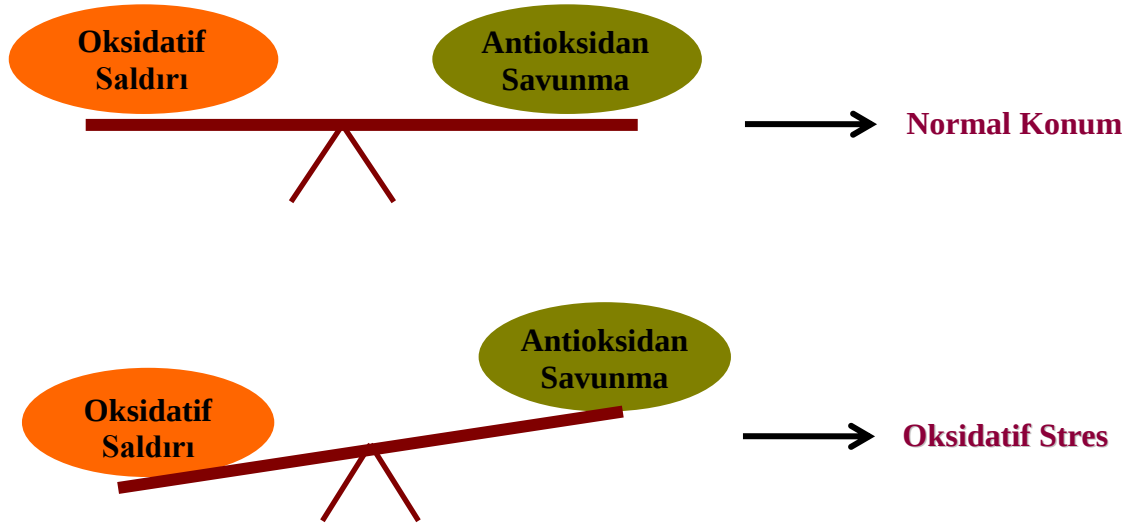
Eğer çok sayıda saldırgan moleküller eksiklerini tamamlamak için arayışta iseler proteinlere, yağ asitlerine ve hatta kalıtım maddesi DNA'ya saldırarak zarar verirler. Vücudumuzdaki her hücre günde yaklaşık on bin saldırıyı göğüslemektedir. Hücrelerde oluşan hasarın çoğu tamir edilebilir niteliktedir. Ancak az bir kısmın tamiri olanaksızdır (<http://www.kadin.ca/oksidatif-stres-serbest-radikaller/>, 20.05.2012).

2.2. Oksidatif Stres Oluşumuna Neden Olan Sebepler

Modern yaşam bize ne kadar yüksek yaşam kalitesi sunsa da bir o kadar da doğal yaşamdan uzaklaştırmaktadır. Bu birçok kronik hastalıkların artışına neden olmaktadır. Oksidatif stresin vücut dengesine etkisi şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Oksidatif stresin artmasına neden olan etkileri genel olarak aşağıda sıralanmıştır.

- Maruz kalınan yoğun çevre kirliliği
- Yüksek enerjili ışınlara maruz kalma (UV, X Işınları, Gama...)
- Nikotin, alkol ve uyuşturucu
- Bazı hastalıklar (diyabet gibi)
- Psikolojik stres
- Enfeksiyonlar
- Yanlış beslenme
- Vücudu aşırı yorma

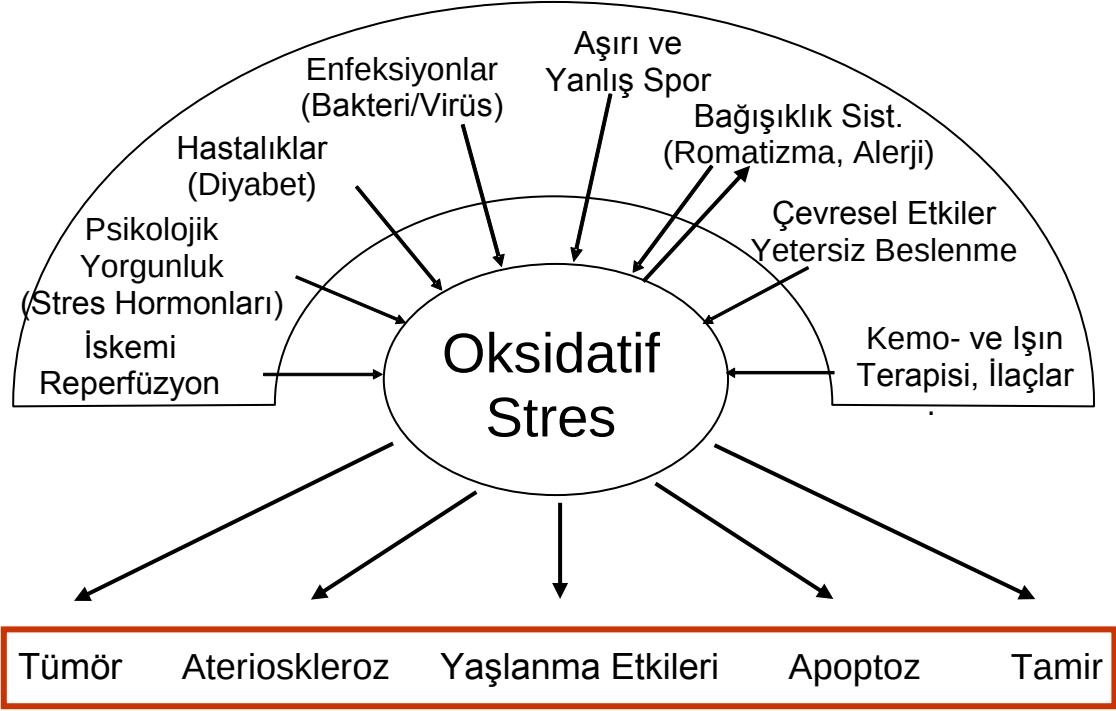
(<http://www.institut-biophysikalische-medizin.de/oxistress.htm>, 05.01.2012; http://www.symptome.ch/wiki/Kurzfassung_Oxidativer_Stress, 25.01.2012)



Şekil 2.1. Oksidatif stresin vücut dengesine olan etkisi
(http://www.webmed.ch/vitaminC_buch/htmldocs/023%20freie_sauerstoffradikale.htm, 20.05.2012)

2.3. Oksidatif Stresin Yol Açtığı Hastalıklar

Oksidatif stres, inflamasyon, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, kanser, diyabet, gut, böbrek hastalıkları, solunum sistemi hastalıkları ve sindirim sistemi hastalıkları gibi çok sayıda hastalığa neden olabilmektedir (<http://www.oksante.com.tr/link35.htm>, 16.07.2012). Şekil 2.2’de oksidatif stresin nedenleri ve yol açtığı hastalıklar verilmiştir.



Şekil 2.2. Oksidatif Stres Oluşumu ve Yol Açtığı Hastalıklar Şeması
(http://www.praxisbenner.de/1/Freie_Radikale_und_Oxidativer_Stress.html,
19.01.2011)

2.4. Oksidatif Stresin Belirtileri

Oksidatif stresin belirtileri arasında, kronik yorgunluk, Derişim bozukluğu, çalışma veriminde düşmesi, organlarda çalışma bozukluğu, kısırlık ve bağışıklık sisteminin zayıflaması gösterilebilir (<http://naturheilpraxis-schilling.eu/coaching/konfliktbewaeltigung/index.html>, 16.07.2012).

2.5. Oksidatif Stresten Korunma

Oksidatif stresten korunmak için sağlıklı ve dengeli beslenilmeli, hafif ve düzenli egzersiz uygulanmalı ve stresten uzak bir yaşam tarzı benimsenmeli (<http://www.mlklinik.com/stres.html>, 18.06.2012).

2.6. Serbest Radikaller

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir

ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hâle getirir (Acworth IN ve Bailey B., 1997).

2.7. Serbest Radikallerin Özellikleri

Serbest radikallerin genel özellikleri şöyle sıralanabilir:

- (ROS) Reaktif oksijen türleri/ (RNS) reaktif azot türleri diye iki türü vardır,
- Bir veya daha fazla ortaklanmamış elektronlara sahiptirler,
- Kısa yarı ömürlüdürler,
- Yüksek reaktivlik gösterirler,
- Oksidasyon sonucu kararlı hâle gelirler (Halliwell, 1998).

2.8. Serbest Radikallerin Görevleri

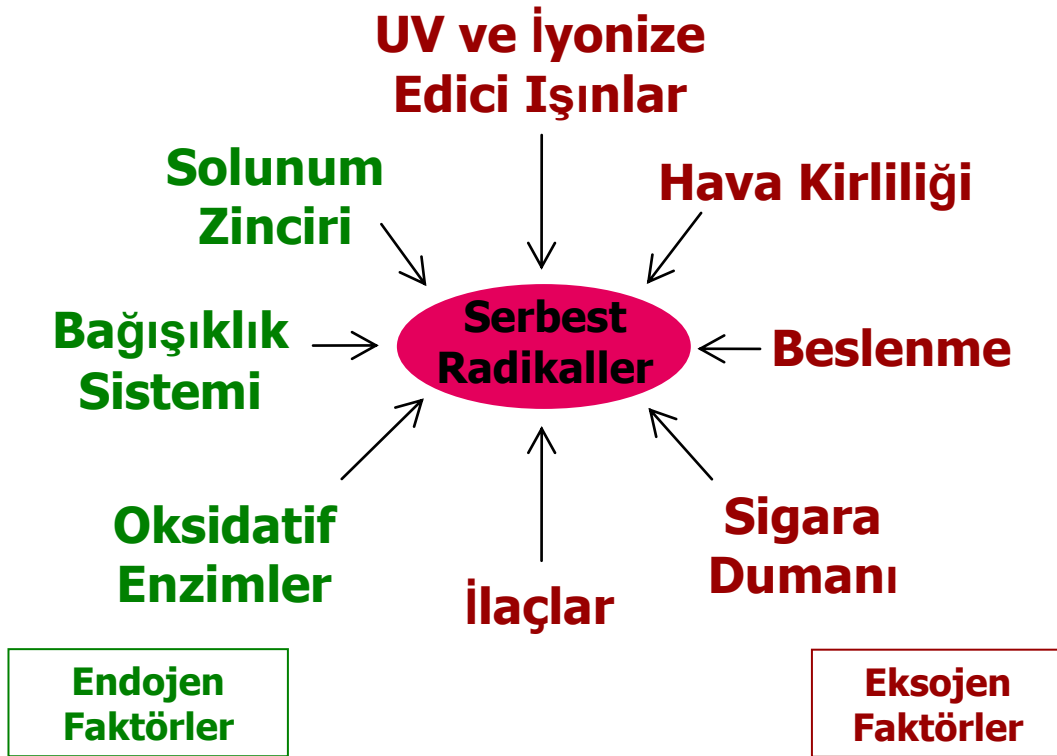
Serbest radikallerin sadece zararları değil, bir yandan da organizma için hayati rolleri vardır. Bunlar:

- Enerji üretiminde rol alırlar.
- Metabolizmayı değiştirirler.
- Hücredeki redoks durumunu değiştirirler.
- Bakteri öldürücüdürler.
- Hücre sinyali iletimde görevlidirler.
- Gen kopyalama faktörlerini aktive ederler.
- Hücre ölümlerini hızlandırırlar.

(<http://de.takethemagicstep.com/coaching/athleten/ernaehrung/ernahrung-freie-radikale/> ;http://www.allgemeinmedizin.uni-frankfurt.de/lit/igel_radikale_versicherunginfo.pdf, 17.07.2012).

2.9. Serbest Radikal Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Serbest radikallerin oluşumunu iç (endojen) ve dış (eksojen) faktörler etkilemektedir. Solunum zinciri tepkimeleri, bağışıklık sistemi tepkimeleri ve oksidatif enzimler iç faktörleri oluştururken, ışınlara, hava kirliliği, beslenme ve alınan ilaçlar dış faktörlerdir.



Şekil 2.3. Serbest Radikal Oluşum Şeması (http://dsg.uni-paderborn.de/fileadmin/evb/materialien/06_04_Vitamin_-_freie_Radikale.pdf, 03.03.2012)

2.10. Serbest Radikallerin Oluşum Biçimleri

1- Kovalent bağı oluşturan elektronlardan birinin bağ atomlarından birinde, diğerinin ötekisinde kalmasıyla sonuçlanan bağ kırılması.

2- Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı. Kovalent bağı oluşturan her iki elektron, atomların birinde kalır. Böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.

3- Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi (Halliwell, 1984, 1990).

2.11. Serbest Radikallerin Yarılanma Süreleri

Serbest radikallerin reaktif türler olması nedeniyle pek çoğunun yarılanma ömrü oldukça düşüktür. Çizelge 2.1’de görüldüğü üzere 10^{-9} s ile en kısa yarı ömürlü radikal $\text{HO}\bullet$ hidroksit radikalidir. Bu durum en reaktif tür olduğunun bir göstergesidir.

Çizelge 2.1. Serbest Radikallerin Yarılanma Süreleri
(http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67flHRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf, 12.06.2011)

Bazı Serbest Radikaller Ve Radikal Olmayan Reaktif Türler	
Reaktif Radikal Türler	Yarılanma Süresi (37 °C-s)
$\text{HO}\bullet$ (hidroksit radikali)	10^{-9}
$\text{RO}\bullet$ (alkoksi radikali)	10^{-6}
$\text{ROO}\bullet$ (peroksi radikali)	7
$\text{O}_2\bullet$ (süperoksitanyon radikali)	Enzim kontrollü
$\text{NO}\bullet$ (azotmonoksit radikali)	1-10
$\text{NO}_2\bullet$ (azotdioksit radikali)	-
$\text{Q}\bullet$ (semikinon radikali)	Günler
Radikal Olmayan Reaktif Türler	
H_2O_2 (hidrojenperoksit)	Enzim kontrollü
$^1\text{O}_2$ (singlet oksijen)	10^{-6} (H_2O)
HOCl (hipoklorikasit)	-
ONOO^- (peroksinitrit)	1 (pH 7.4)
O_3 (ozon)	-

2.12. Biyolojik Sistemlerde Serbest Radikal Oluşumu

Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötr olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler.

İki serbest radikalin birbiri ile tepkimeye girmesi sonucu radikal olmayan bir bileşik ortaya çıkar ve her iki serbest radikal ortadan kalkar. Bir serbest radikal, radikal

olmayan bir yapıyla tepkimeye girince başka bir serbest radikal oluşturur. Bu özellik serbest radikallerin zincir tepkimeleri oluşturabilmelerini sağlar. Şekil 2.4.'de hücre içersindeki serbest radikal oluşum mekanizması gösterilmiştir (Mccord, 1985).

2.13. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller DNA'ya, nükleik asitlere, proteinlere, karbonhidratlara ve lipitlere etki göstermektedir. Şekil 2.5.'de serbest radikallerin etkilediği biyolojik moleküller verilmiştir.

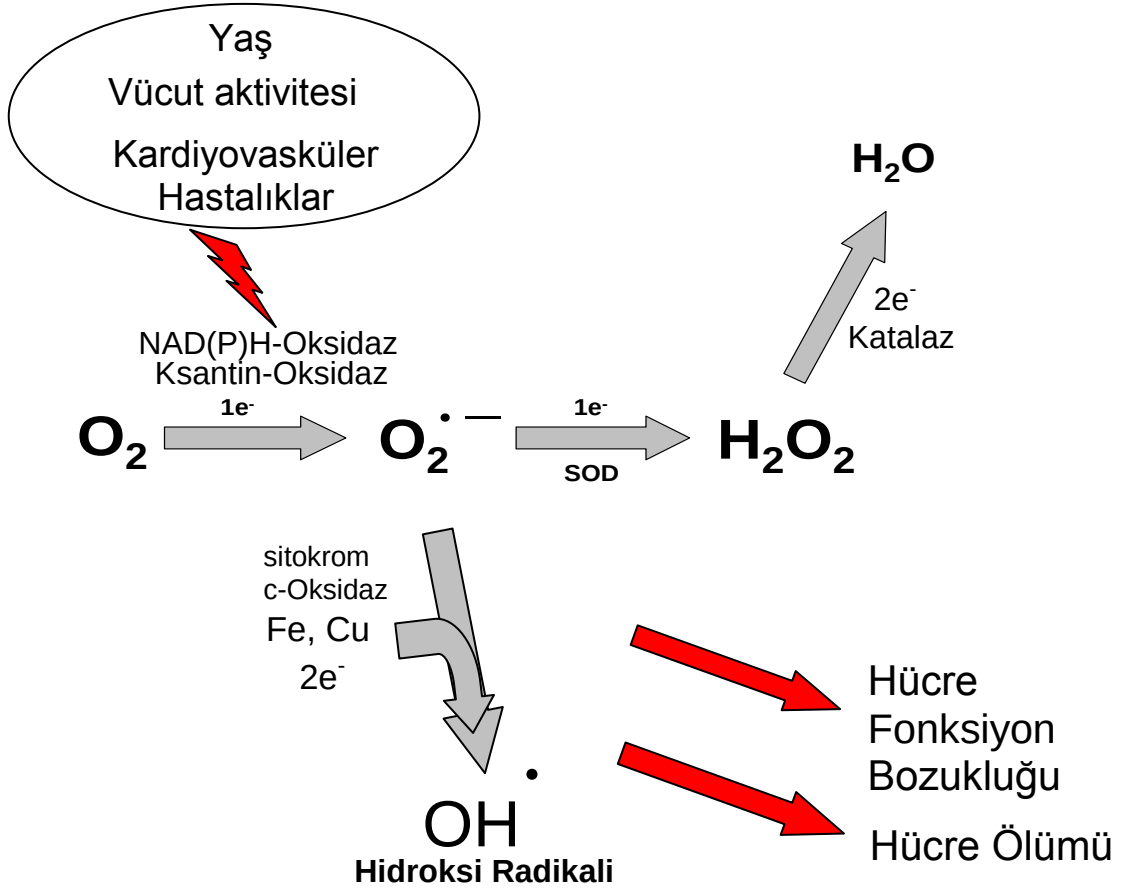
2.13.1. DNA ve Nükleik Asitlere Etkileri

Radyasyon sonucu oluşan serbest radikaller, DNA'ya etki ederek hücrede değişime neden olur ve aynı zamanda hücre ölümüne yol açarlar. Bu zararlı etki kromozom değişikliklerine sebep olur. Hidroksil radikali bazılarla kolayca tepkimeye girer. Hidrojen peroksit ise membranlardan kolayca geçip hücre çekirdeğindeki DNA'ya ulaşır ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına hatta ölümüne yol açar (Agawal ve Kale, 2001).

2.13.2. Proteinlere Etkileri

Proteinlerin serbest radikallerden etkilenme derecesi amino asit dizilişlerine bağlıdır. Protein oksidasyonu, özellikle histidin, tirozin, fenilalanin gibi amino asitlerde karbonil gruplarının oluşumu şeklindedir. Proteinlerde parçalara ayrılma ve çapraz bağlanmalar meydana gelir. Protein fonksiyonlarında (kataliz, transport, reseptör gibi) bozulmalar ve immün sistemi uyarabilecek antijenik değişiklikler oluşabilir (Simonian ve Coyle, 1996).

Serbest radikal hasarı proteinler üzerinde birikmişse veya proteinlerin belirli bölgesi üzerinde yoğunlaşmışsa hücrenin canlılığı bakımından zararlı etki yapar (Erden, 1992; Cheeseman ve Slater, 1993).



Şekil 2.4. Hücrede Serbest Radikal Oluşum Mekanizması (R.Renner, 2008)

2.13.3. Karbohidratlara Etkileri

Monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu peroksitler ve okzoaldehitler açığa çıkar. Oluşan bu okzoaldehitler proteinlere bağlanabilme özelliklerinden dolayı antimitotik (hücre çoğalmasını engelleyici) etki göstererek etki ederler. Bu olaylar kanser ve yaşlanmaya neden olabilir (Ceballos ve ark., 1992).

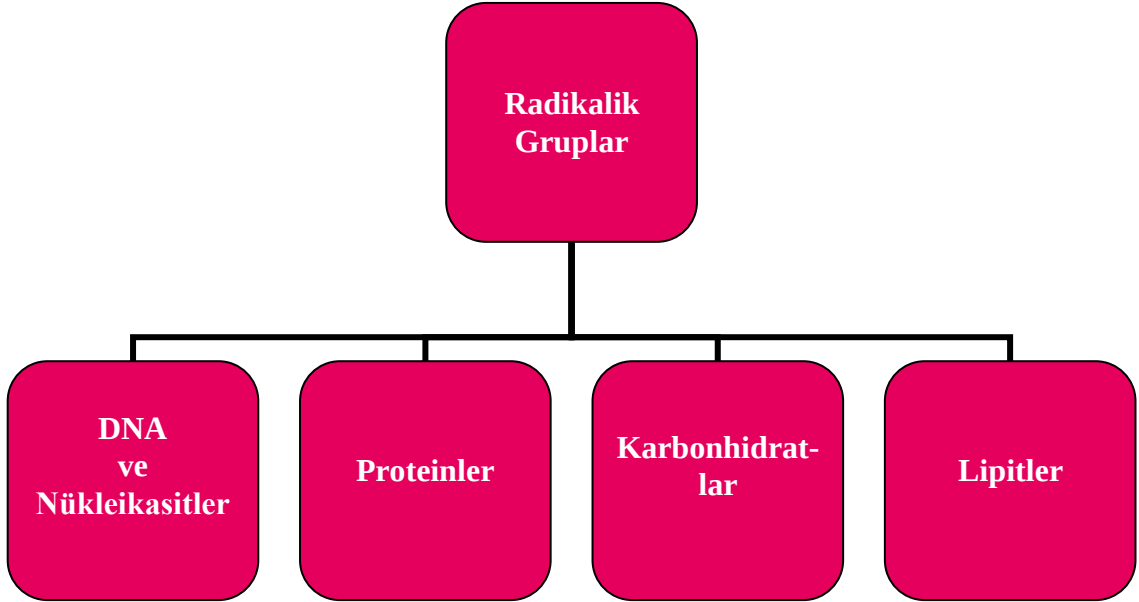
2.13.4. Lipitlere Etkileri

Serbest radikallerin biyolojik dokulardaki doymamış yağ asitlerine etkisi olan lipit peroksidasyonunun toksik olduğu bilinir. Tepkimeler zincirleme gerçekleşir ve tersinmezdir. Toksik etki lipit peroksitlerinin düzeyi ölçülerek belirlenir. Doymamış yağ asitlerindeki bir hidrojen atomunun çıkması peroksidasyonun başlamasına neden olur; böylece yağ asidi zinciri lipit radikali niteliği kazanır. Radikal dayanıksız olup, çift bağların yerini değiştirir ve oksijenle tepkimesi sonucu lipit peroksit radikaline dönüşür.

Lipit peroksit radikalleri diğer doymamış yağ asitlerine etki ederek yeni radikalleri oluşturur, bir yandan da hidrojen atomları alarak hidroperoksitlere dönüşürler (Halliwell, 1996).

Hidroperoksitlerin parçalanmasıyla lipit alkoksi radikalleri açığa çıkar. Lipit peroksidasyonu antioksidan tepkimelerle sonlandırılır ya da devam ederek daha ileriye gider. Lipit peroksidasyonu Fe ve Cu gibi redoks yapan metaller varlığında artar.

Lipit peroksidasyon ürünleri olarak açığa çıkan lipit peroksitleri, hidroperoksitleri membran yapısına direkt olarak, diğer hücre bileşenlerine ise aldehit üreterek dolaylı olarak zarar verir. Bu da pek çok hastalığın ve doku hasarının oluşmasına neden olur. Membran yapısının bozulması sonucu malondialdehit oluşur (Ansari ve ark., 1989).



Şekil 2.5. Serbest Radikallerin Etkilediği Biyolojik Moleküller

2.14. Antioksidan Sistemler

Hücre ve dokular, radikal ürünleri ve tepkimelerini inhibe eden bir sisteme sahiptir. Radikallerle oldukça ivedi tepkimelere girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler antioksidan olarak tanımlanır (Aslan ve ark., 1995).

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile

etkisiz hale getirilirler. Hücre dışı savunma, albümin, bilirubin, transferin, seruloplazmin, ürik asit gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyonS-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (Halliwell, 1995).

2.15. Oksidatif Stresin Belirlenmesinde Kullanılan Analitik Yöntemler

Serbest radikallerin; kısa yarı ömürleri ve reaktif olmaları nedeniyle belirlenmelerinde güçlükler ortaya çıkmaktadır. Bu sebepten oksidatif strese yol açan serbest radikallerin tespit edilmesinde oluşturdukları son kararlı ürünlerin izlenmesi tercih edilir. Bu ürünlere işaretleyici moleküller denmektedir (http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67f1HRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf, 12.06.2011).

Oksidatif stres ve antioksidatif kapasite işaret molekülleri Çizelge 2.2, Çizelge 2.3, Çizelge 2.4 ve Çizelge 2.5 de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. DNA Hasarı İşaret Molekülleri
(http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67f1HRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf, 12.06.2011)

DNA Hasarı İşaret Molekülleri		
İşaret Molekülü	Örnek Materyal	Metot
■ 8-Okso-7,8dihidro-3-Deoksiguanosin	İdrar, İzole Hücreler	HPLC-EC, GC-MS, HPLC-MS, HPLC-MS-MS
■ 8-Oksodihidroguanin	(Örn; Lenfositler)	
■ Eteno Bileşikleri	İdrar	HPLC-MS-MS, 32P- Postlabelling/HPLC
■ Okside Pürin-Pirimidin Bazları	İzole Hücreler (Örn; Lenfositler)	Comet-Assay

Çizelge 2.3. Protein Hasarı İşaret Moleküller

(http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67flHRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf, 12.06.2011)

Protein Hasarı İşaret Molekülleri		
İşaret Molekülü	Örnek Materyal	Metot
■ Karbonil Gupları	Plazma/Serum, Doku	DNPH-Türevlendirme takip eden HPLC veya İmmünokimyasal Dedektör
■ Okside Tiyol Gupları, ■ Proteinlerde Metioninsülfoksit Kalıntıları	Doku, İzole Hücreler, Plazma/Serum	Türevlendirme + Spektrofotometri
■ Tirozin Dimerleri ■ Tirozin Oksidasyonu	Plazma/Serum, İdrar, Doku, Aterosklerotik Plak	Floresans Dedektörlü HPLC, GC-MS
■ Hidroksillenmiş Valin ve Lösin	Plazma	Türevlendirme, Floresans dedektörlü HPLC, GC-MS, İmmün Yöntemler

Çizelge 2.4. Lipit Hasarı İşaret Molekülleri

(http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67flHRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf, 12.06.2011)

Lipit Hasarı İşaret Molekülleri		
İşaret Molekülü	Örnek Materyal	Metot
■ Lipithidroperoksit	Plazma/Serum, Serum Fraksiyonları, Doku	Kolon Sonu Türevlendirmeli Kemilüminesans Dedektörlü HPLC
■ İzoprostan	İdrar, Plazma/Serum, Serum Fraksiyonları, Doku, Yoğunlaşmış Nefes	GC-MS, İmmün Yöntemler, HPLC-MS-MS
■ Malondialdehit	İdrar, Plazma/Serum, Serum Fraksiyonları, Doku	UV-Vis veya Floresans Dedektörlü HPLC, GC-MS
■ Okside Olmuş Ldl	Serum Fraksiyonları	Eliza
■ Etan, ■ Pentan	Nefes	GC, Cavity-Leak-Out Spektroskopi

Çizelge 2.5. Antioksidatif Kapasite İşaret Molekülleri
(http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67flHRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf,
12.06.2011)

Antioksidatif Kapasite İşaret Molekülleri		
İşaret Molekülü	Örnek Materyal	Metot
■ Endojen Antioksidanlar; Süperoksitdismutaz (Sod), Katalaz, Glutasyonperoksidaz, Toplam Tiyo, Glutasyon, Glutatyondisülfidredüktaz	Plazma/Serum, Serum Fraksiyonları, Doku	Enzimatik Aktivite Ölçümleri, İmmünokimyasal Metotlar, Türevlendirme; Fotometri veya HPLC
■ Eksojen Antioksidanlar; Tokoferoller, Karotinoidler, Askorbik Asit, Eser Elementler (Se, Zn)	İdrar, Plazma/Serum, Serum Fraksiyonları, Doku	HPLC, AAS
■ Toplam Antioksidan Kapasite; ■ TRAP ■ ORAC ■ TEAC ■ FRAP ■ PCL	İdrar, Plazma/Serum, Serum Fraksiyonları, Doku	Florimetri, Spektrometri, Kemilüminesans

2.16. 3-Nitrotirozin

3-Nitrotirozin, oksidatif hasar belirlenmesinde işaret molekülü olarak kullanılmaktadır. Şekil 2.6'da 3-nitrotirozinin kimyasal yapısı verilmiştir.

3-NT'in tirozin molekülünden birkaç olası mekanizma ile oluşmaktadır. Örneğin tirozin ve proteinle birleşik tirozinin peroksinitröz asit ve diğer aktif azot türleri ile tepkimesi sonucunda oluşabilir. Şekil 2.7'de 3-nitrotirozinin oluşum mekanizması gösterilmiştir.

Şekil 2.6. 3-nitrotirozinin Kimyasal Yapısı

Şekil 2.7. 3-nitrotirozinin Oluşum Mekanizması
(http://www.kinesis.co.uk/applications/70-3993P_3-Nitrotyrosine.pdf, 18.06.2012)

2.17. 3-Nitrotirozinin Kimyasal Özellikleri

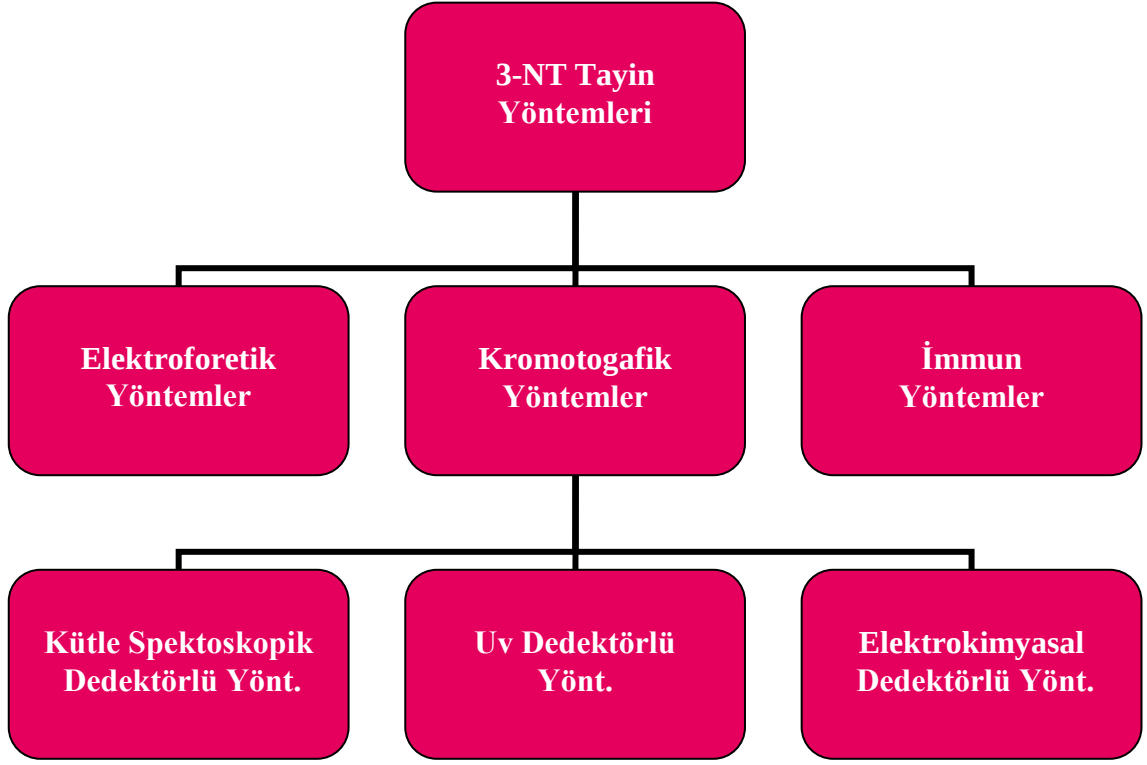
3-nitrotirozin için kaynaklarda verilen pKa değerleri Çizelge 2.6’da sunulmuştur. Bu değerler amino asitlerin, özellikle tirozinin pKa değerlerine yakın değerlerdir. (Maeso ve ark., 2004)

Çizelge 2.6. 3-Nitrotirozin ve Tirozinin pKa Değerleri

	pKa1	pKa2	pKa3
3-NT	2,20	7,20	9,11
Tirozin	2,20	9,11	10,07

2.18. 3-Nitrotirozin Tayin Yöntemleri

Literatürde bildirilen 3-nitrotirozin tayin yöntemleri özetlenerek şekil 2.8’de şematik olarak verilmiştir (Türköz Acar, 2008).



Şekil 2.8. 3-nitrotirozinin Tayin Yöntemleri Sınıflandırılması

2.19. Nitrit ve Nitrat

Serbest radikal olan NO birçok biyolojik tepkimeye girer, NO, O₂ ile tepkimeye girerek, otooksidasyonu sonucu inaktif metabolitlerine dönüşmektedir. Bunlar nitrit ve nitrattır. Nitrit/nitrat, nitrik oksit-L-arginin yolunun kararlı metabolitleridir. Bu metabolitlerin biyolojik sıvılarda ölçümünün, NO endojen üretiminin işaretleyicisi olacağından, klinik belirleyici olabileceği düşünülmüş ve özellikle son on yılda bu konu üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır (Marzinzig ve ark., 1997). Bu çalışmalar daha çok serebrospinal sıvıda ve sinovyal sıvıdadır. Peritoneal ve amniyotik sıvıda yapılmış araştırmalar da mevcuttur. Serebrospinal sıvıda yapılan bir çalışmada nitrit/nitrat değerleri tüberküloz menenjitte aseptik menenjitte göre daha yüksek bulunmuştur. Başka bir çalışmada ise romatoid artritte sinoviyal sıvıda NO üretiminin arttığı tespit edilmiştir (Qureshi ve ark., 1998, Borderie ve ark., 1999).

Biyolojik sıvılardaki nitrit ve nitrat tayininde en sık, Griess reaktifinden yararlanılarak uygulanan kolorimerik yöntem kullanılmaktadır (Tsikas, 2000).

Tükürük, plazma ve idrarda elektrokimyasal dedektörlü HPLC yöntemi denenmiş. Tükürükte iletkenlik dedektörlü iyon kromatografisi yöntemi geliştirilmiş. Ayrıca gaz kromatografisi kütle spektrometrisi ile nitrat ve nitrit tayini gerçekleştirilmiştir. Kapiler elektroforez yöntemi ile küçük anorganik anyonlar hızlı ve etkili bir şekilde ayrılabilirdiğinden giderek kullanımı yaygınlaşmaktadır. Nitrat ve nitrit için geliştirilmiş kapiler elektroforez tayin yöntemlerinin çoğu yüksek pH yürütücü tamponları ile ayırmayı ve tayini öngörmektedir (Pannala ve ark., 2003; Helaleh ve ark., 2000; Tsikas, 2000; Andrei, 2008; Zunić, 1999).

2.20. Beyin Omurilik Sıvısı (BOS)

BOS Türkçe (Beyin Omurilik Sıvısı) teriminin kısaltılmışıdır. İngilizcede CSF (Cerebro Spinal Fluid) teriminin kısaltılmasıdır.

BOS, koroid pleksuslardan salgılanan, subaraknoidal aralık ve ventriküllerde bulunan, araknoid villus yapılardan ve lomber bölgedeki damarlardan kana geri dönen plazma ultrafiltratıdır (<http://www.genbilim.com/content/view/7151/33>, 16.05.2012).

Diğer bir deyişle, BOS, beyin ve omuriliği dış travmalardan koruyan, beyin ile kafatası arasındaki bir sıvıdır. Bu sıvı beyinden çıkan ve omuriliğimizin içerisinde kaslara taşınan sinirleri de dışarıdan gelecek darbelere karşı korumaktadır (<http://www.ms-life.org/bos-nedir/bos-nedir.html>, 14.05.2012).

2.21. BOS'un Genel Özellikleri

- pH = 7,35-7,7
- Yoğunluk = 1006-1008
- Osmolalitesi= 289 mOsm/L
- Yaklaşık miktarı= Çocuklarda 60-100 mL, yetişkinlerde 100-160mL kadardır.
- Yapım hızı= 0, 35mL/dk veya 500 mL/gündür.
- Sentez yeri: Ventriküllerdeki koroid pleksuslarda sentezlenir (az miktarda beyin damarı çevresinde de oluşur).
- Eliminasyon: Duradaki araknoid villuslarla (beyin yüzeyindeki büyük toplar damarlara has doku) emilerek venöz sinüslere drene olur. Bunun 4/5'i beyin çevresinde, 1/5'i omurilik etrafındadır. BOS günde 3-4 kez yenilenmektedir.

2.22. BOS'un Bileşimi

BOS için aşağıda referans değerleri verilmiştir:

Protein	0.15-0.45 g/L
Elektrolitler	
Osmolite	280-300 mmol/L
Sodyum	135-150 mmol/L
Potasyum	2,6-3,0 mmol/L
Klor	115-130 mmol/L
Karbon dioksit	20-25 mmol/L
Kalsiyum	1.00-1.40
Magnezyum	1,2-1,5 mmol/L
Laktat	1,1-2,4 mmol/L
pH	7,28-7,32
PCO ₂	44-50 mm Hg
PO ₂	40-44 mm Hg
Diğer Bileşenler	
Keratin	50-110 umol/L
Glikoz	2,8-4,4 mmol/L
Demir	0,2-0,4 umol/L
Fosfor	0,4-0,6 umol/L
Üre	3,0-6,5 mmol/L

(http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html, 14.05.2012)

2.23. BOS'un Fonksiyonları

- Beyin dokusuna mekanik destek sağlayarak fiziksel travmalardan korur,
- Beyini akut kan basıncı değişikliklerine karşı koruyarak sabit tutulmasına katkıda bulunur,
- Merkezi sinir sisteminin metabolik atıklarını örneğin laktat ve karbondioksit uzaklaştırır.

- Biomoleküllerin intraseebral olarak taşınmasını sağlar,
- Merkezi sinir sistemini patojen saldırılara karşı korur,
- Beyin çevresindeki kimyasal ortamı dengede tutar (<http://www.ms-life.org/bos-nedir/bos-nedir.html>, 01.02.2012; Mark, 1995).

2.24. Kullanılan Yöntemler

Bu tez kapsamında voltametri ve kapiler elektroforez teknikleri kullanılarak geliştirilen yöntemlerden yararlanılmıştır. Bu yöntemlerle ilgili temel bilgiler kısaca aşağıda sunulmuştur.

2.24.1. Voltametri

Bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altında, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemi kapsar. Genel olarak voltametride kullanılan çalışma elektrotları, polarizasyonu artırmak için, yüzey alanları çoğunlukla birkaç milimetre kare ve bazı uygulamalarda ise birkaç mikrometre kare veya daha küçük mikroelettrotlardır.

Tarihsel olarak voltametri Çekoslovak kimyacı Jaroslav Heyrovsky tarafından 1920'lerin başında bulunan voltametrinin özel bir tipi olan polarografi den geliştirilmiştir (Skoog ve ark., 1998).

Voltametrinin çalışma prensibi; elektrokimyasal hücrede, polarize olabilen bir çalışma (indikatör) elektrodu ile karşılaştırma (referans) elektrodu arasına değeri zamanla değiştirilen potansiyel uygulanması sonucu ortaya çıkan akımın, üç elektrotlu hücrelerde çalışma elektrodu ile yardımcı (karşıt) elektrot, iki elektrotlu hücrelerde ise çalışma elektrodu ile karşılaştırma elektrodu arasından ölçülmesi ilkesine dayanır (Yıldız ve Genç, 1993; Bond, 1980).

Voltametri, inorganik kimyacı, fizikokimyacı ve biyokimyacılara, çeşitli ortamlarda meydana gelen yükseltgenme-indirgenme olaylarının, yüzeylerdeki adsorpsiyon olaylarının ve kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrot yüzeylerindeki elektron aktarım mekanizmalarının temel çalışmalarını kapsayan, analitik olmayan amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır.

Elektrokimyasal hücre voltametrik aletin özüdür. Ölçüm kabı, Çalışma (ÇE), Karşılaştırma (KE), Karşıt (AE) olmak üzere üç elektrottan oluşur.

2.24.1.1. Civa Elektrot

Cıva, çalışma elektrot malzemesi olarak oldukça uygun bir seçimdir. Çünkü katodik potansiyel aralığını genişleten (katı elektrot malzemelerine göre) yüksek bir hidrojen aşırı gerilimine sahiptir ve yüksek tekrarlanabilirlik, yenilenebilirlik ve düzgün yüzey gibi özelliklere de sahiptir. Cıva kullanımının dezavantajları ise, sınırlı anodik bölgesi (cıvanın yükseltgenmesine bağlı olarak) ve toksik etkisidir (Wang, 2000).

2.24.1.2. Voltamogram

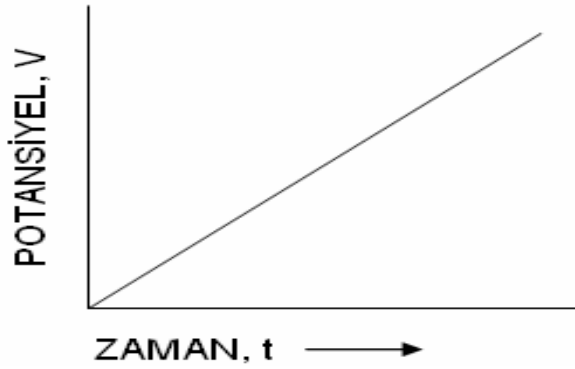
Voltamogramlar (voltametrik dalgalar) uygulanan voltaja karşı (E_{uyg}), oluşan akımın (i) ölçülmesiyle elde edilen grafiklerdir (Skoog ve ark., 1998).

2.24.2. Voltametrinde Kullanılan Uyarma Sinyalleri

Voltametrinde bir mikro elektrot içeren elektrokimyasal hücreye değiştirilebilir potansiyel uyarma sinyali uygulanır. Bu uyarma sinyali metodun temelini teşkil eden karakteristik akım cevapları oluşturur. En çok kullanılan sinyaller, doğrusal taramalı, diferansiyel puls, kare dalga ve üçgendir. Bunlara ait grafikler Şekil 2.9, 2.10, 2.11 ve 2.12’de verilmiştir (Skoog ve ark., 1998).

2.24.2.1. Doğrusal Taramalı Voltametri

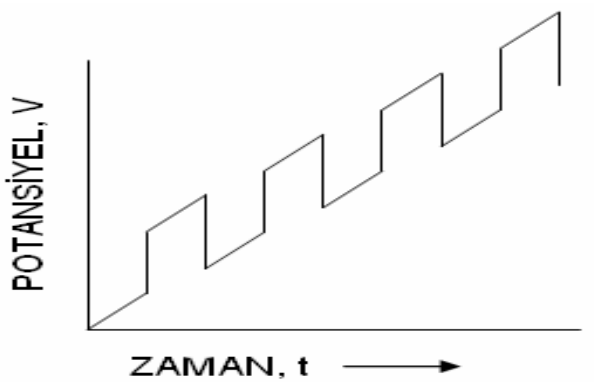
İlk ve en basit voltametrik yöntemler, çalışma elektrodunun potansiyelinin 2–5 mV/s ‘lık tipik bir hızla arttırıldığı ya da azaltıldığı doğrusal taramalı yöntemlerdir. Genellikle mikroamper cinsinden akım, çalışma elektroduna uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak grafiğe geçirilir. Buna voltamogram denir. Voltametrinde, hücreden geçen akım devamlı olarak gözlenir (Skoog ve ark., 1998).



Şekil 2.9. Doğrusal Taramalı Voltametri Sinyali

2.24.2.2. Diferansiyel Puls Voltametri

Diferansiyel puls voltametrisi, eser miktardaki organik ve anorganik türlerin analizinde oldukça kullanışlı bir tekniktir. Genellikle cıva damla elektrot ile birlikte kullanılır. Bu yöntemde, sabit büyüklükteki pulsler elektroda damlanın tam son anında uygulanır (Skoog ve ark., 1998).

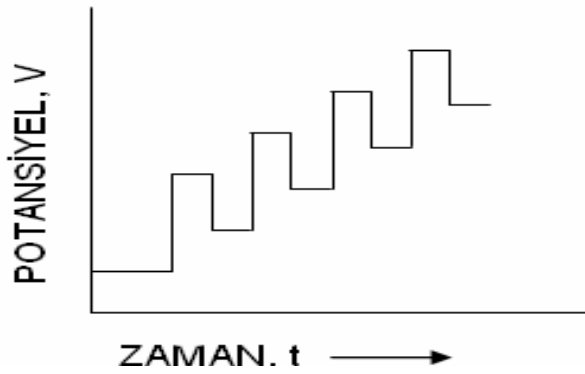


Şekil 2.10. Diferansiyel Puls Voltametri Sinyali

2.24.2.3. Kare Dalga Voltametri

Kare-dalga voltametrisi için bir potansiyel eğrisi üzerinde hem ileri yönde hem de geri yönde pulsler uygulanır. Bu pulslerle birlikte akım da ileri ve geri yönde olmak üzere iki yönde örneklenir. Her bir voltaj pulsundan sonra akım bileşenlerinden faradaik olmayan akım zamanla faradaik akımla birlikte artar. Puls ömrünün sonuna doğru her iki bileşende de azalma olur fakat faradaik olmayan akım, faradaik akımdan daha hızlı

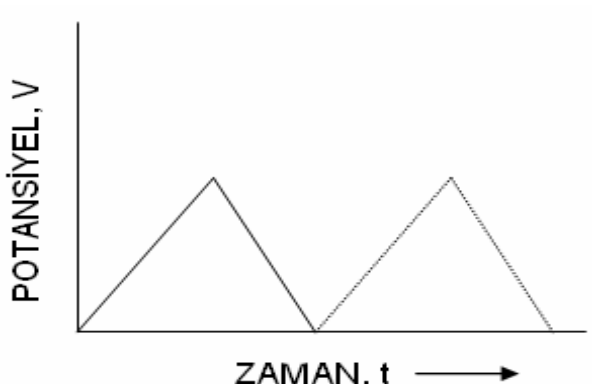
azalır. Böylece faradaik olmayan akım içermeyen bir zaman boyunca ölçümlerin yapılması sağlanır. Pulsu dalga şekli nedeniyle aynı analit türlerinin indirgenme ve yükseltgenmesi tekrarlandığından duyarlılık zenginleşir. Kare-dalga voltametrisi hızlı bir tekniktir, bu nedenle kromatografik dedektör olarak kullanılabilir. Bu yöntem kullanıldığında gözlenebilme sınırı 10^{-7} - 10^{-8} M aralığında sağlanır (<http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week12.pdf>, 12.05.12).



Şekil 2.11. Kare Dalga Voltametri Sinyali

2.24.2.4. Dönüşümlü Voltametri

Dönüşümlü voltametri, rutin kantitatif analizlerde kullanılmadığı halde, özellikle organik ve metal organik sistemlerde yükseltgenme/indirgenme işlemlerinin mekanizma ve hız çalışmaları için önemli bir araçtır. Bu yöntem, normal olarak elektrokimyasal olarak belirtilebilen bir sistemin araştırılması için seçilen ilk tekniktir. Genellikle dönüşümlü voltamogramlar yükseltgenme/ indirgenme tepkimelerinde ara ürünlerin varlığı ile ilgili olacaktır (Skoog ve ark., 1998).



Şekil 2.12. Dönüşümlü Voltametri Sinyali

2.24.2.5. Adsorptif Sıyırma Voltametri

Bu yöntemde yaygın elektrot olarak asılı civa damla elektrodu kullanılır. Elektrot analitin karıştırılan bir çözeltisine bir süre daldırılır. Elektrot yüzeyine analitin birikmesi elektrolitik olarak değil, fiziksel adsorbsiyonla meydana gelir. Yeterince analit biriktikten sonra, karıştırma işlemi kesilir ve birikmiş madde doğrusal taramalı veya puls voltametrik ölçümlerle tayin edilir (Skoog ve ark., 1998).

2.24.3. Elektroforez

Doğru akımın uygulandığı bir tampon çözeltide yüklü taneciklerin diferansiyel göç hızlarına dayanan ayırma yöntemidir. Bu ayırma yöntemi ilk olarak İsveçli kimyacı Arne Tiselius tarafından serum proteinleri üzerinde çalışırken bulunmuş ve bu çalışmasından dolayı kendisi 1948'te Nobel ödülü ile ödüllendirilmiştir.

Elektroforez birçok zor analitik ayırma problemlerine uygulanmaktadır; inorganik anyon ve katyonlar, amino asitler, kateşolaminler, ilaçlar, vitaminler, karbonhidratlar, peptidler, proteinler, nükleik asitler, nükleotidler, polinükleotidler ve çeşitli başka türler.

Elektroforetik ayırma, ince bir tüp içindeki veya düz gözenekli bir destek ortamındaki (örneğin kâğıt veya yarı katı jel) sulu bir tampon çözeltiye numunenin küçük bir bant halinde enjeksiyonu ile gerçekleştirilmektedir. Tampon çözeltiye, her iki ucundaki elektrotlar vasıtasıyla, yüksek bir doğru akım potansiyeli uygulanır. Uygulanan bu potansiyel, numunedeki iyonlarının elektrotlardan birine veya diğerine göç etmesini sağlar. Numunedeki taneciklerin göç hızları, taneciklerin yüküne ve büyüklüğüne bağlıdır. Böylece, numunedeki çeşitli analitlerin ayrılması yük/boyut oranlarındaki farklara dayanır. Bu oranın büyük olması, elektrik alanda ilgili iyonun daha hızlı hareket etmesini sağlar (Skoog ve ark., 1998).

2.24.3.1. Elektroforez Türleri

1. Kâğıt Elektroforez

2. Selüloz Asetat Elektroforez

3. Jel Elektroforez

a. Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE)

b. Agaroz Jel Elektroforez

4. Kapiler Elektroforez

(<http://www.duzen.com.tr/workshop/2006/cagatay.pdf>, 15.05.2012).

2.24.4. Kapiler Elektroforez

Geleneksel tabaka elektroforez çok kullanılmış olmasına ve halen de çok kullanılmasına rağmen, bu tip elektroforetik ayırma yavaş, işçiliği fazla, otomasyonu zor ve çok kesin kantitatif bilgiler vermemektedir. 1980'lerin ortalarından sonlarına kadar, kapiler tüplerde yapılan elektroforez ayırıştırma ve uygulamalarında, hızlı bir artış olmuş ve aynı zamanda birkaç ticari elektroforez cihazı piyasaya sunulmuştur. Kapiler elektroforez oldukça hızlı ve çok küçük hacimdeki 0,1 ile 10 nL numunelerde yüksek ayırma gücüne sahiptir (Skoog ve ark., 1998).

Kapiler elektroforez türleri;

-Kapiler Zon Elektroforez

-Kapiler Jel Elektroforez

-Kapiler İzotakoforez

-Kapiler İzoelektrik Odaklama

2.24.4.1. Kapiler Zon Elektroforez

Kapiler zon elektroforez'de (CZE) tampon çözeltinin bileşimi ayırma bölgesinin her yerinde aynıdır. Uygulanan potansiyel ile karışımı oluşturan parçacıklar kendi iyonik hareketliliklerine göre zonlara ayrılırlar. Burada zonlar tamamen ayrılabilirler gibi kısmen örtüşebilirler de. Tamamen ayrılmış zonlar arasında tampon vardır.

Küçük iyonların elektroforetik ayrılmasında, analit iyonlarını elektroozmotik akış yönünde hareket ettirmek için gerekli zamanın küçük olması yöntemin en iyi

özelliğidir. Bundan dolayı katyon ayırmalarında kapilerin iç kısmına herhangi bir işlem yapılmaz ve elektroozmotik akış ile katyonların hareket yönü katoda doğru olur. Anyonların analizinde ise; kapilerin iç yüzeyi alkil amonyum tuzları ile muamele edilerek elektroozmotik akış yönü ters çevrilir.

Çeşitli küçük moleküllü iyonik sentetik herbisit, pestisit ve ilaçlar veya bunların iyonlaşabilen türevleri CZE ile ayrılabilirler. Aynı şekilde proteinler, amino asitler ve karbonhidratların hepsi kısa sürede CZE ile ayrılabilirler. Nötral karbonhidratlar da ise, negatif yüklü borat kompleksleri oluşturularak ayırma yapılır (Skoog ve ark., 1998).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Fosforik asit (H_3PO_4 , Merck), Sodyum klorür (NaCl , Merck), Potasyum klorür (KCl , Merck), Kalsiyum klorür ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Tekkim), Magnezyum klorür ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck), Sodyum bifosfat ($\text{NaH}_2\text{P}_2\text{O}_7$, Merck), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4 , Merck), Cıva (Hg , Merck), Albümin (Sigma), 3-Nitrotirozin (Sigma), HCl (36–38 % w/w, Merck), Sodyum hidroksit (NaOH , Merck), Sodyum nitrat (NaNO_3 , Carlo Erba), Sodyum nitrit (NaNO_2 , Carlo Erba)

Tüm sulu çözeltilerinin hazırlanmasında Millipore Simplicity cihazından elde edilen saf su kullanılmıştır.

Kapiler elektroforezde kullanılan tüm çözeltiler 0,45 μm por genişliğindeki membran filtreden geçirildi (Millex, Syringe Driven Filter Unit).

3.2. Tampon Hazırlanışı

Voltametrik ve kapiler elektroforetik çalışmalar için 100 mM derişimde fosfat tamponu kullanılmıştır. Tampon çözeltiler derişik fosforik asitten (14,82 M) suyla seyreltilerek hazırlanmıştır. Doymuş NaOH çözeltisi kullanarak, voltametrik destek elektrolitin pH'ı 7,24'e; kapiler elektroforez yürütücü tamponun pH'ı 3,5'a ayarlanmıştır.

3.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

3-Nitrotirozin stok çözeltisi için, 0,11 g katı 3-nitrotirozin tartıldı ve 100 ml'lik balonjoje de $4,86 \times 10^{-3}$ M derişimde hazırlandı.

Nitrat ve nitrit iyonu stok çözeltileri, 5 g/L'lik sodyum tuzlarının suyla seyreltilmesi ile ayrı ayrı hazırlandı. Günlük çözeltiler ise farklı derişimlerde bu stok çözeltilerden karışımları halinde kullanıldı.

3.4. Sentetik BOS

Voltametrik çalışmalarda 3-nitrotirozin ve kapiler elektroforetik çalışmalarda nitrat ve nitrit iyonları için kalibrasyon eğrilerinin hazırlanmasında sentetik BOS kullanılmıştır.

3.5. Sentetik BOS'un Hazırlanışı

İki farklı çözelti daha sonra birbirine karıştırılmak üzere hazırlandı. Birinci çözeltiyi hazırlamak için 1,732 g NaCl, 0,0448 g KCl, 0,0412 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve susuz 0,0763 g MgCl_2 birbirine karıştırılır ve 100 mL'ye tamamlandı.

İkinci çözelti için 22,66 mg Sodyumbifosfat yedisu ile $5,4 \cdot 10^{-3}$ g Sodyumdihidrojenfosfat birbirine karıştırılıp 100 mL'ye tamamlandı.

Hazırlanan her iki çözelti, 1:1 oranında karıştırılıp üzerine 0,3 g/L albümin ilave edilerek sentetik BOS çözeltisi elde edildi

(http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html, 14.05.2012).

3.6. Kullanılan Cihazlar

Elektrokimyasal denemeler, bilgisayar kontrollü Gamry cihazı (Reference 600) (ABD) ile yapılmıştır. Sistem bir Ag/AgCl, 3M KCl karşılaştırma elektrodu ve bir platin karşıt elektrodu içermektedir. Çalışma elektrodu olarak asılı cıva damla elektrodu (HMDE), statik cıva damla elektrodu (SMDE) ve damlayan cıva elektrodun (DME) basit bir yapıda birleştirildiği çok amaçlı bir elektrot kullanılmıştır. pH ölçümü Cyberscan 2100 ile yapılmıştır. Tüm işlemler için Millipore Simplicity® UV su saflaştırıcı sistemden elde edilen ultra saf su kullanılmıştır.

Kapiler elektroforetik denemeler Agilent marka bir 3D kapiler elektroforez cihazı ile yapılmıştır. Detektör olarak Diode Array Dedector olarak isimlendirilen çoklu ışın kullanan UV detektör kullanılmıştır. Kapiler elektroforetik analizler için 50 µm iç çaplı fused silika kapiler kolonlar kullanılmıştır.

Lumbar beyin omurilik sıvısı örnekleri OMÜ nöroloji anabilim dalından temin edilmiştir. Nörologlar tarafından muayene edilen 11 hastadan teşhis amacıyla alınmış

olan örnekler bu amaçla işlemleri tamamlandıktan sonra etik kurul kararı ile bize iletilmiştir. Başka bir deyişle BOS örnekleri bu çalışma için alınmamıştır. Kullanılana kadar -20 C’de bekletilmişlerdir.

3.7. Voltametri Yönteminde Uygulanan Deneysel İşlem

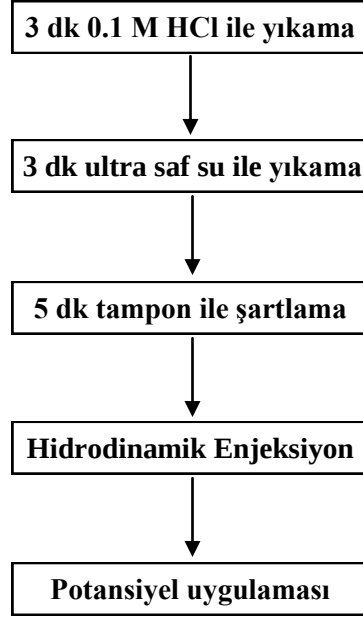
Bu işlem için tampon olarak derişimi 0,1 M olan ve pH’ı 7,24 olarak ayarlanan fosfat tamponu kullanılmıştır. Voltametrik hücreye konan 4 mL destek elektrolit çözeltisine 1 mL sentetik veya gerçek BOS çözeltisi eklenerek, 150 s saf azot gazı geçirilmiştir. Bu çözeltinin voltamogamı alındıktan sonra 3-nitrotirozin standart çözeltisinden ilaveler yapılmasının ardından 50 s daha azot gazı geçirilerek tekrar voltamogamlar kaydedilmiştir. Kullanılan tüm kare dalga ve diferansiyel puls tekniklerinde, adsorptif sıyırma uygulaması yapılmıştır. Voltametri yönteminde uygulanan deneysel koşullar ise; biriktirme süresi 20 s, başlangıç potansiyeli, potansiyel adımı 5 mV, -0,15 V, bitiş potansiyeli -0,8 V, puls süresi 0,1 s, puls boyutu 50 mV olarak seçilmiştir.

3.8. Kapiler Elektroforez Yönteminde Kullanılan Deneysel İşlem

Kapiler elektroforezde ayırma için uygulanan potansiyel -20 kV’dur. Sıcaklık 27⁰ C’a ayarlanmıştır. Numuneler hidrodinamik enjeksiyon ile 50mbar basınçla 75s süre ile verilmiştir.

Kalibrasyon eğrisinin hazırlanmasında kullanılan karışımlar; 600 µL sentetik BOS çözeltisi, 400 µL yürütücü tampon ve uygun şekilde seyreltilmiş NaNO₂ ve NaNO₃ standart çözeltilerinin 1,5 mL’ye su ile tamamlanmasıyla hazırlanmışlardır. Gerçek BOS örnekleri ise, oda sıcaklığında çözüldükten sonra kalibrasyon çözeltilerine benzer oranda tampon çözelti ve su ile seyreltilerek analiz edildi.

Analizde kullanılan kolon her bir analiz öncesinde Şekil 3.1’de sırası verilen yıkama işleminden geçirilmiştir.



Şekil 3.1. Kapiler elektroforezde analiz öncesi ve analiz uygulamalarını gösteren şema

3.9. Cihazlardan Alınan Cevapların Değerlendirilmesi

Voltametri cihazında alınan akım ölçümlerinde pik alanı ve pik yüksekliği seçeneklerinin yanı sıra türevleri alınarak sonuçlar kıyaslanmıştır.

Kapiler elektroforez cihazında da elde edilen elektroforegamlarda düzeltilmiş pik alanları (pik alanı/ pik zamanı) cevap olarak verilmektedir.

3.10. Geri Alınabilirlik Çalışmaları

Kare dalga ve diferansiyel puls yöntemleriyle yapılan çalışmaların geri alınabilirlikleri hesaplanmıştır. Bu amaçla başlangıçta belli miktarda 3-nitrotirozin standardı eklenmiş ve ölçümler sonucu elde edilen kalibrasyon eğrisinden, geri alınabilirlik yüzde olarak hesaplanmıştır.

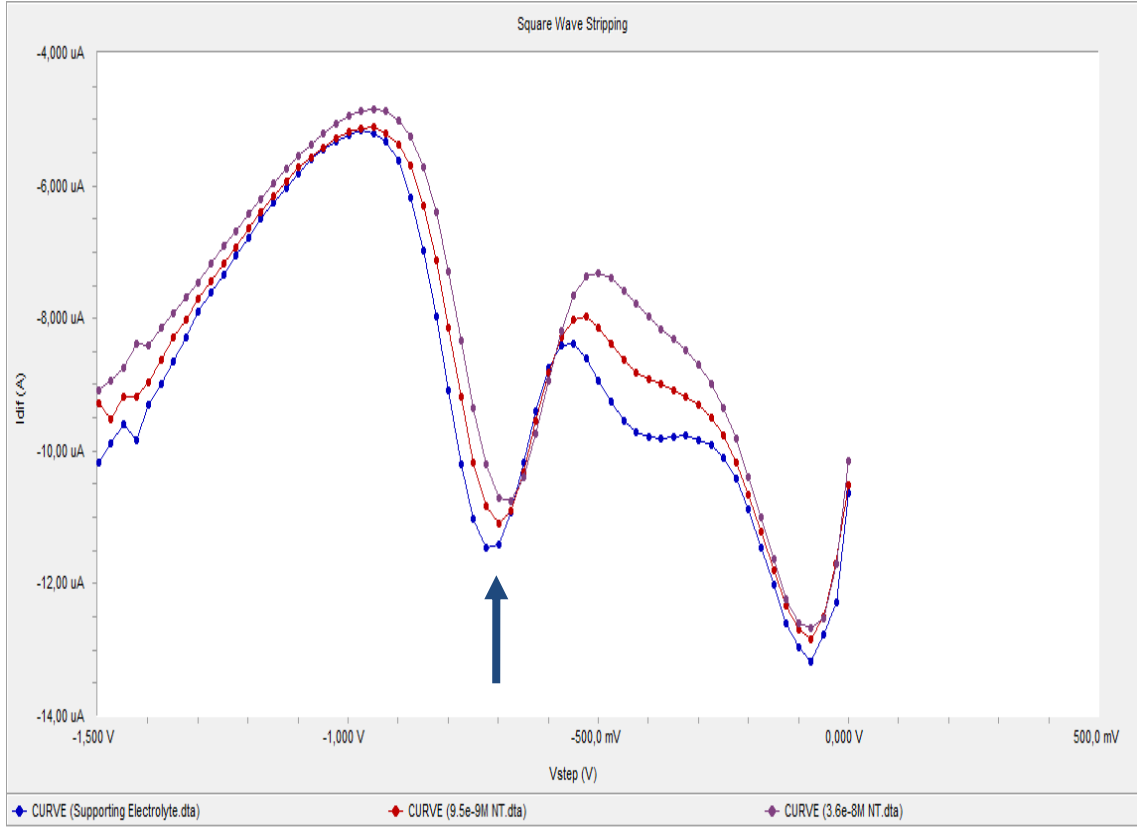
4. BULGULAR

Hem voltametrik yöntemle hem de kapiler elektroforetik yöntemle yapılan ölçümlerde, gözlenebilme sınırı ve tayin sınırı değerleri ayrı ayrı hesaplanmıştır. Buna göre gözlenebilme sınırı (LOD), örnekte ölçülebilen (sinyal olarak okunabilen) fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktarı ifade etmektedir ve kalibrasyon eğrisinin eğiminin standart sapmasının üç katının, eğime bölünmesiyle elde edilir (Skoog ve ark., 1998).

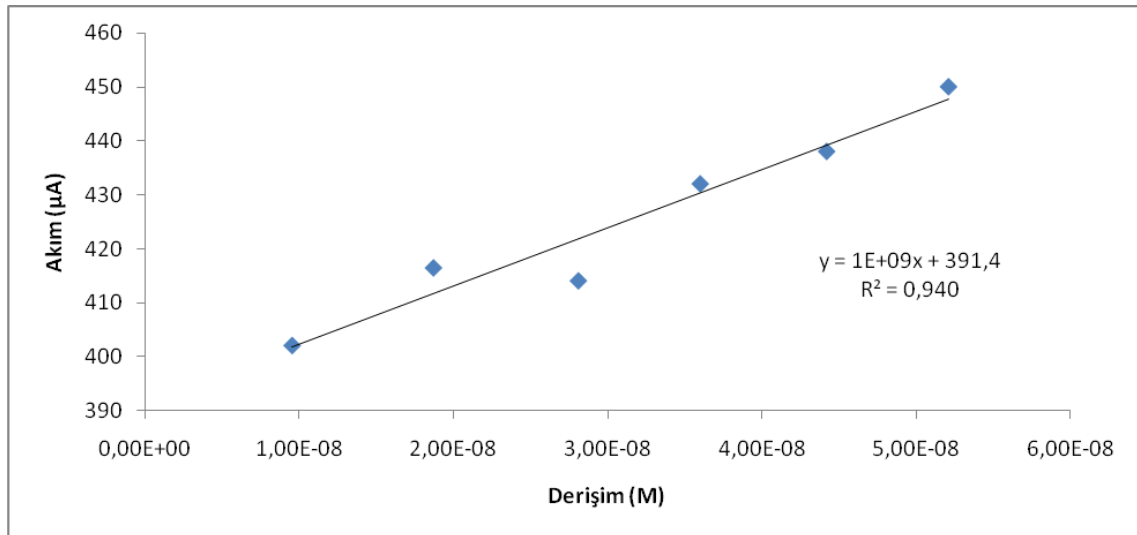
Tayin sınırı (LOQ) ise, analitin kabul edilebilir düzeyde doğru ve kesin olarak metot koşullarında belirlenebildiği en düşük seviyedir ve kalibrasyon eğrisinin eğiminin standart sapmasının on katının, eğime bölünmesiyle elde edilir (Skoog ve ark., 1998).

4.1. Voltametrik Çalışmalar

Kare dalga voltametri ile 3-nitrotirozin standardı için destek elektrolit varlığında elde edilen voltamogramlar Şekil 4.1’de, Şekil, 4.2’de ise bu voltamogramlar ile hazırlanan kalibrasyon grafiği verilmiştir. Bu verilerle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin performans kriterleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur. Kare dalga voltamogramlardan elde edilen veriler kullanılarak 1. Türev grafikleri hazırlanarak Şekil 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.1. 3-nitrotirozinin standartının $9,54 \cdot 10^{-9}$ - $5,21 \cdot 10^{-8}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga voltametrisi yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar

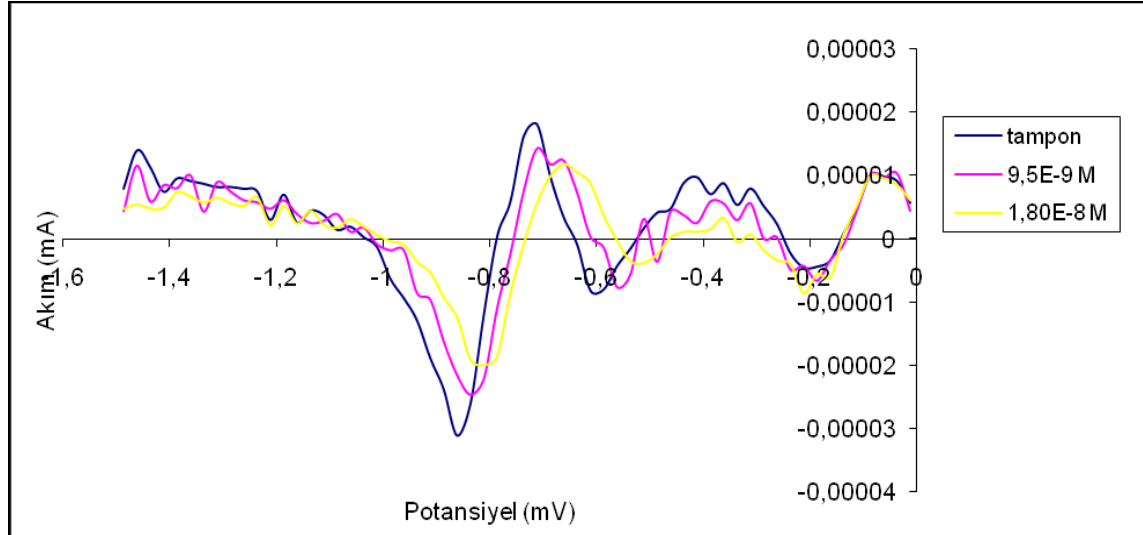


Şekil 4.2. 3-nitrotirozinin standartının $9,54 \cdot 10^{-9}$ - $5,21 \cdot 10^{-8}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga voltametrisi yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.1. 3-nitrotirozin'in kare dalga voltametri yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin karakteristik performans verileri

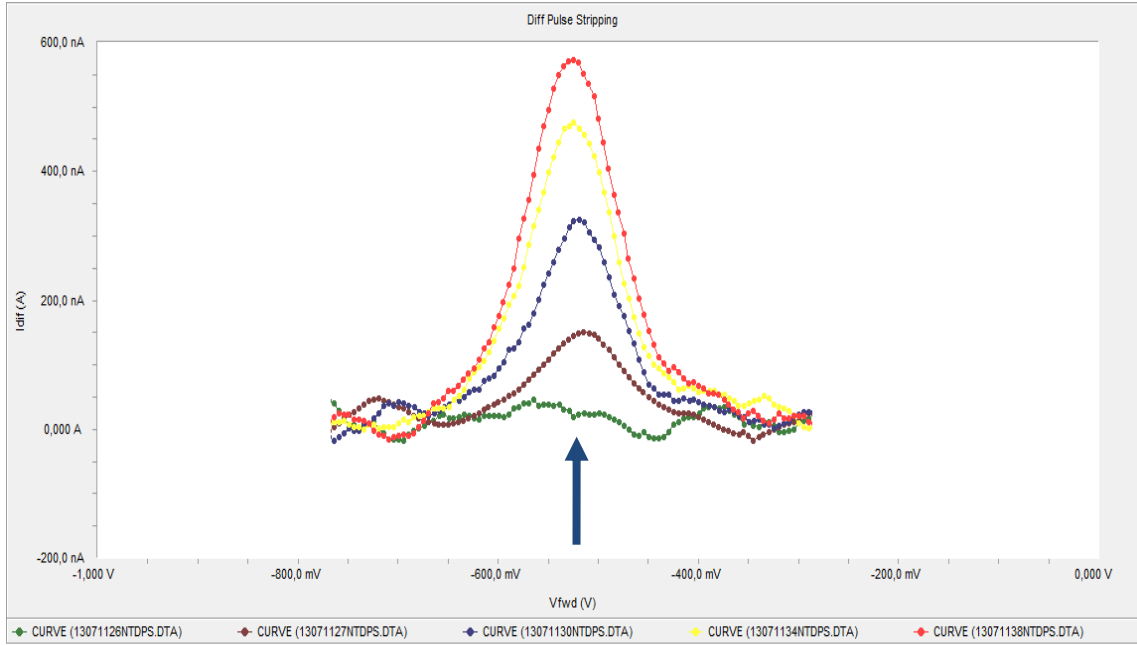
Analit	Derişim Aralığı ($\mu\text{mol/L}$)	Eğim ($\times 10^9$)	Kesim Noktası	Sa	Sb	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	R ²
3-Nitrotirozin	0,009- 0,052	1,08	391,45	4,694	0,135	0,0004	0,0013	0,94

(LOD= Gözlenebilme Sınırı, LOQ= Tayin Sınırı, Sa= Kesim Noktasının Standart Sapması , Sb= Eğimin Standart Sapması)

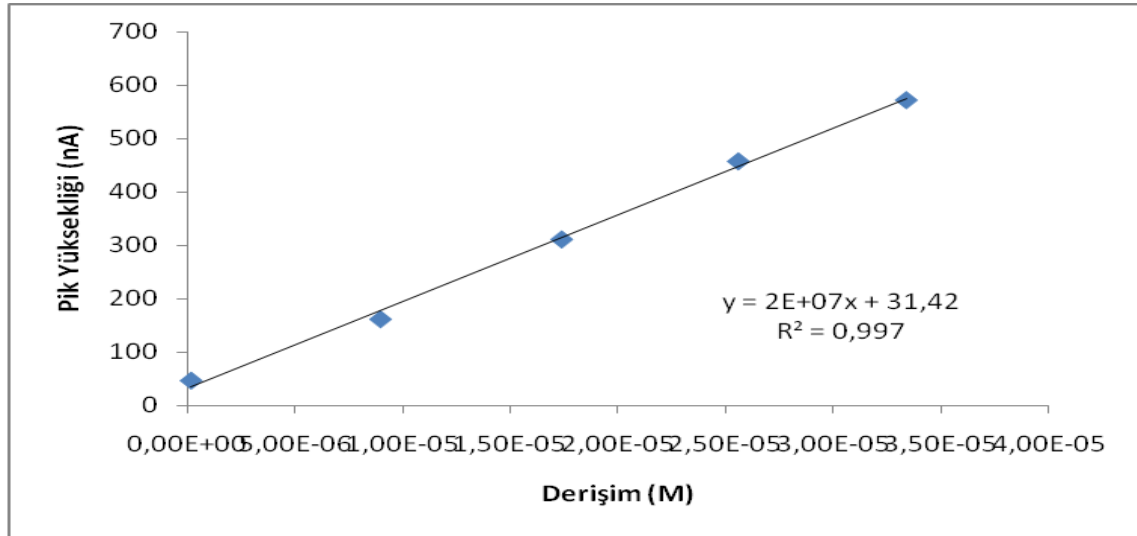


Şekil 4.3. 3-nitrotirozinin standartının $9,54 \cdot 10^{-9}$ - $5,21 \cdot 10^{-8}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga voltametri yöntemi ile oluşturulan 1. Türev grafiği

Diferansiyel puls voltametri ile 3-nitrotirozin standardı için destek elektrolit varlığında elde edilen voltamogramlar Şekil 4.4'de, Şekil, 4.5'de ise bu voltamogramlar ile hazırlanan kalibrasyon grafiği verilmiştir. Diferansiyel puls voltametri yöntemiyle yapılan çalışmalarda, kare dalga voltametri yöntemiyle çalışılan 10^{-9} M seviyesindeki derişimlere inilememiş, bu nedenle daha yüksek derişimler seçilmiştir. Bu verilerle elde edilen kalibrasyon eğrilerinin performans kriterleri Çizelge 4.2'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. 3-nitrotirozinin standartının, $1,98 \cdot 10^{-7}$ - $3,34 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar



Şekil 4.5. 3-nitrotirozinin standartının, $1,98 \cdot 10^{-7}$ - $3,34 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

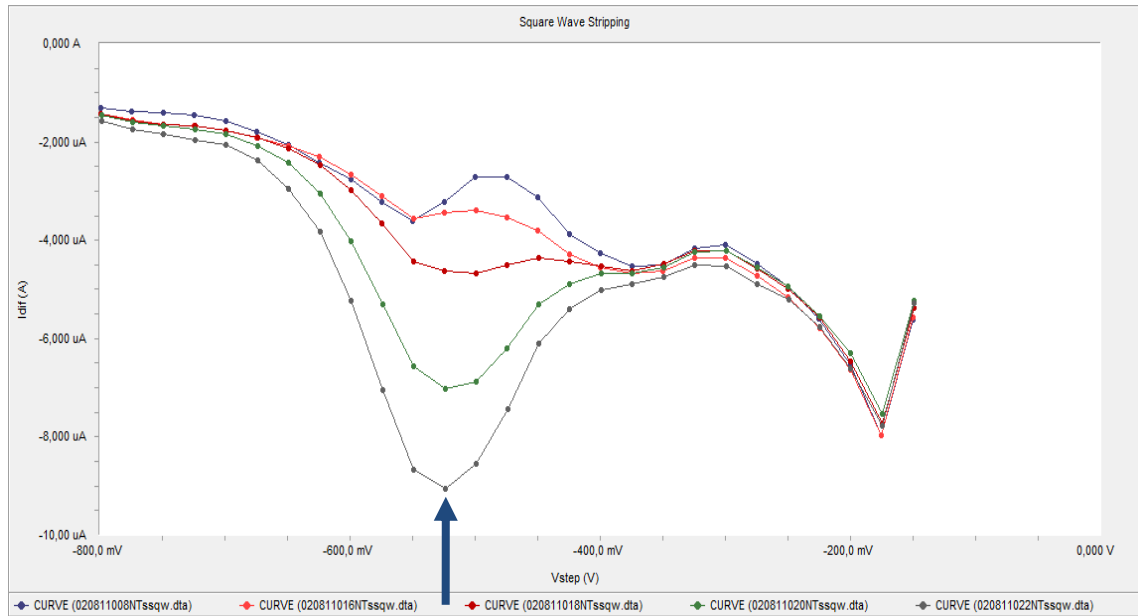
Çizelge 4.2. 3-nitrotirozin'in diferansiyel puls voltametrisi yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin karakteristik performans verileri

Analit	Derişim Aralığı ($\mu\text{mol/L}$)	Eğim ($\times 10^7$)	Kesim Noktası	Sa	Sb	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	R ²
3-Nitrotirozin	1,98 -0,33	1,62	31,42	10,32	$4,97 \cdot 10^{-5}$	0,009	0,031	0,99

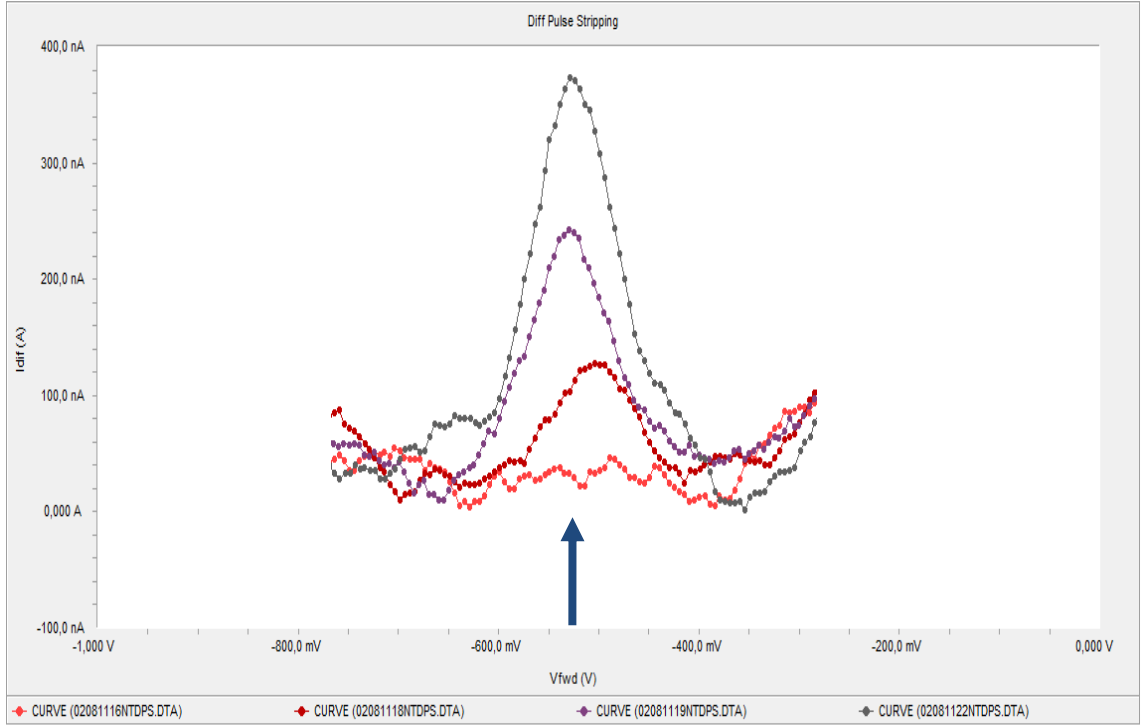
(LOD= Gözlenebilme Sınırı, LOQ= Tayin Sınırı, Sa= Kesim Noktasının Standart Sapması , Sb= Eğimin Standart Sapması)

4.1.1. Karşılaştırmalı Çalışmalar

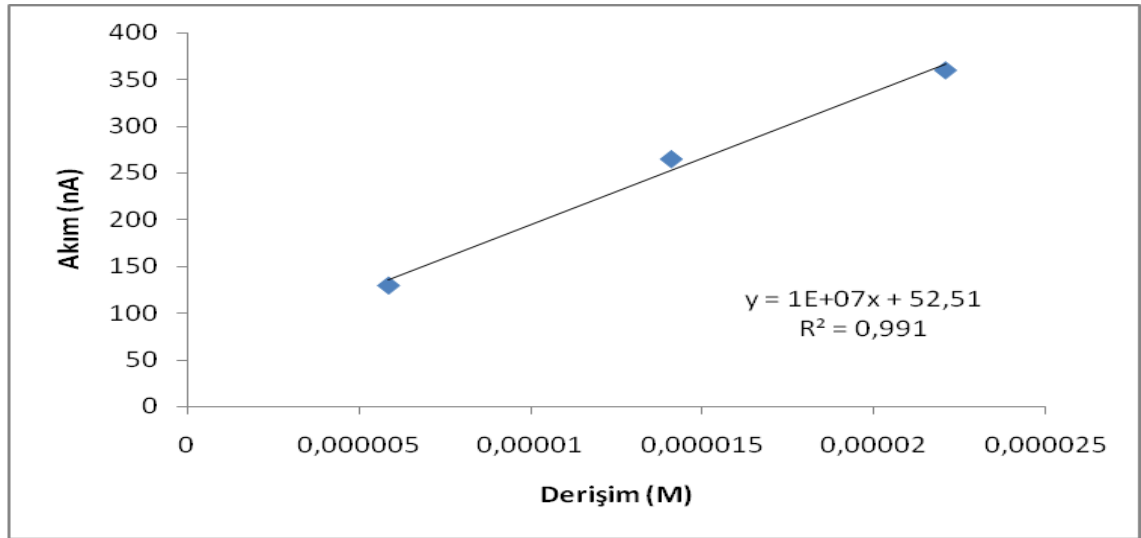
3-Nitrotirozin analizinde kare dalga ve diferansiyel puls yöntemlerini karşılaştırmak için, paralel çalışma planlanarak yürütüldü. Bu amaçla kare dalga ve diferansiyel puls voltametrik sonuçları arka arkaya alınarak kaydedildi. Kare dalga voltamogramları Şekil 4.6, diferansiyel puls voltamogramları Şekil 4.7'de, bunlara ait kalibrasyon eğrileri sırasıyla Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. Performans kriterleri ise Çizelge 4.3'de sunulmuştur. Gerçek BOS örneğine ait voltamogramlar Şekil 4.10 ve 4.11 da sunulmuştur.



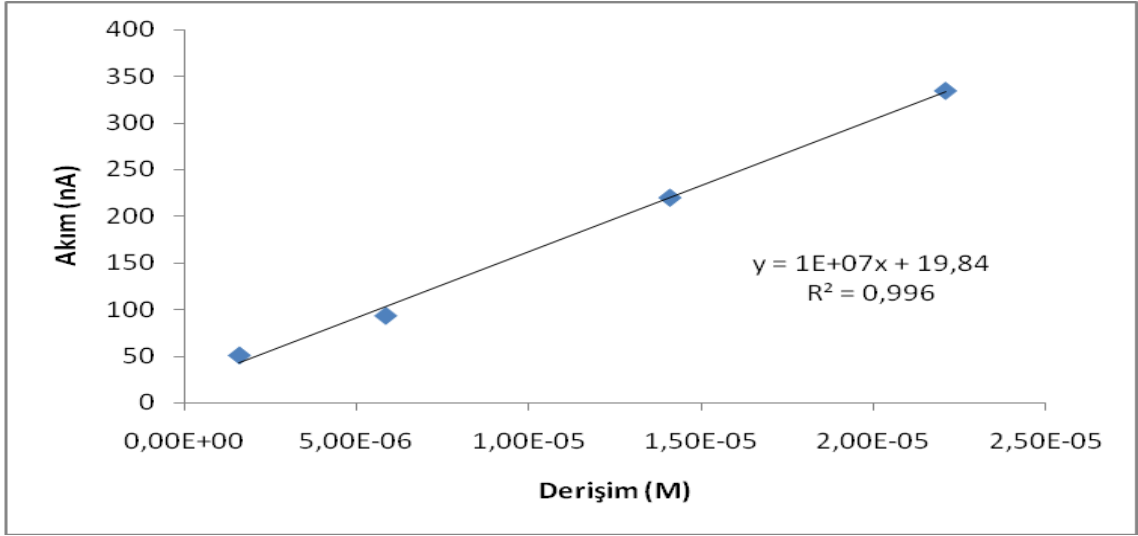
Şekil 4.6. Karşılaştırmalı çalışmada, 3-nitrotirozinin standartının $6,00 \cdot 10^{-8}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar



Şekil 4.7. Karşılaştırmalı çalışmada, 3-nitrotirozinin standartının $1,61 \cdot 10^{-6}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar



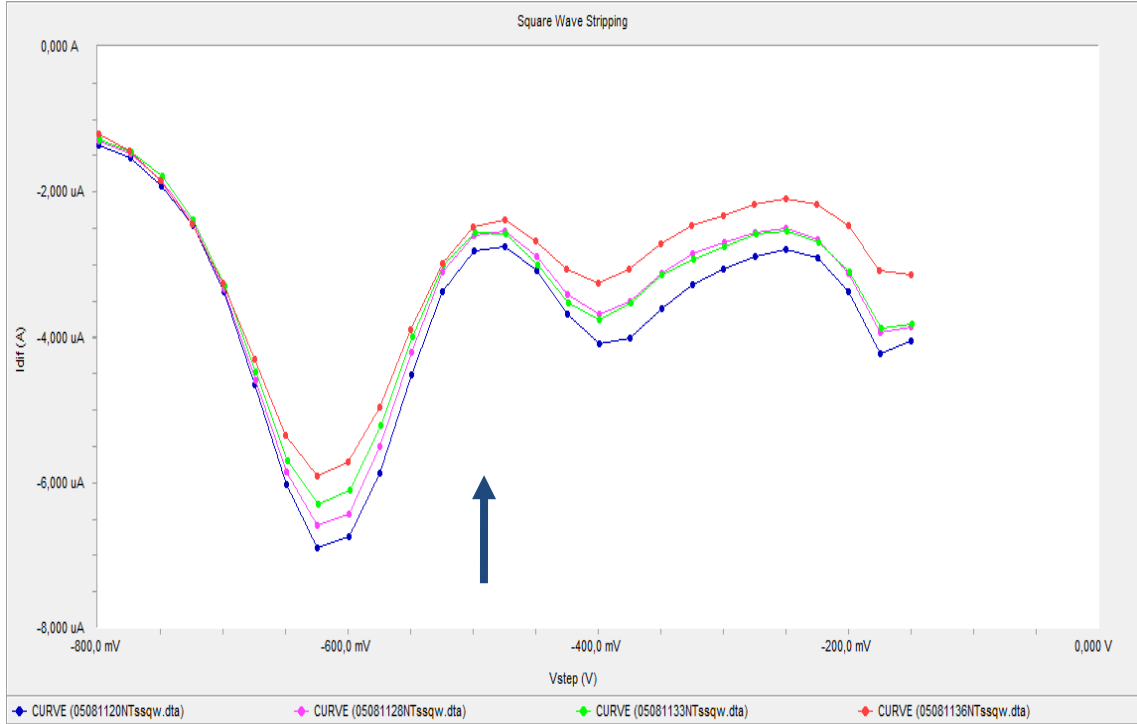
Şekil 4.8. Karşılaştırmalı çalışmada, 3-nitrotirozinin standartının $5,85 \cdot 10^{-6}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi



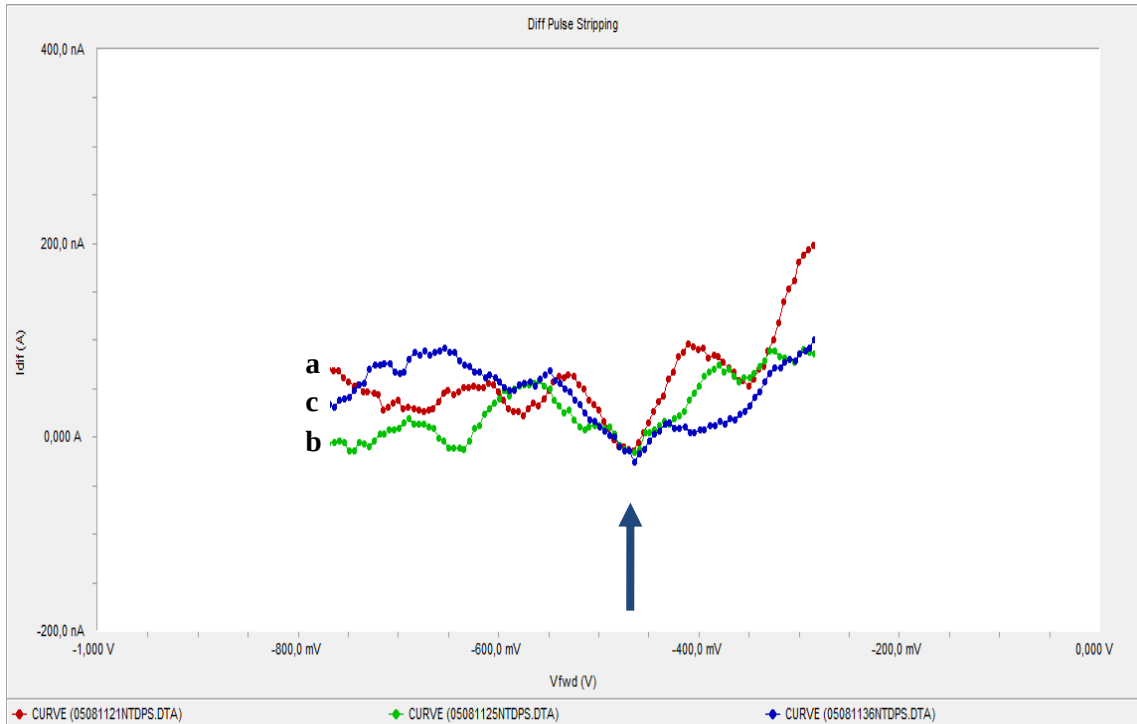
Şekil 4.9. Karşılaştırmalı çalışmada, 3-nitrotirozinin standartının $1,60 \cdot 10^{-6}$ - $2,21 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.3. Kare dalga ve diferansiyel puls yöntemlerinin kalibrasyon eğrilerinin performans verilerinin karşılaştırılması

Yöntem	Derişim Aralığı ($\mu\text{mol/L}$)	Eğim	Kesim Noktası	Sa	Sb	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	R ²
K. Dalga	5,85 – 22,1	1,41E07	52,51	20,22	$1,3 \cdot 10^6$	0,27	0,91	0,99
D. Puls	1,60 – 22,1	1,41E07	19,84	7,65	$5,69 \cdot 10^5$	0,12	0,40	0,99



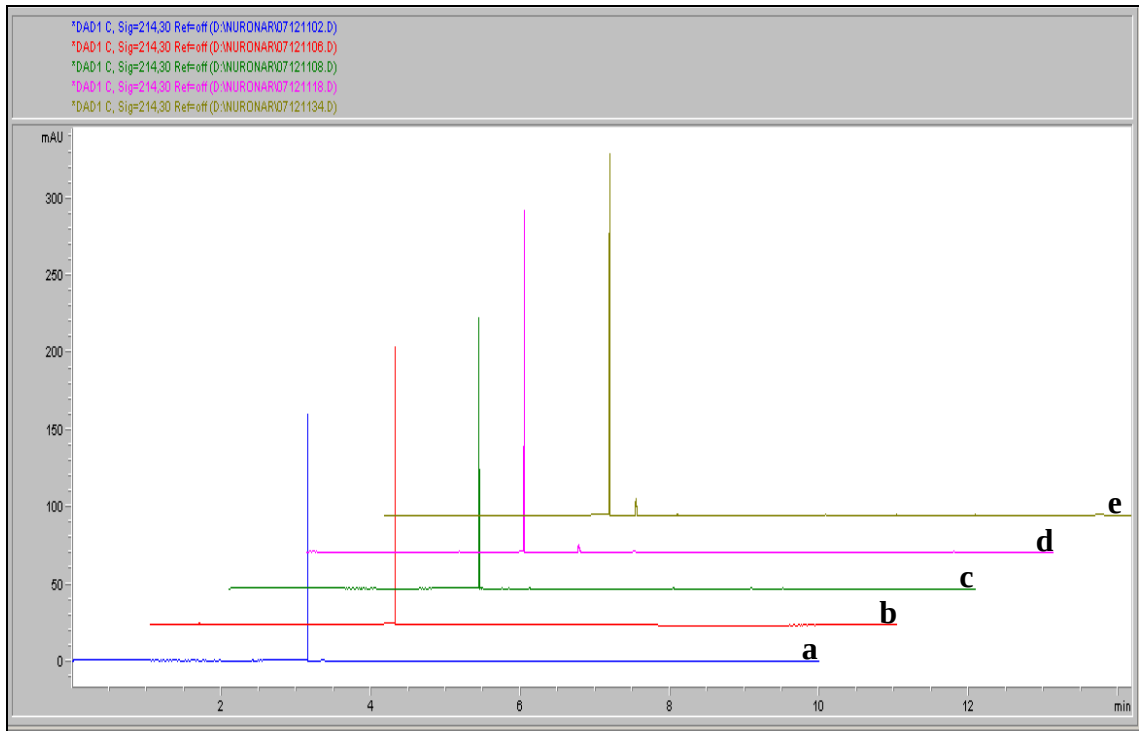
Şekil 4.10. Karşılaştırmalı çalışmada, gerçek bos örneğinin, $9,53 \cdot 10^{-6}$ - $8,91 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , kare dalga yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar



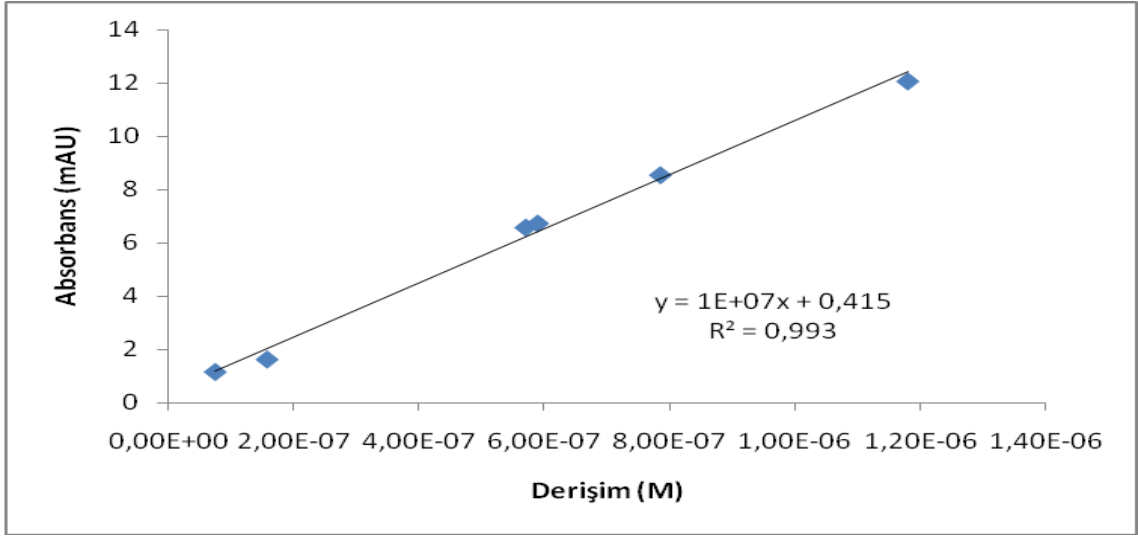
Şekil 4.11. Karşılaştırmalı çalışmada, gerçek bos örneğinin, $9,53 \cdot 10^{-6}$ - $8,91 \cdot 10^{-5}$ M derişim aralığında, 0,1 M fosfat tamponu içerisinde (pH 7,24) , diferansiyel puls yöntemi ile oluşturulan voltamogramlar a) destek elektrolit b) $9,53 \cdot 10^{-9}$ M 3-NT c) $8,91 \cdot 10^{-6}$ M 3-NT

4.2. Kapiler Elektroforez ile Nitrat ve Nitrit İyonu Tayini

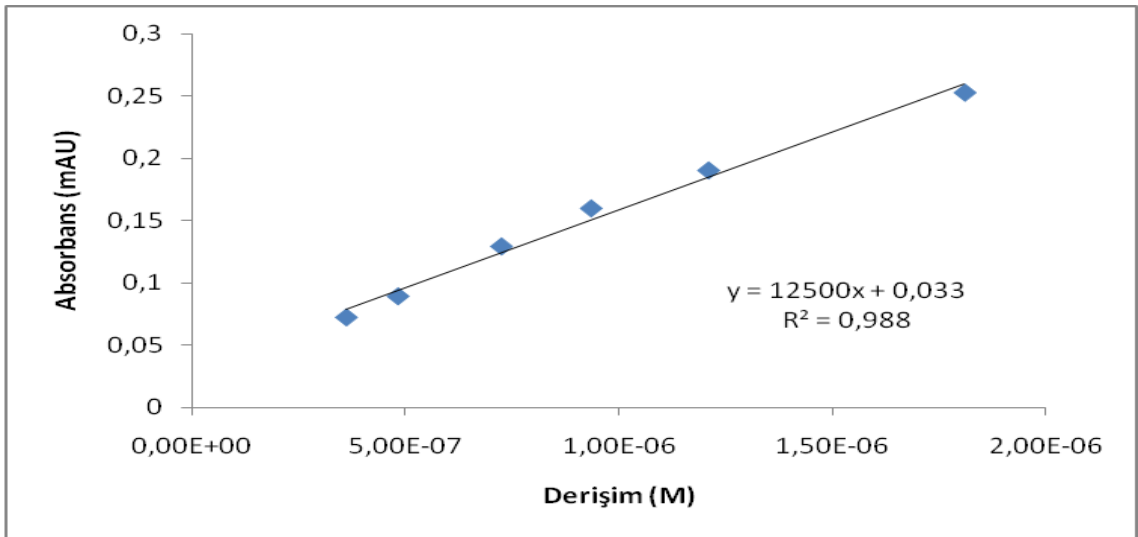
BOS'ta nitrat ve nitrit iyonu tayini yapabilmek amacıyla sentetik BOS içeren standart karışımların elektroferogramları Şekil 4.12'de görülmektedir. Elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'da verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin performans kriterleri ise Çizelge 4.4'de sunulmuştur. Gerçek BOS örneklerine ait elektroferogramlar Şekil 4.15, 4.16 ve 4.17'de görülmektedir. Çalışılan gerçek BOS örneklerinde belirlenen nitrat ve nitrit iyonlarının derişimleri ise Çizelge 4.5'de ortaya konmuştur.



Şekil 4.12. Sentetik BOS içeren nitrat ve nitrit iyonlarının standart karışımlarına ait elektroferogramlar. (Nitrat iyonu derişimleri: a) $2,10 \cdot 10^{-7}$ M, b) $3,93 \cdot 10^{-7}$ M c) $7,85 \cdot 10^{-7}$ M d) $3,93 \cdot 10^{-5}$ M e) $7,85 \cdot 10^{-5}$ M; Nitrit iyonu derişimleri: a) $4,83 \cdot 10^{-7}$ M b) $7,25 \cdot 10^{-7}$ M c) $1,21 \cdot 10^{-6}$ M d) $4,83 \cdot 10^{-6}$ M e) $7,25 \cdot 10^{-5}$ M)



Şekil 4.13. Nitrat iyonunun, $7,43 \cdot 10^{-8}$ - $1,18 \cdot 10^{-6}$ M derişim aralığında, kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

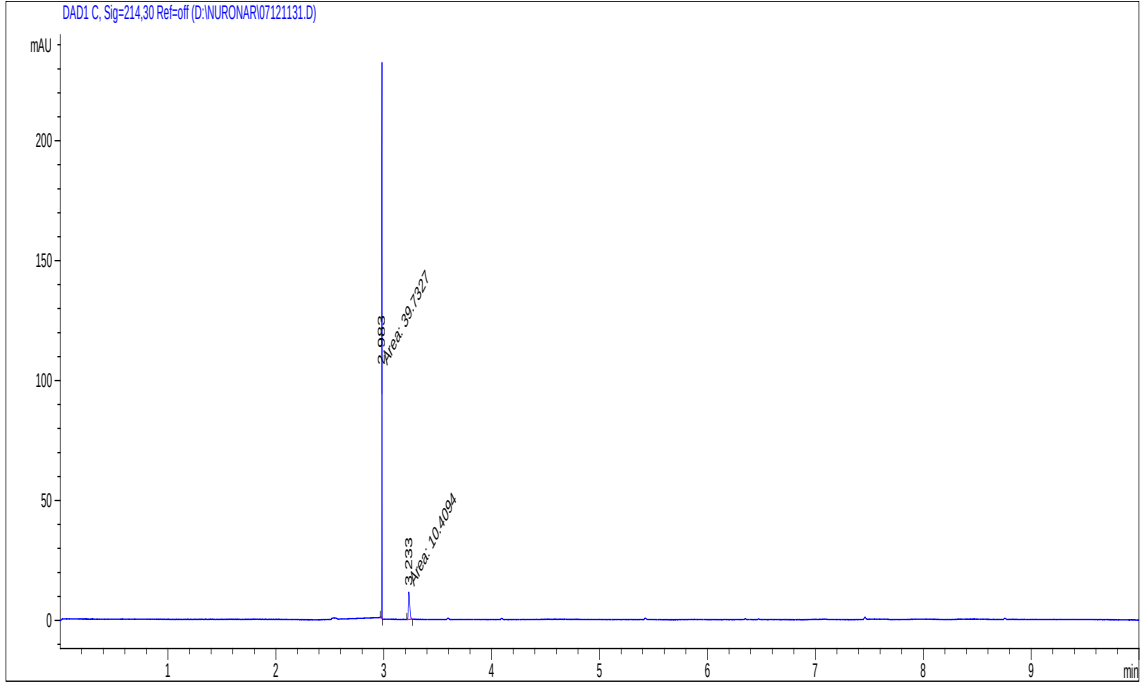


Şekil 4.14. Nitrit iyonunun, $3,62 \cdot 10^{-7}$ - $1,81 \cdot 10^{-6}$ M derişim aralığında, kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

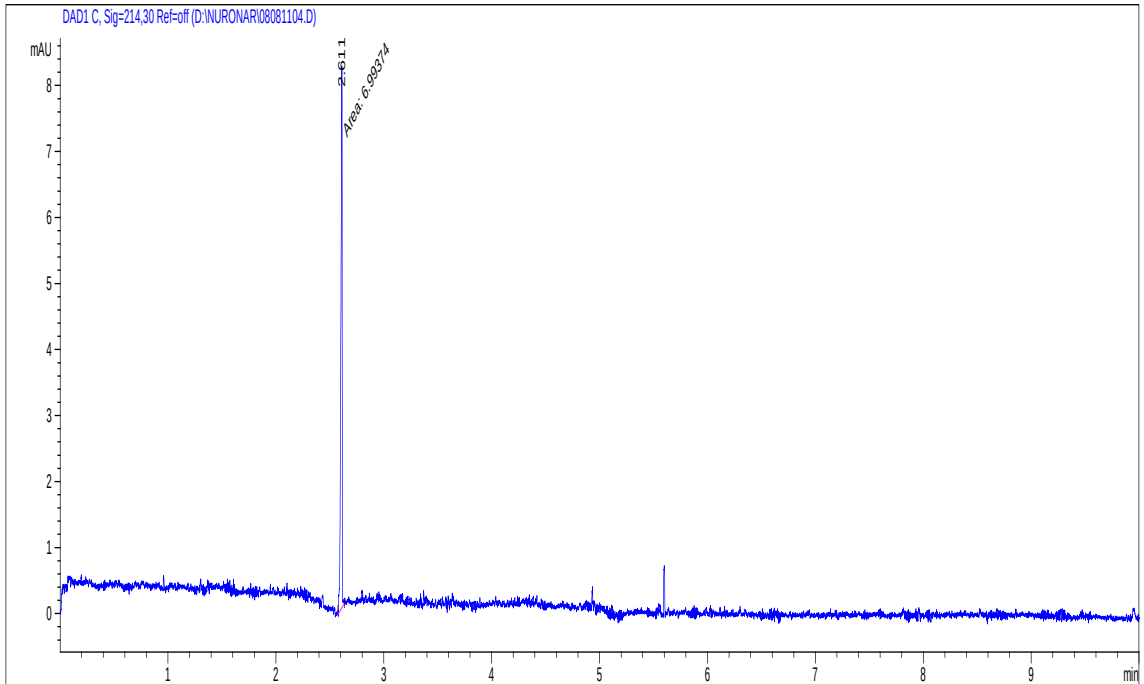
Çizelge 4.4. Nitrat ve nitrit iyonlarının, kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin performans verileri

Analit	Derişim Aralığı ($\mu\text{mol/L}$)	Eğim	Kesim Noktası	Sa	Sb	LOD ($\mu\text{mol/L}$)	LOQ ($\mu\text{mol/L}$)	R ²
NO ₃ ⁻	0,07 – 1,18	1,02E07	4,15E-01	0,27	3,99E05	0,08	0,26	0,99
NO ₂ ⁻	0,36 – 1,81	1,25E05	3,37E-02	7,02E-03	6,75E03	0,17	0,57	0,99

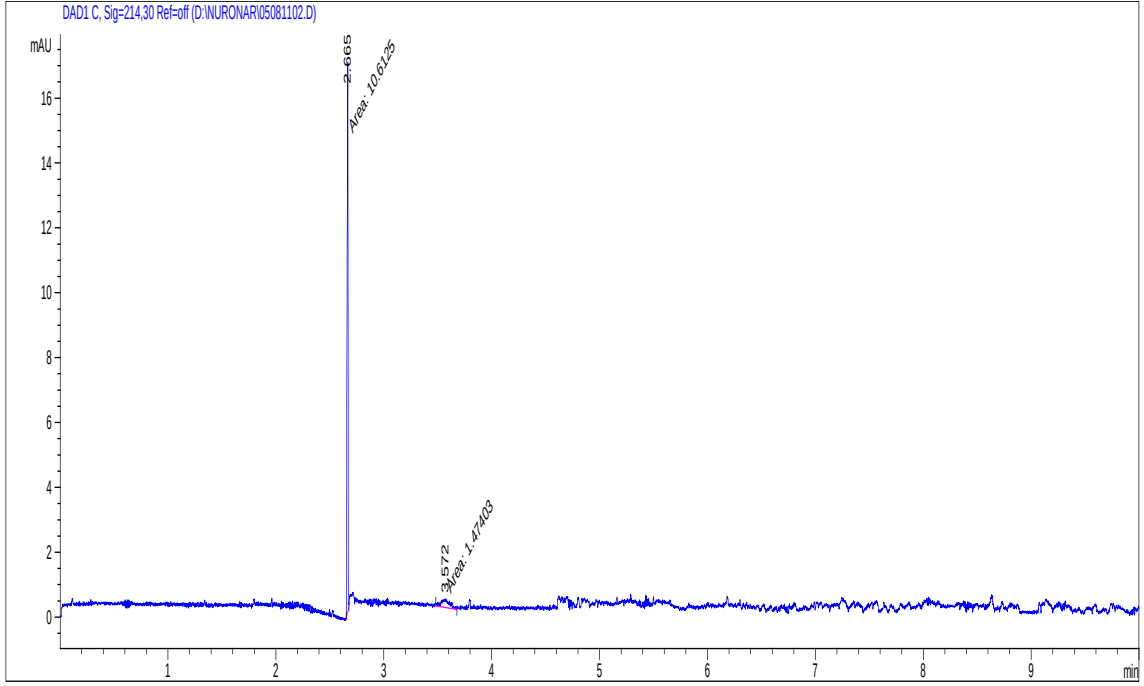
(LOD= Gözlenebilme Sınırı, LOQ= Tayin Sınırı, Sa= Kesim Noktasının Standart Sapması, Sb= Eğimin Standart Sapması)



Şekil 4.15. Nitrit ve nitrat iyonlarının standart çözelti içerisinde kapiler elektroforez yöntemi ile elde edilen elektroforegramı



Şekil 4.16. Nitrit iyonu içermeyen gerçek BOS örneğine ait elektroforegram (2 nolu örnek)



Şekil 4.17. Nitrat ve nitrit iyonu içeren gerçek bos örneğine ait elektroforegram (1 nolu örnek)

Çizelge 4.5. Çalışılan gerçek bos örneklerinde nitrat ve nitrit iyonlarının derişimleri

Gerçek BOS örneği	Nitrat, μM	Nitrit, μM
1	$1,1 \pm 0,2$	$11,2 \pm 0,1$
2	$0,9 \pm 0,2$	-
3	$1,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,2$
4	$1,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,5$
5	$3,8 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,3$
6	$3,4 \pm 0,2$	-
7	$2,9 \pm 0,4$	-
8	$2,5 \pm 0,2$	-
9	$3,0 \pm 0,2$	-
10	$2,3 \pm 0,4$	$3,0 \pm 1,0$
11	$1,9 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,7$

5. TARTIŞMA

Günümüzde oksidatif stres ile yoğun bir şekilde karşılaşılması ve bazı hastalıkların tetikleyicisi olarak gösterilmesi nedeniyle, oksidatif stres belirteçlerinin tayini önem arz etmektedir. 3-Nitrotirozin molekülü proteinleri yükseltgenmesi sonucu ortaya çıkarken, nitrat ve nitrit iyonları oksidatif sürecin nihai ürünleri olarak bilinmektedirler.

Bu çalışmada voltametrik yöntem ile 3-nitrotirozinin, kapiler elektroforez ile nitrat ve nitrit iyonlarının tayini gerçekleştirilmiştir. Her iki yöntem için hazırlanan kalibrasyon eğrilerinde sentetik BOS kullanılmıştır. Biyolojik sıvılardan kaynaklanan girişimleri önlemek amacıyla biyomedikal analizlerde sentetik biyolojik sıvılardan yararlanılmaktadır (Alvi ve Hammami, 2011). Literatürde, bu tez kapsamı dışında sentetik BOS kullanılarak yapılan 3-nitrotirozin, nitrat ve nitrit tayinine rastlanmamıştır.

Daha önce voltametrik yöntemle yapılan çalışmada, pH 9'da adsorptif sıyırma kare dalga voltametrisi ile biyolojik sıvılarda beklenen 10^{-9} M düzeyine inilebilmişti (Türköz Acar, 2008). Bu nedenle başlangıçta kare dalga voltametrisi tercih edilmiştir. Voltamogramlarda, gerçek ve sentetik BOS'tan kaynaklanan yayvan pikin 3-nitrotirozinin gözlenmesini engellemesi nedeniyle çare aranmıştır. Bu nedenle kare dalga voltamogramlarının türevi alınmıştır. 3-nitrotirozin'in BOS içerisinden katı fazı ekstraksiyonu ile alınması başarısız olmuştur.

Kare dalga voltametrisi tersinir elektrokimyasal tepkimeler için daha üstündür. Elektrokimyasal 3-nitrotirozin indirgenmesi tersinmez olduğu için, diferansiyel puls tekniği ile de çalışılmıştır. Kare dalga voltametrisinde, $5,85 \times 10^{-6}$ M derişimde geri alınabilirlik % 70,5 olarak hesaplanmıştır. Diferansiyel puls voltametrisinde, $1,6 \times 10^{-6}$ M derişimde geri alınabilirlik % 87,5 olduğu görülmüştür. Geri alınabilirlik açısından diferansiyel puls voltametrisinde daha verimli sonuçlar elde edilmekle beraber, kalibrasyon eğrisinin diğer parametreleri; eğim, alt teşhis ve tayin sınırları kare dalga voltametrisinde üstündür. Korelasyon katsayısı kare dalga için 0,94 iken, diferansiyel puls için 0,99 değeri elde edilmiştir. Bu sonuçları değerlendirebilmek amacıyla karşılaştırmalı çalışma planlanarak gerçekleştirilmiştir. Daha yüksek derişimlerde ($1,60\text{--}22,1 \mu\text{M}$) yapılan bu ardıl çalışma ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin karşılaştırılması Çizelge 4.3.'de sunulmuştur. Söz konusu çizelgeden görülebileceği gibi diferansiyel puls yönteminde alt tayin sınırının daha düşük olduğu tespit edilmiştir.

3-Nitrotirozin'in 500 mV civarında (Ag/AgCl karşı) gözlenen indirgenme piki, sentetik veya gerçek BOS'tan kaynaklanan pikler nedeniyle engellendiğinden alt tayin sınırında istenen düzeye inilememiştir. Gerçek BOS örnekleriyle yapılan çalışmalarda 3-nitrotirozin'in 10^{-6} M'dan daha düşük derişimlerde gözlenmesi mümkün olmamıştır.

Daha önce de belirtildiği gibi nitrat ve nitrit iyonu için geliştirilmiş kapiler elektroforez tayin yöntemlerinin çoğu yüksek pH yürütücü tamponları ile ayırmayı ve tayini öngörmektedir (Pannala ve ark., 2003, Helaleh ve ark., 2000, Tsikas, 2000, Andrei, 2008, Zunić, 1999). Yüksek pH uygulamasında katyon, nötr ve anyon sırasına göre kolondan çıkmaktadır. Düşük pH ve potansiyelin ters çevrilmesiyle kolondan önce anyonların ayrılması mümkündür. Düşük pH tamponu ile anorganik iyonların ayrılması son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. pH 3,5 fosfat tamponu ile sebzelerde nitrat, nitrit ve okzalit anyonları belirlenmiştir (Erdoğan ve Onar, 2011). Erdoğan ve Onar (2011) tarafından sebzeler için geliştirilen yöntem, BOS'a uygulanmak üzere değiştirilmiştir. Aynı pH'ta ancak daha derişik (100 mM) fosfat tamponu kullanılmıştır. Ayrıca sıcaklık 30 °C yerine 27 °C'de tutulmuştur. Daha düşük alt tayin sınırına ulaşabilmek için numune verme işlemi sırasında 75 s süreyle sıkıştırma uygulanmıştır. Şekil 4.11'de görülebildiği gibi anyonların 4 dk'yı aşmayan bir zaman dilimi içerisinde tespit edilmesi mümkün olmuştur. Toplam analiz süresi de 30dk'yı aşmamaktadır.

Kalibrasyon eğrilerinin performans verilerinden, nitrat iyonunun alt teşhis sınırının $8,00 \cdot 10^{-8}$ M, nitrit iyonun ise $1,70 \cdot 10^{-7}$ M olduğu belirlenmiştir. Tayin sınırları da, nitrat iyonu için $2,6 \cdot 10^{-7}$ M, nitrit için $5,7 \cdot 10^{-7}$ M olarak tespit edilmiştir. Her iki iyon için korelasyon katsayısı 0,99 olarak ölçülmüştür. Verilerden nitrat iyonunun eğimi $1,02 \cdot 10^7$, nitrit iyonun eğimi de $1,25 \cdot 10^5$ olarak ölçülmüştür. Nitrat iyonu için, $11,78 \cdot 10^{-7}$ M derişimde geri alınabilirlik %97 olarak elde edilmiştir. Nitrit iyonu için ise, $7,25 \cdot 10^{-7}$ M derişimde %94,1 olarak hesaplanmıştır. Yöntem gerçek BOS örneklerine başarıyla uygulanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Voltametik olarak 3-NT tayininde 10^{-7} M'a kadar inilebilmiştir. Ancak literatürde biyolojik ortamda derişimin 10^{-9} M olması nedeniyle amaçlanan sonuç alınamamıştır. Bu tür durumlarda uygulanan işlem ya başka bir yönteme geçilmesi veya önderiştirme yapılmasıdır. Kullanılmış olan voltametik teknik adsorptif sıyırma olduğu için etkili bir önderiştirme yapılmaktadır. Çözüm olarak ortam değıştirilmesi düşünölebilir.

Oksidatif stresin bir başka belirteçleri olan nitrat ve nitrit iyonunun BOS'ta tayini için geliştirilmiş olan yöntem hızlı, ekonomiktir ve ön işlem gerektirmemektedir. Dolayısıyla literatür için bir yenilik olarak sunulabilir.

7. KAYNAKLAR

- Acworth, IN., Bailey B., 1997. Reactive Oxygen Species. In: The handbook of oxidative metabolism. Massachusetts: ESA Inc., , p. 1-1 to 4-4
- Agawal, A., Kale, Rk., 2001. Radiation Induced Peroxidative Damage Mechanism And Significance. Indian Journal Experimental Biology Apr; 39:291
- Akdağ, İ., 2003. Metot Validasyon Eğitim Notları, TÜBİTAK-UME. 41 s., Ankara.
- Akdağ, İ., 2006. Metot Validasyonu-Ölçüm Belirsizliği Seminerleri ve Eğitim Notları, 44 s., İzmir.
- Andrei, R., 2008. Timerbaevreviewınorganicanalysis Of Biological fluids using capillary electrophoresis J. Sep. Sci., 31, 2012 – 2021
- Ansarı, K.A., Kaplan, E., Shoeman, D., 1989. Age Related Changes In Lipit Peroxidation And Protective Enzymes In The Central Nervous System.Gowth Develop Aging; 53:117.
- Aslan, R., Şekeroğlu, M.R., Bayiroğlu, F., 1995. Serbest Radical Türlerin Membran Lipit Peroksidasyonuna Etkileri ve Hücresel Antioksidan Savunma. Sağlık. Bil. Derg ; 2:137-42. B 744(2), 433–437.
- Bond, A.M., 1980, Modern polarographic methods in analytical Chemistry,
- Borderie, D., Hilliquin, P., Hermvann, A., et al., 1999. Nitric oxide synthase is expressed in the lymphomononuclear cells of synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis. J Rheumatol; 26:2083-8.
- Ceballos, P.I., Trivier, J.M., Nicole, A.,1992. Age- Correlated Modifications Of Copper –Zinc Superoxide Dismutase And Glutathionic Related Enzyme Activities In Human Erythrocytes. Clin Chem; 38-66
- Cheeseman, KH., Slater, TF., 1993. An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull, 49, 81- 493.
- Erden, M., 1992. Serbest radikaller. T Klin Tıp Bilimleri; 12:201-207
- Halliwell, B., 1996. Antioxidants in human health and disease. Annu. Rev. Nutr. 16: 33-50.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1984. Oxygen Toxicity, Oxygen Radicals, Transition Metals And Disease.Biochem J, 219;1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, JMC., 1990. Role Of Free Radicals And Catalytic Metal İons In Human Disease:An Overview. Methods Enzymol,; 49(3): 577-587.

- Halliwell, B., 1995. Antioxidant Characterization. Methodology And Mechanism. *Biochemical Pharmacology* 49(10), 1341-1348.
- Halliwell, B., 1998. Free Radicals And Oxidative Damage In Biology And Medicine: An Introduction., In: (Eds.) Rea (Hrsg): Oxidative Stress In Skeletal Muscle. Birkhaeuser Verlag, Basel/Switzerland, ,
- Helaleh, M.I.H. and Korenaga, T., 2000. Ion chromatographic method for simultaneous determination of nitrate and nitrite in human saliva. *J. Chromatogr.*
- Ivkovic, S., Müller-Schubert, A., 2004. Oxidativer stress. In "Oxidativer stress. Risikofactor Nr. 1 für Ihre Gesundheit". Astra H&D GmbH, Schlanstedt.. 98–131.
- M. Marzinzig, A.K. Nussler, J. Stadler, E. Marzinzig, W. Barthlen, N.C. Nussler Et Al., 1997. Improved method to measure end products Of Nitric oxide In Biological fluids: Nitrite, Nitrate, And S-Nitrosothiols Nitric oxide, 1, Pp. 177–189.
- Maeso, N., Cifuentes A., Barbas C., 2004. Large-Volume Sample Stacking-Capillary Electrophoresis Used For The Determination Of 3-Nitrotyrosine In Rat Urine, *Journal Of Chromatography B*, 809, 147-152.
- Mark, A., 1995. Clinical Utility of Biochemical Analysis of Cerebrospinal Fluid, *Clin. Chem.*, metabolites nitrite and nitrate in biological fluids by gas chromatography/ s 41 (3) : 343-360.
- Pannala, A.S., A.R. Mani, J.P.E. Spencer, V. Skinner, K.R. Bruckdorfer, K.P. Moore, C.A. Rice-Evans, 2003. *Free radical. Biol. Med.* 34 576.
- Qureshi, G.A., Baig, S.M., Bernard, I. et al., 1998. The neurochemical markers in cerebrospinal fluid to differentiate between aseptic and tuberculous meningitis. *Neurochem Int*; 32:197-23
- Robert, R. Renner, 2008. Freie Radikale Und Oxidativer Stress Peroxiredoxin Als Radikalenpuffer Im Myokard und Skelettmuskel Unter Körperlicher Belastung, *Doktorarbeit, Sporthochschule, Köln*, 116 s.
- Simonian, N.A., Coyle, J.T., 1996. Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annual Review of Pharmacological Toxicology* 36, 83–106
- spectrometry. *Anal Chem* 72:4064–4072.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., 1998. *Enstrümental Analiz İlkeleri* (Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Çev.). Ankara: Bilim Yayıncılık.

- Tsikas, D., 2000. Simultaneous derivatization and quantification of the nitric oxide.
- Tiryaki, O. ve Aysal, P., 2003. Pestisit kal nt s Analizlerinde ı ı ı Metotların Geçerli kılınması (method validation), VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi, 15-17 Ekim 2003. Erciyes Üniversitesi. 7 s., Kayseri.
- Türköz, Acar, E., 2008. 3-Nitrotirozin İçin Nicel Tayin Yöntemi Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Samsun, 168 s.
- Wang, J., 2000. Analytical Electrochemistry, 2nd. Ed. Wiley-VCH, New York, 209
- Yavuz, Erdogan., B., and Onar, A.N., 2011. Determination of Nitrates, Nitrites and Oxalates in Kale and Sultana Pea by Capillary Electrophoresis. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10: 2051-2057.
- Yıldız, A., Genç, Ö., 1993. Enstrumental Analiz. Hacettepe Üniv. Yayınları, 1.Baskı , S: 352.
- Zunić, G., Spasić, S., Jelić-Ivanović, J., Chromatog, B., 1999. Simple and rapid method for the measurement Of Nitrite and nitrate in Human plasma and cerebrospinal fluid by capillary electrophoresis; 30;727(1-2):73-9.
- BOS, <http://www.genbilim.com/content/view/7151/33>, (16.05.2012)
- BOS'un Genel Özellikleri, <http://www.ms-life.org/bos-nedir/bos-nedir.html>, (14.05.2012)
- Cerebrospinal Fluid, http://www.alzet.com/products/guide_to_use/cfs_preparation.html, (14.05.2012)
- Elektroforez Türleri, <http://www.duzen.com.tr/workshop/2006/cagatay.pdf>, (15.05.2012)
- Ernaehrung Radikale, <http://de.takethemagicstep.com/coaching/athleten/ernaehrung/ernaehrung-freie-radikale/>, (17.07.2012)
- Freie Radikale, http://dsg.uni-paderborn.de/fileadmin/evb/materialien/06_04_Vitamin_freie_Radikale.pdf, (03.03.2012)
- Freie Sauerstoff Radikale, http://www.webmed.ch/vitaminC_buch/htmldocs/023%20freie_sauerstoffradikale.htm, (20.05.2012)

Freie Radikale

http://www.praxisbenner.de/1/Freie_Radikale_und_Oxidativer_Stress.html,
(19.01.2011)

Messen Freie Radikale, http://www.allgemeinmedizin.uni-frankfurt.de/lit/igel_radikale_versicherteninfo.pdf, (17.07.2012)

Nitrotyrosine, http://www.kinesis.co.uk/applications/70-3993P_3-Nitrotyrosine.pdf,
(18.06.2012)

Oksidatif Stres Serbest Radikaller, <http://www.kadin.ca/oksidatif-stres-serbest-radikaller/>, (20.05.2012)

Oksidatif Stres, <http://www.oksante.com.tr/link35.htm>, (16.07.2012)

Oksidatif Stresin Korunma, <http://www.mlklinik.com/stres.html>, (18.06.2012)

Oxidativer Stress, <http://www.institut-biophysikalische-medicin.de/oxistress.htm>,
(05.01.2012)

Oxidativer Nitrosativer Stress, <http://naturheilpraxis-schilling.eu/coaching/konfliktbewaeltigung/index.html>, (16.07.2012)

Oxidativer Stress,
http://edoc.rki.de/documents/rki_ab/re67flHRghoUo/PDF/23eiKL8i3a2sc.pdf,
(12.06.2011)

Symptome Oxidativer Stress,
http://www.symptome.ch/wiki/Kurzfassung_Oxidativer_Stress, (25.01.2012)

Voltammetry, <http://www.cem.msu.edu/~cem333/Week12.pdf>, (12.05.2012)

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Muharrem ÖZTÜRK

Doğum Yeri: Darmstadt

Doğum Tarihi: 28.09.1978

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: Almanca

Eğitim Durumu (Kurum/Kurumlar ve Yıl)

Lise: Açıköğretim Lisesi 1998.

Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 2004.

Yüksek Lisans: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Çalıştığı Kurum: T.C. Başbakanlık Basın-Yayın ve Enformasyon Genel Müdürlüğü

İletişim Bilgileri:

Yaşardoğu mah. Kale sok. No. 31

İlkadım/SAMSUN

mcd55@hotmail.com