



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**BURSA İLİNDE
18 – 45 YAŞ ARASI SAĞLIKLI BİREYLERDE
VİTAMİNLERİN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN REFERANS
ARALIKLARININ BELİRLENMESİ**

Dr. Zafer Banu HIZLI

UZMANLIK TEZİ

BURSA-2006



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**BURSA İLİNDE
18-45 YAŞ ARASI SAĞLIKLI BİREYLERDE
VİTAMİNLERİN VE ANTİOKSİDAN PARAMETRELERİN REFERANS
ARALIKLARININ BELİRLENMESİ**

Dr. Zafer Banu HIZLI

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Yeşim ÖZARDA

BURSA-2006

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	ii
İNGİLİZCE ÖZET	iii
GİRİŞ	1 - 44
GEREÇ VE YÖNTEM	45 - 58
SONUÇLAR	59 - 66
TARTIŞMA	67 - 71
EKLER	72
KAYNAKLAR	73 -84
TEŞEKKÜR	85
ÖZGEÇMİŞ	86

ÖZET

Tıbbi kararda gerekli olan referans aralıklarının hesaplanması için çeşitli öneriler bulunmaktadır. Sağlıklı referans bireylerden elde edilen sonuçlardan “ABD Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (NCCLS)” ve “Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC)”nın önerilerine göre parametrik ve parametrik olmayan yöntem ile yapılan hesaplamalar yanında laboratuvara başvuran bireylerin sonuçlarından da hesaplama yapılabilmektedir.

Populasyon, diyet, teknik ve referans grubun seçimine bağlı olarak laboratuvarlar ve bölgeler arası oluşan farklardan dolayı her laboratuvarın kendi referans aralıklarını belirlemesi son derece önemlidir.

Oksidatif stres birçok hastalığın patogeneğinde kritik rol oynamaktadır. Reaktif oksijen türlerinin biyolojik etkileri çeşitli antioksidan savunma sistemleri kontrol altında tutulmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR) gibi antioksidan enzimler, A, E, C, B grubu vitaminler ile çeşitli biyolojik moleküllerden oluşmaktadır. Bu antioksidan savunma sistemleri birbiriyle ilişkili reaksiyonlarla oksidatif stres hasarını ortadan kaldırmaya çalışırlar. Antioksidan parametrelerin ve vitamin düzeylerinin, biyolojik değişkenliklerinin yüksek olması nedeniyle “topluma dayalı referans aralıklar” gözönüne alınarak değerlendirilmesi gereklidir.

Bu çalışmada referans aralıklarını belirlemek amacıyla Bursa ilinde, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Tahliller, Eğitim ve Araştırma Merkez laboratuvarında 18 – 45 yaşları arasındaki 407 bireyden 12 – 14 saatlik açlık sonrasında kanlar alındı. SOD, GPx, GR ve vitamin A, E, C, B₁, B₂, B₆ düzeyleri analiz edildi. Referans değerler NCCLS'nin önerdiği C 28-A prosedürüne göre belirlendi. % 95 referans aralıkları parametrik olmayan yöntem ile hesaplandı. Üretici firmanın vermiş olduğu ve literatürlerden elde edilen referans aralıkları ile karşılaştırıldı.

Çalışmamızın sonuçları Türkiye'de yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilir ve tüm bölgelerden elde edilen veriler ile birleştirilip Türkiye için ortak referans aralıkların belirlenmesi sağlanabilir.

Anahtar Kelimeler: Referans aralık, vitamin, antioksidan parametreler

SUMMARY

Determining Reference Value of Serum Vitamins and Antioxidant Parameters in 18-45 Years Old Healthy Subjects in Bursa

There are some recommendations for determination of reference intervals necessary for medical decision. We can calculate reference intervals from the data of selected healthy reference individuals by using of methods recommended by NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA) and IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine), respectively.

Because of differences which may exist between laboratories and locales with respect to population, diet, laboratory, technique and selection of reference groups, it is important for each laboratory to establish its own reference intervals for diagnostic evaluation of patient results.

Oxidative damage plays a crucial role in the pathogenesis of various diseases. Antioxidant defence systems include vitamins A, E, C, B and antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione reductase (GR). Because of biologic variation of antioxidant enzymes and vitamin levels, measurements of these parameters assessed by population based reference values.

In this study, for purpose of determining reference values, specimens from 328 healthy adults ages between 18 – 45 years old were collected after a 12 to 14 hour fasting. SOD, GPx, GR and vitamin A, E, C, B₁, B₂, B₆ levels measured in Central Laboratory of Uludag University Medical School in Bursa. Reference values were estimated according to NCCLS Approved Guideline C 28-A. The central % 95 reference interval was determined nonparametric method.

The data can be used in comparative inter – Turkey studies and it can be combined with the data obtained from the other regions to determine reference values for Turkish population.

Keywords: Reference value, vitamin, antioxidant parameters

GİRİŞ

I.Giriş ve Amaç

Referans değerler ve aralıklar laboratuvar test sonuçlarının yorumlanmasında temel alınır ve klinisyen hekimlere sağlıklı ve hasta bireyleri ayırmada, hastalıkla ilgili durumun değerlendirilmesinde yardımcı olurlar. Referans değerlerin belirlenmesi ve referans aralıkların ortaya konması klinik kimyada çok önemlidir. Referans değer ve aralıklar üzerine olan bir seri makale klinik kimya laboratuvarları için Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC)'nin referans aralık hesaplanması için olan önerilerini ortaya koymaktadır. IFCC dökümanları referans değer teorisinin temel düşüncesini tanımlamaktadır (1) ve referans bireylerin seçimi (2), örnek toplanması ve işlenmesi (3), referans değerlerin istatistiksel prosedürler ile hesaplanması (4) ile referans değerlerin sunumu (6) için önerilerde bulunmaktadır. IFCC aynı zamanda her laboratuvarın kendi referans değerlerini üretmesi gerektiğini söylemektedir (1).

Laboratuvara spesifik referans aralıklarının üretimi klinik laboratuvarın esansiyel fonksiyonudur. Bununla birlikte eğer IFCC'nin tüm önerileri takip edilecek olursa bu işlem zahmetli, zaman alıcı ve pahalı bir süreçtir (7, 8).

Ülkemizde bu konuda yapılmış olan çalışmalar oldukça azdır ve gerekliliği aşıkardır. Bu amaçla Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Tahliller, Eğitim ve Araştırma Merkez Laboratuvarında 41 biyokimyasal parametre için 18-45 yaş arası sağlıklı bireylerden ve laboratuvar verileri kullanılarak referans aralıkları belirlenmiştir. Bu çalışmamızda rutinde kullanılan ve son yıllarda yapılmış araştırmalarda oldukça sık yer alan vitamin ve antioksidan parametrelerin referans aralıklarını belirlemeye çalıştık. Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz referans aralıklar laboratuvar koşullarımıza ve hasta kitemize uygundur. Çalışmamızın sonuçları Türkiye'de yapılan diğer çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırılabilir ve tüm

bölgelerden elde edilen veriler ile birleştirilip Türkiye için ortak referans aralıklarının belirlenmesi sağlanabilir.

II.Genel Bilgiler

Analit düzeyine göre hastalık var veya yok tanısı; hastalık yoksa hastalık için risk grubunda olup olmadığı kararı; risk grubunda ise izleme kararı; ilaç tedavisi için karar; komplikasyon riski; metastaz varlığı kararları tıbbi kararlar olarak adlandırılır. Referans aralıklar tıbbi kararda referans alınan sağlık göstergesi olan değer aralıklarıdır (9). Referans aralığı yalnızca sağlıklı bireyleri belirlemek için değil, belirli fizyolojik ve patofizyolojik durumları temsil etmek üzere de yapılabilir (10).

Referans aralıklar sağlık ve hastalıkla ilgili klinik değerlendirmede büyük önem taşımaktadır. Biyokimyasal testlerin sayısının gün geçtikçe artması ve çeşitlenmesi, üretilen verilerin yorumlanmasını dolayısıyla referans aralıklarını daha da önem taşıyor duruma getirmiştir. Dolayısıyla test sonuçlarının doğru ve kesin şekilde anlamlandırılmasını sağlayacak güvenilir referans noktaları bulunmalıdır. Populasyon, diyet, teknik ve referans grubun seçimine bağlı olarak laboratuvarlar ve bölgeler arası farklılıklardan dolayı her laboratuvarın kendi referans aralıklarını belirlemesi en ideal olanıdır (11). Uygun referans grubun oluşturulması gereklidir ancak çok az sayıda medikal merkez iyi ve homojen referans grup oluşturabilmektedir. Ayrıca ekonomik sıkıntılar durumu daha da zor hale getirmektedir. Her laboratuvarın referans aralıklarını hesaplaması zor olduğu için büyük çoğunluğu literatürlerdeki veya ticari kitlerdeki referans değerleri kullanmaktadır (12).

Klinik laboratuvarlardaki günlük uygulamalarda, laboratuvar test sonuçlarında yazılan referans aralık değerleri, çoğunlukla sağlıklı bireylerden elde edilen değerlerdir. Sağlıklı bireylerin seçimi, önceden belirlenmiş kriterlere göre hazırlanan anket formunun doldurulması, fizik muayenelerinin ve gerekli tetkiklerinin yapılmasından sonra gerçekleştirilir (13).

Sağlıklı bireylerden referans aralıklar, Amerika Birleşik Devletleri'nde bulunan "Klinik Laboratuvar Standandartları Ulusal Komitesi" (National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS) ve "Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu" nun (International Federation of Clinical Chemistry-IFCC) (13) önerilerine göre hesaplanmaktadır.

Laboratuvara başvuran bireylerden referans aralık saptamak için geliştirilmiş çeşitli yöntemler vardır (14). İndirekt yöntemler hastane verilerinden elde edildikleri için sağlıklı bireylerden referans aralık hesaplama yöntemlerine göre daha kolaydır ancak gelişmiş veri tabanlarına ihtiyaç vardır (15).

II.1. Referans değerler

Referans değerler referans bireylerden elde edilir. **Referans bireylerden** oluşan gruplar da **referans gruplar** olarak adlandırılır. Her grupta yer alacak bireyin yaş, cinsiyet, sağlık ve hastalık türü gibi hangi kriterlere göre seçileceği belirlenir. Belirlenmiş standartlar ve kriterlere göre örnekler toplanır, işlenir ve analiz edilir. Referans gruplardan bu şekilde elde edilen sonuçlara **referans değerler** denir. Her referans değerinin, hangi değerler arasında olması gerektiğini gösteren **referans aralık sınırları** hesaplanır (13).

Geçmişte sağlıklı bireylerden elde edilen referans aralıklar "normal değerler" olarak adlandırılmaktaydı. "Normal" sözcüğünün çeşitli anlamları olmasından dolayı karışıklık yarattığı gözlemlenmiş ve kullanılmaması gerektiği düşünülmüştür. Sağlıklı ve hastalıklı teriminin laboratuvar tarafından değerlendirilebilmesi için IFCC normal değer yerine referans değer ve bununla ilişkili olarak referans birey, referans sınır, referans aralık ve gözlenen değerler terimlerinin kullanılmasını önermiştir (9).

“Normal” terimi farklı şekillerde tanımlanabilir (16):

1. Bireyin kendi normal: Sağlıklı döneminde belirtilen bireyden elde edilmiş değer
2. Optimum sağlık koşullarındaki bireylerden elde edilmiş verilere dayanan değerler
3. Cohort (eş grupları) normalleri: Hastanın grubunu temsil eden sağlıklı toplumdaki bireylerden elde edilmiş değerler
4. Genel toplum normalleri: Hastanın geldiği toplumun tüm fertlerini temsil eden gruptan elde edilmiş normaller
5. İstatistikteki anlamıyla, normal dağılım ya da Gaussian dağılıma uyan veriler grubu : Epidemiyoloji yönünden değerlendirildiği zaman, %95 aralıktaki değerler normal olarak alındığında, %5'lik dış alanlardaki normal bireylerin mutlaka hasta olduğu kabul edilmektedir.

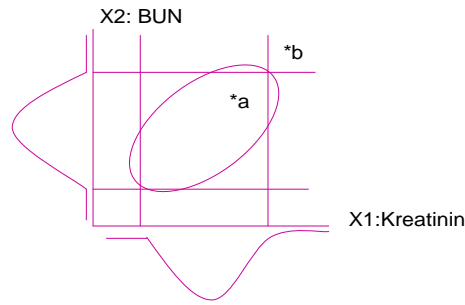
Referans değerler “sağlıkla ilişkili”, “diabetik”, “yatan hastalara ilişkin” ve “ayaktan tedavi gören hastalarla ilişkili” gibi tanımlanmaktadır. Ayrıca hesaplanmalarında temel alındıkları bireylere göre de adlandırılmaktadırlar (14):

- Popülasyona dayalı
- Bireye dayalı referans değerler

Popülasyona dayalı referans değerler, belirli kriterlere göre seçilen gruptan elde edilen verilerden oluşmaktadır. Bireye dayalı referans değerler ise, bireyin önceden tanımlanmış belirli bir durumunda elde edilen değerdir (14)

Belirli kriterlere göre seçilmiş bölgelerde (coğrafi bölgeler gibi), homojen referans grupları oluşturularak, referans aralıkları hesaplanabilir. Laboratuvarlar arasında kullanılan analiz yöntemlerine ve enstrümanlara göre birbirlerine çevrilebilirler. Önemli olan, referans aralıklarının, kullanıldıkları toplumu temsil etmeleridir (13).

Referans değerler tek analit için bulunabileceği gibi, birden fazla analitin aynı gruptaki referans bölgesi de hesaplanabilir. Tek analit için hazırlandığı zaman “tek değişkenli referans aralık”, aynı grup fakat birden fazla analit için hazırlandığı zaman “ok-değişkenli referans bölge”den bahsedilir. Örneğin sadece BUN için referans aralık hesaplanmışsa tek değişkenli referans aralık, BUN ve kreatinin birlikte değerlendirilerek aynı referans grup için bir referans alanı oluşturulmuşsa “populasyona dayalı çok değişkenli referans alanı” denilir (şekil 1) (14).



şekil 1. Populasyona dayalı çok değişkenli referans alanı

II. 1.1. Referans aralıkların saptanma aşamaları (Tablo I)

Tablo I. Referans aralıkların saptanma aşamaları

1. Referans aralık saptanması yolunun belirlenmesi
2. Referans bireylerin seçilme yönteminin belirlenmesi
3. Standart anket formunun oluşturulması
4. Referans aralığı saptanacak analitin özelliklerinin belirlenmesi
 - Örnek alınmadan önce referans bireylerin nasıl hazırlanacağı
 - Örneğin alınma ve saklanması hangi koşullarda yapılacağı
 - Analit ölçüm yöntemine girişim oluşturan etkenlerin saptanması
5. Laboratuvar koşullarının hazırlanması
6. Analitik kontrolün değerlendirilmesi ve sürdürülmesinin sağlanması
7. Belirlenmiş kriterlere göre verilerin toplanması
8. Verilerin istatistiksel analizinin değerlendirilmesi
9. İstatistiksel yöntemlere göre referans aralıklarının hesaplanması

II. 1. 1. 1. Referans Aralık Saptanma Yolunun Belirlenmesi

Referans değerler hangi bireylerden oluşursa oluşsun, tıbbi geçerlilik için, tanımlanmış uygun koşullarda elde edilen uygun verilerden hesaplanmalıdır. Referans değerlerin kullanılabilmesi için, aşağıdaki koşullara mutlaka uyulmalıdır (14):

1. Referans bireyler açık ve ayrıntılı olarak tanımlanmalı ve kaydedilmelidir.
2. Klinik karar verilirken, karşılaştırılan parametreden başka, karşılaştırılan grup referans grubuyla benzer olmalıdır. Örneğin: Hastalık var/yok kararında, hasta, sağlıklı olduğuna karar verilmiş olan referans grubuyla karşılaştırılırken; terapötik ilaç izlemede doz

ayarlanırken, aynı hastalığı geçirmiş, semptomları ilaçla yok edilmiş grup referans alınır.

3. Analiz için örneklerin alındığı ve hazırlandığı koşullar net olarak tanımlanmalıdır ve standardize edilmelidir.
4. Tüm birimler aynı olmalıdır.
5. Tüm laboratuvar sonuçları yeterli analitik kontrol altında mümkün olduğu kadar yüksek derecede standardize edilmiş yöntemlerle elde edilmelidir
6. Tanı için hastalığın patogenez evresinin sınırları çizilmelidir Tüm testlerin tanısal duyarlılığı, tanısal özgüllüğü, prevalansı ve yanlış kararlara neden olduğu zaman sebep olduğu mali ve klinik zarar mutlaka bilinmelidir.

II. 1. 1. 2. Referans Bireylerin Seçilme Yönteminin Belirlenmesi

Referans bireylerinin seçimi, referans aralığı saptamasında en önemli basamaklardan birini oluşturmaktadır. Öncelikle, referans popülasyonunun iyi belirlenmesi gerekmektedir. Bu popülasyon kişinin kendisi (kişinin sağlıklı dönemlerinde elde edilmiş olan test sonuçları), hastane dışı (yani sağlıklı varsaydığımız popülasyon) veya hastane popülasyonu olabilir. Hatta, daha spesifik değerlere ulaşmak hedefleniyorsa, hasta grupları bile ayrı popülasyonlar olarak ele alınabilirler (8)

. 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 (10, 17):

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

II. 1. 1. 2. 1. Direkt ve İndirekt Yöntem

Direkt yöntemde, belirlenmiş kriterlere göre hazırlanan anket formları ile seçilen bireylerin analizleri yapılır. Direkt yöntemde, “priori” ve “posteriori” olarak iki farklı şekilde ayırım yapılabilir (18, 22).

Referans aralığın saptanmasında önerilen protokol şu şekildedir (5, 17):

- 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.

İndirekt yöntemde laboratuvara başvuran hastalardan elde edilen sonuçlar kullanılarak referans aralıklar hesaplanır. Bu yöntem tüm koşulları sağlayan bir veri tabanını kullanarak ve geriye dönük olarak referans aralıklarını tespit eder (23). İndirekt yöntemlerden biri olan “Bhattacharya” yönteminde seçilmemiş birey verilerinin çoğunluğu sağlıklı ilişkili verilerden oluşmaktadır (24). Bu yöntemi esas alarak geliştirilmiş çeşitli modifikasyonlarla referans aralıklar indirekt olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde sağlıklı ilişkili veriler “gama fonksiyon” adı verilen işleme hastalıkla ilişkili verilerden ayrılmaktadır. Analitler için elde edilen verilerin histogramları çizilir. Histogramlardan yararlanılarak logaritmik bazı hesaplamalar yardımıyla elde edilen noktalardan doğrusal özellik gösteren aralıkta olanları sağlıklı ilişkili veriler olarak kabul edilir. Sağlıklı ilişkili verilerin aritmetik ortalamasının ± 2 standart sapma uzaklığındaki veriler referans aralık alt ve üst sınırları olarak saptanır (25-27).

Başka bir yöntem ise sağlıkla ilişkili verilerin dağılımının “mod” etrafında olan bölümünde bulunduğu temeline dayanmaktadır. Daha sonra bu verilerden GraphRoc bilgisayar programı kullanılarak, indirekt olarak olarak referans aralıklar saptanmaktadır (28).

Laboratuvar verilerinden referans aralık saptanırken kullanılan diğer bir yöntem de, bireylerin “taburcu tanılarına” göre referans aralığı saptanacak olan analitleri etkilemeyecek olan bireylerin verileri, referans aralık hesaplanmasında kullanılır (15). Daha sonra bu bireylerin verilerinden IFCC'nin önerilerine göre (gerekirse logaritmik transformasyon yapılarak) referans aralıklar saptanabildiği gibi parametrik olmayan yöntem kullanılarak da referans aralıklar saptanabilir (29).

II. 1. 1. 2. 2. “Priori” ve “Posteriori” Yöntem

Her ikisi de direkt örnekleme stratejisini uygular. Farkları referans birey seçimindedir. Analiz yöntemi ile ilgili bilgiler çok sayıda ve çok iyi biliniyorsa, bireyler tanımlanmış kriterlere göre seçilir ve örnekler toplanır (priori). Bu yöntem, ileriye dönük bir ayırım işlemidir. Analiz yöntemi ayrıntılı bilinmiyor ve hakkında yeterli bilgi toplanamıyorsa, bireylerden örnekler alınır. Analiz yapıldıktan sonra, ayırma yapılır ve alt gruplara bölünür (posteriori). Bu yöntem, geriye dönük bir ayırımdır. (30). Posteriori direkt yöntemde ise, bireylerden standardize koşullarda örnekler toplanırken, kriterlere göre hazırlanmış anketler doldurulur. Daha sonra seçim yapılır. Bu şekilde uygulamayla, referans grupları oldukça fazla sayıda birey içerebilir. Hasta veri tabanının kullanılması bu yöntemde girmektedir (31).

II. 1. 1. 2. 3. Rastgele ve Rastgele Olmayan Yöntem

Rastgele olan yöntemde grup üyelerinin hepsinin, referans grubun kriterlerini sağladığı düşünülerek örnekler toplanır ve analiz edilir. Elde edilen veriler istatistiksel analiz ile değerlendirilir, referans aralıklar hesaplanır. Referans aralıklarının saptanması için, kan donörlerinden ve hastane

alışanlarından grup oluşturularak referans aralık hesaplanması rastgele örnekleme tanımına girmemektedir (14).

Rastgele olmayan örneklemede seçilen popülasyondan grup oluşturmak için bireylerin önceden hangi kriterleri sağladığı saptanır. Rastgele olmayan örnekleme çoğunlukla uygulanan yöntemdir (31).

II. 1. 1. 3. Referans Birey Bilgilerinin Kaydedilmesi İçin Standart Anket Formlarının Oluşturulması

Referans verilerinin toplanması sırasında dikkate alınması ve kaydedilmesi gerekli olan tüm bilgiler (preanalitik etkenler gibi) analit özellikleri de dikkate alınarak belirlenir. Özel anket formları hazırlanır. “Referans aralık saptama anket formu” (Tablo II) olarak adlandırılabilir (17).

Tablo II. Referans aralık saptama anket formu

REFERANS ARALIK SAPTAMA ANKET FORMU

TÜM BİLGİLER KEŞİNLİKLE GİZLİ TUTULACAKTIR VE SİZİN KAN ÖRNEĞİNİZDEN ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ İÇİN KULLANILACAKTIR.
ÖRNEK NO: (LABORATUVAR TARAFINDAN DOLDURULACAKTIR)

ÖRNEK ALINDIĞI SAAT:
İSİM (ADI,SOYADI):

MEDENİ HALİ: TELEFON:
YAŞ: (YIL) CİNSİYET: İRK:
BOY: (m) (cm) AĞIRLIK: (kg)

MESLEK:
KENDİNİZİ SAĞLIKLI HİSSEDİYOR MUSUNUZ? (E) (H)
DÜZENLİ OLARAK EGZERSİZ YAPIYOR MUSUNUZ? (E) (H)
EVET İSE NE KADAR SIKLIKTA? (SAAT/HAFTA)
AKTİVİTENİN DERECESESİ? (HAFIF) 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 İLAÇI ALIYOR MUSUNUZ? (E) (H)
EĞER EVET İSE NE?
İŞİNİZDE TEHLİKELİ KİMYASAL MADDELERE (E) (H)
MARUZ KALİYOR MUSUNUZ?
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:
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 KALITSAL 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 İLAÇI 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, BEBEGİNİZİ EMDİRİYOR MUSUNUZ? (E) (H)
HAMİLE MISINIZ? (E) (H)
EĞER EVET İSE, TAHMİNİ DOĞUM TARİHİNİZ NEDİR?
ORAL KONTRASEPTİF KULLANIYOR MUSUNUZ? (E) (H)
EĞER EVET İSE HANGİSİ?

Tablo I'de dördüncü maddede belirtildiği gibi, referans aralığı saptanacak olan analitin ölçüm yöntemiyle girişim oluşturabilecek etkenler belirlenerek, bu konuda bilgi toplayabilecek sorular da, anket formunda bulunur. Gerekliğinde referans bireye ulaşabilmek için, anket formunda hastanın adı soyadı, telefon numarası, adresi bulunmalıdır. Anket formu konusunda, referans birey bilgilendirilir ve "yazılı olur" izni alınır (19).

Referans grubuna alınmayacak bireylerin belirlenebilmesi için, gruptan ayırma kriterleri belirlenir (Tablo III) ve bu kriterler anket formunda yer alır (32).

Tablo III. Gruptan ayırma (dışlama) kriterleri

Kan donörü olma	Gebelik
Hipotansiyon veya hipertansiyon durumu	Laktasyon
İlaç bağımlılığı	İleri derecede şişmanlık
İlaç kullanımı (reçeteli)	Meslek hastalığı varlığı
Genetik faktörler	Son zamanlarda geçirilen ameliyat:
Hastanede yatma (şu anda veya yakın zamanda)	Son zamanlarda yapılan transfüzyon:
Son zamanlarda geçirilen hastalık	Vitamin kullanımı

II. 1. 1. 4. Referans Aralığı Saptanacak Analitin Özelliklerinin Belirlenmesi

Referans aralığı saptanacak analite ait ve analiti etkileyebilecek özellikler de oldukça önem taşımaktadır. Bu nedenle bireylerin seçilmesinde kullanılan anket formlarına bu özelliklere yönelik sorular eklenmelidir (19). Örneğin vitaminlerin ölçüm numunelerinin ışıktan korunması gerekmektedir (33).

II. 1. 1. 5. Laboratuvar Koşullarının Sağlanması

Laboratuvar koşulları, analitin özellikleri, analiz yöntemi ve analiz cihazına göre düzenlenmelidir. Testi etkileyebilecek olan tüm preanalitik, analitik ve postanalitik etkenler standardize edilmelidir (32).

II. 1. 1. 5. 1. Preanalitik Evre

Preanalitik faktörler, biyolojik (metabolik ve hemodinamik kaynaklı biyolojik değişkenler, ilaç etkileşimleri, başka hastalıklarla etkileşimler) ve metodolojik (hasta örneği toplanması, örnek alma teknikleri, eklenen koruyucular, kan alma tüplerine aktarma şekli) faktörler başlıkları altında toplanılarak değerlendirilirler (34).

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 IV) (14).

Tablo IV. Analizi etkileyen preanalitik koşullar

Standardizasyon	Örnekler
Hasta pozisyonu	<ul style="list-style-type: none">• Yatar pozisyonda• Oturarak
Bireyin hazırlığı	<ul style="list-style-type: none">• En son yediği yemek içeriği ve ne zaman yediği• Farmakolojik ajan alıyor mu? Ne zamandır?• Biyolojik ritmlere göre örnek zamanı• Fiziksel aktivite
Örnek alınması	<ul style="list-style-type: none">• Örnek toplamadan önceki istirahat süresi• Stres durumu• Toplama sırasındaki çevre koşulları• Zaman• Örnek alma bölgesi• Ekipman• Teknik
Örneğin işlenmesi (analize hazırlık)	<ul style="list-style-type: none">• Taşınması• Pıhtılaşma süresi• Serum / plazmanın ayrılması• Korunması• Analize hazırlık

Laboratuvarda örneklerin tiplerine göre toplanma/alınma, analize hazırlık ve korunmaları konusunda prosedürler oluşturulmalı, referans bireylerden örnekler prosedürlere uygun alınmalıdır (Tablo V). Analitlere göre değişiklik gösteren işlemler de ayrıca not edilmelidir (35).

Tablo V. Örneklerin toplanmasında dikkat edilecek koşullar

<p>Örnek alınacak vakumlu tüplerin belirtilmesi</p> <ul style="list-style-type: none">• Antikoagülanlı veya antikoagülansız tüpe alınacağı belirlenmelidir <p>Analiz örneği sıvıları, fibrinojenden ve diğer hücre artıklarından arınmış olmalı</p> <p>Örnek kan ise</p> <ul style="list-style-type: none">• Kanın arteriyel, venöz veya kapiller olacağı bildirilmelidir <p>Diğer vücut sıvıları (BOS, idrar, plevra, perikardiyal sıvılar)</p> <ul style="list-style-type: none">• Toplanması, korunması, gönderilmesi ve işlenmesi ile ilgili prosedürler yazılarak ilgili birimler bilgilendirilmelidir• Özellikle toplanma zamanları ve laboratuvara ulaşma süreleri belirlenmeli ve kaydedilmelidir• Gerektiğinde koruyucuların ve antikoagülanların seçimi• İdrar analizlerinde, özellikle 24 saatlik idrarın miktar kontrolü için kreatinin ölçülmelidir <p>Sıcaklık</p> <ol style="list-style-type: none">1. Bazı analitler için örneklerin özel koşullarda alınması, saklanması, gönderilmesi ve işlenmesi gerekebilir. Örneğin: 37°C, oda sıcaklığı veya buz içinde <p>Anaerobik koşullarda saklanması</p> <ol style="list-style-type: none">2. Kan gazları ölçümlerinde olduğu gibi
--

II. 1. 1. 5. 2. Analitik Evre

Referans değerlerin elde edilme çalışmaları süresince, laboratuvarın analitik sisteminin geçerliliği kanıtlanmalıdır. Gün içi ve günler arası değişkenlikler belirlenmelidir (36).

Analitik performansı etkileyen diğer faktörler de (ekipman, enstrümantasyon, su dahil reaktifler, kalibrasyon standartları ve hesaplama yöntemleri) sürekli olarak kontrol edilir (Tablo VI). “Eksternal Kalite Değerlendirme Programları” sonuçları ile doğruluk verileri de değerlendirilebilir veya doğruluğu kanıtlayıcı bilgiler kaydedilir (36).

Tablo VI. Analitik sistem geçerliliğinin kanıtlanması (kalite güvence)

3. Reaktifler	Üretim numaralarına göre değişkenlikler
4. Kullanıcı	Kullanıcılar arasındaki değişkenlikler
5. Enstrüman	Enstrümanlar arasındaki değişkenlikler
6. Analitik kalite kontrol:	Kesinlik Gün içi – Grup içi Günler arası – Gruplar arası Doğruluk Bias İnterferans

II. 1. 1. 6. Analitik Kontrolün Değerlendirilmesi ve Sürdürülmesinin Sağlanması

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 (36). İç kalite kontrol sistemlerinin kontrol materyalleri ve kontrol kuralları, James Westgard tarafından geliştirilmiş olup, kalitenin monitorizasyonunda büyük değere sahiptir (37). Ricos ve arkadaşları ortak referans aralıklarının analitik kalite spesifikasyonları üzerinde durmuşlar ve dış kontrol materyalleri ile

gerçekleştirilen kontrolün, analitik spesifikasyonlar yönünden önem taşıdığını vurgulamışlardır (38).

II. 1. 1. 7. Verilerin Toplanması

Referans bireylerden elde edilen değerler bilgisayara aktarılır. Referans bireylerinden oluşan referans grupları, kendi içlerinde altgruplara ayrılabilir. Altgruplar bazı değişkenlere göre homojenliğin sağlanabilmesi için oluşturulur. Seçilen bireylerin içerisinde çok homojen alt grupların oluşturulması için bazı kriterlerin olması gerekmektedir. Altgruplara bölünmesinde temel alınan kriterlerin başında yaş ve cinsiyet gelmektedir. Tablo VII 'te altgruplara ayırma kriterleri özetlenmektedir (14).Grupların içinde homojenliğin sağlanabilmesi dolayısıyla standardizasyon için altgruplara bölme kriterleri de dikkate alınarak bilgiler toplanır (32).

Tablo VII . Alt gruplara ayırma kriterleri

Cinsiyet	Örneğin alındığı saat
Yaş	Örnek alınırken postür
İrk	Tütün kullanımı (sıklık ve miktar)
Coğrafik yerleşim	Diyet
Etnik durum	Egzersiz
Açlık veya tokluk	Kan grubu
Diurnal değişim	Menstrüel döngü evresi

II. 1. 1. 8. Verilerin İstatistiksel Analizinin Değerlendirilmesi

Referans örneklerin analizinden sonra veriler istatistiksel olarak incelenir. Bu incelemeler dağılımın incelenmesini, alt gruplara ayrılmasını, aşırı uç değerlerin belirlenmesini ve referans aralıkların saptanmasını içerir (14).

II. 1. 1. 9. İstatistiksel Yönteme Göre Referans Aralıklarının Hesaplanması

II. 1. 1. 9. 1. Referans Değerleri Hesaplama Yöntemleri

Hazırlanmış protokol ve prosedürlere göre referans bireylerden analiz materyalleri toplanır. Analiz edilir ve sonuçlar toplanır. İstatistiksel olarak incelenir. Hesaplama yöntemine karar verilir. Referans değerlerin hesaplanmasında iki istatistiksel yöntem kullanılmaktadır (Tablo VIII) (14):

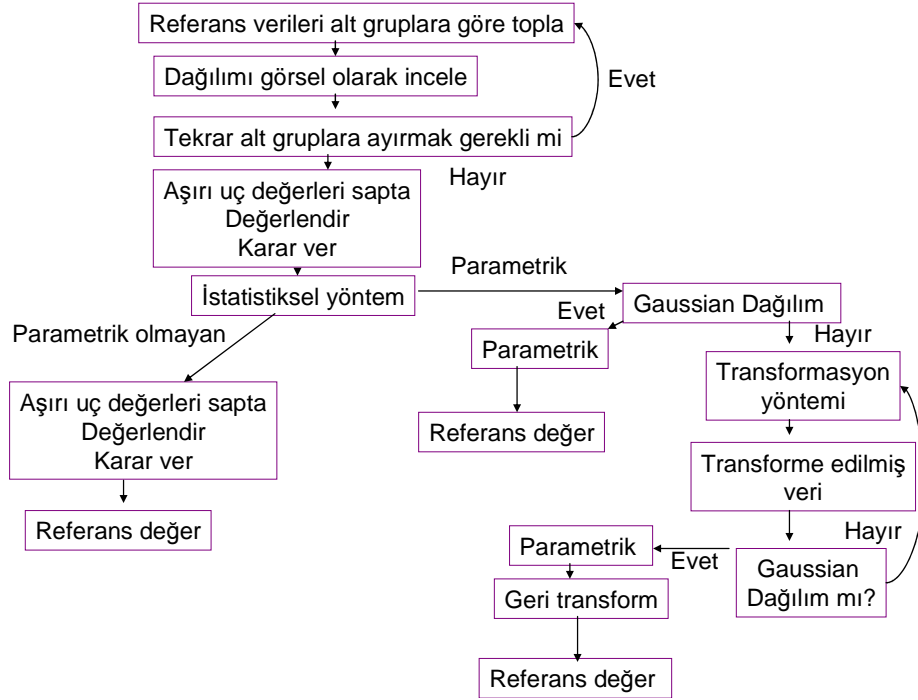
1. Parametrik yöntem
2. Parametrik olmayan yöntem

Parametrik yöntemde, referans grup verilerinin olasılık dağılımının “Gaussian/Normal” dağılıma uyduğu kabul edilir. Hesaplamalarda parametrik istatistik yöntemler kullanılır. Parametrik olmayan yöntemde ise, referans grup verilerinin, olasılık dağılım grafiğinin Gaussian dağılımına uymadığı düşünülür. Parametrik olmayan istatistik yöntemlerinden yararlanır (39).

Gerçekte referans bireylerinin analit düzeyleri ile ilgili verileri Gaussian formuna uymamaktadır. Parametrik yöntem kullanılması için transformasyon yapılması gerekmektedir (14).

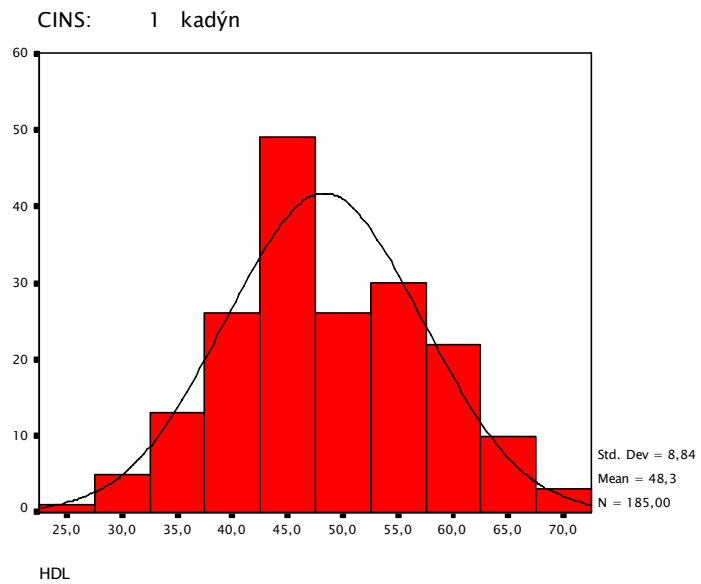
IFCC parametrik yöntem ile referans aralık hesaplamayı önerirken, NCCLS parametrik olmayan yöneme göre hesaplamayı temel almaktadır. Her ikisi için de referans aralık analizinde verilerin istatistiksel olarak değerlendirilebilmesi için en az 120 verinin yeterli olacağı belirtmiştir. Yaş ve cinsiyet gibi ana alt gruplar için de bu sayı geçerlidir. Fakat yenidoğan, pediatrik ve geriatik gibi popülasyonlarda alt gruplar için bu sayıda birey bulmak zor olabileceğinden böyle durumlarda ne kadar veri elde edilirse edilsin referans aralık analizleri yapılabilir (5, 17).

Tablo VIII: Referans aralıklarının hesaplanma algoritması



II. 1. 1. 9. 2. Dağılımın İncelenmesi

Referans grup verilerinin histogramları çizilir. Histogramlar manuel olarak veya bilgisayar programlarıyla oluşturulabilmektedir. Sütun grafikleriyle birlikte normal dağılım eğrisi de çizdirilebilir (Şekil 2) (35).



Şekil 2. Örnek histogram

Dağılım aşağıda belirtilen hususlar dikkate alınarak değerlendirilmelidir (14):

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 verilmesin de yardımcı olabilmektedir.

II. 1. 1. 9. 3. Aşırı Uçlarda Gözlenen Verilere Yaklaşım (Sapan Değerler)

Dağılımlar değerlendirilirken gözlenen dağılımdan ayrılmış aşırı uç değerler hesaplamalara alındığı zaman sonuçlar olumsuz etkilenmektedir (29).

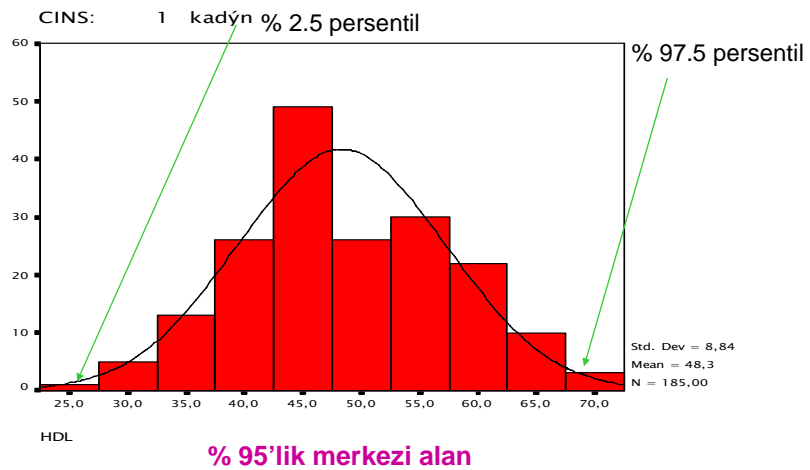
Parametrik dağılımlarda veriler normal dağılım gösterdiğinden aşırı uç değerler aritmetik ortalamanın ± 3 SD (standart sapma) veya ± 4 SD sınırları dışındaki değerler olarak alınır ve hesaplamalara katılmaz. Fakat biyolojik veriler çoğunlukla normal dağılıma uymamaktadır (35).

Parametrik olmayan dağılımlarda aşırı uç değerlerin saptanması ve hesaba alınmaması konusunda çeşitli hesaplar önerilmekte ve uygulanmaktadır. "D/R kuralı" referans aralıkların hesaplanmasında aşırı uç değerleri belirlemek için önerilen yöntemlerden biridir. Dixon tarafından

önerilen D/R oranına göre karar için kestirim değeri 1/3 olarak kabul edilmiştir (32). “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 (17).

II. 1. 1. 9. 4. Referans Değer Aralıklarının Belirlenmesi

Referans düzeyler tek değer olarak kullanılmazlar. Referans aralık sınırları verilirken hangi yüzdelikler arasının kabul edildiği belirtilmelidir. Tanımlanan yüzdelikteki değer o yüzdelikteki konsantrasyonu belirtir. Güven aralığı popülasyonun gerçek yüzdelik değerlerinin ne kadar güvenle hangi sınırdaki bulunduğunu gösterir. Referans grup verilerinin dağıldıkları alanın %95'lik merkezi alanındaki sonuçlar referans değerleri temsil ederler. Bu nedenle alt sınır 2.5'uncu yüzdelik, üst sınır 97.5'uncu yüzdelik değeri olarak alınarak referans dağılımının her iki ucundan %2.5'lük veri hesap dışı bırakılır (Şekil 2). Bu nedenle IFCC bu yüzdelikler arasındaki aralığın kullanılmasını önermektedir (5, 14, 17).



Şekil 3. Histogramda % 2.5 ve % 97.5 sınırlarının gösterilmesi

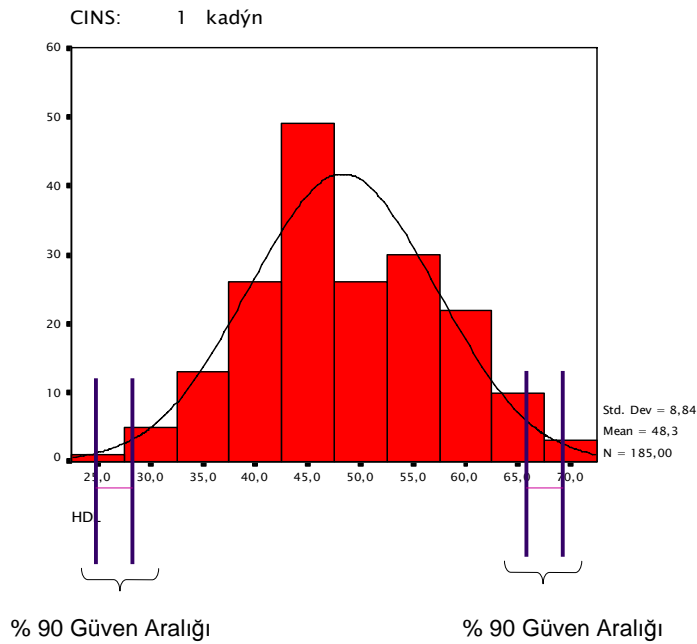
Parametrik yöntemle referans aralıklar aşağıdaki şekilde hesaplanır. Bu hesaplama ile merkezi alan % 95, alt sınır % 2.5 ve üst sınır % 97.5'dir (14):

- (Aritmetik ortalama) - {1,96 x (standart sapma)}...2.5'uncu yüzdilik
- (Aritmetik ortalama) + {1,96 x (standart sapma)}..97.5'uncu yüzdilik

Parametrik olmayan yöntemle referans aralıklar hesaplanırken veriler küçükten büyüğe olmak üzere sıralanır. % 2.5 alt sınır ve % 97.5 üst sınırlara karşılık gelen sıra numaraları aşağıda belirtildiği şekilde saptanır (14):

- Alt sınır: $r_1 = 0.025 (n+1)$ 2.5'uncu yüzdilik
- Üst sınır: $r_2 = 0.975 (n+1)$97.5'uncu yüzdilik

Hesaplanan her referans aralığın alt ve üst sınırları belirli sınırlar arasında değişir Referans aralıkların alt ve üst sınırlarının güvenliliğini artırmak ve belirsizlik derecesini azaltmak için alt ve üst sınırların güven aralığının hesaplanması gerekmektedir. (14, 25). Bu sınırlarda %90 veya %95 güvenle hesaplanır ve "%90 veya %95 güven aralığı" olarak adlandırılır (32). Örneklemdaki birey sayısı arttıkça güven aralığı daralır. Diğer bir deyişle bireyler arasındaki değişkenlik azalır. Referans aralık değerleri daha güvenilir olur (Şekil 4) (35).



Şekil 4. Histogramda güven aralıklarının gösterilmesi

Parametrik yöntemde, %90 güven aralıkları aşağıdaki formüle göre hesaplanmaktadır (14, 35):

$$\%90 \text{ Güven Aralığı} = (\text{Alt veya üst referans sınır}) \pm \{2,81(\text{standart sapma})/\sqrt{(\text{veri sayısı})}\}$$

Parametrik olmayan yöntemle güven aralıklarının hesaplanmasında Tablo IX'da gösterilen değerlerden yararlanılmaktadır (14).

Tablo IX. %90 güven aralığını belirleyen sıra numaraları

Örnek sayısı, (n)		Sıra	
En az	En çok	a	b
120	131	1	7
132	159	1	8
160	187	1	9
188	189	1	10
190	216	2	10
217	246	2	11
247	251	2	12
252	276	3	12
277	307	3	13
308	310	3	14
311	338	4	14
339	366	4	15
367	369	5	15

Not: "a" hedef popülasyonun 2.5'uncu yüzdeliikteki sınırın %90 güven aralığının alt sınırını temsil eden verinin numarasını gösterir. "b" hedef popülasyonun 2.5'uncu yüzdeliikteki sınırın %90 güven aralığının üst sınırını temsil eden verinin numarasını gösterir. 97.5 yüzdelik sınırları için a ve b değerlerine karşılık olan sıra numaraları, n+1'den çıkarılır.

II. 1. 1. 9. 5. Referans Değerlerin Hesaplanmasında Alt Grup Değerlerinin Karşılaştırılması

Biyolojik örneklerdeki ölçüm sonuçları bir çok faktörün etkisi altındadır. Referans bireylerden bu etkenler dikkate alınarak alt grupların oluşturulması ile bireyler arasındaki varyasyonlar en aza indirilir. Sonuç olarak mümkün olduğu kadar homojen gruplar elde edilmiş olur. Alt grup değerleri elde edildikten sonra gruplar arasındaki farklılıklar test edilerek karşılaştırılır ve klinik kullanıma sunulur (14, 17).

Öncelikle alt grupların hangi kriterlere göre oluşturulacağına karar verilir. Bunun için çalışma konusu olan analit ile ilgili fizyolojik bilgiler elde edilir, klinik yararlılık saptanır. Alt grup gerekiyorsa ve analitin klinik anlamlılığı da biliniyorsa en az 120 bireyden oluşacak şekilde alt gruplar ayrılır (5, 14, 17).

İki dağılımdaki ortalamalar ve grup içi değişkenliklerdeki farklılıklar karşılaştırılır. Ortalamalar arasındaki farklar, iki alt grup için "Student's t-testi" ile, çok sayıda alt grup için "varyans analizi" ile test edilebilir. Bu testlere parametrik olmayan alternatifler olan "Mann-Whitney U testi", "Wilcoxon'un rank-sum testi" ve "Kruskal-Wallis çoklu örneklem" testleri uygulanabilir. Grup içi varyasyonların farkları test edilirken iki varyans oranı için "Fisher's F-testi", ikiden fazla varyans için "Bartlett's testi" ve normal dağılım varsayımına az duyarlı olan "Levene's testi" gibi parametrik testlerden yararlanılabilir (39).

Alt grupların ortalamaları arasındaki farkın tıbben önemli olan anlamlılık derecesi iki yolla incelenebilir (35):

1. Standart normal sapma testi:

Tablo X'da belirtildiği gibi "z değeri" ve "kritik z değeri" hesaplanır. Hesaplanan "z değeri" "kritik z değeri"nden büyük ise alt grupların referans aralıkları ayrı ayrı hesaplanır.

Tablo X. z değerlerinin hesaplanması için kullanılan formüller

$$z = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{[(s_1^2 / n_1) + (s_2^2 / n_2)]^{1/2}}$$

(x_1, x_2 : Alt grupların aritmetik ortalamaları, s_1, s_2 : Alt grupların standart sapmaları, n_1, n_2 : Alt grupların veri sayıları)

$$z_{\text{kritik}} = 3 (n_{\text{ort}} / 120)^{1/2} \dots\dots\dots n_{\text{altgrup}} = 60 \text{ için}$$

$$z_{\text{kritik}} = 3 [(n_1 + n_2 / 240)]^{1/2} \dots\dots\dots n_{\text{altgrup}} = 120 \text{ için}$$

2. Standart sapmalar arasındaki oran:

Standart sapması büyük olan alt grubun standart sapma değeri küçük olanın 1.5 katı veya daha fazlası ise alt grupların referans aralıkları ayrı ayrı hesaplanır (14).

Birden fazla alt grup karşılaştırılması gerektiği durumlarda problem daha komplike hale gelir ve istatistiksel yardım gerekir. 3 veya daha fazla alt grup için ANOVA testi önerilmektedir. Bilgisayar istatistik programında alt gruplar eşleştirilerek ANOVA ve F-test yapılır. Eşleşmiş ortalamalar Tukey testi ile karşılaştırılır. İstatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan alt gruplar anlamlılık için z kriterine göre karşılaştırılır. Yukarıda açıklanan kriterler referans aralıklarının laboratuvarlar arasındaki transferinde de kullanılabilir (17, 40).

II. 1. 2. Referans Aralıkların Transferi ve Geçerli Kılınması

Her laboratuvarın test listesindeki tüm analitler için güvenilir referans aralıklarını belirlemesi ana görevlerindendir. Güvenilir referans aralıkların hesaplanması analit sayıları ve yeni yöntemlerin gün gittikçe 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 (14, 17):

- 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 birbiriyle uyumlu olmalıdır
- 4- Preanalitik, analitik ve postanalitik uygulamalar her iki laboratuvarda standardize programlarla yapılmalıdır

Aynı laboratuvara yeni bir analiz yöntemi veya enstrüman kurulduysa bu durumda referans aralık transferinde analitik sistemler dikkate alınır. Hasta örnekleri kullanılarak yapılan yöntem karşılaştırma deneylerinin sonuçlarına göre transfer gerçekleştirilir. Genel olarak iki analitik sistem benzer belirsizlik ve bilinen interferansların etkisindeyse, aynı veya karşılaştırılabilir standart ve kalibratörler kullanıyorsa, sonuçlar aynı birimlerde ise ve yöntem karşılaştırma deneylerinden kabul edilebilir sonuçlar elde edildiyse veriler transfer edilebilirler (14,17,35).

Eğer bir laboratuvar üretici firma veya diğer laboratuvarın aynı analitik sistem için saptadığı referans aralıklarını kullanacaksa bu durumda referans popülasyonun farkı gündeme gelir. Ayrıca bunlara ek olarak preanalitik faktörler de referans değer hesaplama çalışmaları kapsamına alınmalıdır. Bu tür transfer klinik laboratuvarlarda sıklıkla karşılaşılan referans aralık transfer tipidir (14, 17, 34).

Referans aralıkların transferinden sonraki aşama, kendi toplumumuzdaki geçerliliğinin kanıtlanmasıdır. Popülasyon ve analitik sistem özellikleri ile ölçütler değerlendirilerek karar verilir ya da küçük referans gruplar oluşturularak referans aralıklar değerlendirilir (35).

II. 1. 3. Referans Aralıkların Belirtilmesi ve Bildirilmesi

Her analit için hesaplanan referans aralıklar laboratuvar sonuç raporlarında belirtilirken özellikle yaş ve cinsiyetten kaynaklanan farklılıklara dikkat çekilmelidir. Bu aralık dışında ölçülen değerler için “yüksek” veya “düşük” şeklinde sonuç raporlarında uyarı yapılmalıdır (35).

II. 1. 4Türkiyede Yapılan Referans Aralıkları Belirleme Çalışmaları

Ülkemizde referans aralıkların hesaplanması üzerine özellikle son yıllarda sınırlı sayıda da olsa çalışmalar yapılmıştır. Örneğin Denizli’de laboratuvara başvuran bireylerden ve ayrıca sağlıklı bireylerden (41) Bursa’da sağlıklı bireylerden (19) ve laboratuvar verilerinden (27) rutin biyokimyasal analizlerin; sağlıklı bireylerden plazma total homosistein düzeylerinin (42); pediatrik popülasyonda serum bilirubin düzeylerinin (43); 40 yaş ve üzeri erkeklerde prostat spesifik antijen düzeylerinin (44) Türk toplumuna ait referans aralıkları ortaya koyulmuştur. Rutin olarak klinikte sıklıkla faydalanılan parametrelerin yanında üzerinde araştırmalar yapılan ve önemi ortaya konulan oksidatif stres ve antioksidanlar için de Türkiye’deki referans aralık çalışmalarının gerekliliği yapılan birkaç çalışma ile ortaya konulmuştur (45, 46).

III. Oksidatif Stres ve Serbest Radikaller

Oksidatif stres genel olarak prooksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin prooksidanlar lehine bozulduğu patolojik bir tablodur. Canlı organizmadaki serbest radikallerin başlıca kaynağı oksijendir. Serbest oksijen radikalleri (SOR) normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan yan ürünlerdir ve başlıca hedef molekülleri çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir (47).

Oksidatif stres ve buna bağlı biyolojik etkilerin birçok hastalıkla ilişkisi olduğunu gösteren çalışmalar yapılmış ve halen yapılmaktadır. Bu hastalıklar arasında kalp damar hastalıkları, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, bazı

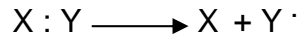
kanser türleri, nörodejeneratif hastalıklar, katarakt, respiratuvar distres sendromu, romatoid artrit gibi bazı otoimmün hastalıklar ve enfeksiyon hastalıkları bulunmaktadır (48, 49). Ancak serbest radikal ve antioksidan sistemlere ait enzimlerin referans değerleri hakkında literatürde bazı çalışmalar olmasına rağmen halen çok fazla veri bulunmamaktadır (50, 51, 52, 53).

III. 1. Serbest Radikaller

Serbest radikaller için birçok tanım yapılmasına rağmen en çok kabul gören tanım; bir serbest radikalın moleküler ya da atomik yörüngesinde bulunan ve genelde çok reaktif olan çiftleşmemiş elektron bulunduran bir kimyasal ürün olduğu şeklindedir. Atomlardaki elektronlar yörünge olarak bilinen boşluklarda hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur (54).

Bir serbest radikal 3 yolla ortaya çıkabilir (55):

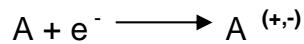
1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar (Bölünme sonrası her bir parçada ortak elektronlardan biri kalır).



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar. Heterolitik bölünmede kovalent bağı oluşturan her iki elektron atomlardan birisinde kalır.



3. Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi ile oluşurlar.

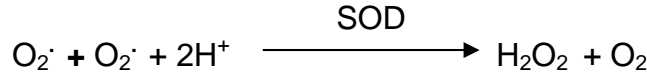


Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşurlar (54). Serbest oksijen radikalleri yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktif olduklarından tüm hücre bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliği gösterirler ve yapılarının bozulmalarına neden olurlar (56). Biyolojik sistemlerdeki reaktif

oksijen türleri (ROS); süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali (HO^{\cdot}), nitrik oksit (NO^{\cdot}), peroksil radikali (ROO^{\cdot}) ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli bileşenlerini oluştururlar (57, 58, 59).

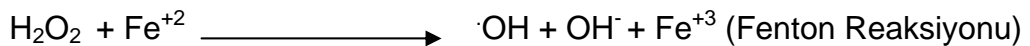
III. 1. 1. Süperoksit Radikali ($O_2^{\cdot-}$) (57, 58, 59)

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) organizmada en çok üretilen radikaldir. İnsan vücudundaki pek çok molekül (örneğin mitokondriyal elektron transport sistemi elemanlarının bir kısmı) oksijenle direkt olarak reaksiyona girerek $O_2^{\cdot-}$ oluşturabilir. $O_2^{\cdot-}$ bu şekilde fizyolojik olarak oluştuğu gibi yabancı mikroorganizmaları öldürmek üzere aktif fagositler tarafından koruyucu amaçla da üretilir. $O_2^{\cdot-}$ organizmada en çok üretilen radikal olmasına karşın reaktivitesi çok yüksek değildir. Hidroksil radikaline ($^{\cdot}OH$) göre daha düşük bir reaktiviteye sahip olduğu için açığa çıktığı hücre bölümünden daha uzak yerlere difüze olabilir. Ancak bu difüzyon hücre içindeki süperoksit dismutaz (SOD) enziminin yüksek konsantrasyonu nedeniyle sınırlıdır.

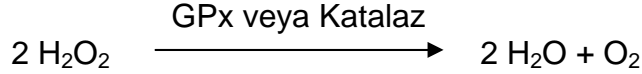


III. 1. 2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2) (57, 58, 59):

H_2O_2 aslında gerçek bir serbest radikal değildir. Çünkü bütün elektronları eşleşmiştir. Ancak demir, bakır, mangan gibi geçiş metalleri ile reaksiyona girerek $^{\cdot}OH$ radikali oluşumuna yol açabildiğinden dolayı önemli bir oksidandır. H_2O_2 DNA hasarı yapıcı etkisini $^{\cdot}OH$ radikali aracılığı ile gösterir.



H₂O₂'nin biyolojik önemi hidrofobik membranlardan kolayca diffüze olabilmesidir (örneğin mitokondriyal membranlar). H₂O₂ plazma membranlarından da kolayca diffüze olarak toksik etkisini daha uzak hücrelerde de gösterebilir. İnsan hücrelerinden H₂O₂'nin uzaklaştırılmasına katalaz veya glutatyon peroksidaz (GPx) aracılık eder.



III. 1. 3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$) (57, 58):

Biyolojik sistemlerde bulunan potansiyel olarak en güçlü oksidandır. Yarı ömrü çok kısa ve reaktivitesi çok yüksek olduğu için komşu moleküllerle hızla reaksiyona girer. Organizmada başlıca Fenton ve Haber-Weiss Reaksiyonları ile elde edilir. $\cdot\text{OH}$ radikalinin en önemli özelliği hücre membranlarına yakın yerlerde oluştuğunda membran fosfolipidlerinin yağ asidi yan zincirlerine etki ederek serbest radikal zincir reaksiyonunu başlatabilmesidir.

III. 3. Oksidatif Stres ve Serbest Radikal Hasarının Dokular Üzerine Etkileri

Serbest oksijen radikalleri ile makromoleküller (proteinler, DNA/RNA, lipidler, karbonhidratlar) arasındaki etkileşimler reversibl ve irreversibl oksidatif hasara yol açabilir (60):

- DNA/RNA üzerine olan etki: Deoksiriboz halkasının ayrılması, baz hasarı, zincir kırılmaları sonucunda mutasyonlar, translasyonel hatalar ve protein sentezi inhibisyonu ortaya çıkar.
- Proteinler üzerine olan etki: Agregasyon ve çapraz bağlanma, parçalanma ve kırılma, tiyol grupları modifikasyonu meydana gelir. Sonuçta enzim aktivitelerinde değişimler, iyon transportu değişimleri, hücre içine Ca⁺² girişinde artış olur.

- Çoklu doymamış yağ asitlerine etki: Lipid peroksidasyon ürünlerinin oluşumu hücre membran akışkanlığında azalma, permeabilite değişiklikleri ve membrana bağlı enzimlerin aktivitelerinde değişikliklere yol açar.
- Karbonhidratlar üzerine olan etki: Özellikle monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu H₂O₂, peroksitler ve oksoaldehitler (glioksal, vs) oluşur. Antimitotik özellik gösteren oksoaldehitler karsinogenez ve yaşlanmada rol oynarlar.

III. 4. Antioksidanlar

Organizmada tüm anabolik ve katabolik reaksiyonlar sırasında sürekli olarak oksidanlar üretilmektedir (61). Bu reaktif oksijen türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta “antioksidan savunma sistemleri” olarak bilinen bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (Şekil 5) (54). Böylece sağlıklı bir organizmada oksidan düzeyi ve antioksidanların bunları etkisizleştirme gücü bir denge halinde bulunur (Tablo XI) (61). Bu radikallerin oluşma hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum sonuçta doku hasarına yol açmaktadır (62)

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi, hem de hücre dışı savunma mekanizmalarıyla etkisiz hale getirirler. Hücre dışı savunma albümin, bilirubin, transferin, serüloplazmin, ürik asit, vitaminler gibi çeşitli molekülleri içermektedir. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadırlar. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon-S-transferaz, glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon redüktaz (GR), katalaz ve sitokrom oksidazdır. Bakır, çinko ve selenyum gibi eser elementler ise bu enzimlerin fonksiyonları için gereklidir (63).

Tablo XI. Serbest Oksijen Radikalleri ve İlgili Antioksidan Savunma Sistemleri

Serbest Oksijen Radikalleri/Prooksidanlar	Antioksidanlar		
	Enzimatik Olmayanlar		Enzimatik
	Suda Çözünenler	Yağda Çözünenler	
Süperoksit	Vitamin C	-	Süperoksit Dismutaz
Singlet Oksijen	Vitamin C, Ürik Asit, Protein Tiyolleri	Vitamin E	-
Hidrojen Peroksit	Vitamin C ve Protein Tiyolleri	-	Glutasyon Peroksidaz
Hidroksil Radikali	Vitamin C, Glutasyon	-	-
Hipokloröz Asit	Vitamin C, Ürik Asit, Protein Tiyolleri, (Albümin)	-	-
Lipid Hidroperoksitleri	-	-	Glutasyon Peroksidaz, Glutasyon S-Transferaz, Paraoksonaz
Alkoksil ve Peroksil Radikalleri	B-Karoten, Albümin, Bilirubin	Vitamin E, Ubikinol	-
Nitrik Oksit Radikali	Tiyoller	Vitamin E	-
Peroksinitrit	Vitamin C	Vitamin E	-
Serbest Demir	Transferin	-	-
Hem ve Hem İçeren Proteinler	Haptoglobın, Hemopeksin, Albümin	-	-
Bakır	Serüloplazmin, Ürik Asit, Albümin	-	-

Antioksidanlar etkilerini başlıca şu yollarla gösterirler (64):

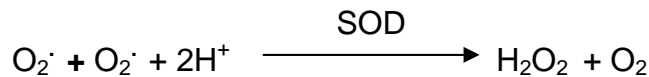
- Serbest radikal oluşumunun önlenmesi veya serbest radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması
- Katalitik metal iyonlarının uzaklaştırılması
- Çöpçü (scavenger) etki: serbest oksijen radikalleri ile etkileşerek onları yakalama ve daha az reaktif başka bir moleküle çevirerek etkisiz hale getirme (örneğin, antioksidan enzimler)
- Söndürücü (quencher) etki: Serbest oksijen radikalleri ile etkileşime girip onlara bir proton aktararak aktivitelerinin azaltılması veya inhibe edilmesi (örneğin, flavinoidler, vitaminler)
- Onarıcı (repair) etki
- Zincir kırıcı (chain breaking) etki: Serbest oksijen radikallerini ve zincirleme reaksiyonları başlatacak diğer maddeleri bağlayarak zincir reaksiyonlarının yavaşlatılması veya sonlandırılması (örneğin; transferin, ferritin, serüloplazmin).

Birçok antioksidan bu etkilerden birkaç tanesini bir arada gösterebilmektedir (61).

III. 4. 1. Enzim Yapısındaki Antioksidanlar

III. 4. 1. 1. Süperoksit Dismutaz (SOD) (E.C.1.15.1.1)

Hücrede serbest oksijen radikalleri oluşurken ilk basamakta süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) meydana geldiği ve SOD enzimi bu radikalın dismutasyonunu sağladığı için hücre içindeki ilk savunma sistemini oluşturmaktadır (65).



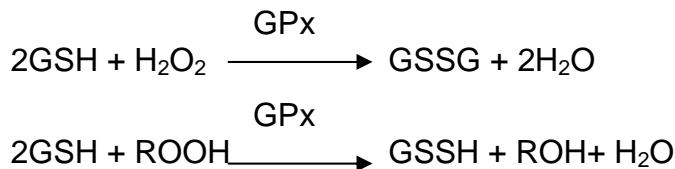
SOD metalloprotein yapısındadır ve farklı formlarda stoplazmada, mitokondriyal matriksde ve hücre dışı sıvılarda bulunur (58). Ökaryotik hücrelerde SOD'ın üç farklı izoenzimi mevcuttur: Bakır, çinko SOD (Cu,Zn-

SOD), mangan SOD (Mn-SOD) ve hücre dışı SOD (EC-SOD). Bakır ve çinko içeren iki alt birimden oluşan 32 000 Dalton molekül ağırlığındaki form esas olarak bütün hücrelerin sitozolik kompartmanında bulunurken (Cu,Zn-SOD), 80 000 Dalton molekül ağırlıklı Mn-SOD mitokondriyal matriksde yerleşim gösterir. Mn-SOD total hücreSEL SOD aktivitesinin onda birini oluşturur ve Cu,Zn-SOD'ın tersine pH-duyarlıdır; pH artışında aktivitesi büyük ölçüde azalır. EC-SOD, Cu,Zn-SOD yapısındadır ancak hücre dışı ortamda yer alır. Vasküler düz kas hücrelerinde sentezlenir, endotelial yüzeyde hücre dışı matrikse ve heparan sülfat glikozaminoglikanlarına bağlanır, endotel kaynaklı nitrik oksit in süperoksit bağımlı inaktivasyonunun en aza indirilmesini sağlar (66). Süperoksit radikalleri spontan olarak dismutasyona uğrayabilirler ancak SOD bu dismutasyonun hızını 10 kat artırır (67).

III. 4. 1. 2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) (E.C.1.11.1.9)

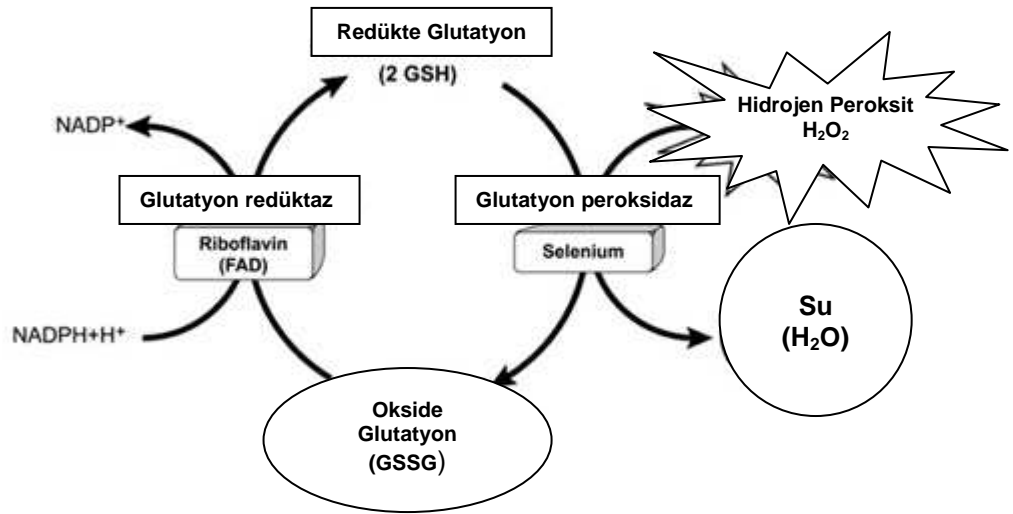
Aktif bölgesinde selenosistein aminoasidi içeren tetramerik enzim ailesidir. Düşük moleküler ağırlıklı tiyollerini kullanarak glutasyonu (GSH) ve lipid peroksidlerini redükte eder. Günümüzde dört tane GPx izoformu tanımlanmıştır: GPx-1 (hücreSEL GPx) bütün hücrelerde bulunur ve hidrojen peroksidlerini redükte eder; GPx-2 (gastrointestinal GPx) gastrointestinal epitel hücrelerinde bulunur ve diyetSEL peroksidlerin redüksiyonunu sağlar; GPx-3 (hücre dışı GPx) memelilerde hücre dışı kompartmandaki en önemli antioksidan enzimdir; GPx-4 (fosfolipid hidroperoksit GPx) esterifiye lipidleri redükte eder (66-69).

Glutasyon peroksidaz eritrositlerde oksidan strese karşı en etkili antioksidan olup H₂O₂ ve lipid hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizler. Her iki reaksiyonda da indirgenmiş glutasyon (GSH) hidrojen vericisi olarak kullanılır (70).



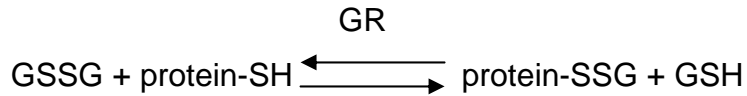
III. 4. 1. 3. Glutatyon Redüktaz (GR) (1.6.4.2)

GPx'in reaksiyonu sırasında oluşan okside glutatyonu (GSSG) redükte glutatyona (GSH) dönüştürerek dolaylı olarak antioksidan etki gösteren bir enzimdir (Şekil 6). Bu kataliz gerçekleştirilirken koenzim olarak NADPH kullanılır. GR enziminin hücresel fonksiyonu GSH:GSSG oranınının 20:1 olarak kalmasını sağlamaktır (71).



Şekil 6. Glutatyon döngüsü

Normal şartlarda GR ile GSSG'nin redüksiyonu oldukça hızlıdır, ancak oksidatif stres söz konusu olduğunda GSSG birikimi olabilir. Bu durumda GSSG ya hücrelerden transport olur veya protein sülfhidrilleri ile etkileşerek protein-disülfidlenmiş glutatyon ürünleri oluşumuna neden olur (72).



III. 4. 2. Enzim Yapısında Olmayan Antioksidanlar

III. 4. 2. 1. Antioksidan Vitaminler

Vitaminlerin yeterli miktarda alınımı normal büyüme-gelişme ve sağlığın sürdürülmesi için gereklidir (73). Günümüzde vitaminler nutrisyonel durum kandaki konsantrasyonlarının ölçümü ile ortaya konmaktadır.

Vitaminlerin günlük alınması gereken miktarları (The Recommended Dietary Allowance; RDA) Amerikalı ve Kanadalı toplumların serum veya kan referans değerlerinin alt sınır konsantrasyonunu sağlayacak vitamin alınımı temel alınarak yapılmıştır (74).

Vitamin eksikliği yaygın olmamasına karşın doğumsal metabolizma bozukluklarında veya diyet ile alımının ciddi şekilde kısıtlanması sonucunda eksiklik görülebilir. Sıklıkla karşılaşılan vitamin eksikliği nedenleri beslenme bozuklukları, besinlerin emilimini etkileyen bazı hastalıklar, aşırı kan kayıpları, hemodiyaliz, metabolik nedenler ve bazı ilaçların kullanılmasıdır. Vitamin düzeylerinin arttığı durumlar RDA düzeylerinin aşıldığı zamanlarda görülmektedir (14).

Vitamin düzeylerinin referans aralıkların dışına çıkmasına neden olabilecek durumlarda kişilerin vitamin düzeylerinin laboratuvar testleri ile belirlenmesi gerekliliği önem kazanır. Bu gereksinim yeni yöntemlerin kullanılması ile elde edilen sonuçların geliştirilmesini ve değerlendirilmesi konusunu gündeme getirir (14).

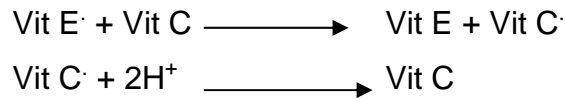
Günümüzde laboratuvarlarda plazma, tam kan veya eritrositlerde vitaminlerin konsantrasyonlarını, vitamin durumunu kesin olarak değerlendirecek objektif metodlar ve veriler halen bulunmamaktadır (73). Kullanılan RDA değerlerinin ölçüm metodlarından bağımsız referans değerler olmadıkça kesin olamayacağını bildirilmiştir (74).

III. 4. 2. 1. 1. Vitamin C (Askorbik Asit)

Vitamin C vücudun normal metabolik fonksiyonu için gerekli suda çözünen esansiyel bir vitamindir (75). İnsanlar ve diğer primatlar glukronik asit yolağından C vitamini sentezlenmesi için gerekli L-glukanolakton oksidaz enzim geninin mutasyonu sonucu C vitaminini sentezleyemezler (76). Bu nedenle C vitamininin diyetle alınması zorunludur; güncel RDA miktarı sigara içmeyen, sağlıklı erişkin için 60 mg/gün olarak belirtilmiştir (77).

Vitamin C biyolojik sıvılardaki önemli suda çözünen antioksidandır (78):

- Güçlü bir elektron donörüdür ve redükleyici ajandır, serbest radikallere karşı scavenger görevi yapar
- O_2^- Radikali, OH radikali ve hipokloröz asidi indirger
- Aktif nötrofil ve monositlerden kaynaklanan oksidanları nötralize eder
- Demir ve bakır içeren reaksiyonlara etki eder. Örneğin; Fenton Reaksiyonu
- Lipid peroksidasyonu başlamadan önce sulu ortamdaki peroksil radikalleri ile direkt olarak reaksiyona girerek membranları peroksidatif hasardan korur
- LDL oksidasyonunu önler ve elektronları membrandaki E vitaminine transfer eder
- Oluşan E vitamini radikalini redükte ederek E vitaminini yeniden oluşturur. Böylece E vitamininin yeniden kullanılmasını sağlar. Ayrıca antiproteazların oksidan maddelerle inaktive olmasını engeller (79).

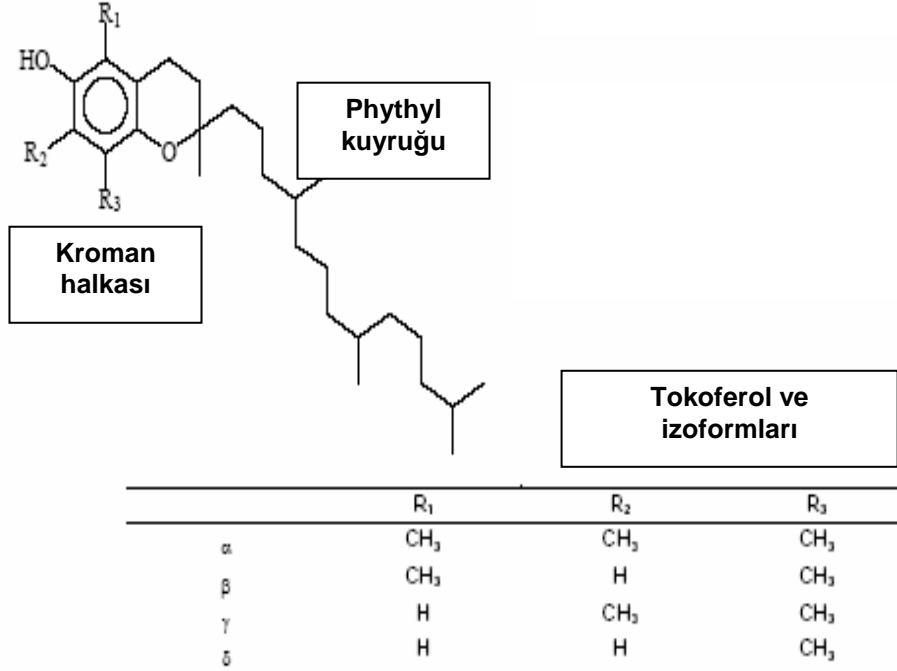


C vitamini hidrofilik bir molekül olduğundan sulu ortamlarda E vitaminine göre daha iyi bir antioksidandır. Suda çözünebilen diğer antioksidanlarla kıyaslandığında plazma lipid peroksidasyonu engelleyen en iyi antioksidandır (80).

III. 4. 2. 1. 2. Vitamin E

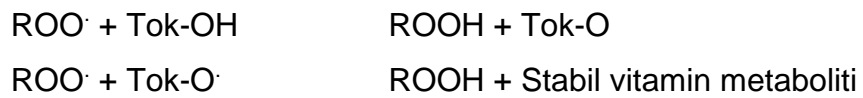
Vitamin E yağda çözünen esansiyel bir vitamindir. Doymuş yan zincirli tokoferoller olarak adlandırılan birbiri ile ilişkili iki grup için kullanılan bir terimdir. Bu gruplar kromanol halkalarının 5, 7, 8. pozisyonlarındaki spesifik metil gruplarına göre alfa, beta, gamma ve delta olarak izoformlara ayrılırlar. Alfa tokoferol insan dokularında en fazla bulunan ve en yüksek biyolojik aktiviteye sahip formdur (Şekil 7) (81, 82). Antioksidan etkisi en fazla olan

alfa tokoferolün yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif formunu oluşturur ve antioksidan özellik de bu gruptan kaynaklanmaktadır (83).

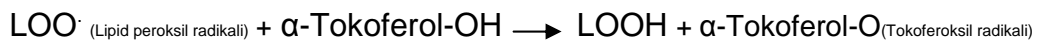


Şekil 7. E vitamini ve izoformları

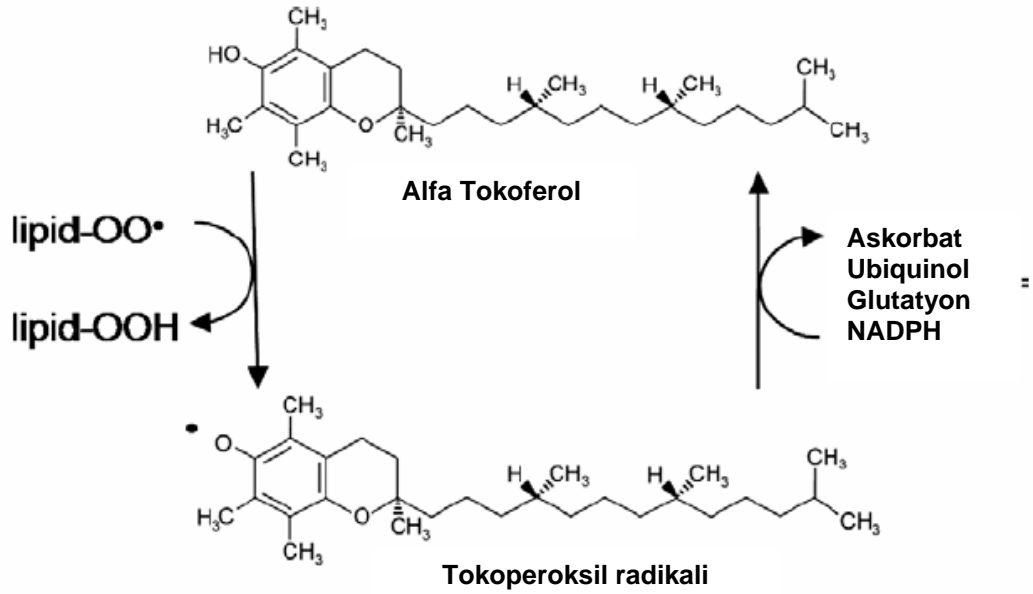
Alfa tokoferol oluşan reaktif oksijen ve reaktif nitrojen türlerine karşı çok güçlü bir scavengerdir (82). E vitamini (Tok-OH), peroksitler üzerindeki nötralize edici etkisini kendisinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikale (ROO[·]) transfer etmek suretiyle iki basamakta yapar (84):



Tokoferol hücre membran fosolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırarak serbest radikal etkilerinden korur ve bu nedenle zincir kırıcı antioksidan olarak bilinmektedir (85):



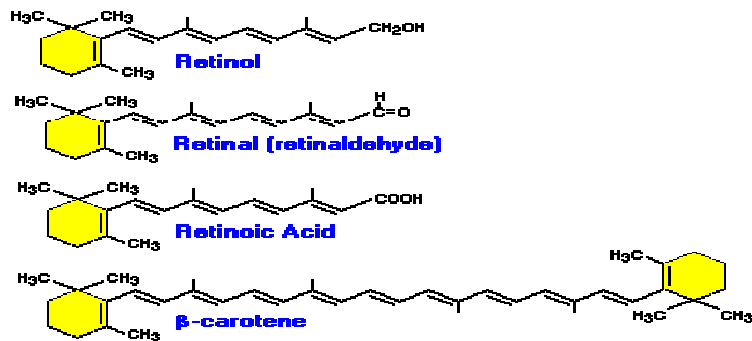
Reaksiyon sonucu oluşan tokoferoksil radikali stabil bir bileşiktir. Vitamin C, ubiquinol, glutatyon ve NADPH molekülleri ile rejenere olabilir veya glukronik asitle oksidasyona uğrayarak safra yolu ile atılır (Şekil 9) (86).



Şekil 9: Alfa tokoferolün lipid peroksidasyonundaki rolü

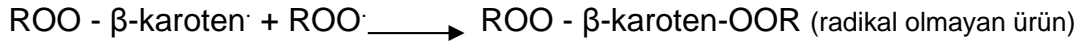
III. 4. 2. 1. 3. Vitamin A

Vitamin A siklohekzenil halkası taşıyan bir poliizopren bileşiğidir. Alkol (retinoller), aldehitler (retinaller) ve retinoik asitler başta olmak üzere A vitamininin çeşitli vitaminik türleri bulunur (Şekil 10) (14).



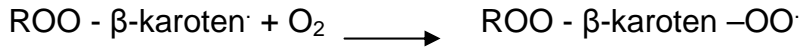
Şekil 10. A vitamininin vitaminik şekilleri

Doğadaki en potent ve en iyi bilinen provitamin A, β -karotendir (24). A vitamininin metabolik ön maddesi olan β -karoten antioksidan özelliklerini "söndürücü etki" ile göstermektedir (84):



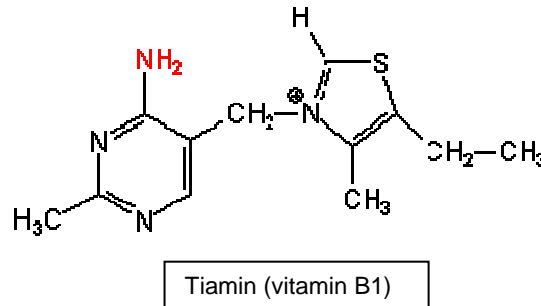
Karotenoidlerin yapısındaki konjuge çift bağlar antioksidan aktiviteden sorumludur. Son derece güçlü bir singlet O_2 temizleyicisi olan β -karoten ayrıca hidroksil, peroksil ve alkoksil radikalleriyle de doğrudan reaksiyon vererek lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonunu önleyebilir. Bu reaksiyon esnasında β -karoten membran iç yüzünde antioksidan rol oynarken vitamin E dış yüzde görev yapar (87).

Her β -karoten molekülü iki peroksil radikalini bağlayarak ortamdan uzaklaştırır. Ortamdaki oksijen konsantrasyonunun yüksek olması halinde ise reaktif bir peroksil radikali oluşur (87):



III. 4. 2. 1. 4. Vitamin B₁ (Tiamin)

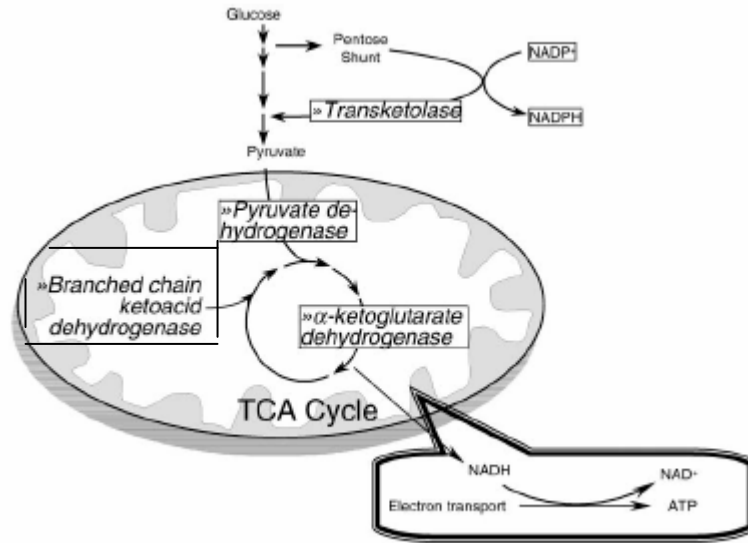
B₁ vitamin olarak bilinen tiamin suda çözünen B-kompleks vitaminlerindedir (88). Yan gruplar taşıyan bir pirimidil tiyazol halkasıdır (Şekil 11) (14).



Şekil 11. Tiaminin kimyasal yapısı

Tiamin insan vücudunda serbest tiamin ve fosforile formlar (tiamin monofosfat, tiamin trifosfat ve tiamin pirofosfat (tiamin difosfat olarak da bilinir) halinde bulunur (88).Tiamin pirofosfat (TPP) önemli enzimlerin koenzimi olarak görev yapar. Serbest tiaminden sentezlenebilmesi için magnezyum, ATP ve tiamin pirofosfokinaz gereklidir (89).

Pirüvat dehidrogenaz, α -ketoglutarat dehidrogenaz ve dallı-zincirli ketoasit dehidrogenaz enzimleri TPP'e bağlı mitokondriyal enzim kompleksleridir ve pirüvat, α -ketoglutarat ve dallı zincirli aminoasitler derivelerinin dekarboksilasyonuna katılarak enerji metabolizmasında esansiyel rol oynar (90). Ayrıca TPP pentoz fosfat yolağının transketolaz enzimi için de koenzimdir. Transketolaz oksidatif karbonhidrat metabolizmasını kontrol eder (Şekil 13) (91).



Şekil 13: Tiamine bağlı enzimler

Tiamin; aldehitler, polifenoller ve askorbik asit üzerine antioksidan etkiler yapar (92). Yapılan çalışmalarda tiamin-askorbik asit kompleksinin özellikle merkezi sinir sisteminde dopaminin serbest radikallerce okside olmasını inhibe ettiği belirtilmiştir (93). Tiamin eksikliği olan sıçanların beyin dokusunda serbest radikallerin, karaciğerde de lipid peroksidasyon ürünlerinin arttığı gösterilmiştir. Ayrıca tiaminin in vitro olarak sıçan karaciğer

mikrozomlarında lipid peroksidasyonunu ve oleik asitin serbest radikallerle oksidasyonunu engellediği bildirilmiştir (92, 94).

III. 4. 2. 1. 5. Vitamin B₂ (Riboflavin)

Riboflavin vücutta esas olarak flavin adenin dinükleotid (FAD) ve flavin mononükleotid (FMN) koenzimlerinin integral bir bileşeni olarak bulunmaktadır (95). Riboflavinden türevlenen bu koenzimlere flavinler, flavin koenzimi kullanan enzimlere de flavoproteinler adı verilir (96). Flavınler oksidaz, redüktaz ve dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi için esansiyel olan prostetik gruplardır. FAD ve FMN redoks tepkimelerinde elektron taşıyıcısı olarak aktivite gösterirler (97).

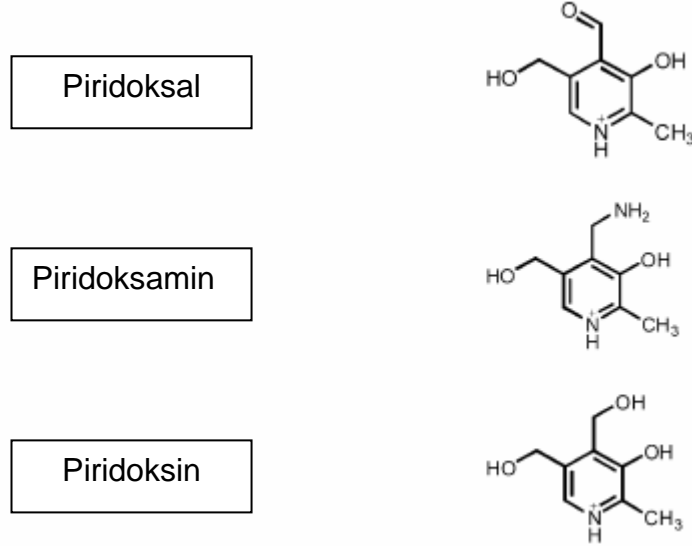
Flavin oksidazlar oksijeni elektron akseptörü olarak kullanarak H₂O₂'e iki elektron veya suya dört elektron transfer ederler (88). Flavin redüktazlar substratların redüksiyonunu katalizler. NAD(P)H+H⁺ , FAD'ı FADH₂'e redükte eder bu da sitokrom veya okside glutasyonu (GSSH) redükte eder. Flavin redüktaz için tipik bir örnek olan glutasyon redüktaz NADPH'ı redükleyici substrat olarak kullanır. Flavin dehidrogenazlar substrattan hidrojen hareketini katalizler ve hidrojeni akseptöre transfer ederek oksidasyon-redüksiyon reaksiyonlarında kullanır (98).

Riboflavin durumu genellikle eritrosit ya da üriner flavin düzeyleri ile veya eritrosit glutasyon redüktaz aktivitesi ile değerlendirilir. Riboflavin eksikliği glutasyon redüktaz aktivitesinde azalma ve düşük glutasyon düzeyleri yanında glutasyon peroksidaz (H₂O₂: Glutasyon oksidoredüktaz), katalaz, aldoz redüktaz (alditol: NADP oksidoredüktaz) aktivitelerinde de düşmeye neden olur (97, 99).

III. 4. 2. 1. 6. Vitamin B₆

B₆ vitamininin piridoksal piridoksamin ve piridoksin (piridoksol) olmak üzere üç doğal şekli vardır (Şekil 15) (14). Bu üç doğal şeklin fosfat deriveleri

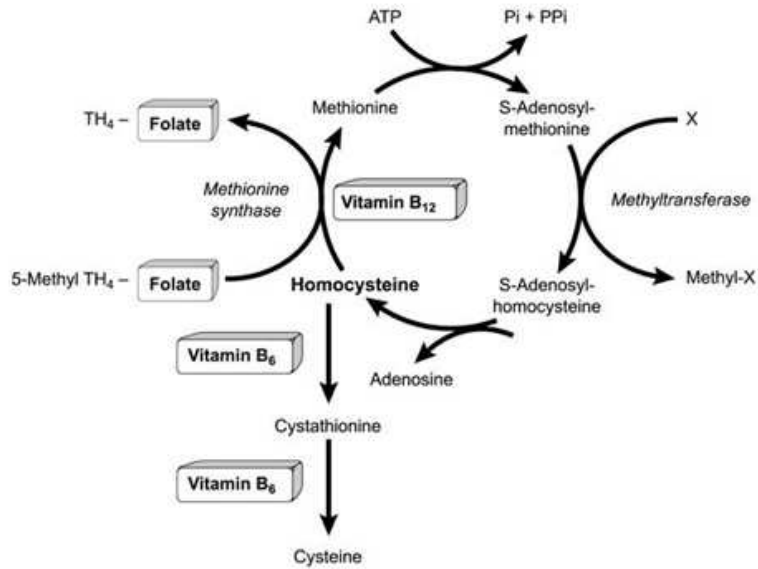
piridoksal 5-fosfat, piridoksin 5-fosfat ve piridoksamin 5-fosfattır. Piridoksal 5-fosfat insan metabolizması için çok önemli reaksiyonlarda yaklaşık 100 enzimin aktif koenzimidir (100).



Şekil 15. Vitamin B₆'nın doğal formları

Vitamin B₆ direkt antioksidan aktiviteye sahiptir. Piridoksamin piridoksine göre glukoz otooksidasyonu boyunca süperoksit radikali oluşumunu, glikolize hemoglobin oluşumunu ve eritrosit lipid peroksidasyonunu daha etkin olarak önlemektedir (101). Vitamin B₆ diabetiklerde antioksidan özelliklere sahiptir. Özellikle piridoksin tedavisi eklenen diabetik hastalarda oksidatif stresin ve diabetik komplikasyonların azaldığı gösterilmiştir (102). Piridoksamin H₂O₂'e karşı savunmada piridoksale göre daha etkin olmasına rağmen piridoksal süperoksit radikal oluşumunu inhibe etmede daha etkilidir (103). Vitamin B₆ indirekt olarak da şelatlama etkisi ile antioksidan olarak görev yapabilir. Piridoksin sıçan böbreğinde oksidatif stresi ve toksisiteyi azaltır (104). Piridoksal yine sıçanlarda demir şelatlama aktivitesi nedeniyle demir atılımını artırırken (105) piridoksamin hepatositte artan oksidatif stres sitotoksitesini azaltır (106). Mekanizması tam olarak bilinmese de vitamin B₆'nın antioksidan özellikleri peroksil radikalleri ile hidroksil ve/veya amin gruplarının etkileşimi sonucu olduğu düşünülmektedir (107).

Vitamin B₆ metionin döngüsüne katılarak homosisteinin metabolize olmasında rol oynamaktadır (Şekil 16). Homosisteinin kandaki regülasyonu vitamin B₁₂, folik asit ve vitamin B₆'ya bağlıdır (108). Vitamin B₆ trans-sülfürasyon reaksiyonları ile, folik asit ve vitamin B₁₂ de metilasyon yolağıyla intrasellüler olarak metabolize olur (109). B vitamin eksikliği sonucu ortaya çıkan hiperhomosisteinemi durumunda homosisteinin tiyol gruplarının otooksidasyonu sonucu oluşan intrasellüler süperoksit anyonu endotelial vazodilatasyonu bozar (110). Gözlemler homosistein antioksidan enzimlerin ekspresyonunu azaltmaktadır (111) ve hücreleri oksidatif ajanların oksidatif stres hasarına karşı daha duyarlı kılmaktadır (112).



Şekil 16: Homosistein metabolizması

MATERYAL VE METOD

I. Çalışma Grubu ve Örnek Toplanması

Bursa ilinde, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Tahliller, Eğitim ve Araştırma Merkez Laboratuvarında, 07.03.2005-31.05.2006 tarihleri arasında, 18-45 yaşları arasındaki sağlıklı, enfeksiyon, alerji ve sistemik hastalığı olmayan National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) C28-A prosedürüne uygun olarak hazırlanan ve preanalitik etkenler değerlendirilerek sorular eklenen anket formuna (Tablo II) göre hastane personelinden ön değerlendirme yapılan 407 birey (224 kadın, 183 erkek), seçilmiştir. Diurnal varyasyonu önlemek için 12-14 saatlik bir gecelik açlık sonrası, sabah 10:00'a kadar vakumlu tüplere (BD Vacutainer Systems) [1 adet EDTA'lı tüp (2 mL), 1 adet heparinli (4 mL), 1 adet antikoagülsüz tüp (4 mL)] olmak üzere 10 mL kan alındı. vitaminlerin analizi için EDTA'lı tam kan; SOD ve GPx için heparinli tam kan kullanıldı. GR, Total antioksidan kapasite (TAOK), A, E, C, B₆ vitaminleri için antikoagülsüz tüpe alınan kan 2000 g'de 10 dakika santrifüj edildi, serum ayrıldı. Ayrılan kanlardan B₁, B₂, A, E, B₆ vitaminleri ve GR, TAOK numuneleri direkt; SOD, heparinli plazma ayrıldıktan ve % 0.9 NaCl ile dört kez yıkanarak elde edilen eritrosit paketi elde edilerek; C vitamini ise Chromosystems Diagnostics International By HPLC (Almanya) kitleriyle ön hazırlık aşamaları sonrası çalışmaya hazırlanarak analize kadar -20°C'de 1 ay kadar saklandı.

II. Analitler ve Analitik Sistem

1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı, "Agilent 1100 Series" (Almanya)
2. Otoanalizör "Abbott Aeroset" (Almanya)
3. Spektrofotometre, "Shimadzu U.V. Visible 1601" (Japonya)
4. Su banyosu, "Nüve BM 302" (Türkiye)
5. Santrifüj, "Nüve 1000R " (Türkiye)

6. Santrifüj, "Hettich Mikro 200" (Almanya)
7. Karıştırıcı (vorteks), "Nüve NM 110" (Türkiye)
8. Otomatik pipet (20 µL), "Rainin Pipet-Lite SL 20" (A.B.D.)
9. Otomatik pipet (100 µL), "Rainin Pipet-Lite SL 100" (A.B.D.)
10. Otomatik pipet (200 µL), "Rainin Pipet-Lite SL 200" (A.B.D.)
11. Otomatik pipet (1000 µL), "Rainin Pipet-Lite SL 1000" (A.B.D.)
12. Otomatik pipet (1-5 mL), "Exelpette XLD 5000" (İngiltere)
13. Otomatik pipet (200-1000 µL), "Eppendorf" (Almanya)
14. Derin dondurucu (-20° C), "İnoksan ZS 520 " (Türkiye)
15. Buzdolabı "Bosch FD 7810" (Almanya)

III. Ticari Kitler

1. Vitamin A, E; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.155 Kat. No. 34000
2. Vitamin A, E kontrol; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.064 Kat. No.0036, 0037
3. Vitamin C; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.414 Kat. No. 65000
4. Vitamin C kontrol; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.225 Kat. No. 0075, 0076
5. Vitamin B₁; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.455 Kat. No. 35000
6. Vitamin B₁ kontrol; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.194 Kat. No. 0034, 0035
7. Vitamin B₂; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.265 Kat. No. 37000
8. Vitamin B₂ kontrol; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.194 Kat. No. 0034, 0035
9. Vitamin B₆; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.265 Kat. No. 31000/S
10. Vitamin B₆ kontrol; "Chromsystems Diagnostics by HPLC" (Almanya) Lot. No.074 Kat. No. 0038, 0039

11. Süperoksid Dismutaz (Ransod), "Radox Laboratories Ltd." (İngiltere) Lot. No. 034217 Kat. No. SD125
12. Glutasyon Redüktaz, "Radox Laboratories Ltd." (İngiltere) Lot. No. 041732 Kat. No. GR2368
13. Glutasyon Redüktaz Kontrol Serum, "Radox Laboratories Ltd." (İngiltere) Lot. No. 097GR Kat. No. GR 2608
14. Glutasyon Peroksidaz (Ransel), Lot. No. 043387 Kat. No. RS504
15. Total Antioksidan Kapasite; "Radox Laboratories Ltd." (İngiltere) Lot. No. 041747 Kat. No. NX2332
16. Total Antioksidan Kapasite Kontrol Serum, "Radox Laboratories Ltd." (İngiltere) Lot. No. 155NX Kat. No. NX2331

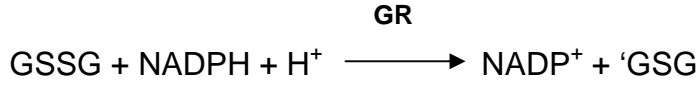
IV. Kimyasal Malzemeler

1. Sodyum dihidrojen fosfat, "Merck" (Almanya) Kat. No. 6345
2. Potasyum ferri siyanür, "Merck" (Almanya) Kat. No. 4971
3. Potasyum dihidrojen fosfat "Merck" (Almanya) Kat.No. 4871
4. Potasyum ferri siyanür, "Merck" (Almanya) Kat.No. 4971
5. Potasyum siyanür, "Merck" (Almanya) Kat.No. 4966
6. Sodyum bikarbonat, "Sigma" (Almanya) Kat.No S 5761

V. Yöntemler

V. 1. Eritrosit Glutasyon Peroksidaz (GPx) Aktivitesinin Ölçümü

GPx aktivitesi ticari kit (Ransel) kullanılarak ölçüldü. GPx enzimi, glutasyonun (GSH) kümenhidroperoksit tarafından oksidasyonunu katalizlemektedir. Meydana gelen okside glutasyon, glutasyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında hızla redükte olurken aynı anda NADPH okside olarak $NADP^+$ 'ye dönüşmektedir.



Bu reaksiyon sırasında 340 nm'deki absorbans azalması (ΔAbs) GPx aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Ayırıcılar:

1. Ransel ayırıcı: GSH (4 mmol/L), GR (≥ 0.5 U/L) ve NADPH (0.34 mmol/L)
2. Ransel tampon: 4.3 mmol/L EDTA içeren 0.05 mol/L fosfat tamponu (pH:7.2)
3. Ransel kümenhidroperoksit: (0.18 mmol/L)
4. Ransel dilüe edici ayırıcı
5. Double Drabkin ayırıcı: 50 mg potasyum siyanid ve 200 mg potasyum ferri siyanid ve 1 gr sodyum bikarbonat 500 ml distile su ile hazırlandı.

Deneyin Yapılışı:

GPx aktivitesinin ölçümü için 50 μL tam kan, 1 mL Ransel sulandırıcı ayırıcı ile seyreltilerek hemolizat elde edildi ve 5 dakika bekletildikten sonra 1 mL Double Drabkin ayırıcı ile karıştırıldı. Bu karışım en geç 20 dakika içinde kullanıldı. 1 mL Ransel ayırıcı üzerine yukarıdaki karışımdan 20 μL eklendi. 37 °C lik su banyosunda 5 dakika bekletildikten sonra reaksiyonu başlatmak için üzerine kümenhidroperoksit çözeltisinden 40 μL ilave edildi. 1 dakika sonra başlangıç absorbansı kaydedilerek süre başlatıldı. 1. dakika ve 2. dakikada absorbanlar kaydedildi ve dakikadaki absorbans azalması ($\Delta\text{Abs}/\text{dk}$) hesaplandı. Kör olarak çalışma çözeltisine örnek yerine 20 μL distile su konuldu. Absorbans ölçümleri spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda yapıldı (Tablo XII).

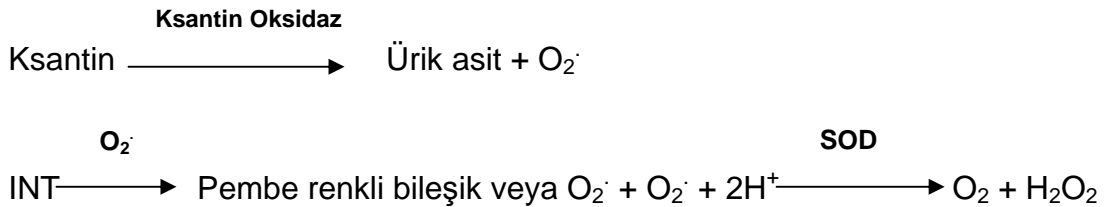
Tablo XII: GPx aktivitesi ölçümü

	KÖR	NUMUNE
Dilüe Numune	-	20 µL
Distile Su	20 µL	-
Reagent	1 mL	1 mL
Kümenhidroperoksit	40 µL	40 µL

Hesaplama: Kör aktivitesinden numune aktivitesi çıkarıldı ve çıkan sonuç dilüsyon faktörü olan 41 ile (50 µL tam kan + 1 mL Ransel dilüe edici ayıraç + 1 mL Double Drabkin ayıracağı: Numune 41 kez dilüe edilmiş oldu) çarpıldı. U/L enzim aktivitesini veren bu değer numunenin Drabkin ayıracağı ile ölçülmüş g/L cinsinden hemoglobin değerine bölünerek hesaplandı. Sonuçlar gram hemoglobin başına ünite olarak verildi (U/g Hb).

V. 2. Eritrosit SOD Aktivitesinin Ölçümü

Eritrosit SOD aktivitesi ticari kit (Ransod) kullanılarak ölçüldü. Bu yöntemde ksantin, ksantin oksidaz (XO) enziminin katalizi ile O_2^- radikali oluşturur. Oluşan bu radikal, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-feniltetrazolyumklorid (INT) ile reaksiyona girer ve pembe renkli bir bileşik oluşturur veya SOD enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile dismutasyona uğrayarak H_2O_2 ve O_2 meydana gelir. Böylece INT ile reaksiyona giren O_2^- miktarı azaldığı için reaksiyon inhibe olur.



Burada SOD aktivitesinin ölçümü yukarıdaki reaksiyonun inhibisyon derecesinin ölçülmesine dayanmaktadır. Açığa çıkan pembe renk eritrosit SOD aktivitesi ile ters orantılıdır.

Ayırıklar :

- 1- 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0): 0.68 g KH_2PO_4 ve 0.71 g Na_2HPO_4 9 dL distile suda çözüldü ve pH'sı kontrol edilip 1 L' ye tamamlandı.
- 2- Ransod substrat: Ksantin (0.05 mmol/L), I.N.T. (0.025 mmol/L)
- 3- Ransod tampon: CAPS (40 mmol/L, pH 10.2) ; EDTA (0.94 mmol/L)
- 4- Ransod ksantin oksidaz: (80 U/L)
- 5- Ransod standart: (4.6 U/mL)

Deneyin yapılışı

SOD aktivitesi ölçümü için, 0.5 mL tam kanın eritrosit paketi alındı ve hacmi soğuk distile su ile 2 mL'ye tamamlandı. Bu karışım +4 °C'de 15 dakika bekletilerek hemolizat elde edildi. Hemolizat 0.01 M fosfat tamponu (pH 7.0) ile 25 kez sulandırıldı. Deney 37° C' lik şartlarda gerçekleştirildi. Deney sırasında kör tüpüne 25 µL fosfat tamponu, numune tüpüne 25 µL dilüe hemolizat ve standart tüpüne 25 µL standart konulduktan sonra her bir tüpe sırasıyla 850 µL substrat ve 125 µL ksantin oksidaz enzimi eklenerek karıştırıldı ve 30 saniye bekledikten sonra her bir tüp için spektrofotometrede 505 nm dalga boyunda absorbans sıfırlandı ve 3 dakika sonra son absorbans kaydedilerek $\Delta A/dk$ hesaplandı (Tablo XIII).

TabloXIII: Eritrosit SOD aktivitesinin ölçümü

	KÖR	NUMUNE	STANDART
Fosfat tamponu	25 µL	-	-
Dilüe hemolizat	-	25 µL	-
Standart	-	-	25 µL
Substrat	850 µL	850 µL	850 µL
Karıştırıldı			
Ksantin Oksidaz	125 µL	125 µL	125 µL

Hesaplama : Numunelerin ve standartların SOD'ın sağladığı INT redüksiyonunun % inhibisyon değeri hesaplanır :

$$\text{Numunenin/Standartların \% inhibisyon} = 100 - \left[\frac{\Delta A/\text{dk Numune/Standart} \times 100}{\Delta A/\text{dk Kör}} \right]$$

Standart konsantrasyonlarının logaritma değerleri y eksenine ve % inhibisyonları x eksenine yerleştirilerek standart eğri grafiği çizilir. Bu grafikten elde edilen $y = ax + b$ denkleminde formüle göre elde edilen numunelerin % inhibisyon değerleri denkleminde x yerine konularak y değerleri bulunur. y değerinin antilogaritması alındığında numunenin konsantrasyonu U/mL cinsinden belirlenmiş olur. U/mL olarak saptanan değer hemolizatın hemoglobin değerine bölüldüğünde eritrosit SOD aktivitesi gram hemoglobin başına ünite olarak elde edilmiş olur (U/g Hb).

V. 3. Serum Glutasyon Redüktaz (GR) Aktivitesinin Ölçümü

Glutasyon redüktaz NADPH varlığında okside glutasyonun (GSSG) redüksiyonunu katalize eder. 340 nm'de ölçülen absorbans azalması ölçülerek GR aktivitesi hesaplanır.



Ayıracılar :

1. Tampon: Potasyum fosfat (250 mmol/L, pH 7.3) EDTA (0.5 mmol/L)
2. Substrat : Okside Glutasyon (GSSG) (2.2 mmol/L)
3. NADPH : (0.17 mmol/L)

Deneyin yapılışı : GR ölçümleri Randox Laboratories Ltd.'nin (İngiltere) kitleri kullanılarak Abbott-Aeroset (Almanya) otoanalizörüne uyarlanarak yapıldı. 8 µL hacimde numune ve kontrol serumları 200 µL substrat ile karıştırılıp 40 µL NADPH eklenir. 37⁰C ve 340 nm'de 1. ve 5 dakikadaki absorbanlar kaydedilir (Tablo XIV).

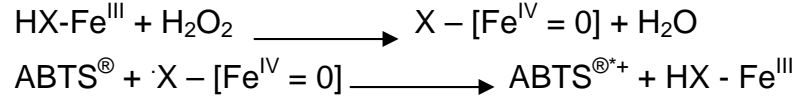
Tablo XIV: GR aktivitesi ölçümü

	NUMUNE	KONTROL
Kontrol	-	8 µL
Numune	8 µL	-
Substrat	200 µL	200 µL
NADPH	40 µL	40 µL

Hesaplama : 1. ve 5. dakikalardaki absorbanlar arası fark kalibrasyon katsayısı 4983 ile çarpılarak glutasyon redüktaz aktivitesi ünite/litre (U/L) cinsinden hesaplandı.

V. 4. Serum Total Antioksidan Kapasitesinin Ölçümü

ABTS[®] (2, 2'- Azino-di- [3-etilbenziazolin sülfonat]), peroksidaz (metmyoglobin) ve hidrojen peroksit ile inkübe edildiği zaman 600 nm'de absorban veren mavi-yeşil renkli ABTS radikali oluşur. Numunenin içeriğindeki antioksidan kapasite ile doğru orantılı olarak renkte meydana gelen azalma spektrofotometrik olarak ölçülür.



$\text{HX-Fe}^{\text{III}}$ = Metmyoglobin

$\text{X} - [\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}]$ = Ferrimyoglobin

Ayıracılar :

1. Tampon : Salin ile tamponlanmış fosfat (80 mmol/L, pH 7.4)
2. Kromojen : Metmyoglobin (6.1 $\mu\text{mol/L}$)
ABTS[®] (610 $\mu\text{mol/L}$)
3. Substrat : Hidrojen peroksit (stabilize formda) (250 $\mu\text{mol/L}$)
4. Standart : 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2 karboksilik asit (1.65 mmol/L)

Deneyin yapılışı : TAOK ölçümleri Randox Laboratories Ltd.'nin (İngiltere) kitleri kullanılarak Abbott-Aeroset (Almanya) otoanalizöre uygulanarak çalışıldı. 4 μL distile su/standart/numune örneği 200 μL kromojen ile karıştırılıp 37°C'de ve 600 nm'de ilk absorbans ölçülür. Daha sonra 200 μL substrat solüsyonu eklenir ve 3 dakika sonraki absorbans belirlenir (TabloXV).

Tablo XV: TAOK ölçümü

	KÖR	STANDART	NUMUNE
Distile su	-	-	-
Standart	-	4 μL	-
Numune	-	-	4 μL
Kromojen	200 μL	200 μL	200 μL
Başlangıç absorbansı (A_1) ölçülür			
Substrat (H_2O_2)	40 μL	40 μL	40 μL
Substrat eklendikten sonraki 3. dakikada A_2 absorbansı ölçülür.			
$A_2 - A_1 = \text{numune/standart/kör}$			

Hesaplama:

Faktör= Standart Konsantrasyonu / (Δ A Kör - Δ A Standart)

Total Antioksidan Kapasite (mmol/L) =Faktör x (Δ A Kör- Δ A Numune)

V. 5. Vitamin Düzeylerinin Ölçümü

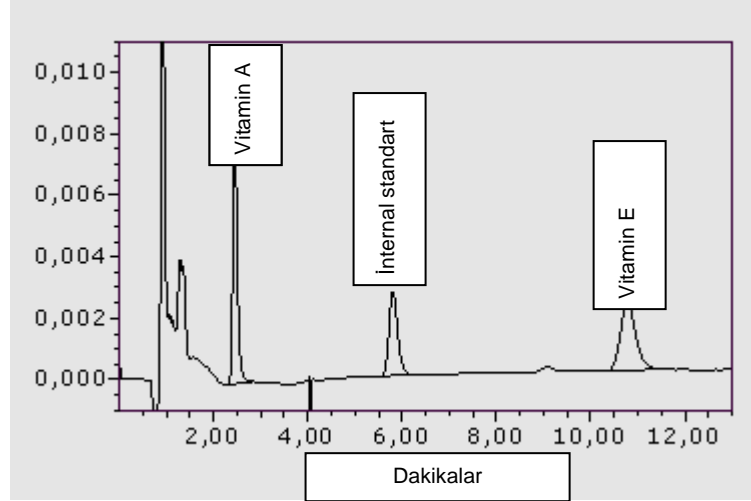
Vitamin A, E, B₆ düzeyleri serumda, vitamin B₁, B₂ düzeyleri EDTA'lı tam kanda, vitamin C düzeyleri heparinli plazmada yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) yöntemi ile Chromsystems Diagnostics by HPLC (Almanya) kitleri kullanılarak, Agilent 1100 Series HPLC (Almanya) cihazında çalışıldı. Vitamin A, E, C'nin analizinde ultraviyole (UV) dedektör kullanılırken, vitamin B₁, B₂, B₆'nın analizinde floresans dedektör kullanıldı.

HPLC kromatografik metodların güncel ve gelişmiş bir şeklidir. HPLC'de yüksek basınçlı pompalar ve basınçlı akımın kuvvetine karşı koyacak şekilde yapılmış, delikli katı maddeyle kaplı kolon (sabit faz) kullanılır. Analizi yapılan moleküller tampon çözelti (mobil sıvı faz) ile birlikte kolon içinde ileriye doğru akım yönünde, belirli bir hızda ve basınçta ilerletilir. Maddelerin yük, büyüklük, bağlanma afinitesi gibi özelliklerine göre kolon içinde filtrasyon tekniğiyle ayrıştırılması sağlanır. (113). Kolondan çıktıktan sonra bileşiklerin soğurdukları enerji miktarları fotometrik, florometrik ve elektrokimyasal dedektörlerce ölçülür (14).

Vitamin A, E ölçümü için enjeksiyon hacmi 50 μ L, akış hızı 1.5 mL/dk, kolon sıcaklığı 20-25⁰C olarak ayarlandı. UV dedektörde ilk absorbans 325 nm dalga boyunda 3. dakikadaki absorbans 295 nm'de saptandı ve 15 dakika içinde kromatogramlar elde edildi (Şekil 17). İnternal standarda göre cihaza ait bilgisayar programında hesaplamalar yapıldı.

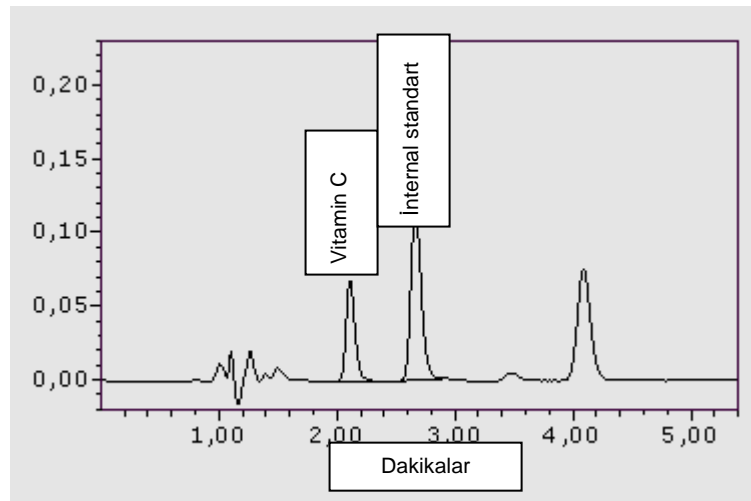
Vitamin analizleri sonucunda elde edilen değerler mg/L ve μ g/L birimleriyle ifade edildi. Literatürlerde μ mol/L cinsinden ifade edilen değerler

çevirim faktörlerinden faydalanılarak mg/L ve µg/L birimlerine dönüştürüldü ve karşılaştırmalar yapıldı.



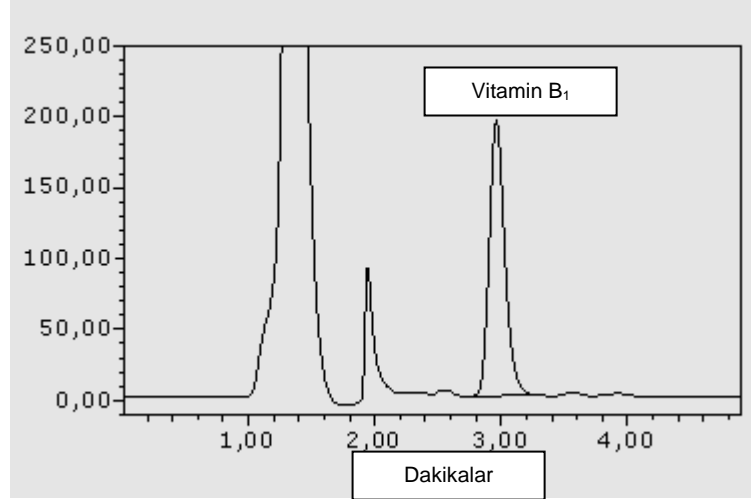
Şekil 17. Vitamin A, E kromotogramı

Vitamin C ölçümünde enjeksiyon hacmi 20 µL, akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 20-25⁰C olarak ayarlandı. UV dedektörde absorbands 245 nm'de saptandı ve 5 dakikalık dönemde kromotogramlar elde edildi (Şekil 18). İnternal standarda göre cihaza ait bilgisayar programında hesaplamalar yapıldı.



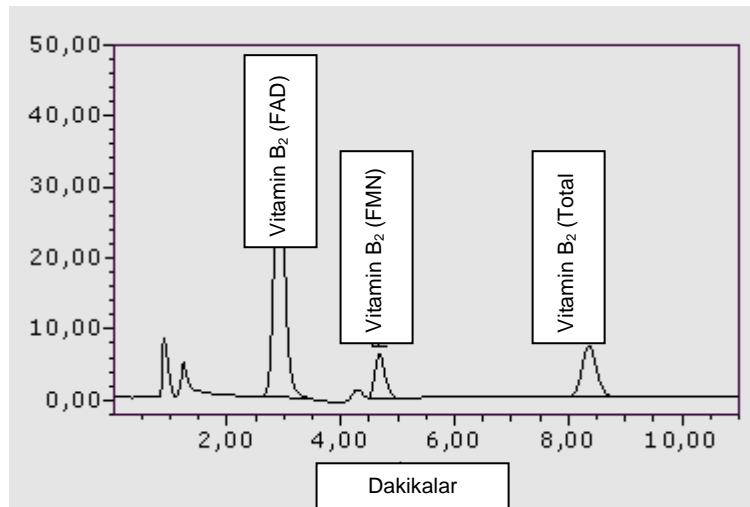
Şekil 18. Vitamin C kromotogramı

Vitamin B₁ ölçümünde enjeksiyon hacmi 50 µL, akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 20-25⁰C olarak ayarlandı. Floresans dedektörde eksitasyon absorbanansı 367 nm'de emisyon absorbanansı 435 nm'de saptandı ve 5 dakikalık dönemde kromotogramlar elde edildi (Şekil 19). Elde edilen absorbananslarla cihaza ait bilgisayar programında hesaplamalar yapıldı.



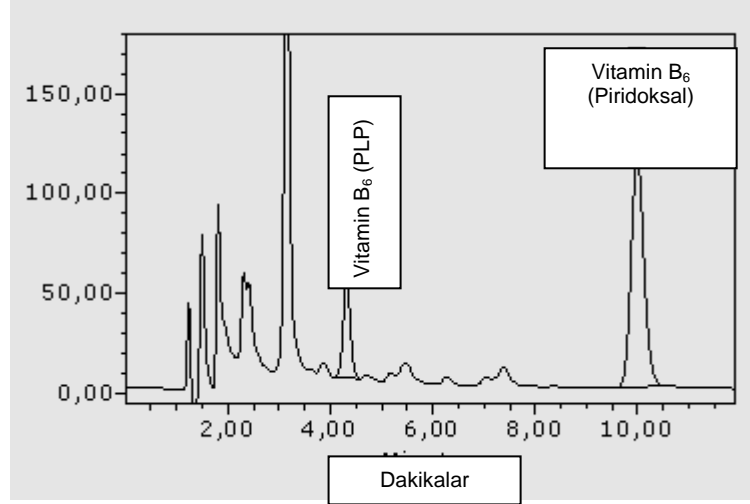
Şekil 19. Vitamin B₁ kromotogramı

Vitamin B₂'nin ölçümünde enjeksiyon hacmi 50 µL, akış hızı 1.5 mL/dk, kolon sıcaklığı 20-25⁰C olarak ayarlandı. Floresans dedektörde eksitasyon absorbanansı 465 nm'de emisyon absorbanansı 525 nm'de saptandı ve 8 dakikalık dönemde kromotogramlar elde edildi (Şekil 20). Cihaza ait bilgisayar programında hesaplamalar yapıldı.



Şekil 20. Vitamin B₂ kromotogramı

Vitamin B₆'nin ölçümünde enjeksiyon hacmi 40 µL, akış hızı 1 mL/dk, kolon sıcaklığı 20-25⁰C olarak ayarlandı. Floresans dedektörde eksitasyon absorbanansı 320 nm'de emisyon absorbanansı 415 nm'de saptandı ve 8 dakikalık dönemde kromotogramlar elde edildi (Şekil 21). Elde edilen absorbananslarla cihaza ait bilgisayar programında hesaplamalar yapıldı.



Şekil 21. Vitamin B₆ kromotogramı

VI. Referans Aralıkların Hesaplanması

Analizler sonucunda elde edilen veriler bilgisayarda Statistical Packages for Social Sciences (SPSS 10.0) istatistik programına aktarıldı ve parametrik olmayan yöntem kullanılarak referans aralıklar analiz edildi:

Parametrik Olmayan Yöntem

1. Veriler cinsiyetlere göre alt gruplara ayrıldı
2. Her analitin verilerinin dağılımı görsel olarak incelendi
3. Cinsiyetten başka alt gruplara ayrılıp ayrılamayacağı değerlendirildi
4. Aşırı uç değerler incelendi (D/R kuralına göre)
5. Cinsiyetler arası farkın olup olmadığı araştırıldı (Standart normal sapma testi)

6. Parametrik olmayan yönteme göre referans aralık sınırları hesaplandı
7. Alt ve üst sınırların % 90 güven aralıkları saptandı

VII. Veri Analizi ve İstatistik

İstatistiksel hesaplamalarda, dizin işlemlerinde ve histogramların çizilmesinde SPSS 10.0 bilgisayar programından yararlanıldı. Değişkenlerin analitlerle olan ilişkilerinin saptanmasında ise "Pearson Korelasyon testinden" yararlanıldı. Parametrik olmayan yöntemle güven aralıklarının hesaplanmasında Tablo IX'da gösterilen değerlerden yararlanılmıştır.

SONUÇLAR

Referans aralıklarını saptadığımız testlerin analitik geçerlilikleri ile, seçilmiş referans bireylerden parametrik olmayan yöntemlerle elde ettiğimiz referans aralık sonuçları verilmektedir.

I. Analitik Kalite Kontrol Sonuçları

Analizi yapılan vitaminlerin ve antioksidan parametrelerin iç kalite kontrol sonuçları olan gün içi değişkenlikleri (Tablo XVI) ve günler arası değişkenlikleri (Tablo XVII) belirlenmiştir:

Tablo XVI. Analitlerin gün içi analitik performansları

	Beklenen aralık	n	% CV
Vitamin A	0.37-0.57 mg/L	10	1.2
Vitamin E	5.47-8.88 mg/L	10	2.2
Vitamin C	5.19-8 mg/L	10	2.1
Vitamin B ₁	24.5-36.7 µg/L	10	4
Vitamin B ₂	81.4-122 µg/L	10	4
Vitamin B ₆	5.88-10.1 µg/L	10	2.4
Glutasyon Peroksidaz	59 U/mL	10	2.7
Süperoksit Dismutaz	4.6 U/mL	10	4.15
Glutasyon Redüktaz	89 U/L	10	3.16
Total Antioksidan Kapasite	1.55 mmol/L	10	1.91

Tablo XVII. Analitlerin günler arası analitik performansları

	Beklenen aralık	n	% CV
Vitamin A	0.37-0.57 mg/L	10	2.7
Vitamin E	5.47-8.88 mg/L	10	2.9
Vitamin C	5.19-8 mg/L	10	3.5
Vitamin B ₁	24.5-36.7 µg/L	10	5.5
Vitamin B ₂	81.4-122 µg/L	10	6.2
Vitamin B ₆	5.88-10.1 µg/L	10	2.8
Glutasyon Peroksidaz	59 U/mL	10	3
Süperoksit Dismutaz	4.6 U/mL	10	4.55
Glutasyon Redüktaz	89 U/L	10	3.92
Total Antioksidan Kapasite	1.55 mmol/L	10	2.44

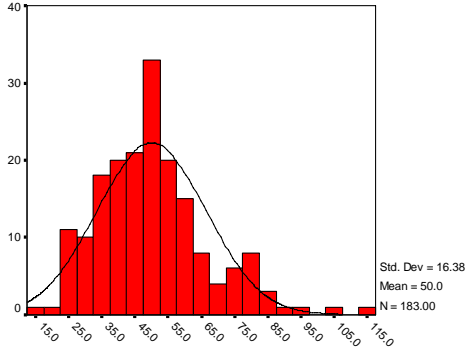
II. Referans Aralıkların Hesaplanması

Parametrik olmayan yöntemle göre seçilmiş referans bireylerin değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

18-45 yaşları arasındaki referans bireyler cinsiyetlere göre gruplandırıldı. Erkek ve kadın referans bireylerden elde edilen verilerin histogramları SPSS 10.0 istatistik programında çizilerek (Şekil XXII) dağılımları incelendi. Aşırı uç değerler D/R kuralına göre belirlenerek hesap dışı bırakıldı. Cinsiyetler arası farklılıklar incelendi. Z kritik değerine göre anlamlı fark olan parametreler için ayrı ayrı hesaplandı. Referans değerlerin alt – üst sınırları ile % 90 güven aralıkları hesaplandı. Elde edilen aralıklar üretici firmaların verdikleri ve diğer araştırmacıların elde ettikleri değerler ile karşılaştırıldı (Tablo XVIII).

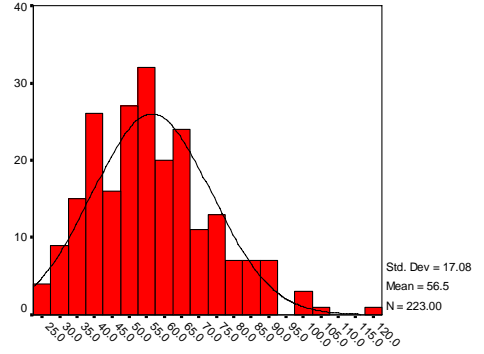
Şekil XXII. Erkek ve kadın referans bireylerden elde edilen histogramlar

Erkek

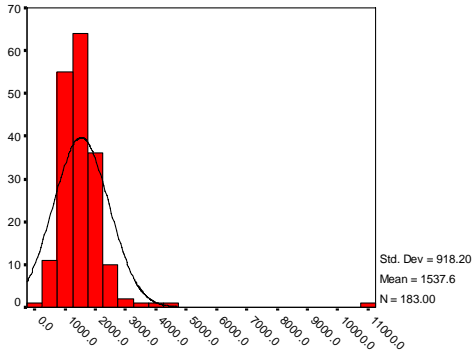


GPXHBE

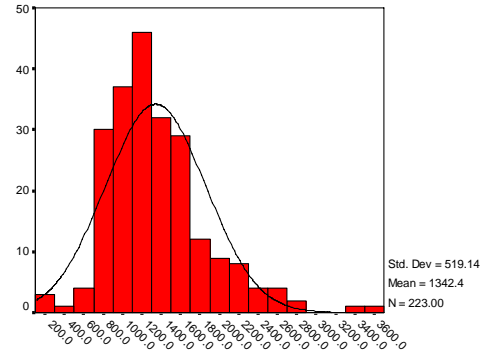
Kadın



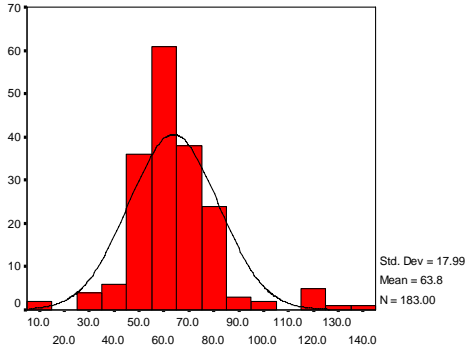
GPXHBK



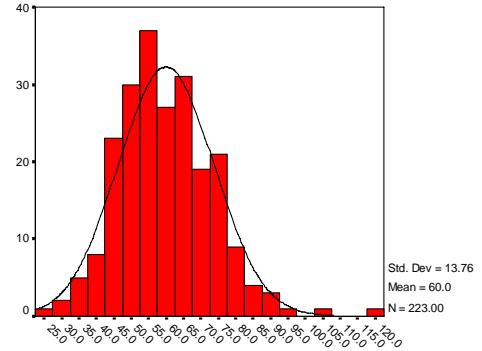
SODHBE



SODHBK

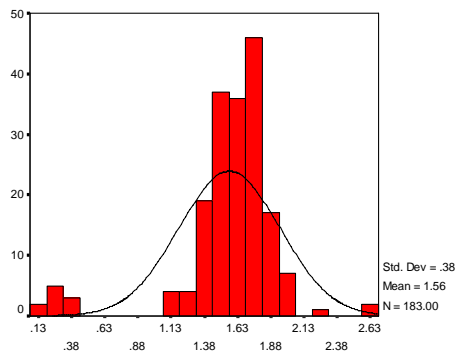


GRXE



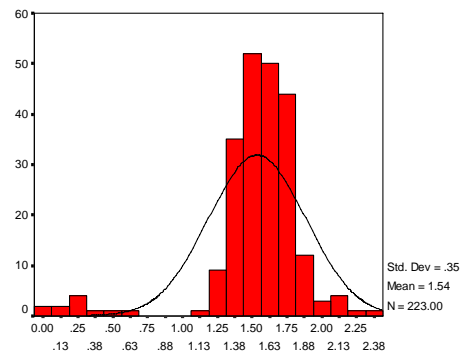
GRXK

Erkek

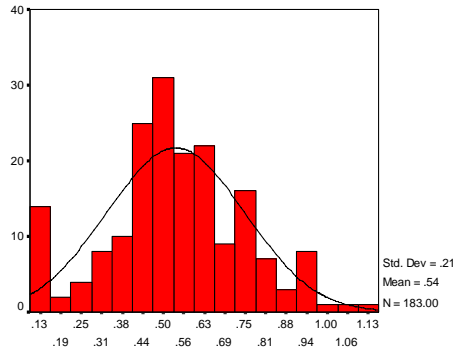


TAOKE

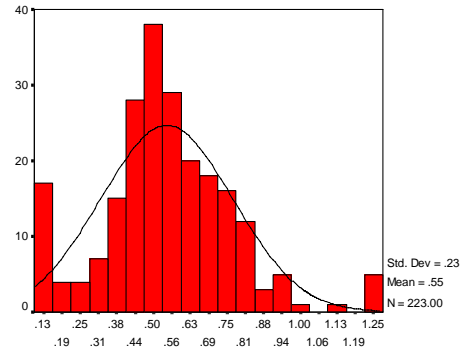
Kadın



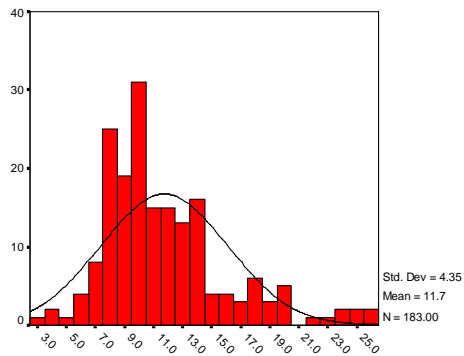
TAOKK



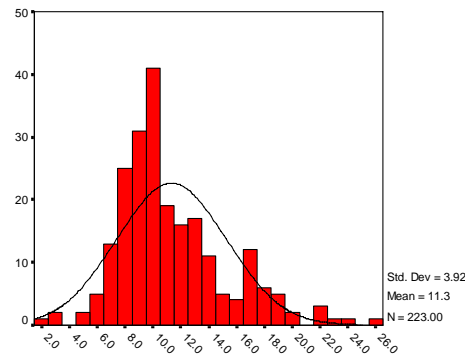
VITAE



VITAK

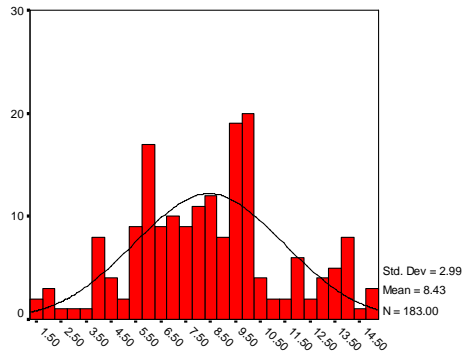


VITEE



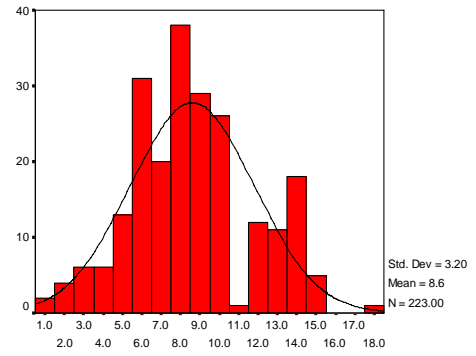
VITEK

Erkek

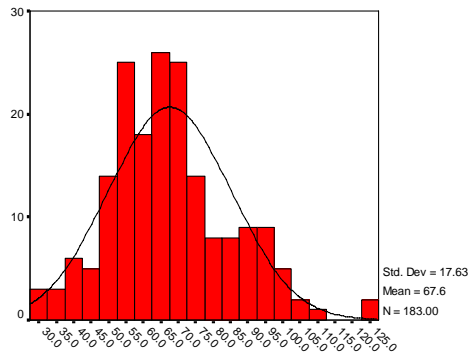


VITCE

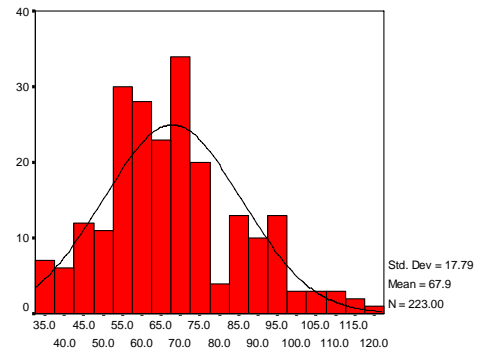
Kadın



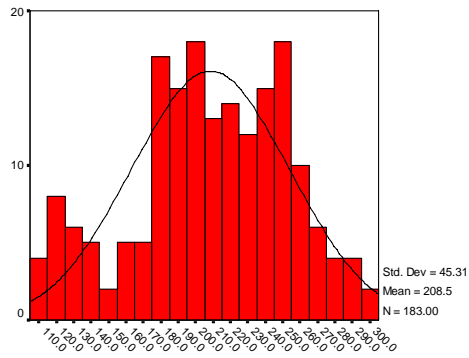
VITCK



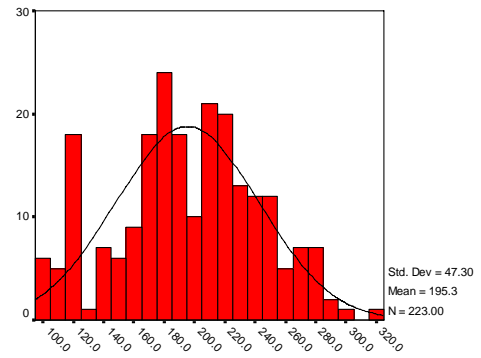
VITB1E



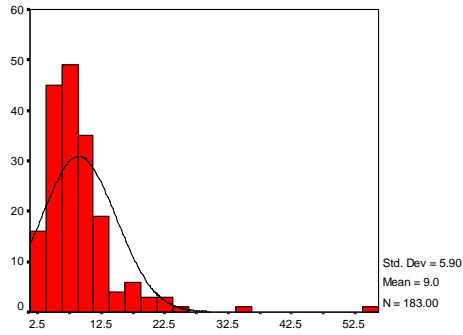
VITB1K



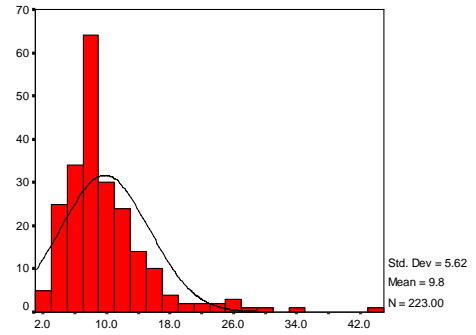
VITB2E



VITB2K



VITB6E



VITB6K

Tablo XVIII: Parametrik olmayan yöntem ile hesaplanan referans aralıkları ve diğer kaynaklardan elde edilen değerler

ANALİT	CİN S	(N) BURSA	ANALİTLERİN BİRİMLERİ	HESAPLANAN REFERANSLARIN ALT – ÜST SINIRI	% 90 GA ALT SINIR	% 90 GA ÜST SINIR	FIRMA ALT – ÜST SINIR	TIETZ	DİĞER ÜLKELERDE YAPILAN ÇALIŞMALAR (114-116)	TÜRKİYE'DE YAPILAN ÇALIŞMALAR (45, 117, 118)
GPx	E	181	U/g Hb	25,2 - 82,5	24,3 - 27,4	80,4 - 90,0	27.5 – 73.6	24.66 – 43.74	83.13 – 89.55	58.32 - 81.92
	K	219	U/g Hb	25,9 - 88,2	25,3 - 30,5	85,1 - 91,3	27.5 – 73.6	24.66 – 43.74	83.13 – 89.55	62.04 - 94.44
SOD	E	179	U/g Hb	634 - 2496	611 - 748	2247 - 2498	1102 – 1601		732 – 764	601 - 2919
	K	219	U/g Hb	690 - 2323	684 - 782	2284 - 2498	1102 – 1601		732 – 764	849 - 2657
GR	E - K	404	U/L	34,5 - 97,3	28,2 - 39,4	86,7 - 115,9	33 – 73		13.39 – 35.91	15.41 - 55.45
TAOK	E - K	394	mmol/L	1,14 - 2,05	0,35 - 1,25	1,98 - 2,21	1.3 – 1.77		0.83 - 1.43	1.16 - 1.64
Vit A	E - K	406	mg/L	0,15 - 0,95	0,11 - 0,23	0,93 - 1,14	0.3 – 0.7	0.3 – 0.8	0.37 – 1.11.	0.41 – 0.93
Vit E	E	183	mg/L	5,63 - 24,37	2,58 - 6,33	20,17 - 25,99	5 - 20	5 – 18	8.28 – 24.2	6.68 – 20.48
	K	222	mg/L	4,61 - 21,5	3,24 - 5,36	18,97 - 24,36	5 - 20	5 – 18	8.28 – 24.2	6.68 – 20.48
Vit C	E - K	406	mg/L	2,48 - 14,44	2,23 - 3,33	14,08 - 14,90	4.6 – 14.9	4 – 15	1.11 – 16.75	0.54 – 2.30
Vit B ₁	E - K	406	µg/L	35,1 - 109,3	33,9 - 37,6	97,3 - 108,5	28 – 85	25 – 85	25.9 – 29.1	
Vit B ₂	E	183	µg/L	115,4 - 293,2	105,7 - 119,1	300,4 - 277,9	137 – 370	40 – 240	197.94 – 435.17	
(FAD)	K	223	µg/L	104,3 - 280,4	100,5 - 112,8	275,4 - 297,9	137 – 370	40 – 240	197.94 – 435.17	
Vit B ₆	E	180	µg/L	2,38 - 18,83	2,15 - 3,09	17,84 - 23,13	3.6 – 18	3 – 30	5.7 – 38.29	
	K	221	µg/L	3,09 - 23,13	1,91 - 3,49	20,39 - 28,19	3.6 – 18	3 – 30	5.7 – 38.29	

GPx'in referans aralık değerleri cinsiyetler arasında anlamlı farklılık bulunduğundan kadın (n=219) ve erkek (n=181) için ayrı ayrı hesaplandı. Kadınlarda erkeklere göre daha yüksek referans aralık elde edildi.

SOD için cinsiyetler arasındaki anlamlı farklılık nedeniyle her iki cins için hesaplanan referans aralıklar kıyaslandığında kadınların (n=219) özellikle alt referans sınırının erkeklerinkine (n=179) oranla daha yüksek oluşu göze çarptı.

GR (n=404) ve TAOK'nin (n=394) referans sınırları cinsiyetler arasında farklılık göstermediğinden her iki cins için tek bir aralık olarak hesaplandı.

Vitamin A (n=406), C (406), B₁ (n=406) için her iki cinse ait birer referans aralık belirlendi.

Vitamin E (erkek n=183, kadın n=222), B₂, (erkek n=183, kadın n=223) B₆'nın (erkek n=180, kadın n=221) referans aralıkları cinsiyetler arası anlamlı fark nedeniyle ayrı ayrı hesaplandı. Vitamin E ve B₂'nin referans değerleri erkeklerde daha yüksek bulunurken; vitamin B₆'nin referans değeri kadınlarda yüksek olarak saptandı.

III. Parametreler Arasında Belirlenen Korelasyonlar

1. GPx ile SOD ($r=0.169$, $p<0.001$), vitamin E ($r=0.106$, $p<0.05$), vitamin B₂ ($r=0.161$, $p<0.001$), vitamin B₆ ($r=0.102$, $p<0.05$) arasında anlamlı pozitif korelasyon; GR ile arasında anlamlı negatif korelasyon ($r=-0.110$, $p<0.05$)

2. GR ile TAOK ($r=0.155$, $p<0.001$) ve vitamin B₁ ($r=0.122$, $p<0.05$) arasında anlamlı pozitif korelasyon; SOD ($r=-0.105$, $p<0.05$) ve vitamin E ($r=-0.171$, $p<0.001$) ile arasında anlamlı negatif korelasyon

3. TAOK ile vitamin B₁ ($r=0.140$, $p<0.05$ arasında anlamlı pozitif korelasyon; SOD ile arasında ($r=-0.227$, $p<0.001$) anlamlı negatif korelasyon

4. Vitamin E ile vitamin B₁ ($r=-0.128$, $p<0.05$) ve vitamin B₂ ($r=-0.145$, $p<0.05$) arasında anlamlı negatif korelasyon

5. Vitamin B₁ ile vitamin C ($r=0.130$, $p<0.05$) arasında anlamlı pozitif korelasyon; SOD ($r=-0.129$, $p<0.05$) ve vitamin B₂ ($r=-0.227$, $p<0.001$) arasında anlamlı negatif korelasyon

6. Vitamin B₂ ile SOD arasında anlamlı ($r=0.136$, $p<0.05$) pozitif korelasyon saptandı.

TARTIŞMA

Laboratuvar analiz sonuçlarına göre hastalığın olup olmadığı, iyileşmenin derecesi veya terapötik yarar konusundaki kararlar referans değerlere göre alınır. Hekimin kararını etkilemesi yanında bu değerler bireyin veya hastanın yaşamında olumsuzluklara neden olabilmektedir. Bu nedenle laboratuvar test sonuçlarının özellikle karar düzeyleri konusunda şüpheye neden olmaması gerekir. Bu şüphelerin ortadan kalkması referans aralıkların kullanıldığı toplum için belirlenmiş olmasına bağlıdır (1, 13, 17).

IFCC her laboratuvarın kendi referans değerlerini üretmesi gerektiğini belirtmektedir (1-6). Ancak referans aralıkların hesaplanması zahmetlidir ve bu nedenle her klinik laboratuvar tarafından gerçekleştirilememektedir. Önerilen hesaplama yöntemlerine göre ülkemizde klinik değerlendirmede ve araştırmalarda kullanılan parametrelerin düzeylerini ve referans aralıkları belirleme çalışmaları yapılmıştır (19, 27, 41-46, 119-122). Bu nedenle geçerli referans aralıklarının ortaya konulması ile gelecekte yapılacak araştırmalara ışık tutulabilecek ve toplum sağlığı açısından riskli durumlar belirlenerek önlemler alınması sağlanacaktır. Ayrıca hastalıkların tanı ve takibinde kullanılan testlerin güvenle değerlendirilmesi mümkün olacaktır (114, 121-123).

Laboratuvarların kendi referans aralıklarını belirleme çalışmaları sonucunda elde ettikleri değerler, literatürlerdeki ve kit prospektüslerindeki değerlerle karşılaştırıldığında uyum gözleniyorsa laboratuvarın aynı analizi yapan diğer laboratuvarlarla paralel sonuç verdiği ve bulunduğu toplumun referans aralığının diğer toplumların referans aralıklarıyla biyolojik farklılık dışında benzer olduğu sonucuna varılabilir.

Ayrıca iç ve dış kalite kontrol programlarından iyi sonuçlar alınmasına rağmen literatürlerdeki ve kit prospektüslerindeki değerlerle karşılaştırıldığında örtüşen neticeler elde edilememişse o zaman toplumun

referans aralığının farklı olduğu söylenebilir ve bu farklı sonucu yoruma taşıma imkanı doğar.

Ayrıca güncel bir konu olan laboratuvarların akreditasyonu esnasında laboratuvarların dış kalite kontrol programlarına uygunluğu yanında analizi yapılan parametreler için referans aralıkların transformasyonu ya da IFCC ve NCCLS'nin belirttiği kriterlere göre hesaplanması gerektiği ortaya konulmuştur (124-128).

Referans aralığı çalışmasıyla bir laboratuvarın sağlayacağı en önemli kazanımlardan birisi, referans sınırın güvensizliği hakkında başka hiçbir yerden elde edemeyeceği kendi sistemine özgü belirsizlik bilgisini vermesidir. Örneğin; troponin T referans aralığının üst sınırı 0.8 ng/mL iken hastamıza ait tek analiz sonucumuz 0.75 ng/mL ve bu sonuca göre iskemik kalp hastalığı olup olmadığı kararını vermemiz gerekli. Eğer sağlıklı toplumumuzun % 95'ini temsil eden referans aralığımızda üst sınır değerinin güvensizliğini % 5 olarak biliyorsak hastanın 0.75 ng/mL değerinin iskemisi olmayan toplumun % 95'nin içinde olduğunu ve büyük bir olasılıkla hastanın iskemisi olmadığını söyleyebiliriz. Bu şekilde analizi yapılan test daha iyi tanınmış ve elde edilen sonuç daha güvenilir şekilde yorumlanmış olur (10).

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stres birçok hastalığın patogeneğinde kritik rol oynamaktadır (129-135). Bu reaktif oksijen türlerinin biyolojik etkileri çeşitli antioksidan mekanizmalarla kontrol altında tutulmaktadır. Antioksidan savunma sistemleri SOD, GPx, GR gibi antioksidan enzimler, A, E, C, B grubu vitaminler ile çeşitli biyolojik moleküllerden oluşmaktadır (114). Bu antioksidan savunma sistemleri birbiriyle ilişkili reaksiyonlarla oksidatif stres hasarını ortadan kaldırmaya çalışırlar (136). Araştırmalar antioksidan vitamin düzeylerinin diğer oksidatif stres parametreleriyle birlikte değerlendirilmesinin daha sağlıklı olacağı bildirilmektedir (123, 137).

Antioksidan vitaminlerin ve antioksidan enzimlerin konsantrasyonları ile ilgili çeşitli toplumlarda çok geniş çalışmalar yapılmıştır ve yapılmaktadır (45, 46, 138-143). Benzer analitik metodlarla ve benzer populasyonlarda yapılan pek çok araştırmada farklı referans aralık değerleri ortaya konulmaktadır. Farklı referans değerlerin ortaya çıkması analitik değişkenliklerin yanında epidemiyolojik pek çok etkene bağlı bulunmaktadır (73) Dolayısıyla bu durum çalışmaların ve klinik analiz sonuçlarının yorumlanıp birbirleriyle karşılaştırılmasında zorluklara neden olmaktadır. Vitaminlerin yaşam boyunca insan metabolizması için önemini ortaya koyan birçok çalışma, güvenilir referans aralıklar temel alınarak yapılmış değerlendirilmelere ihtiyaç duyulduğuna dikkat çekmektedir (139, 141). Günümüzde laboratuvar uygulamalarında serum, plazma, tam kanda ve eritrositlerde bu parametrelerin düzeylerinin değerlendirilmesini sağlayacak yaş, cinsiyet, coğrafi konum, yaşam tarzı farklılıkları gibi durumlar göz önüne alınarak ve standardize metodlara göre belirlenmiş referans değerlerine her toplumda ortaya konulmalıdır (139, 141, 142). Türkiyede bu konuda yapılmış çalışmalar bulunmakla beraber sayıları oldukça azdır (19, 27, 41, 42, 44-46, 54, 117-122)

Dünyada ve ülkemizde sıklıkla kullanılan serum vitamin düzeylerini ve çok sayıda araştırmaya konu olan antioksidan parametrelerin referans aralıklarını toplumumuz için belirlemek, bu referans aralıkların uygulanabilirliğini değerlendirmek ve bu parametreler arası korelasyonları incelemek temel amaçlarımızdı.

Referans aralıklarının belirlenmesinde ilk aşama referans bireylerin seçimidir. Her analit için cinsiyet ve yaş grupları alt gruplarının en az 120 bireyden oluşması gereği birey seçimi aşamasında en önemli zorluğu oluşturdu. NCCLS'nin birey seçimi aşamasında kullanılmasını önerdiği anket bu aşamada çok yararlı oldu (17). Referans grupları oluşturan bireyleri herhangi bir sistemik hastalığı, enfeksiyonu olmayan, hastanede tedavi görmeyip, laboratuvara sadece kontrol amacıyla kan vermek için başvuranlar ile hastane personeli, Uludağ Üniversitesi'nde okuyan öğrenciler gibi

çevremizde bulunan, aktif bir hastalığı bulunmayan ve hiç ciddi bir hastalık geçirmemiş kişilerden seçtik. Mümkün olduğun kadar homojenliği sağlamak için yaş sınırını 18-45 yaş olarak belirledik. Ayrıca hesaplamalar için en az 120 veri gerekli olduğundan referans birey sayısının 120'den fazla olmasına özen gösterdik.

Laboratuvarımızda referans verilerin toplanması ve analizleri sırasında iç kalite kontrol sonuçları incelendiği zaman gün içi ve günler arası aritmetik ortalamaları firma sınırları arasında bulundu (Tablo XVI, XVII). Değişkenlik katsayıları da tıbben analitik kalite gerekliliklerine ve Avrupa biyolojik değişkenlik temeline dayalı hedefe göre değerlendirildiği zaman kabul edilebilir sınırlarda gözlemlendi (37).

Genel olarak üretici firmanın ve literatürlerin belirttiği referans aralıklar hesapladığımız referans aralıklardan farklı olmakla birlikte % 90 güven aralıkları içinde veya yakınında bulunmaktadır. Buna rağmen alt ve üst sınırlar arasındaki farklılıklar çok küçük değerler olsa da klinik yarar açısından önemli olabilir. Zardo ve arkadaşları dış kalite değerlendirme çalışmaları sırasında her laboratuvarın referans aralıklarını da kaydetmişlerdir (146). İncelemeleri sonucunda referans aralıklarının laboratuvarlar arasında farklı olmasının klinik yararlanım açısından paradoks yaratacağını belirtmişlerdir. Bizim sonuçlarımızı firma ve diğer kaynaklarda belirtilenlerle (Tablo XVIII) karşılaştırdığımız zaman elde ettiğimiz sonuçlar Zardo ve arkadaşlarına hak vermemize neden oldu.

Talwar ve arkadaşları antioksidan parametrelerin ve vitamin düzeylerinin, biyolojik değişkenliklerinin yüksek olması nedeniyle topluma dayalı referans aralıklar göz önüne alınarak değerlendirilmesi gerektiğini söylemişlerdir (73). Bizim çalışmamızın sonuçları da bu görüşü destekler niteliktedir. Ayrıca aynı çalışmacılar bu parametreler için yapılan çalışmaların az sayıdaki katılımcıyla yapıldığını ve sonuçların genellikle ortalama \pm SD şeklinde verildiğini; bu durumun eksiklik ve yükseklik kararını vermede güvenilir şekilde kullanımı sınırlandıracağını belirtmişlerdir (73). Biz de

Çalışmamızda 407 sağlıklı bireyden elde ettiğimiz verilerden NCCLS'nin önerdiği parametrik olmayan yönteme göre referans aralıkları hesaplayarak sonuçlarımızın güvenilirliğini artırmaya amaçladık.

Referans aralıkların bölgesel olarak hesaplanmalıdır. Çünkü bu değerler bölgeler, coğrafi konum veya populusyona göre belirlenebilir. Oluşturulacak alışma grubu veya grupları ile ülke genelinde yaygınlaştırılabilir. Bu şekilde saptanacak referans aralıkları Türk populusyonu hakkında yararlı bilgiler de sağlayabilir. Ayrıca bu gibi çalışmaların yaygınlaşması klinik laboratuvarların kalitesine katkıda bulunabileceği gibi laboratuvar test sonuçlarında standardizasyonu da sağlayabilecektir. Referans aralık projelerinin ulusal boyutta gerçekleştirilmesi toplum sağlığına olan yararları nedeniyle desteklenmelidir.

Ekler

1. Etik kurul onay yazısı

KAYNAKLAR

1. Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values: Part 1. The concept of the reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1987, 25: 337-42.
2. PetitClerc C,. Approved recommendation on the theory of reference values: Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1984, 25: 639-44.
3. Solberg HE, PetitClerc C. Approved recommendation on the theory of reference values: Part 3. Preparation of individuals and collection of specimens for the production of reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1988, 26: 593-8.
4. Solberg HE, Stamm D. Approved recommendation on the theory of reference values: Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1991; 29:531-5.
5. Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values: Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. J Clin Chem Clin Biochem 1987, 25: 645-56.
6. Dybkaer R, Solberg HE. Approved recommendation on the theory of reference values: Part 6. Presentation of observed values related to reference values. J Clin Chem Clin Biochem 1987, 25: 657-62.
7. Grasbeck R. Reference values, why and how. Scand J Clin Lab Invest 1990; S201:45-53.
8. Solberg HE, Grasbeck R. Reference values. Adv Clin Chem 1989; 27: 2-79.
9. Henny J, PetitClerc C, Fuentes-Arderiu X, Petersen PH, Quernalto JM, Villarino-Gonzales MI, Arrimadas-Esteban E, Cabrero-Olive D, et al. Multicentric reference values for some quantities measured with Elecsys 2010 analyser. Clin Chim Acta 2003; 334:143-6.
10. Laleli, Y. Referans kavramı, ulusal referans politikası ve hasta verilerinin kullanımı. Turk J Biochem 2003; 28 (4); 225-227.
11. Young, DS. Determination and validation of reference intervals of reference intervals. Arc Pathol Lab Med 1992, 116, 704-709.

- 12.**Grasbeck, R. The evolution of the reference value concept. Clin Chem Lab Med. 2004;42(7):692-7.
- 13.**Horn PS, Pesce AJ. Reference intervals: an update. Clin chim Acta 2003; 334:5-23.
- 14.**Burtis, Carl A; Ashwood Edward R. Tietz Fundamental of Clinical Chemistry (2nd Edition). USA Saunders Company, 1994; 251-258.
- 15.**Grossi E, Colombo R, Cavuto S, Franzini C. The REALAB Project: A new method for the formulation of reference intervals based on current data. Clinical Chemistry 2005 51(7): 1232-1240.
- 16.**PetitClerc C. Normality: The unreachable star? Clin Chem Lab Med 2004 42:698-701.
- 17.**C28-A How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory; Approved guideline. NCCLS , 1995: Vol.17. No:18
- 18.**Jagarinec N, Flegar-Mestric Z, Surina B, Vrhovski-Hebrang D, Preden-Kerekovic V. Pediatric reference intervals for 34 biochemical analytes in urban school children and adolescents. Clin Chem Lab Med 1998 36(5):327-337.
- 19.**Ozarda Ilcol, Y; Aslan D. Determining reference value of blood chemistry profile in healthy subjects in Bursa. Turk J Biochem 2004; 29 (2); 183-192.
- 20.**Hubl W, Schmieder J, Gladrow E, Demant T. Reference intervals for thyroid hormones on the Architect[®] Analyser. Clin Chem Lab Med 2002 40(2):165-166
- 21.**Ashavaid TF, Kondkar AA, Todur SP, Dherai AJ, Morey J, Raghavan R. Lipid, lipoprotein, apolipoprotein and lipoprotein (a) levels: Reference intervals in a healthy Indian population. Journal of Atherosclerosis and Thrombosis 2005 12:251-259
- 22.**Sikaris K, McLachlan RI, Kazlauskas R, de Kretser D, Holden CA, Handelsman DJ. J Clin Endocrinol Metab. 2005 Nov;90(11):5928-36
- 23.**Baadenhuijsen H, Smit JC. Indirect estimation of clinical chemical reference intervals from total hospital patient data: Application of a modified Bhattacharya procedure. J Clin Chem Biochem 1985 Dec; 23(12):829-39.
- 24.**Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into gaussian components. Biometrics 1967 Mar; 23(1):115-35.

- 25.**Naus AJ, Borst A, Kuppens PS. Determination of n-dimensional reference ellipsoids using patient data. *J Clin Chem Clin Biochem* 1982 20:75-80.
- 26.**White JD. Use of patient data in the control of urea, creatinine and electrolyte estimations. *Clin Chim Acta* 1978 84:353-60.
- 27.**Ilcol YO, Aslan D. Use of total patient data for indirect estimation of reference intervals for 40 clinical chemical analytes in Turkey. *Clin Chem Lab Med* 2006; 44: 867-76.
- 28.**Kairisto V, Hanninen KP, Leino A, Pulkki K, Peltola O, Nantö V, Pulkki LM, Irjala K. Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1994; 32: 789-796.
- 29.**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. *Clin Chem* 1994; 40 (12): 2209-2215.
- 30.**Grasbeck, R; Alström, T. *Reference Values in Laboratory Medicine: The Current State of The Art*. Chichester, England, John Wiley & Sons, Ltd., 1981, pp.279-288.
- 31.**Harris EK. Statistical aspects of reference values in clinical pathology. *Progress in Clinical Pathology*. Vol. 7. Grune & Stratton, Inc. Newyork, USA, 1981, pp. 45-66.
- 32.**Kaplan LA, Pesce AJ. *Clinical Chemistry, Theory, Analysis, Correlation 3rd Edition* 1996, Mosby, USA
- 33.**Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*. 2000 Appleton & Lange
- 34.**Petersen PH, Rustad P. Prerequisites for establishing common reference intervals. *Scand J Clin Invest* 2004 64:285-292
- 35.**Aslan, D. Referans aralıkların hesaplanması. In: Gezer S, Güner G, Tuncel P, eds. *Klinik Laboratuvarlarda Yöntem Seçimi Değerlendirilmesi ve Laboratuvara Uygulanması Kurs Kitabı*. İzmir, 2000: 80-119.
- 36.**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.
- 37.**Westgard JO. Within-subject and between-subject CV values of analytes. <http://www.westgard.com/lesson.html>

- 38.**Ricos C, Domenach M, Perich C. Analytical quality specifications for common reference materials. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42:702-709.
- 39.**Laleli Y, Akbay A. Referans aralık analizi. In: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay FZ, eds. *Tıbbi laboratuvarlarda standardizasyon ve kalite yönetimi*. Ankara, 2000: 124-137.
- 40.**Sasse EA. Determination of reference intervals in the clinical laboratory using the proposed guideline National Committee for Clinical Laboratory standards C28P. *Arc Pathol Lab Med* 1992 Jul; 116(7):710-3.
- 41.**Enli Y, Aslan D, Akalin N, Aydın Y, Yilmazturk GC, Gochan I, Tekinturk S, Demir S. Determination of reference intervals for 18-40 years old people living in Denizli by using different methods. *Turk J Biochem* 2003 28(4):228-245
- 42.**Taskin G, Yilmaz Sipahi E, Yildirimkaya M, Nadirler F, Halloran M, Ayoglu FN, Laleli Y. Plasma total homocysteine levels in healthy Turkish population sample. *Acta Cardiol* 2006 61(1):35-42
- 43.**Tiker F, Gurakan B, Tarcan A. Serum bilirubin levels in 1-month-old, healthy, term infants from southern Turkey. *Ann Trop Paediatr* 2002 22(3):25-8
- 44.**Muezzinoglu T, Lekili M, Eser E, Uyanik BS, Büyüksu C. Population standarts of prostate spesific antigen values in men over 40: Community based study in Turkey. *Int Urolog and Nephro* 2005 37:299-304
- 45.**Ozbay B, Dulger H. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in Turkish population: Relation to age, gender, exercise and smoking. *Tohoku J Exp Med* 2002 197:119-124,
- 46.**Inal ME, Kanbak G, Sunal E. Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clinical Chimica Acta* 2005 305:75-80
- 47.**Vassalle C, Petrozzi L, Btto N, Andreassi MG, Zucchelli GC. Oxidative stres and its assosiation with coronary artery disease and different atherogenic risk factors. *J Intern Med* 2004; 256 (4):308-15.
- 48.**Zima T, Stipek S, Tesar V, Nemecek K, Mechurova A. Free radicals in the pathogenesis of selected diseases. *Cas Lek Cesk* 1995; 134 (10):291-5.
- 49.**Kuhn MA. Oxygen free radicals and antioxidants. *Am J Nurs* 2003; 103 (4):58-62.

- 50.** Gil L, Siems W, Mazurek B, Gross J, Schroeder P, Voss P, Grune T. Age-associated analysis of oxidative stress parameters in human plasma and erythrocytes. *Free Radical Research* 2006 40(5):495-505.
- 51.** Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 1997, 43(4):562-568.
- 52.** Gouado I, Mbiapo TF, Moundipa FP, Teugwa MC. Vitamin A and E status of some rural populations in North of Cameroon. *Int J Vitam Nutr Res* 1998 68(1):21-5.
- 53.** Volkovova K, Beno I, Staruchova M, Bobek P, Mekinova D, Tatara M. Antioxidative enzyme activity in the blood of healthy persons. *Bratisl Lek Listy* 1996 Mar; 97(3):134-8.
- 54.** Atlan N, Dincel AS, Koca C. Diabetes mellitus ve oxidative stress. *Turk J Biochem* 2006; 31 (29):51-56.
- 55.** Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 2001, Third edition, Oxford Science Publications, 22-24.
- 56.** Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med* 1991, 91:14-21.
- 57.** Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*, 2000, 109 (1):33-44.
- 58.** Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-9.
- 59.** Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 899:136-47.
- 60.** Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clinic Proc* 1988; 63(4): 381-9.
- 61.** Abrescia P, Golino P. Free radicals and antioxidants in cardiovascular diseases. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2005; 3(1): 159-71.
- 62.** Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool?. *Redox Report* 2004; 9(3):145-152.
- 63.** Halliwell B. Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology*, 1995; 49(10):1341-48.
- 64.** Armstrong D. Free radicals and antioxidant protocols. *Methods Mol Biol* 1998; 108:299-313.

- 65.**Petersen SV, Enghild JJ. Extracellular superoxide dismutase: structural and functional considerations of a protein shaped by two different disulfide bridge patterns. *Biomed Pharmacother* 2005; 59(4):175-82.
- 66.**Leopold JA, Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler thromb Vasc Biol* 2005; 25:1332-40.
- 67.**Bolann BJ. Improvement of a direct spectrophotometric assay for routine superoxide dismutase activity. *Clin Chem* 1991; 37:1993-7.
- 68.**Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1987; 256:677-686.
- 69.**Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, Loscalzo J. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J Biol Chem*. 2004; 279:26839 –26845
- 70.**Bompart GJ, Prevot DS, and Bascand JL. Rapid automated analysis of glutathion reductase, peroxidase and s-transferase activity. *Clin Biochem* 1990; 23:501-4.
- 71.**Akyol Ö. Oxidative stres in schizophrenia. *The Medical Journal of Kocatepe* 2004, Ek sayı:15-25.
- 72.**Brigelius R, Muckel C, Akerboom TP, Sies H. Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 1987; 32:2529-2534.
- 73.**Talwar DK. Biological variation of vitamin in blood of healthy individuals. *Clinical Chemistry* 2005 51(11):240-246.
- 74.**Ihara H, et al. Stability of fat soluble and water-soluble vitamins in artificially prepared, vitamin enriched, lyophilized serum. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 2004 18:240-246.
- 75.**Jaffe GM. Vitamin C. Machlin L, ed. *Handbook of vitamins*. New York: Marcel Dekker Inc, 1984:199-244.
- 76.**Woodall AA, Ames BN. Diet and oxidative damage to DNA: The importance of ascorbate as an antioxidant. ParkerL, Fuchs J, eds. *Vitamin C in health and disease*. New York: Marcel Dekker Inc, 1997:193-203.
- 77.**National Research Council. *Recommended dietary allowalances*. 10th ed. Washington, DC: National Academy Pres, 1989.

- 78.**Rose Rc, Bode AM. Biology of free radical scavengers-an evaluation of ascorbate. *FASEB J* 1993; 7:1135-42.
- 79.**Robert FC. Vitamin C: The nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Medical Hypotheses* 1985; 18:61-77.
- 80.**Krajcovicova-Kudlackova M, Paukova V, Bacekova M, Dusinska M. Lipid peroxidation in relation to vitamin C and vitamin E levels. *Cent Eur J Public Health* 2004; 12(1):46-8.
- 81.**Traber MG. Utilization of vitamin E. *Biofactors*. 1999;10(2-3):115-120.
- 82.**Schneider C. Chemistry and biology of vitamin E. *Mol Nutr Food Res* 2005;49:7-30.
- 83.**Burton G, Joyce W, Ingold K. Is vitamin E the only lipid soluble, chain breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes? *Arc Biochem Biophys* 1983; 221(1): 281-290.
- 84.**S. Oğuz Kayaalp. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. Cilt:3. 1993 Feryal Matbaacılık ANKARA
- 85.**Rachel I.M. van Haaften, Guido R. M. M. Haenen, Chris T.A. Evelo, Aalt Bast. Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug Metabolism Reviews* 2003, 35(2&3):215-253.
- 86.**Tucker JM, townsend DM. Alpha-tocopherol: roles in prevention and therapy of human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2005; 59: 308-387.
- 87.**Di Mascio P, Murphy ME, and Sies H. Antioxidant defence systems: The role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:194-200.
- 88.**Tanphaichitr V. Thiamin. In: Shils M, ed. *Nutrition in Health and Disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999:381-389.
- 89.**Gibson Gary E, Zhang Hui. Interactions of oxidative stress with thiamine homeostasis promote neurodegeneration. *Neurochemistry International* 2002, 40:493-504.
- 90.**Rindi G. Thiamin. In: Ziegler EE, Filer LJ, eds. *Present Knowledge in Nutrition*. 7th ed. Washington D.C.: ILSI Press; 1996:160-166.
- 91.**Sauberlich HE. Biochemical alterations in thiamine deficiency-Their interpretation. *Am J Clin Nutr* 1967, 20:528-542.

- 92.**Lukienko PI, Mel'nichenko NG, Zverinskii IV, Zabrodskaya SV. Antioxidant properties of thiamine. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2000; 9:874-76.
- 93.**Florence TM, Stanber JL. Manganese catalysis of dopamine oxidation. *Sci Total Environ* 1989; 78:233-240.
- 94.**Sushko LI, Lukienko PI. Effect of vitamin B1 deficiency on xenobiotic hydroxylation and lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Farmakol Toksikol*. 1981; 2:102-104.
- 95.**Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. Riboflavin. *Dietary Reference Intakes: Thiamin, Riboflavin, Niacin, Vitamin B-6, Vitamin B-12, Pantothenic Acid, Biotin, and Choline*. Washington D.C.: National Academy Press; 1998:87-122.
- 96.**Brody T. *Nutritional Biochemistry*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999.
- 97.**Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. *Chemico-Biological Interactions*, 2006 (Article in press)
- 98.**Bohles H. Antioxidative vitamins in prematurely and maturely born infants. *Int J Vitam Nutr Res*. 1997;67(5):321-328.
- 99.**Bates CJ. Glutathione and reduced indices in rat lenses, liver and red cells during riboflavin deficiency and its correction. *Exp. Eye. Res*. 1991, 53:123-130.
- 100.** Leklem JE. Vitamin B-6. In: Machlin L, ed. *Handbook of Vitamins*. New York: Marcel Decker Inc; 1991:341-378.
- 101.** Jain SK, Lim G. Pyridoxin and pyridoxamin inhibits superoxide radicals and prevents lipid peroxidation, protein glycosylation, and (Na⁺⁺ K⁺)-ATPase activity reduction in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radical Biol Med* 2001; 30:232-237.
- 102.** Cohen KL, Gorecki GA, Silverstein SB, Ebersole JS, Solomon LR. Effect of pyridoxin (vitamin B6) on diabetic patients with peripheral neuropathy. *J Am Pediatr Assoc*. 1984; 74:394-397.
- 103.** Kanan K, Jain SK. Effect of vitamin B6 on oxygen radicals, mitochondrial membrane potential, and lipid peroxidation in H₂O₂-treated U937 monocytes.
- 104.** Anand SS. Pyridoxine attenuates chromium-induced oxidative stress in rat kidney. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; 97:58-60.

- 105.** Johnson DK, Pippard MJ; Murphy TB, Rose NJ. An in vivo evaluation of iron-chelating drugs derived from pyridoxal and its analogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1982; 221:399-403.
- 106.** Mehta R, O'Brien PJ. Prevention of copper and iron induced hepatocyte oxidative stress cytotoxicity by pyridoxal. Submitted to publication.
- 107.** Depeint F, Bruce WR, Shangari N, Mehta R, O'Brien PJ. Mitochondrial function and toxicity: Role of the B vitamins on the one-carbon transfer pathways. *Chemico-Biological Interactions* 2006 (Article in press).
- 108.** Rimm EB, Willett WC, Hu FB, et al. Folate and vitamin B6 from diet and supplements in relation to risk of coronary heart disease among women. *JAMA*. 1998;279(5):359-364.
- 109.** Dudman NPB. Disordered methionine homocysteine metabolism in premature vascular disease: its occurrence, cofactor therapy and enzymology. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1993; 13:1253-60.
- 110.** Duan J, Murohara T, Ikeda T, et al. Hyperhomocysteinemia impairs angiogenesis in response to hindlimb ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:2579-85.
- 111.** Outinen PA, Sood SK, Liaw PCY, et al. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J* 1998; 332:213-21.
- 112.** Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC. Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clinical Biochem* 2003; 36:431-441.
- 113.** Nelson DL, Cox MM (Çeviri Editörü : Prof. Dr. Nedret Kılıç) *Lehninger Biyokimyanın İlkeleri (Lehninger Principles of Biochemistry 2005 Worth Publishers)* 2005 Palme Yayıncılık
- 114.** Andersen HR, Nielsen JB, Nielsen F, Grandjean P. Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes. *Clinical Chemistry* 1997 43(3):562-568.
- 115.** De Vega L, Perez Fernandez R, Martin Mateo MC, Bustamante J, Bustamante A, Herrero AM, Bustamante Munguira E. Study of the activity of glutathione-peroxidase, glutathione-transferase, and glutathione-reductase in renal transplants. *Transplant Proc.* 2003 Jun;35(4):1346-50.
- 116.** Yao JK, Leonasrd S, Reddy R. *Schizophrenia Research* 1998 32:1-8

117. Duman BS, Ozturk M, Yilmazeri S, Hatemi H. Thiols, malonaldehyde and total antioxidant status in the Turkish patients with type 2 diabetes mellitus. *Tohoku J Exp Med.* 2003 Nov;201(3):147-55.

118. Bakan N, Taysi S, Yilmaz O, Bakan E, Kuskay S, Uzun N, Gundogdu M. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in serum of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Chim Acta.* 2003 Dec;338(1-2):143-9.

119. Mecocci P, Polidori MC, Troiano L et al. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radical Biology & Medicine* 2000 28(8):1243-1248).

120. Mahley RW, Arslan P, Pekcan G, Pépin GM, Agacdiken A, Karaagaoglu N, Rakicioglu N, Nursal B, Dayanikli P, Palaoglu KE, Bersot TP. Plasma lipids in Turkish children: impact of puberty, socioeconomic status, and nutrition on plasma cholesterol and HDL. *J Lipid Res.* 2001 Dec;42(12):1996-2006.

121. Mahley RW, Pepin J, Palaoglu KE, Malloy MJ, Kane JP, Bersot TP. Low levels of high density lipoproteins in Turks, a population with elevated hepatic lipase. High density lipoprotein characterization and gender-specific effects of apolipoprotein e genotype. *J Lipid Res.* 2000 Aug;41(8):1290-301.

122. Hodoglugil U, Mahley RW. Smoking and obesity make a bad problem worse: genetics and lifestyle affect high density lipoprotein levels in Turks. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006 Mar;6(1):60-7.

123. Hodoglugil U, Tanyolac S, Williamson DW, Huang Y, Mahley RW. Apolipoprotein A-V: a potential modulator of plasma triglyceride levels in Turks. *J Lipid Res.* 2006 Jan;47(1):144-53. Epub 2005 Oct 28.

124. Dighe AS, Rao A, Coakley AB, Lewandrowski KB. Analysis of laboratory critical value reporting at a large academic medical Center. *Am J Clin Pathol.* 2006 May;125(5):758-64.

125. Saxena S, Kempf R, Wilcox S, Shulman IA, Wong L, Cunningham G, Vega E, Hall S. Critical laboratory value notification: a failure mode effects and criticality analysis. *Jt Comm J Qual Patient Saf.* 2005 Sep;31(9):495-506.

126. Cooper WG. Quality control practices and preferences in today's clinical laboratory. A report for government regulators, decision makers, and advisors. *MLO Med Lab Obs.* 1997 Jun;29(6):56-7, 60, 62-5.

127. Laleli YR, Oktem M. External quality assessment scheme by private laboratories in Turkey. *Hematology.* 2005;10 Suppl 1:143-50.

128. Davies KW. Quality assurance in clinical chemistry laboratories in the UK. *Accred Qual Asur.* 1999 4:18-26

129. Ruiz C, Alegria A, Barbera R, Farre R, Lagarda MJ. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in patient with type 1 diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(2):99.

130. Sierra C, Vileseca MA, Moyano D, Brandi N, Campistol J, Lambruschini N, Cambra FJ, Deulofeu R, Mira A. Antioxidant status in hyperphenylalaninemia. *Clin Chim Acta* 1998;276(1):1.

131. Apopstolski S, Marikovic Z, Nikolic A, Blagojevic D, Spasic MB, Michelson AM. Glutathione peroxidase in amyotrophic lateral sclerosis: the effects of selenium supplementation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998;17(3-4):325.

132. Mihailovic MB, Avromovic DM, Jovanovic IB, Pesut OJ, Matic DP, Stojanov VJ. Blood and plasma selenium levels and GSH-Px activities in patients arterial hypertension and chronic heart disease. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998;17(3-4):285.

133. Kim JD, McCarter RJ, Yu BP. Influence of age, exercise and dietary restriction on oxidative stress in rats. *Aging* 1996;8(2):123.

134. Serban MG, Tanaseanu S, Bara C. Oxidant stress, and antioxidant protection in lupus nephropathy. *Rom J Intern Med* 1996;34(1-2):105.

135. Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 2000;35:1.

136. Winklhofer-Roob B, Van't Hof MA, Shmerling DH. Reference values for plasma concentrations of vitamin E and A and carotenoids in Swiss population from infancy to adulthood, adjusted for seasonal influences. *Clin Chem.* 1997 Jan;43(1):146-53.

137. Ondreicka R, Beno I, Cerna o, Grancicova E, Staruchova M, Volkovova K, Bobek P, Tatara M. Relation between levels of vitamins C, E, A ve beta-carotene and activity of antioxidant enzymes in the blood. *Bratisl Lek Listy* 1998 99(5):250-4.

138. Olmedilla B, Granado F, Gil-Martinez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clinical Chemistry* 1997 63(6):1066-1071.

139. Ho SP, Chan-Yeung M, Chow KKM, Ip MSM, Mak JCW. Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese Adults:influence of age, gender and smoking. *Respirology* 2005 10:305-309.

- 140.** De La Torre R, Casado A, Lopez-Fernandez ME, Carrascosa D, Venarucci D. Superoxide dismutase activity levels in a Spanish population 50-93 years. *Am J Hum Biol* 1999 11:45-47.
- 141.** Rush JWE, Sandiford SD. Plasma glutathione peroxidase in healthy young adults: influence of gender and physical activity. *Clinical Biochemistry* 2003 36:345-351.
- 142.** 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* 2002 322:117-120.
- 143.** Maes M, Weeckx S, Wauters A, Nells H, Scharpe S, Verkerk R. Biological variability in serum vitamin E concentrations: relation to serum lipids. *Clin Chem*. 1996 Nov;42(11):1824-31
- 144.** Bates CJ. Vitamin analysis. *Ann Clin Biochem* 1997 34:599-626.
- 145.** Fell GS, Talwar D. Assessment of status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998 1:491-7.
- 146.** Zardo L, Secchiero S, Sciacovelli L, Bonvicini P, Plebani M. Reference intervals: Are interlaboratory differences appropriate? *Clin Chem Lab Med* 1999 37 (11/12):1131-1133.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nin desteği ile gerçekleştirilmiştir (Proje No: 2004-12/12).

Çalışmalarım sırasında bilimsel ve sosyal alanda yardım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen uzmanlık tezi danışmanım Doç. Dr. Yeşim ÖZARDA'ya öncelikle teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Uzmanlık eğitimim boyunca bana her zaman yol gösteren Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. H. Asuman TOKULLUGİL'e, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak zamanlarını ve emeklerini harcayan kürsümüzün tüm öğretim üyelerine gönülden şükranlarımı sunarım.

Tezimi hazırlamamdaki destekleri için Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Diler ASLAN'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca bana çalışma olanaklarını sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıbbi Tahliller, Eğitim ve Araştırma Merkez Laboratuvarı Başkanı Prof. Dr. İsmail Hakkı ULUS'a teşekkür ederim.

Her zaman birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sıcak dostluklarından dolayı tüm çalışma arkadaşlarıma, Uludağ Üniversitesi Tıbbi Tahliller, Eğitim ve Araştırma Merkez Laboratuvarı teknisyenlerine ve elemanlarına yardımları ve destekleri için şükranlarımı sunarım.

Beni bu günlere getiren aileme ve hiçbir zaman sevgi, güven ve desteğini esirgemeyen değerli eşime ve tüm dostlarıma teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Son olarak bu çalışmaya katılmayı kabul eden tüm kişilere teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

30.08.1977 yılında Samsun'da doğdum. İlkokul eğitimimi Samsun Atatürk İlkokulu'nda , ortaokul eğitimimi Samsun İlkadım Ortaokulu'nda ve lise eğitimimi Samsun 19 Mayıs Lisesi'nde tamamladım. Aynı yıl İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimime başladım. 2002 yılından beri Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde sürdürdüğüm uzmanlık eğitimime halen devam etmekteyim.