**Serum glikoz düzeylerinin belirlenmesi**

Serum glikoz düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel assay, RLB252 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Glikoz oksidaz (GOD), glikozun glukona oksidasyonunu katalize eder.

Oluşan hidrojen peroksit (H2O2), peroksidaz varlığında fenol ile reaksiyona girerek

4 - aminofenazon (4-AP) olışturur.

β-D-Glikoz + O2 + H2O ⎯⎯ ⎯→ GOD Glukonik asit + H2O2

H2O2 + Fenol + 4-AP ⎯⎯⎯→ POD Quinon + H2O

Numuneler Relassay kiti ile Mindray BS400 cihazında tam otomatik olarak çalışıldı.

Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 250 μl alındı, numuneden 4 μl alındı ardından küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 546 nm’de okundu. Beş dakika sonra ikinci absorbans 546nm’de okunarak glikoz düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Serum trigliserid düzeylerinin belirlenmesi**

Serum trigliserit düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Relassay, RLB257 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Trigliseridler lipaz enzimi ile hidrolize olarak gliserol ve serbest yağ asitleri açığa çıkar. Gliserol, gliserol kinaz ve ATP tarafından gliserol-3-fosfat (G-3-P) ve adenosin-5-difosfata (ADP) dönüştürülür. Gliserol-3-fosfat (G-3-P) daha sonra gliserol fosfat dehidrojenaz (GPO) ile dihidroksiaseton fosfata (DAP) ve hidrojen peroksite (H2O2) dönüştürülür. Son reaksiyonda, hidrojen peroksit (H2O2) peroksidaz varlığında aminofenazon (4-AP) ve p-klorofenole dönüşerek kırmızı renk verir. Rengin yoğunluğu 505 nm de ölçülerek trigliserit düzeyleri belirlenir.

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 3 μl alınarak küvet içinde karıştırıldı, 30 saniye sonra ilk absorbans 505 nm’de okundu. Beş dakika sonra ikinci absorbans 505 nm’de okunarak trigiserit düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Serum total kolesterol düzeylerinin belirlenmesi (mg/dl)**

Serum trigliserit düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Relassay, RLB248 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Serumda bulunan kolesterol aşağıdaki reaksiyonlara göre renkli bir kompleks oluşturmaktadır.

Kolesterol esterleri + H2 O kolesterol esteraz Kolesterol + yağ asitleri

Kolesterol esterleri + H2 O kolesterol esteraz Kolesterol + yağ asitleri

Kolesterol + O2 kolesterol oksidaz 4-Kolestenon + H2 O2

2 H2 O2 + Fenol + 4-Aminoantipirin peroksidaz Quinonimine + 4H2 O

Hidrojen peroksit, peroksidazın katalitik etkisi altında 4-aminoantipiridin ve fenol ile reaksiyona girerek kırmızı renk oluşturur. Bu rengin yoğunluğu 540 nm de ölçülerek glukoz düzeyleri belirlenir

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 250 μl alındı, numuneden 3 μl alınarak küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 540 nm’de okundu. Beş dakika sonra ikinci absorbans 540 nm’de okunarak total kolesterol düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Serum HDL-kolesterol düzeylerinin belirlenmesi**

Serum HDL-kolesterol düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Relassay, RLB261 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Numunenin herhangi bir ön işlemine veya santrifüjlenmesine gerek kalmadan doğrudan serum HDL (yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol) düzeylerinin belirlenmesi 2 basamakta gerçekleşir.

1.Lipoproteinin eliminasyonu

Kolesterol esterleri ⎯⎯⎯→ CHE Kolesterol + Yağ asitleri

Kolesterol + O2 ⎯⎯⎯⎯→ CHOD 4-Kolestenon + H2 O2

2 H2 O2 ⎯⎯⎯⎯⎯→ Catalase 2H2 O + O

2. HDL-kolesterol ölçümü:

Kolesterol esterleri ⎯⎯⎯→ CHE Kolesterol + Yağ asitleri

Kolesterol + O2 ⎯⎯⎯⎯→ CHOD Kolestenon + H2 O2

2 H2O2 + HDAOS + 4-AA ⎯⎯⎯→ POD Quinon Pigment + 4H2 O

Oluşan rengin yoğunluğu, numunedeki HDL konsantrasyonu ile orantılıdır.

Yapılışı: Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alınarak küvet içinde karıştırılıp 5 dk sonra ilk absorbans 570 nm ‘de okundu. Daha sonra reaktif 2’den 50 μl alınarak karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans 570 nm’de okunarak LDL-kolesterol düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Serum LDL-kolesterol düzlerinin belirlenmesi**

Serum LDL-kolesterol düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Relassay, RLB263 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

1.Lipoproteinin eliminasyonu

İlk adımda, HDL, VLDL ve şilomikronlar elimine edilir ve reaksiyon için özel koşulda

reaktif olmayan bileşiklere dönüştürülür.

Kolesterol esterleri ⎯⎯⎯→ CHE Kolesterol + Yağ asitleri

Kolesterol + O2 ⎯⎯⎯⎯→ CHOD 4-Kolestenon + H2 O2

2 H2 O2 ⎯⎯⎯⎯⎯→ Catalase 2H2 O + O

2. LDL-kolesterol ölçümü:

İkinci reaktif sadece LDL-kolesterol renk reaksiyonudur.

Kolesterol esterleri ⎯⎯⎯→ CHE Kolesterol + Yağ asitleri

Kolesterol + O2 ⎯⎯⎯⎯→ CHOD Kolestenon + H2 O2

2 H2O2 + HDAOS + 4-AA ⎯⎯⎯→ POD Quinon Pigment + 4H2 O

Oluşan rengin yoğunluğu, numunedeki LDL konsantrasyonu ile orantılıdır.

Yapılışı: Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alınarak küvet içerisinde karıştırılıp 5 dakika sonra ilk absorbans 570 nm’de okundu. Daha sonra reaktif 2’den 50 μl karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans okunarak LDL-kolesterol düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Serum total protein düzeylerinin belirlenmesi**

Serum total protein düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Relassay, RLB268 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi. Kolorimetrik testtir.

İki değerlikli bakır, karakteristik mor renkli biuret kompleksi oluşturmak için alkali çözelti içinde protein peptit bağları ile reaksiyona girer. Sodyum potasyum tartrat, bakır hidroksitin çökelmesini önler ve potasyum iyodür, bakırın otomatik olarak indirgenmesini önler. Renk yoğunluğu, fotometrik olarak belirlenebilen protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örnek ve reaktifin ilavesiyle reaksiyon başlar

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 200 μl alındı, numuneden 4 μl alınarak küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 546 nm’de okundu. Beş dakika sonra ikinci absorbans 546 nm’de okunarak total protein düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Serum albümin düzeylerinin belirlenmesi**

Serum albümin düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Relassay, , RLB273 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi. Kolorimetrik testtir

pH 4.1 değerinde albümin, mavi-yeşil bir kompleks oluşturmak için herhangi bir anyonik boyarmadde olan bromokresol yeşili (BCG) ile bağlanmaya yetecek kadar katyonik bir karakter gösterir. Mavi-yeşil rengin renk yoğunluğu, albümin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak belirlenebilir. Örnek ve reaktifin ilavesiyle reaksiyon başlar.

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 3 μl alınarak küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk ilk absorbans 605 nm’de okundu. Beş dakika sonra ikinci absorbans 605 nm’de okunarak albümin düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak verildi.

**Plazma total oksidan kapasitesinin (TOK) belirlenmesi**

Plazma TOK düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, RL0024 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Yöntem, örnek içerisindeki oksidanların demir iyonlarını demir iyonlarına oksitlemesi prensibine dayanmaktadır. Testin asidik ortamında, bu demir iyonları bir kromojen ile renkli bir kompleks oluşturdu. Standart ve örneklerin absorbansı suya karşı 546' da okundu. Test hidrojen peroksit ile kalibre edildi (Erel, 2005).

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 45 μl alınarak, küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 530 nm’de okundu. Reaktif 2’den 15 μl karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans 530 nm’de okunarak TOK düzeyleri belirlendi. Sonuçlar μmol H2O2 Eq/L olarak verildi.

**Plazma total antioksidan kapasitesinin (TAK) belirlenmesi**

Plazma TAK düzeyleri, Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, RL0017 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Prosedür, renkli 2,2ʹ-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) radikalinin numunede bulunan antioksidanlar ile renksiz indirgenmiş bir forma indirgenmesine dayanmaktadır. Standart ve örneklerin absorbansı, tam otomatik otoanalizör ile deiyonize suya karşı 660 nm'de okundu. Bu prosedür bir E vitamini analoğu olan Trolox kullanılarak kalibre edildi. Test,% 3'ten daha düşük mükemmel hassasiyet değerlerine sahiptir. (Erel, 2004).

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 300 μl alındı, numuneden 18 μl alınarak küvet içerisinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 660 nm’de okundu. Reaktif 2’den 45 μl alınarak karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans 660 nm’de okunarak TAK düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mmol Trolox Eq/ L olarak ifade edildi

**Plazma süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin belirlenmesi:**

Plazma SOD aktivitesi Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, RLD0123 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Speroksit dismutazın rolü, oksidatif enerji süreçleri sırasında üretilen toksik radikalin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürülmesini hızlandırmaktır. Bu yöntemde, süperoksit radikalleri üreticisi olan ksantin ve ksantin oksidaz sistemi kullanılarak 2- (4-iyodofenil) -3- (4-nitrofenol) -5-feniltetrazoliyum klorid (INT) ile reaksiyona giren süperoksit radikallerinin indirgenerek kırmızı bir formazan boyası oluşturulur. Süperoksit dismutaz aktivitesi daha sonra bu reaksiyonun inhibisyon derecesi ile ölçülür. Enzim aktivitesi ölçümü ise reaksiyonun 505 nm’de ortamda bulunan SOD enzimi ile inhibisyonuna dayanır.

**Yapılışı:** Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 4 μl alınarak küvet içinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 505 nm’de okundu. Sonra reaktif 2’den 20 μl karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans 505 nm’de okunarak SOD aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

**Plazma katalaz (CAT) aktivitesinin belirlenmesi**

Plazma CAT aktivitesi Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, RLD8934 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Katalaz, H2O2’nin su ve moleküler oksijene yıkımını katalizleyen bir enzimdir. Ölçümü Kolorimetrik metot ile 2 adım da gerçekleşir:

İlk adım da numune hidrojen peroksit ile inkübe edilerek, hidrojen peroksidin suya ve oksijene dönüşümü gerçekleşir. .

İkinci adım ise hidrojen peroksit yokluğunda katalaz metanol ile tepkimeye girerek formaldehit açığa çıkar. Formaldehit kromojen görevi yapmaktadır. Sonuçta pembe renk oluşmaktadır. Absorbans 505 nm'de ölçülür.

Yapılışı: Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 8,5 μl alınarak küvet içerisinde karıştırılıp 30 saniye sonra ilk absorbans 505 nm’ de okundu. Sonra reaktif 2’den 125 μl karıştırıldı ve 5 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans 505 nm’de okunarak CAT aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/L olarak ifade edildi.

**Plazma glutasyon peroksidaz (GPx) aktivitesinin belirlenmesi:**

Plazma GPx aktivitesi Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, RLD3465 Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

Glutasyon peroksidaz, t-bütil hidroperoksit varlığında redükte glutasyonun okside glutasyona dönüştürerek H2O2’in su ve oksijene dönüşmesinde etkilidir Okside glutasyon glutasyon redüktaz enzimi ile redükte glutasyona indirgenir. Bu reaksiyonda NADP’ye oksitlenen NADPH’ın 340 nm dalga boyunda belirlenen absorbans farkının zamana karşı okunarak GPX aktivitesi belirlenir.

Yapılışı: Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 250 μl alındı, numuneden 5 μl alınınarak küvet içinde karıştırılıp 60 saniye sonra ilk absorbans 340 nm’de okundu. Sonra reaktif 2’den 10 μl karıştırıldı ve 2 dakika inkübasyondan sonra ikinci absorbans 340 nm’de okunarak GPx aktivitesi belirlendi. Sonuçlar U/Lolarak ifade edildi.

**Plazma malondialdehit (MDA) düzeylerinin belirlenmesi**

Plazma MDA düzeyleri spektrofotometre cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, RLMD0158Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

**Prensibi,** malondialdehit ve tiyobarbitürik asidin (TBA) reaksiyonu üzerine asidik koşullar altında pembe renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır.

**Yapılışı:** Bir deney tüpüne 250 µl numune alınır. Üzerine 250 µl reaktif 1 ve 50 µl reaktif 3 konulur ve vortekslenir. Oda ısısında 15 dakika bekletilir. Sonra bu tüp 4000 devirde 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüjden sonra tüpte iki kısım vardır. Üstte sıvı kısım ( supernatant), altta ise prespitant kısım oluşur. Supernatant kısmından pipetle yavaşça 250 µl alınır, bir cam tüpe aktarılır. Bunun üzerine 250 µl reaktif 2 ilave edilerek 1 dakika vortekslenir. Tüpler 80° C’lik etüvde 60 dakika inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüpler buzlu soğuk suya alınır ve soğutulur. Örneklerde oluşan pembemsi sarı-eflatun renk spektrofotometre cihazıyla absorbansları 532 nm’de ölçülür

Standart olarak 1-1-3-3 tetra etoksi propan şişesinden 10m.mol'lük standart hazırlanır. Sonuçlar bu kalibratöre göre değerlendirilir.

R1: TCA=Triklorasetik Asit R2: Tiyobarbitürük asit R3: Sodyum klorür

MDA Standart Curve Hazırlanışı:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 100mmol/L | Standart No.6 | 500 µL orijinal standart + 500 µL standart sulandırıcı |
| 50mmol/L | Standart No.5 | 500 µL standart No 6 + 500 µL standart sulandırıcı |
| 25mmol/L | Standart No.4 | 500 µL standart No 5+ 500 µL standart sulandırıcı |
| 12,5 mm /L | Standart No.3 | 500 µL standart No 4 + 500 µL standart sulandırıcı |
| 62,5 mm/L  3,125mmol/L | Standart No.2  Standart No. 1 | 500µL standart No 3 + 500 µL standart sulandırıcı  500µL standart No 2+ 500 ul standart sulandırıcı |

**Plazma nitrik oksit düzeyinin belirlenmesi**

**Prensibi:**

**Nitrik Oksit Test Protokolü:**

1-Blank tube: 200 ul distile su.Take 200 ml of distilled water to 1.5 ml ep tubes.

2-Standart tube: **Take 200 ml of 40umol/L sodıum nitirite solution to 1.5 ml ep tubes.**

**40 umol/L sodyum nitrit solüsyonundan 200 ul epondorf tüplere alındı.**

3- Sample tubes: Take 200 ml of sample to 1.5 ml ep tubes

Epondorf tüp içerisine 200 ul plama örneği alındı.

Epondorf tüpler içerisine 200 ul plazma ve standart konuldu . Standart ve numune tüplerinin her birinin üzerine 1.6 ml reaktif 1 ilave edildi ve vortekslendi. Üzerine 0,8 ml reaktif 2 ilave edilerek tekrar vortekslendi. On beş dakika oda ısısında bekletilerek 3100 *g*’de 10 dakika santrifüj edildi. Üsstteki süpernatanttan 1,6 ml alındı. Üzerine kromojen reaktifinden (R3) 0,8 ml ilave edilerek karıştırıldı. Oda ısısnda 20 dakika inkübe edildikten sonra absorbanslar distile suya karşı 550 nm de spektrofotometrik olarak belirlendi.

|  |
| --- |
| **Rektifler** |
| **Reaktif 1: Sülfat solusyonu** |
| **Reaktif 2: Alkali Reaktifi** |
| **Reagent 4: Choromogenic Agent B** |
| **Choromogenic Reagent: Reagent 3 + Reagent 4 + Reagent 5 (3:3:2)** |
| **Reagent 5: Acid Solutıon** |
| **Reagent 6: 2mmol/L Sodıum Nitrite Standard** |
| **Preparation of 40 umol/L sodium nitrite standard solution: Dilute the reagent 6 with distilled water at a ratio of 1:49 and mix fully. Prepare the fresh solution before use.** |

( N.O ‘ de standart eğri yok.Formülle hesaplanıyor.)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| |  |  |  |  |  | | --- | --- | --- | --- | --- | | **N.O Calculatıon: ΔA1/ΔA2 x c** | | |  |  | |  |  |  |  |  | | ΔA1: OD sample-OD blank | | |  |  | | ΔA2: OD standard-OD blank | | |  |  | | c: concentratıon of sodium nitrite(40umol/L) | | | | | |  | | |  |  | |  | |  |  |  | |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |
|  |  |  |

**Serum Immunglobulin A (Ig A) düzeyinin belirlenmesi**

Serum IgA düzeyi Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi. Kolorimetrik testtir

İmmünoglobulin A (IgA), bir anti-IgA antikoru ile seçici olarak reaksiyona girer ve bir immünokompleks oluşturur. Oluşan bulanıklık, numunedeki IgA konsantrasyonu ile orantılıdır ve 605 nm dalga boyunda ölçülür.

Yapılışı: Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alınarak küvet içerisinde karıştırılıp 5 dakika sonra ilk absorbans 605 nm’de okundu. Reaktif 2’den 38 μl alınarak karıştırıldı. Beş dakikalık inkübasyon sonrasında ikinci absorbans 605 nm’de okunarak Ig A düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak ifade edildi.

**Serum Immunglobulin G (Ig G) düzeyinin belirlenmesi**

Serum Ig G düzeyleri ELISA (BT-Lab) cihazında ticari test kiti ( BT-Lab, E0019Ch) ile belirlendi.

**Prensibi:**

**Bir pleyt içerisindeki standart kuyucuklarına 50 ul standart konulur. Numune kuyucuklarına ise** 40 µl serum ve 10 µl anti-IgG antibody konulur. Standart ve numune kuyucuklarının her birine 50 µl streptavidin-HRP konularak karıştırılır. Pleytlerin üzeri kapatılarak 60 dakika 37 ºC de inkübe edilir. Beş kez yıkama çözeltisi ile yıkandı. Substrat solüsyon A ve B solüsyonlarından 50 µl, eklenerek ve 37 °C ‘ de 10 dakika karanlık ortamda inkübe edildi.Stop solüsyonundan 50 µl ilave edilerek mavi rengin sarıya dönüştüğü gözlenmiştir. Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içerisinde absorbanslar 450 nm de ELISA cihazında ölçülerek belirlenmiştir.

**IgG Standard Hazırlanışı:**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 64 ug/ml | Standart No.5 | 120 µL orijinal standart + 120 µL standart sulandırıcı (diluent) |
| 32ug/ml | Standart No.4 | 120 µL standart No 5 + 120 µL standart sulandırıcı |
| 16ug/ml | Standart No.3 | 120 µL standart No 4+ 120 µL standart sulandırıcı |
| 8ug/ml | Standart No.2 | 120 µL standart No 3 + 120 µL standart sulandırıcı |
| 4ug/ml | Standart No.1 | 120µL standart No 2 + 120 µL standart sulandırıcı |

**Serum Immunglobulin M (Ig M) düzeyinin belirlenmesi**

Serum IgM düzeyi Mindray BS400 model otoanalizör cihazında ticari test kiti (Rel Assay Diagnostik, Gaziantep, Türkiye) ile belirlendi.

İmmünoglobulinler M (IgM), bir anti IgM antikoru ile seçici olarak reaksiyona girer ve bir immünokompleks oluşturur. Oluşan bulanıklık, numunedeki IgM konsantrasyonu ile orantılıdır ve 340 nm dalga boyunda ölçülür.

Yapılışı: Otomatik cihaz tarafından Reaktif 1’den 150 μl alındı, numuneden 2 μl alınarak küvet içerisinde karıştırılıp 5 dakika sonra ilk absorbans 340 nm’de okundu. reaktif 2’den 38 μl alınarak karıştırıldı. Beş dakikalık inkübasyon sonrasında ikinci absorbans 340 nm’de okunarak Ig M düzeyleri belirlendi. Sonuçlar mg/dl olarak ifade edildi.

Plazma vitamin C (Askorbik Asit ) düzeylerinin belirlenmesi

Plazma vitamin C düzeyleri Haag (1985)’ın bildirdikleri metoda göre spektrofotometre (Shimadzu U.V. 1700, Japonya ) cihazında belirlendi.

Askorbik asit, okside edici maddelerle dehidroaskorbik asite okside olarak, asit solüsyonlarla diketoglukonik asite dönüşür. Bu maddeler 2,4-dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girdiğinde bis-2,4-dinitrofenilhidrazon oluşur. Oluşan madde 12 mol sülfirik asit ile muamele edildiğinde kırmızımsı renkli kompleksi meydana gelerek 520 nm’de okunarak absorbansları belirlenir.

Kullanılan Ayıraçlar

Triklorasetik asit (TCA) çözeltisi, %6: 6 g TCA 100 ml’lik balon jojede distile su ile 100 ml’ye tamamlanarak hazırlanır.

Sülfirik Asit (H2SO4) Çözeltileri:

a) 4.5 mol /L H2SO4 : 100 ml’lik balon jojeye 75 ml distile su alınarak yoğun H2SO4 asit ile çeşme suyunda soğutularak 100 ml’ye tamamlanır.

b) 12 mol/L H2SO4 : 100 ml’lik balon jojeye 33 ml distile su alınarak yoğun H2SO4 asit ile çeşme suyunda soğutularak 100 ml’ye tamamlanır.

Tioüre Çözeltisi, %5: Beş gram tioüre tartılarak 100 ml’lik balon jojeye konulur, distile su ile çözündürülerek 100 ml’ye tamamlanır.

Bakır Sülfat Çözeltisi (CuSO4.5H2O), %6 : 0,94 gr CuSO4 tartılarak 100 ml’lik balon jojeye konulur, distile su ile çözündürülerek 100 ml’ye tamamlanır.

Temel Çözelti: 2,4- Dinitrofenilhidrazin ‘den 2 gr alınarak 4,5 M H2SO4 çözeltisi ile 100 ml’lik balon jojede çözündürülür. Bir gece +4 C’de buzdolabında karanlıkta bekletilerek süzüldü, elde edilen çözelti temel çözelti olarak kullanıldı.

Renk reaktifi: Tioüre (%5), CuSO4.5H2O (%6) ve temel çözeltilerin karışımları renk reaktifi olarak kullanılır (100/5/5, v/v/v)

Standart solusyonu: 10 µ/ml lik askorbik asit %6’lık triklorasetik asit içerisinde hazırlanarak standart elde edilmiştir.

Yapılışı: Kan alınır alınmaz santrifüj edilerek plazmaları ayrıldı. Epondorf tüplerine 500 µl plazmalar alınarak üzerlerine 1’er ml %6’lık TCA çözeltisi ilave edilerek vortekslendi. Analiz edilinceye kadar -80 °C de derin dondurucuda saklandı. Analiz sırasında örnekler çözündürülerek tekrar vortekslendi, 3000 devirde 15 dakika +4°C de santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlardan 500 µl alınarak epondorf tüplerine aktarıldı. Standart tüplerine 500 µl standart solüsyonundan blank tüpüne ise 500 µl %6 lık TCA çözeltisinden konuldu. Örnek, standart ve blank tüplerinin üzerine 200 µl renk reaktifi konularak kapatıldı. Tüpler 38° C’de 4 saat su banyosunda bekletildi. İnkübasyondan sonra buz üzerinde 10 dakika bekletilen tüplerin üzerine soğuk 12 M H2SO4 çözeltisinden 1’er ml ilave edildi. Tüpler vortekslenerek absorbasları 520 nm’de blanka karşı okundu.

µg/ml askorbik asit= Testin absorbansı/standardın absorbansı X 3 formülü ile konsantrasyonları hesaplandı.