

Bitki Ekstrelerinde Oksidatif Stres Biyobelirteçleri için Yöntem Performansının Değerlendirilmesi ve Biyolojik Varyasyonlar: Metot Validasyon Çalışması

Erkan ÖNER^{1*}, Ergül Belge KURUTAŞ², İltir DEMİRHAN³, Meltem GÜNGÖR⁴

¹Mersin Üniv. Eczacılık Fak, Biyokimya ABD, Mersin-Türkiye ²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv, Tıp Fak, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Kahramanmaraş-Türkiye ³Harran Üniv, SHMYO, Elektronik-Otomasyon Bölümü, Şanlıurfa-Türkiye, ⁴Sanko Üniv, Tıp Fak, Tıbbi Biyokimya Bölümü, Gaziantep-Türkiye

¹https://orcid.org/0000-0002-6332-6484, ²https://orcid.org/0000-0002-6653-4801, ³https://orcid.org/0000-0003-0054-7893

⁴https://orcid.org/0000-0002-8062-1610

✉: ergulkurutas@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, bitki ekstralarında oksidatif stres biyobelirteçleri için yöntem performansının kabul edilebilirliğini değerlendirmek için biyolojik varyasyonlar ve analitik kalite spesifikasyonlarının saptanması amaçlandı. Araştırmada *Silybum marianum* (Deve Dikeni) ve *Artemisia absinthium* (Pelin Otu) kullanıldı. Bitkilerden 0., 1., 3., 5., 7., 15. ve 30. günlerde örnekler alındı. Bitki ekstralarında oksidatif stres biyobelirteçleri [katalaz (CAT) superoksit dismutaz (SOD) ve malondialdehit (MDA)] spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü. Her bir bitkinin kendi-içinde (CVI) ve bitkiler-arası (CVG) varyasyonlarından bireysellik indeksi (Bİ) ve referans değişim değeri (RDD) hesaplandı. Ayrıca analitik kalite spesifikasyonları olarak impresiyon, bias ve toplam hata hesaplandı. Çalışmamızda, *Artemisia absinthium*'a kıyasla *Silybum marianum*'da daha yüksek antioksidan enzim aktiviteleri (SOD ve CAT) ve daha düşük MDA düzeyleri tespit edildi ($p < 0.05$). Bitkilerde MDA düşük bireysellik gösterdi ve MDA'nın CVI'sı CVG'den daha büyüktü. Bununla birlikte, CAT ve SOD güçlü bir bireysellik gösterdi, ancak bitkilerdeki CVI'ları CVG'lerden daha küçüktü. CAT ve SOD dışında, MDA analitinin RDD'leri, yüksek CVI nedeniyle nispeten daha yüksekti ve bu da daha yüksek bir RDD ile sonuçlandı. Ayrıca açıklanan metodoloji, tüm analitler için < 3.5 analitik CV ile bu hedeflere ulaşır. Bias ve toplam hata hedefleri sırasıyla %11.2-25.2 ve %8.93-27.6 idi. Bitkinin anormal bir fizyolojik süreçle sonuçlanan bazı nedensel ajanlar tarafından hastalandığını tahmin etmeye yönelik RDD konsepti, laboratuvar optimizasyonunu göstermede değerli bir araç olabilir. Ayrıca, bitkilerde oksidatif stres biyobelirteçlerinin ölçümleri için biyolojik varyasyona dayalı istenen kesinlik hedefleri, mevcut metodolojilerle elde edilebilir.

Biyokimya

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 17.09.2021

Kabul Tarihi : 05.11.2021

Anahtar Kelimeler

Oksidatif Stres Biyobelirteçleri
Yöntem Performansı
Biyolojik Varyasyonlar
Artemisia absinthium
Silybum marianum

Evaluation of Method Performance and Biological Variations for Oxidative Stress Biomarkers in Plant Extracts: A Method Validation Study

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine biological variations and analytical quality specifications to evaluate the acceptability of method performance for oxidative stress biomarkers in *Silybum marianum* (Milk thistle) and *Artemisia absinthium* (Wormwood) plant extracts. *Silybum marianum* and *Artemisia absinthium* were used in the study. Samples were taken from plants on the zero, 1st, 3rd, 5th, 7th, 15th and 30th days. Index of individuality (II) and reference change value (RCV) were calculated from within-subject (CVI) and between-subject (CVG) variations. Moreover, imprecision, bias and total error were calculated as analytical quality specifications. Oxidative stress biomarkers [catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA)] in plant extracts were measured as spectrophotometric methods. Compared

Biochemistry

Research Article

Article History

Received : 17.09.2021

Accepted : 05.11.2021

Keywords

Oxidative Stress Biomarkers
Method Performance
Biological Variations
Artemisia absinthium
Silybum marianum

to *Artemisia absinthium*, higher antioxidant enzyme activities (SOD and CAT) and lower MDA levels in *Silybum marianum* were found in our study ($p < 0.05$). MDA in plants showed low individuality, and CVI of MDA were larger than CVG. However, CAT and SOD in plants showed strong individuality, but CVI of them were smaller than CVG. CAT and SOD except, RCVs of MDA analyte were relatively higher, because of high CVI, resulting in a higher RCV. Also, the described methodology achieves these goals, with analytical CVs of $< 3.5\%$ for all analytes. Goals for bias and total error were 11.2-25.2% and 8.93-27.6%, respectively. The RCV concept for predicting that the plant is diseased by some causative agent resulting in an abnormal physiological process can be a valuable tool in demonstrating laboratory optimization. Moreover, desirable precision targets based on biological variation for measurements of oxidative stress biomarkers in plants can be achieved with current methodologies.

Atıf Şekli: Öner E, Kurutaş EB, Demirhan İ, Güngör M 2022. Bitki Ekstrelerinde Oksidatif Stres Biyobelirteçleri için Yöntem Performansının Değerlendirilmesi ve Biyolojik Varyasyonlar: Metot Validasyon Çalışması. . KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (5): 965-973. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.997048>

To Cite : Öner E, Kurutaş EB, Demirhan İ, Güngör M 2022. Evaluation of Method Performance and Biological Variations for Oxidative Stress Biomarkers in Plant Extracts: A Method Validation Study KSU J. Agric Nat 25 (5): 965-973. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.997048>

GİRİŞ

Validasyon cihazın, metodun veya ölçüm prosedürünün belirlenen amaçlara uygunluğunun objektif olarak test edilerek yazılı delillerle kanıtlanmasıdır. Analitik metot validasyonu, bir metodun performansını belirlemek için yapılan birtakım değişkenlere göre test ve ölçme işlemleridir. Çeşitli alanlarda verilen pek çok karar, yapılan ölçümlerin sonucuna dayanılarak verilir. Doğru karar verebilmek için analitik ölçüm sonucunun doğru ve tekrarlanabilir olması gerekir. ISO/IEC, ICH, US EPA, US FDA, USP, cGMP gibi kurumlar tarafından belirlenmiş ve uluslararası kabul edilen çeşitli validasyon kriterleri mevcuttur. Bunlar Doğruluk (accuracy), kesinlik (precision), özgünlük (specifity), doğrusallık (linearity), gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of Detection), tayin sınırı (LOQ; limit of quantification), çalışma aralığı (range), tutarlılık (ruggedness), sağlamlık ya da kararlılık (robustness) ve stabilite'dir (Yılmaz, 2012, FDA, 2013, EURACHEM, 1998).

Analitik performans kriterleri elde etmek için biyolojik varyasyonun kullanılması, bir test sonucu için ne kadar doğal varyasyonun beklendiğini belirlemekle başlar. Her bitki örneğinde ölçülen büyüklüğün konsantrasyonu, temel veya homeostatik ayar noktası etrafında değişir. Gözlemlenen toplam varyasyon, preanalitik varyasyon, analitik varyasyon ve her bir bitkinin aynı gün içerisinde ve farklı günlerde ölçülmesiyle oluşur. Bir laboratuvar ortamında, biyolojik bileşeni tek gerçek değişken olarak bırakarak preanalitik ve analitik değişkenliği kontrol edebiliriz. Biyolojik varyasyon; analitik varyasyonun etkisini belirlemek, bir analiz istenen performans kriterlerini geliştirmenin basit bir

yoludur (Kurutas,2014, Yücel, 2014 ve Çokluk, 2019). Bitkiler sesil doğaları gereği yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişmelerini olumsuz yönde etkileyecek birçok stres faktörü ile karşılaşılır. Biyotik ve abiyotik kökenli olabilen bu stres faktörleri bitkilerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlar oluşturarak, ürün nicelik ve niteliğini olumsuz yönde etkileyebilir (Büyük, 2012).

Reaktif oksijen türleri (ROS) bitkilerde endojen olarak kloroplastlardaki fotosentez reaksiyonlarında, plastit ve peroksizomlarda, mitokondrilerde sitrik asit siklüsünde, plazma membranında bulunan NADPH oksidaz, peroksidazlar ve amino oksidazlar gibi enzimlerin etkisiyle oluşan en yoğun serbest radikallerdir (Büyük, 2012). Tuzluluk, UV radyasyonu, kuraklık, ağır metaller, aşırı yüksek ve düşük sıcaklıklar, besin eksikliği, hava kirliliği, herbisitler ve patojen saldırıları gibi biyotik ve abiyotik stres faktörleri, ROS'ların oluşum ve detoksifikasyon hızı arasındaki dengeyi bozabilir. Bu da hücresel yapılarda hasarlara neden olan ROS'ların hücre içindeki miktarının hızla artmasına yol açar (Doğru, 2020). Bitkiler oksidatif stres altında yaşamlarını devam ettirebilmek ve stresle başa çıkabilmek için ROS'un kontrolü ve detoksifikasyonunu sağlayan çeşitli antioksidan enzimlere (katalaz, superoksit dismutaz, v.s.) sahiptirler.

Oksidatif stres biyobelirteçleri, insan ve hayvan dokularında, eritrosit ve lökositlerde, serum ve idrar örneklerinde ölçülebilmektedir (Hürşitoğlu, 2021, Kurutas, 2015, Kurutas, 2016, Kurutas 2009 ve 2005). Bitkilerde bu yöntemlerin uygulanabilirliğini test edilebilmesi için yöntem validasyonuna ihtiyaç

vardır. Bitkilerdeki oksidatif stres biyobelirteçleri için yöntem performansının kabul edilebilirliğini değerlendirmek için analitik kalite spesifikasyonları ile ilgili veriler literatürde bariz bir şekilde eksiktir. Bu tür veriler, analitik kalite spesifikasyonlarının belirlenmesin; sağlıklı bitki popülasyonunda referans aralıklarının değerlendirilmesinde ve bir bitkiden (referans değişiklik değeri; RDD) elde edilen seri sonuçlardaki değişikliklerin öneminin değerlendirilmesinde önemlidir. İlk defa yapılan bu çalışmada bitki ekstrelerinde oksidatif stres biyobelirteçlerinin ölçülmesinde metod validasyonunun sağlanması için; biyolojik varyasyonların saptanması ve analitik kalite spesifikasyonları saptanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada kullanılan iki adet bitki türü (*Silybum marianum* ve *Artemisia absinthium*) Kahramanmaraş ili civarından Aralık 2020-Haziran 2021 tarihleri arasında toplandı. Tüm deneysel çalışmalar, Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Laboratuvara getirilen bitki örnekleri steril bir neşter kullanılarak parçaladıktan sonra güneş görmeyen, oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutulan bitki numuneleri toz haline getirilmesi için mekanik öğütücü kullanıldı ve sonra 10 g tartılarak 100 ml %70'lik metanol (Merck) üzerine ilave edildi ve buzdolabında (+4 °C) bir gün bekletildi. Bir gün sonunda numuneler Whatmann No. 1 (Merck) filtre kâğıdıyla süzülükten sonra alkolün tamamen uçması için çökelti oda sıcaklığında bir kaç dakika bekletildi. Çökelti 10 ml steril serum fizyolojik ile 5 dakika (3.000 g) santrifüjlenerek (Sorvall RC 2B) yıkandıktan sonra üst faz uzaklaştırıldı ve kalıntı tekrar %20'lik 5 ml metanolde buzdolabında (+4 °C) bir gece bekletildikten sonra filtre kâğıdıyla süzülerek ekstraksiyon işlemi tamamlandı. Daha sonra tüm bitki ekstraktları, toplama periyodu sonunda test edilene kadar -70°C'de saklandı. Elde edilen bitki ekstrelerinde antioksidan enzim aktiviteleri (CAT, SOD), lipid peroksidasyon düzeyleri ve protein içerikleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçüldü ve yöntem performansı değerlendirildi.

Antioksidan Enzim Aktivitelerinin Saptanması

Katalaz (CAT) Aktivitesi

Her bir bitki ekstresinde CAT enzim aktivitesi Beutler yöntemiyle saptandı (Beutler, 1984). Reaksiyon karışımı için; 1 M Tris-HCl (Tampon çözelti pH 8.0), 10 mM H₂O₂, belirlenen ölçüde saf su ve enzim içeren bitki ekstresinden oluşmaktadır. 37°C'de enzimin aktivitesi ile parçalanmış H₂O₂'in 230 nm' de 10 dakika süreyle her 5 dakikadaki absorbans değişimleri (Shimadzu UV-1601,

Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçülerek yapıldı. Sonuçlar Ü/mg protein olarak ifade edildi.

Superoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi

SOD aktivitesi her bitki ekstresinde Fridovich yöntemiyle saptandı (Fridovich, 1974). SOD aktivite tayini için bitki ekstresi 0.01 M Fosfat tamponu (pH 7.0) çözeltisi ile 65 kat seyreltilerek, bu dilüsyonda aktivite belirlendi. Reaksiyon karışımı bitki ekstresi, ksantin ve INT (p-iyodonitrotetrazolium viyole) içeren karışım substrat ve ksantin oksidazdan oluşur. Kör de numune ile aynı şekilde hazırlandı fakat numune yerine fosfat tamponu konuldu. 37°C'de numunenin 505 nm de havaya karşı ilk 30 saniyedeki başlangıç absorbansları (A1) ölçülerek yapıldı. Aynı esnada kronometre ile 3 dakika sonra son absorbansları (A2) (Shimadzu UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçüldü ve değerler standart eğriden değerlendirildi. Sonuçlar Ü/mg protein olarak ifade edildi.

Lipid Peroksidasyon Düzeylerinin Saptanması

Lipid peroksidasyon ürünü Malondialdehit (MDA)'tir. Her bir bitki ekstresinde MDA düzeyi Ohkawa yöntemiyle saptandı (Ohkawa ve ark., 1979). Lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın aerobik şartlarda pH 3.4'de tiyobarbitürik asit ile numunenin inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan renk şiddeti ortamdaki MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır; 532 nm'de spektrofotometrik olarak (Shimadzu UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japonya) ölçüldü. MDA sonuçları, nmol/mg protein olarak ifade edildi.

Protein Düzeylerinin Saptanması

Bitki ekstresinin protein içeriği Lowry yöntemi ile saptandı (Lowry ve ark., 1951). Proteinlerin alkali bakır sülfat ilavesiyle, fosfotungustik asit ile mavi renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renkli bileşiğin ise spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda absorbansı ölçülerek (Shimadzu UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japonya) kantitatif olarak protein miktarları tespit edildi.

İstatistik Analizler

Her bir bitkiden sıfırıncı, 1., 3., 5., 7., 15. ve 30. günlerde olmak üzere yedi örnek alındı ve ekstrasyonlar hazırlandı. Bitki ekstrelerinde oksidatif stres biyobelirteçlerinin düzeyleri ölçüldü. Cochran ve Reed testleri kullanılarak uç değerler çıkarıldıktan sonra logaritmik transformasyonla dönüştürülmüş veriler (veri transformasyonu ile dağılım Gaussian forma yaklaştırıldıktan sonra) üzerinde varyasyon analizleri yapıldı. Uç değerlerin çıkarılmasından sonra biyolojik varyasyon verileri

Fraser ve ark. tarafından yayınlanan yöntemle göre yapıldı. (Fraser, 2001, Fraser, 2004, Fraser, 2014, Fraser, 1994). Analitik varyans (SDA^2), aşağıdaki formüle göre tekrarlanan ölçümler arasındaki farklardan hesaplandı.

$$SDA^2 = \sum d^2 / 2n$$

burada d, tekrarlanan ölçümler arasındaki farktır ve n, tekrarlanma sayısıdır. SDA^2 , ilk numune konsantrasyonuna göre SDA , analitik varyasyon katsayısı (CV_A) olarak ifade edilir. Her analiz için, toplam varyansı bitkiler arası (SD_G^2) varyansı ve toplam bitkinin kendi içindeki varyansı (SD_{TI}^2) bölmek için tek yönlü varyans analizi (One way ANOVA) kullanıldı. SD_{TI}^2 hem biyolojik hem de analitik bileşenleri içerdiğinden, her bir bitkinin kendi içinde varyansı (SD_I^2) aşağıdaki formül kullanılarak çıkarılarak elde edildi (Ricos, 2004).

$$S_I^2 = S_{TI}^2 - S_A^2$$

Bitkinin kendi içinde ve bitkiler arası biyolojik varyasyonları, her bir bitkinin homeostatik ortalaması sırasıyla, bitkinin kendi içindeki varyasyon katsayısı (CV_I) ve bitkiler arası varyasyon katsayısı (CV_G) kullanılarak ifade edildi. Bitkiler için bireysellik indeksi (Bİ), CV_I/CV_G olarak hesaplandı, burada düşük bir değer (<0,60: yüksek bireysellik) popülasyona dayalı referans aralıklarının düşük kullanılabilirliğini gösterirken, yüksek bir değer (>1,40: düşük bireysellik) popülasyona dayalı referans aralıklarının yüksek kullanılabilirliği göstermektedir. Oksidatif stres biyobelirteçlerinin iki seri ölçümünün $p < 0,05$ 'te önemli ölçüde değişmesi için gereken fark olan referans değişim değeri (RDD), aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Ricos, 2004)

$$RDD = 21/2 \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2} = 2.77 CV_{TI}$$

Z- skoru 1,96 (%95 olasılık, çift yönlü z-skor) olarak kabul edildi.

Bitkide oksidatif stres biyobelirteçleri için biyolojik varyasyon verileri, aşağıdaki formüller kullanılarak impresizyon (I), bias (B) ve total hata (TE) için arzu edilen (desirable) kalite spesifikasyonlarını tahmin etmek için kullanıldı (Petersen, 2002).

$$I = 0.5 CV_I$$

$$B = 0.25 (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

$$TE = 1.65 (0.25 CV_I) + 0.25 (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

Bu çalışmada, test sisteminin güvenilirliğini doğrulamak ve sonuçları etkileyebilecek kullanıcıların performansını ve çevresel koşulları değerlendirmek amacıyla "in house QC" kontrol materyali kullanıldı. (Yücel, 2019; Ursula, 2011). Bitkinin kendi içinde ve bitkiler arasındaki ortalama biyolojik varyasyonların farklılıkları F testi ile kontrol edildi. CAT, SOD ve MDA değerlerindeki önemli eğilimleri kontrol etmek ve bitkinin kendi içindeki varyasyonların zamana bağlılığını araştırmak için doğrusal regresyon analizi kullanıldı. Bitkilerde antioksidan enzim aktivitelerini (CAT ve SOD) ve MDA düzeylerinin karşılaştırmaları Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR ve TARTIŞMA

S. marianum'da, *A. Absinthium*'a kıyasla daha yüksek antioksidan enzim aktivitesine (SOD ve CAT) ve daha düşük MDA düzeyine sahip olduğu saptandı ($p < 0,05$). Sonuçlar Çizelge 1'de gösterildi.

Çizelge 1. *Silybum marianum* ve *Artemisia absinthium*'da oksidatif stres biyobelirteçlerinin ortalama, medyan, standart sapma ve referans değerleri

Table 1. Mean, standard deviation and reference ranges of oxidative stress biomarkers

Plants	Analitler	Mean	Medyan	Referans Aralığı
<i>Silybum Marianum</i>	SOD	631.33	650	520-770
	CAT	117.56	110	50-170
	MDA	49.33	56	11-78
<i>Artemisia Absinthum</i>	SOD	583.33	590	400-750
	CAT	86.11	95	40-150
	MDA	54.33	50	25-100

CAT ve SOD enzim aktivite sonuçları $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein ve MDA düzeyleri nmol/mg protein olarak verilmiştir.

* *Silybum marianum*'da *Artemisia absinthium*'a kıyasla SOD ve CAT enzim aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p < 0,05$).

** *Silybum marianum*'da *Artemisia absinthium*'a kıyasla MDA düzeyi istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p < 0,05$).

Çizelge 2'de görüldüğü gibi, MDA'nın CV_I 'sı, CV_G 'sinden daha büyüktü. Buna karşın, CAT ve SOD'un CV_I 'i her iki bitki gruplarında CV_G ' den daha küçüktü. SOD ve CAT hariç, MDA'nın CV_I 'nin CV_G 'den yüksek çıkmasından dolayı, bitkiler de RDD analitleri de nispeten daha yüksek bulundu. CAT ve SOD'un Bİ sonuçları 0,6-1,4 arası bulunduğu için

yüksek bireysellik gösterdiği ve referans değerlerin orta düzeyde kullanışlı olduğunu saptandı. Buna karşın, her iki bitkide MDA'nın Bİ sonucu 1,4'den yüksek çıkmıştır. Bu sonuç MDA'nın düşük bireysellik yani popülasyona dayalı referansın yüksek düzeyde kullanışlı olduğunu göstermektedir.

Analitik varyasyonu en aza indirmek için her bir

bitkinin 30 günlük bir süre içinde elde edilen 30 örnekte ve kontrol materyalinde (in house QC) analiz edilen seriler arasındaki imprecizyon verileri Çizelge 3'te verilmiştir. Bitki ekstralarında CAT, SOD ve

MDA ölçümüne yönelik laboratuvar yöntemimizin belirsizliği, istenen kesinlik hedeflerinden daha azdı.

Çizelge 2. *Silybum marianum* ve *Artemisia absinthium*'da oksidatif stres biyobelirteçlerinin biyolojik varyasyon bileşenleri

Table 2. Biological variation components of oxidative stress biomarkers in *Silybum marianum* and *Artemisia absinthium*

		^a CV _I (%)	^b CV _G (%)	^c Bİ	^d RDD (%)
<i>Silybum Marianum</i>	SOD	14.84	16.83	0.882	2.59
	CAT	34.8	35.04	0.993	4.01
	MDA	50.21	35.18	1.427	4.25
<i>Artemisia Absinthium</i>	SOD	16.26	18.39	0.884	0.97
	CAT	40.49	41.15	0.984	1.59
	MDA	50.43	35.77	1.410	1.55

CAT ve SOD enzim aktivite sonuçları Ü/mg protein ve MDA düzeyleri nmol/mg protein olarak verilmiştir.

* aCV_I (Birey içi biyolojik varyasyon), bCV_G (Bireyler arası biyolojik varyasyon), cBİ (Bireysellik indeksi) ve dRDD (Referans değişim değeri)

Çizelge 3. *Silybum marianum* ve *Artemisi absinthium*'da spektrofotometrik olarak ölçülen oksidatif stres biyobelirteçlerinin ölçüm kesinliği (precision) (CV)

Table 3. Measurement precision (CV) of oxidative stress biomarkers measured spectrophotometrically in *Silybum marianum* and *Artemisi absinthium*

	Analitler	* Aynı Seri Çalışma (Within Batch)		**Farklı seri Çalışma (Between Batch)	
		Mean	CV(%)	Mean	CV(%)
<i>Silybum marianum</i>	SOD	633.45	12.82	650.00	16.82
	CAT	115.42	35.74	109.68	35.01
	MDA	50.12	48.55	50.63	36.74
<i>Artemisia absinthium</i>	SOD	582.78	17.01	584.75	18.39
	CAT	85.96	41.50	80.49	41.15
	MDA	55.02	51.32	68.86	45.77

* Within batch imprecision; havuzlanmış bir bitki örneğinin aynı gün içinde 10 kez analiz edilmesiyle hesaplanmıştır.

** Between Batch; istatistiksel analiz bölümünde açıklandığı gibi, her bir bitkinin 30 günlük bir süre içinde elde edilen 30 örnekte ve kontrol materyalinde (in house QC) analiz edilen seriler arasındaki belirsizlik (imprecision) verileri)

Her bir analit (CAT, SOD, MDA) için, laboratuvar yönteminin belirsizliği ve biyolojik varyasyon verilerinden elde edilen I, B ve TE için istenen analitik kalite spesifikasyonları Çizelge 4'te sunulmuştur. Her iki bitkide tüm analitlerin (CAT, SOD ve MDA) analitik varyasyonları istenilen özellikteki analitik kalite spesifikasyonlarına ulaştığı görülmektedir. Özellikle bütün analitler (CAT, SOD ve MDA) için CVA ile I değerleri benzer olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra, *S. marianum* ve *A. Absinthium*'da SOD haricinde CAT aktivitesi ve MDA düzeylerinin CVA'sı ile B'nin benzer olması, istenilen hedeflerden sapmanın olmadığını işaret etmektedir. Çizelge 4'deki her iki bitki türünde izin verilen hata (en fazla %1.86) düzeyinin altındadır. Elde edilen %CV değeri de önerilen maksimum %CV'nin (%1.0) altındadır.

Regresyon analizinde, her iki bitkide 30 gün boyunca CAT ve SOD aktivitelerinde ve MDA düzeylerindeki değişiklikler için herhangi bir eğilim göstermediği

saptandı.

Bildiğimiz kadarıyla, bitki örneklerinde oksidatif stres biyobelirteçlerinin (CAT, SOD ve MDA) biyolojik varyasyonlarına ilişkin verilerin belirlenmesini ve uygulanmasını gerçekleştiren ilk çalışmadır. Bitkilerdeki oksidatif stres biyobelirteçleri için yöntem performansının kabul edilebilirliğini değerlendirmek için analitik kalite spesifikasyonları (I, B, TE) ile ilgili veriler literatürde bariz bir şekilde eksiktir. Bu çalışmada, *S. marianum* ve *A. absinthium* bitki ekstralarında antioksidan enzim aktivitelerinin (CAT ve SOD) ve lipid peroksidasyon düzeylerinin ölçülmesi ve yöntem performansının değerlendirilmesi için analitik kalite spesifikasyonları saptandı.

Bitkilerde antioksidan kapasiteyi ölçmek için bugüne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir (Albayrak, 2010). Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT)

reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azobileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu

yöntemler oksijen radikal absorban kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer.

Çizelge 4. *Silybum marianum* ve *Artemisia absinthium*'da analitik varyasyon (CVA), belirsizlik (I), sapma (B) ve biyolojik varyasyondan kaynaklanan total hata (TE) sonuçları

Table 4. Analytical variation (CVA), uncertainty (I), deviation (B) and total error (TE) results from biological variation in *Silybum marianum* and *Artemisia absinthium*

		İstenen Özellikler (Desirable specifications)			Yöntem Belirsizliği (Method imprecision)
		I (%)	B (%)	TE (%)	CV _A (%)
<i>Silybum Marianum</i>	SOD	7.42	11.2	8.93	7.4
	CAT	17.4	17.0	18.71	17.4
	MDA	25.1	25.1	26.97	25.11
<i>Artemisia Absinthium</i>	SOD	8.13	12.28	9.78	8.13
	CAT	20.25	20.25	21.7	20.25
	MDA	25.22	25.2	27.6	25.22

Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır. ET temelli yöntemler toplam Folin Ciocalteu ayırıcı ile toplam Fenolik yöntemi (FCR), Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir (Somogyi, 2007). Yukarıda bahsedilen her iki yöntem de total antioksidan kapasiteyi ölçmeye yöneliktir. Oysa, bu çalışmada, bitkinin sahip olduğu CAT enziminin ve SOD enzimlerinin ayrı ayrı aktivitesi ölçüldü. Ölçülen enzim aktivitesi spesifik aktivite birimi cinsinden (Ü/mg protein) verildi. Bitkilerin Protein içerikleri Folin Ciocalteu ile ölçüldü. Bu bitki çalışmasında kullanılan yöntemlerin temel prensibini HAT ve ET teşkil etmektedir. Üstelik, bu yöntemlerle antioksidan enzim aktiviteleri (CAT ve SOD) kanda, dokuda ve idrarda da ölçülmekte olup sensitivitesi ve spesifitesi oldukça yüksek olduğu Kurutaş ve ark. tarafından bildirilmiştir (Kurutas, 2015a ve 2015b).

SOD'lar olağanüstü katalitik etkinlikte çalışan metalloproteinlerdir (Kurutas, 2016). O₂ i H₂O₂ 'e dönüştürme rolü olan SOD'ların aktif merkezlerinde yer alan metal iyonlarına göre üç izoenzimi vardır. Bunlar bakır ve çinko içeren Cu/Zn SOD, mangan içeren MnSOD ve demir içeren FeSOD'lardır (Kurutas, 2016, Scandalios, 1993, Edreva, 1998, Kukreja, 2005). Bu çalışmada *S. marianum*'da SOD aktivitesinin *A. absinthium*'a kıyasla yüksek olarak bulundu. SOD aktivitesiyle yapılan çalışmalarda; SOD'ların ifadesindeki artışların bitkide biyotik ve abiyotik strese bağlı oluşan oksidatif strese başa çıkmada ve bitkilerin stres koşulları altında canlılığı sürdürmesine katkı sağlamada önemli rolleri olduğu ileri sürülmüştür. *Morus alba* L. (dut), *Cicer arietinum* L. (nohut) ve *L. esculentum* (domates) gibi

birçok bitkide çeşitli stres koşulları altında gerçekleştirilen çalışmalarda SOD aktivitesinde artışlar meydana geldiği gözlenmiştir (Harinasut, 2003, Gaprinska, 2008, Attia, 2009).

CAT enzimi bitkilerin stres koşulları altında oluşan zararlı H₂O₂ 'in H₂O ve O₂ 'ya direkt olarak dönüşümünü sağlayarak hücreleri strese karşı korumada görevli en önemli enzimatik antioksidanlardan biridir (Demirhan, 2021, Ozyurt, 2021, Kurutas, 2016) Bu çalışmada *S. marianum*'da CAT aktivitesi *A. absinthium*'a kıyasla yüksek olarak bulundu. Yüksek bitkilerde tanımlanmış çok sayıda CAT izoenzimi; *Hordeum vulgare*'de (arpa), *Helianthus annuus* L.'ta (ayçiçeği), *Brassica oleracea* L. 'da (karnabahar) ve *Zea mays* L.'da (mısır) çalışılmıştır ve elde edilen veriler neticesinde enzimin farklı stres koşulları ve farklı bitkilerde değişik düzeylerde koruma sağladığı gözlenmiştir (Azevedo 1998, Azpilicueta 2007, Frugoli 1996, Polle 1992).

Bitkilerde stresin öncelikli etkilerinden biri olarak gösterilen lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan MDA analizleriyle stresin öncelikli hedefi olan membranlardaki etkileri yansıtılmaktadır (Kurutas, 2016). Bu çalışmada *S. marianum*'da MDA düzeylerinin *A. absinthium*'a kıyasla düşük olduğu saptandı. Günümüze dek gerçekleştirilmiş olan çalışmalarda stresle birlikte *Lycopersicon esculentum* L'da (domates) (Krupa 1989, Qarati 1997, Malk 1992), *Triticum aestivum* L'da (buğday) (Vassilev 2004), *Hordeum vulgare* L'de (arpa) (Gaur, 1994), *Brassica nigra* (L.) W.D.J.Koch'da (hardal) (Nouairi 2006, Halliwell 1999) ve daha birçok bitkide MDA düzeyinin yani lipid peroksidasyonunun arttığı gösterilmiştir.

Validasyon çalışmaları, gerek klinik laboratuvarlarda gerekse Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda

ve Kontrol Genel Müdürlüğünün, Gıda Kontrol Laboratuvarlarında metot birlikteliğini sağlamak amacıyla konularında uzman personeller tarafından yapılmaktadır (Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 2018). Validasyon çalışmaları, çeşitli analiz metotlarını uygulayan laboratuvarın yeterliliğini teyit ederken izleyeceği yöntemleri/çalışmaları; bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin nasıl değerlendirileceğinin belirlenmesi ve bu verilerle ölçüm belirsizliğinin hesaplanıp raporlanmasına da yol gösterir. Bu kapsamda parametreler ve deney modeli önerilirken uluslararası kabul görmüş rehberler göz önünde bulundurularak ve laboratuvarın TS EN ISO/IEC 17025 gereksinimlerini de karşılayacak şekilde istatistiki olarak gerekli bilgileri içerecek şekilde hazırlanması gereklidir. Laboratuvarlarda analitlerin ölçümünde güvenilir sonuçlar verilebilmesi için biyolojik varyasyonun hesaba katılması gerekmektedir (Yücel, 2014). Laboratuvar verilerinde biyolojik varyasyon, bir bireyde her bir analitin homeostatik ayar noktasında izlenen rastgele dalgalanmaları olarak tanımlanır (Kurutas, 2014, 2015a, 2015b). Toplam analitik hata sınırlarının belirlenmesi için pek çok kaynak kullanılabilir. Ayrıca biyolojik varyasyon verileri, özellikle bireysel biyolojik varyasyon, referans aralığın belli bir fraksiyonu, yöntemin genel performansı da hata sınırlarının belirlenmesinde kullanılır (Kurutas, 2015a, ve 2015b).

Bu çalışmada her iki bitkide de CAT ve SOD için CV_G genel olarak CV_I'dan daha büyüktü. Her bir bitkinin CAT ve SOD'un CV_I'sı küçük olduğu için homeostatik ayar noktası hakkında daha kesin bilgi verebilir ve bitkinin herhangi bir strese ya da kimyasala maruz kalıp kalmadığı hakkında daha iyi bilgi verebilir. Bununla birlikte, her bir bitkinin MDA'nın CV_I'sinin büyük olmasının nedeni bitki lipid peroksidasyonundaki günden güne biyolojik varyasyonlar görülebileceği yönündedir. Ayrıca, MDA'nın bitkiler arasındaki ortalama toplam varyanslarının (CV_G), muhtemelen bitki içi varyasyonundaki heterojenlikten ve belki de stabilite sorunlarından dolayı, her iki bitkininin CV_I'sını daha küçük olduğunu bulduk. Bir MDA analitinin CV_I değerleri, CV_G değerlerinden çok daha büyük olması; MDA analitinin verilerindeki homojenliğin olmaması, biyolojik varyasyonun hatalı hesaplanmasına ve sonuçların yanlış yorumlanmasına neden olabilir. Bİ, CV_I/CV_G formülü ile hesaplanmaktadır (Kurutas, 2015a ve 2015b). Bu formüle göre sonucun 0,6'dan küçük olması yüksek bireysellik olduğunu yani bitki popülasyona dayalı referansın düşük kullanışlı olduğunu göstermektedir. Sonucun 1.4 ve bu değerden yüksek olması düşük bireyselliği yani bitki popülasyona dayalı referansın yüksek düzeyde kullanışlı olduğunu göstermektedir. Bİ değerinin 0.6 ile 1,4 arasında olmasında ise orta düzey bireysellik

yani popülasyona dayalı referansın orta düzeyde kullanışlı olduğunu göstermektedir. RDD, bitkinin ağır metaller, kuraklık, yüksek ve düşük sıcaklık, mekanik yaralanma, ultraviyole (UV) ışık, fotoinhibisyona yol açan yüksek ışık yoğunluğu, patojen enfeksiyonu ve hava kirliliği gibi stres faktörlerine maruz kalması durumundaki analitlerin düzeylerindeki değişikliklerin değerlendirilmesi için önemli bir araç olabilir. Referans aralıklarını tanımlamak için önemli miktarda kaynak harcamak yerine, laboratuvarların RDD'yi hesaplamak için iyi kurulmuş metodolojiyi uygulamaları ve bunları günlük pratikte kullanmaları, bitkiden gelen seri sonuçlardaki değişikliklerin izlenmesinde büyük avantaj sağlamaları istenmektedir (Kurutas, 2015a ve 2015b).

Yöntem performans değerlendirilmesinde laboratuvarın belirlediği yonteme göre farklı kriterlerle yapılır (Yücel 2014, Kurutas 2015a ve 2015b). Bugün sistematik hata (inaccuracy), imprecizyon (rastlantısal hata) ve total hata kavramları yerine ISO tarafından önerilen ve geçerli olan sözler gerçeklik (trueness), bias, presizyon ve belirsizliktir (uncertainty). Burada gerçeklik, doğruluk kavramındaki bias'ın yerinin, belirsizlik ise toplam hata kavramının yerini almıştır. Bildiğimiz kadarıyla bitkide oksidatif stres biyobelirteçlerinin biyolojik varyasyonu ilk kez belgelendi. Bu çalışmada, bu yöntem belirsizliği, veri değişkenliğine yalnızca %23'lük bir katkı sağladığı için arzu edilen analitik CV, genellikle 0,5 kat CV_I olarak kabul edildi. (Kurutas 2015a ve 2015b). Çalışmamızda, bitkide oksidatif stres biyobelirteçlerini ölçmek için laboratuvar yöntemlerimizin belirsizliği, istenilen kesinlik hedeflerinden daha düşük bulundu. Bu çalışmada biyolojik varyasyon verilerinden türetilen analitik kalite spesifikasyonlarının mevcut metodolojilerle elde edilebileceği görülmüştür. Bu nedenle, bu biyolojik varyasyon verilerinin bitkilerde oksidatif stres biyobelirteçlerinin analizinde bu yaklaşımı uygulamak için yardımcı olabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bitkilerde oksidatif stres biyobelirteçlerini ölçmek için kullanılan laboratuvar yöntemlerimizin toplam analitik hatası izin verilen toplam hata sınırının altındadır, dolayısıyla yöntemin performansı uygundur. Bİ ve RDD değerlerinin belirlenmesi, bir bitkinin mevcut durumu hakkındaki değişiklikler konusunda konuyla uğraşan bilim insanlarını daha doğru yönlendirmesine olanak sağlayacak belirteçlerdir. Bu uygulamalar yakın gelecekte bütün Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığına bağlı laboratuvarlarda kullanılmaya başlanacak ve elde edilen laboratuvar sonuçlarının daha doğru yorumlanması ile ilgili faaliyetlerinin geliştirilmesine zemin oluşturacaktır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

EBK; Çalışmanın planlanmasında, literatür taramasında, makalenin yazımında ve sonuçların yorumlanmasında, EÖ, İD, MG; Materyallerin toplanmasında ve analizlerin ölçülmesinde katkı sağladıklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Albayrak S, Sağdıç O, Aksoy A 2015. Bitkisel Ürünlerin Ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Eylül 2015, Antalya. Derleme Sunusu Cilt I, s. 465-470.
- Attia H, Karray N, Lachaa M 2009. Light Interacts With Salt Stress In Regulating Superoxide Dismutase Gene Expression In Arabidopsis. *Plant Science* 177: 161-7.
- Antweiler H 1980. Effects of Silymarin on Intoxication With Ethionine and Ethanol. In Braatz and Schneider, November 1980, Cologne.
- Anonim 2019. Yem Bitkileri Üretimi, 1998-2018. http://www.tuik.gov.tr/PreIstatistikTablo.do?istab_id=61. (Alınma Tarihi: 20.02.2021).
- Anonymous 2004. Basis of Design and Actions on Structures (EN 1991-1-4), General Actions Part 1-3: Snow Loads. European Committee for Standardisation, Brussels.
- Azevedo RA, Alas RM, Smith RJ, Lea PA 1998. Response Of Antioxidant Enzymes To Transfer From Elevated Carbon Dioxide To Air And Ozone Fumigation, In Leaves And Roots Of Wild-Type And Catalase deficient Mutant Of Barley. *Physiologica Plantarum* 104: 280-92
- Azpilicueta CE, Benavides MP, Tomaro ML, Gallego SM 2007. Mechanism Of CATA3 Induction By Cadmium In Sunflower Leaves. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 589-95.
- Büyük I, Soydam S, Aras S 2012. Bitkilerin Stres Koşullarına Verdiği Moleküler Cevaplar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi* 69(2): 97-110.
- Çokluk E 2019. Klinik Biyokimya'da Biyolojik Varyasyon: Referans Değişim Değeri Ve Bireysellik İndeksi. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory* 10: 526-532.
- Demirhan İ, Güngör M, Kurutaş EB, Özyurt M 2021. Kahramanmaraş'ta Yaygın Olarak Tüketilen Polifenol Yönünden Zengin Çoban Çökerten (*Tribulus Terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella Bursa-Postaris*) Bitkilerin Antioksidan Gücünün Karşılaştırılması: in Vitro Çalışma. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 24 (6): 1154-1160.
- Doğru A 2020. Bitkilerde Aktif Oksijen Türleri ve Oksidatif Stres. *Biotechnology* 3: 205-226.
- Edreva A 1998. Stres Physiology, Definition And Concepts Of Stres. *Classification Of Stress Factors, Approaches Applied In Stress Research. Bitkilerde Stres Fizyolojisinin Moleküler Temelleri Sempozyumu. İzmir-EBİLTEM, Bornova, 22-26 Haziran 1998.*
- EURACHEM (1998). The Fitness For Purpose Of Analytical Methods. EURACHEM Guide
- FDA (2013). Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).
- Fridovich I 1974. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64(1): 97-112.
- Fridovich I 1986. Biological Effect Of Superoxide Radical. *Archives Biochemistry and Biophysics* 247: 1-11.
- Fraser CG 2001. *Biological Variation: From Principles To Practice*. Washington DC: American Association for Clinical Chemistry Press.
- Fraser CG 2004. Inherent Biological Variation And Reference Values. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 42: 758-764.
- Fraser CG 2014. Are "Scientific Statements" The Scientific Truth? <http://www.westgrad.com/biodatabase1.htm>, accessed January 1.
- Fraser CG 1994. Data On Biological Variation: Essential Prerequisites For Introducing New Procedures? *Clinical Chemistry* 40: 1671-1673.
- Frugoli JA, Zhong HH, Nuccio ML, McCourt P, McPeck MA, et al. 1996. Catalase Is Encoded By A Multigene Family In Arabidopsis Thaliana (L.). *Plant Physiology* 1996; 112: 327-36.
- Gapinska M, Sklodowska M, Gabara B 2008. Effect Of Short- And Long-Term Salinity On The Activities Of Antioxidative Enzymes And Lipid Peroxidation In Tomato Roots. *Acta Physiologiae Plantarum* 30: 11-8.
- Gaur A, Grupa SK 1994. Lipid Components Of Mustard Seeds (*Brassica Juncea L.*) As Influenced By Cadmium Levels. *Plant Foods for Human Nutrition* 46: 93-102
- Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü 2018. Kimyasal Ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi. Nisan.
- Halliwell B, Gutteridge MC 1999. *Free Radical and Other Reactive Species and Disease*. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press 639-46.
- Harinasut P, Poonsopa D, Roengmongkol K, Charoensataporn R 2003. Salinity Effects On Antioxidant Enzymes In Mulberry Cultivar. *ScienceAsia - Journal of The Science Society of Thailand* 29:109-13.

- Hürşitoğlu O, Orhan FÖ, Kurutaş EB, Doğaner A, Durmuş HT, Kopar H 2021. Diagnostic Performance of Increased Malondialdehyde Level and Oxidative Stress in Patients with Schizophrenia. *Noro Psikiyatı Ars* 58:184-188.
- Krupa Z, Baszynski T. 1989. Acyl Lipid Composition Of Thylakoid Membranes Of Cadmium-Treated Tomato Plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 11: 111-6
- Kukreja S, Nandval AS, Kumar N, Sharma SK, Sharma SK, Unvi V, et al. 2005. Plant Water Status, H₂O₂ Scavenging Enzymes, Ethylene Evolution And Membrane Integrity Of Cicer Arietinum Roots As Affected By Salinity. *Biologia Plantarum* 49: 305-8.
- Kurutas EB, Aksan ME, Miraloglu M 2014. Evaluation of reference values and biological variations for neuron-specific enolase in sterile human urine. *Adv Lab Med In*, 4: 64 - 72.
- Kurutas EB, Gumusalan Y, Cetinkaya A, Dogan E 2015a. Evaluation Of Method Performance For Oxidative Stress In Urine And Biological Variations In Urine Of Patients With Type 2 Diabetus Mellitus And Diabetic Nephropathy. *Biological Procedures Online* 17:3.
- Kurutas EB, Gul S 2015b. Biological Variation of Oxidative Stress Biomarkers and Lactic Dehydrogenase in Mice. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 21: 299-305.
- Kurutas EB 2016. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. *Nutr J* 25:15:71.
- Kurutas EB, Sahan A, Altun T 2009. Oxidative stress biomarkers in liver and gill tissues of Spotted barb (*Capoeta barroisi* lortet, 1894) living in Ceyhan river, Adana-Turkey. *Turk J Biol* 33: 275-82.
- Kurutas EB, Ciragil P, Gul M, Kilinc M 2005. The effects of oxidative stress in urinary tract infection. *Mediators Inflamm* 2005; 2005: 242-4.
- Kurutas EB, Arican O, Sasmaz S 2005. Superoxide dismutase and myeloperoxidase activities in polymorphonuclear leukocytes in acne vulgaris. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat* 14:39-42.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenyl reagent. *J Biochem* 193: 265-75.
- Malik D, Sbeoran IS, Singh R 1992. Carbon Metabolism Of Cadmium Treated Wheat Seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* 30(2): 223-9.
- Nouairi I, Ben Ammar W, Ben Youssef N, Ben Miled Daoud D, Habib Ghorbal M, et al. 2006. Comparative Study Of Cadmium Effects On Membrane Lipid Composition Of Brassica Juncea And Brassica Napus Leaves. *Plant Science* 170: 511-9
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K 1979. Assay For Lipid Peroxides in Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry* 95(2): 351-358.
- Ozyurt M, Kopar H, Özyurt S, Demirhan İ, Kurutas EB 2021. Menengiç, Işgın ve Çiriş Otu'nda Antioksidan Aktivitenin Araştırılması. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 24: 733-737.
- Petersen PH, Fraser CG, Jorgensen L, Brandslund I, Stahl M, Gowans E, et al. 2002. Combination of analytical quality specifications based on biological within and between-subject variation. *Annals of Clinical Biochemistry* 39: 543-550.
- Polle A, Chakrabarti K, Chakrabarti S, Seifert F, Schramel P, Rennenberg H 1992. Antioxidants And Manganese Deficiency In Needles Of Norway Spruce (*Picea Abies* L.) Trees. *Plant Physiology* 99: 1084-9.
- Quariti O, Boussama N, Zarrouk M, Cherif A, Ghorbal MH 1997. Cadmium- And Copperinduced Changes In Tomato Membrane Lipids. *Phytochemistry* 45: 1343-50.
- Ricos C, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Iglesias N, Jimenez CV, et al. 2004. The Reference Change Value: A Proposal To Interpret Laboratory Reports In Serial Testing Based On Biological Variation. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 64:175-184.
- Scandalios JG 1993. Oxygen Stress And Superoxide Dismutase. *Plant Physiology* 101: 7-12.
- Somogyi, A, Rosta, K, Pusztai, P, Tulassay Z. and Nagy, G 2007. Antioxidant measurements, *Physiological. Measurement* 28: 41-55.
- Ursula GB, Francis B, 2011. Characterisation of within-batch and between-batch variability in microbial counts in foods using Poisson-gamma and Poisson-lognormal regression models. *Food Control* 22: 1268-1278.
- Vassilev A 2004. Cadmium-Induced Changes In Chloroplast Lipids And Photosystem Activities In Barley Plants. *Biologia Plantarum* 48: 153-6.
- Yılmaz A 2012. Kimyasal Analizlerde Metod Validasyonu ve Verifikasyonu. *TURKLAB Rehber*, No:01.
- Yücel D 2014. Pratik Metot Validasyonu ve Verifikasyonu. Ankara.
- Yücel D 2019. Laboratuvar Kalite Yönetim Sistem El Kitabı. Türk Biyokimya Derneği, ISBN 978-605-87229-7-2