

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

LABORATUVAR HİZMETLERİ

KANDA BİYOKİMYASAL TESTLER

Ankara, 2015

-
- Bu modül, mesleki ve teknik eğitim okul/kurumlarında uygulanan Çerçeve Öğretim Programlarında yer alan yeterlikleri kazandırmaya yönelik olarak öğrencilere rehberlik etmek amacıyla hazırlanmış bireysel öğrenme materyalidir.
 - Millî Eğitim Bakanlığınca ücretsiz olarak verilmiştir.
 - **PARA İLE SATILMAZ.**

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR	ii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. KANDA GLİKOZ, LİPİT, PROTEİN VE TOPLAM BİLİRUBİN	3
1.1. Kan Şekeri.....	3
1.2. Kan Lipitleri.....	4
1.3. Serum Proteinleri	6
1.4. Kanda Bilirubin.....	7
1.5. Spektrofotometrik Yöntemle Kanda Glikoz, Lipit, Protein ve Toplam Bilirubin Tayini.....	7
UYGULAMA FAALİYETİ	12
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	13
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	14
2. SERUM ENZİMLERİ.....	14
2.1. Enzimler ve İşlevleri	14
2.2. Enzimlerin Klinik Tanıda Önemi.....	16
2.3. Transaminazlar.....	16
2.4. Transferazlar	17
2.5. Fosfatazlar (Alkali fosfataz= ALP).....	18
2.6. Serum Enzimlerini Tayin Yöntemleri.....	18
2.7. Spektrofotometrik Yöntemle Serum Enzimleri Tayini	19
UYGULAMA FAALİYETİ	22
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	23
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	24
3. Kanda sodyum ve potasyum.....	24
3.1. Kanda Sodyum.....	24
3.2. Kanda Potasyum	25
3.3. Kanda Sodyum ve Potasyum Tayini	26
UYGULAMA FAALİYETİ	28
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	29
ÖĞRENME FAALİYETİ-4	31
4. KANDA KALSİYUM VE FOSFOR.....	31
4.1. Kanda Kalsiyum.....	31
4.2. Kanda Fosfor.....	32
4.3. Kanda Kalsiyum ve Fosfor Tayini	33
UYGULAMA FAALİYETİ	36
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	37
ÖĞRENME FAALİYETİ-5	38
5. OTOANALİZÖR İLE BİYOKİMYASAL TESTLER	38
5.1. Otoanalizörler	38
5.2. Otoanalizörlerle Ölçüm Yapma	42
UYGULAMA FAALİYETİ	46
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	47
MODÜL DEĞERLENDİRME	48
CEVAP ANAHTARLARI.....	50
KAYNAKÇA	52

AÇIKLAMALAR

ALAN	Laboratuvar Hizmetleri
DAL	Tarım Laboratuvarı
MODÜLÜN ADI	Kanda Biyokimyasal Testler
SÜRE	40/32
MODÜLÜN AMACI	Spektrofotometre, flame fotometre ve otoanalizör kullanarak kanda biyokimyasal testler yapmaya yönelik bilgi ve becerileri kazandırmaktır.
MODÜLÜN ÖĞRENME KAZANIMLARI	<ol style="list-style-type: none">1. Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak spektrofotometre ile kanda glikoz, lipit, protein ve toplam bilirubin tayini yapar.2. Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak spektrofotometre ile kanda enzim aktivitelerini ölçer.3. Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak flame fotometre ile kanda sodyum ve potasyum tayini yapar.4. Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak spektrofotometre ile kanda kalsiyum ve fosfor tayini yapar.5. Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak otoanalizör ile tekniğine uygun biyokimyasal testler yapar.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	<p>Donanım: Santrifüj, su banyosu, pipet, deney tüpü, kan serumu, distile su, glikoz standart çözeltisi, glikoz, lipit, protein ve toplam bilirubin tayinlerinde kullanılan reaktifler, spektrofotometre, santrifüj, beher, mezür, pipet, , otomatik pipet, reaktifler (sgot, sgpt, alp, act), flame fotometre, balon joje, pipet, puar, standart sodyum çözeltisi, standart potasyum çözeltisi, UV-VIS spektrofotometre, kalsiyum reaktifi (tris, O-cresolphtalein, 8-hyoksiyquinoline-5-sulfonic acid), kalsiyum standart çözeltisi (2,5 mmol/L kalsiyum karbonat, 0,1 N HCl), potasyum reaktifi, fosfor standart çözeltisi (1,615 m mol/L monopotasyum fosfat), otoanalizör, bilgisayar</p> <p>Ortam: Laboratuvar ortamı</p>
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	<p>Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz.</p> <p>Öğretmen modül sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru-yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.</p>

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Hastalık tanılarının doğru konulabilmesi için biyokimyasal testler çok önemlidir. Günümüzde çok çeşitli yöntemlerle biyokimyasal testler yapılmaktadır.

Veteriner hekimlik alanında klinik biyokimyanın önemi giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Klinik biyokimya alanında laboratuvarlardan hangi testin hangi hallerde istenebileceğinin bilinmesi, testlerin isabetli seçilmesi önem kazanmaktadır.

Bu modül çalışmasında kazanacağınız yeterlikler, ileride yapacağımız çalışmalarda size çok önemli katkılar sağlayacaktır.



ÖĞRENME FAALİYETİ-1

ÖĞRENME KAZANIMI

Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak spektrofotometre ile kanda glikoz, lipit, protein ve toplam bilirubin tayini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Kanda bulunan glikoz, lipit ve protein önemini araştırarak bilgi ediniz.
- Bilirubin oluşumu ve atılımını araştırınız.

1. KANDA GLİKOZ, LİPİT, PROTEİN VE TOPLAM BİLİRUBİN

1.1. Kan Şekeri

Kan şekeri vücudu dolaşan kan aracılığıyla tüm hücrelerin kullanımına sunulan enerji verici bir maddedir. Karbonhidratların sindirimi sonucunda kan dolaşımına katılan kan şekerinin (glikoz) düzeyine; glisemi, normal sınırlardaki glisemiye normoglisemi, normal sınırlarının altındaki glisemiye hipoglisemi, normal sınırlarının üstündeki glisemiye hiperglisemi denir.

Açlık halinde ölçülen kandaki glikoz (şeker) düzeyine açlık kan şekeri denir. Belirli hastalıkların takibinde, son derece önemli bir kriterdir. Düşük ya da yüksek olması sağlık sorunlarına neden olabilir. Kedi ve köpeklerde diabetes mellitusun tanı ve tedavisinde önemi vardır. Ayrıca hipertirodizm veya şiddetli karaciğer hastalıkları gibi glikoz toleransının anormal olduğu durumlarda da kandaki düzeyi önemlidir. Kan glikozu, ruminantların metabolik profillerinin tayininde de kullanılır.

Yapılan incelemeler çeşitli hormonların karbonhidrat metabolizması üzerine etkili olduklarını ortaya koymuştur. İnsülin hormonu, kan glikoz konsantrasyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. İnsülin hiperglisemiye yanıt olarak, pankreastan direk kan içine salgılanır. İnsülin salgılanmasına, glikozun dışında amino asitler, serbest yağ asitleri, keton cisimleri ve glukagon hormonuyla neden olur. Epinefrin ve norepinefrin hormonları insülin salgılanmasını engeller.

İnsülin glikoz, glikojen kullanılmasının ve protein sentezinin, yağ sentezinin artmasına neden olarak metabolizmada önemli rol oynayan karaciğer, kas ve yağ dokusu üzerine etki eden bir anabolik hormondur. İnsülin salgılanması kan glikozu tarafından ayarlanır aynı zamanda insülin kan glikoz konsantrasyonunu düzenler.

Kandaki glikoz konsantrasyonunun azalması halinde (hipoglisemi) insülin salgılanması azalır. Glikoz konsantrasyonunun artması insülin salgılanmasını artırır.

İnsülin eksikliği sonunda meydana gelen hiperglisemi ve glikozüri dokular tarafından glikozun kullanılması ve taşınmasında insülin hormonunun etkisinin bir görünümüdür. İnsülin, normal koşullardan fazla miktarda bulunursa glikoz hücre içine girer ve fosfatları çünkü insülin glikokinaz aktivitesini de artırır.

Ön hipofiz bezinden salgılanan büyüme hormonu ve ACTH (adrenokortikotrop hormon) insüline zıt etki göstererek kan glikozunu yükseltme eğilimindedirler. Büyüme hormonu, yağ dokusundan serbest yağ asitlerini serbest hale geçirerek glikozun bu doku tarafından kullanılmasını inhibe eder.

ACTH böbreküstü bezi kabuğu hormonlarının salgılanmasını artırarak glikoz düzeyi üzerine etkili olur. Böbrek üstü bezi kabuğu hormonlarından glukokortikoidler glukoneojenere yol açar. Ayrıca glikozun ekstrahepatik dokular içinde kullanılmasını inhibe ederler. Böbrek üstü bezi medulla kısmından salgılanan epinefrin, hem karaciğerde hem de kasta glikojenin parçalanmasını stimüle eder (uyarır).

Pankreastan sentezlenen glukagon hormonunun salgılanmasını hipoglisemi stimüle eder, karaciğerde glikojen yıkımını artırarak kan glikoz düzeyini yükseltir.

Kan glikoz düzeyi beslenme durumuna, hormon düzeyine ve türlere göre değişiklik gösterir. Ruminantlarda kan glikoz düzeyi ruminant olmayanlara göre düşüktür, kanatlılarda ise memelilere göre yüksek konsantrasyondadır.

TÜR	At	İnek	Koyun Keçi	Domuz	Köpek	Kedi	Tavuk
Kanda glikoz miktarları (mg/dl)	78	55	45- 55	90	85	75	210

1.2. Kan Lipitleri

Suda çözünmeyip, eter, kloroform ve benzen gibi polar olmayan çözücülerde çözünen maddelerdir. Lipidler tüm canlılarda bulunur, çünkü hayatın devamlılığı için gereklidir. Lipidler katı yağları, mumları ve onlarla ilişkili bileşikleri kapsarlar. Vücutta genellikle ya membran lipidleri ve yağ hücrelerinde trigliserit olarak bulunurlar, ya da lipoprotein partikülleri olarak proteinler ile birlikte plazmada taşınırlar.

Diyetle alınan yağın %98'i trigliserid, geriye kalanı ise fosfolipid, kolesterol, kolesterol esteri, serbest yağ asitleri, yağda eriyen vitaminler, steroidler ve terpenlerdir.

➤ **Kolesterol**

Hayvansal kökenli bir steroiddir. Bu nedenle lipidler gibi eter ve kloroformda erir. Kolesterol endojen ve eksojen kaynaklı olabilir, çekirdekli hücrelerce sentezlenebilir. Sentezde en aktif olan organlar karaciğer, adrenal korteks, yumurtalıklar, testisler ve bağırsak epitelyum hücreleridir.

Kolesterol, insan diyetinde düşük miktardadır (1 g/ gün). Bazı lipoproteinlere katılarak plazmada perifer dokulara taşınır ve oralarda hücre membranlarının en büyük bileşeni olabilir. Diyetteki kolesterol %0.05 oranında bulunduğunda karaciğer, ince bağırsak ve adrenal bezler kolesterolün % 80'ini sentez ederler, buna karşılık diyet % 2 kolesterol içerdiğinde endojen kolesterol üretimi, %10- 30'a düşer. Bu durumda karaciğer sentezi inhibe edilir. Bağırsakta kolesterol sentezi kolesterolden ziyade safra asitleri tarafından inhibe edilir. Kolesterolün yaklaşık yarısı safra tuzlarına çevrildikten sonra feçes ile atılır.

- **Kolesterolün serumda arttığı durumlar**
 - Esansiyel hiperkolesterolemi
 - Şeker hastalığı
 - Hipotiroidizm
 - Tıkanma sarılığı
 - Gebelik
- **Kolesterolün serumda azaldığı durumlar**
 - Hepatik dejenerasyon
 - Hipertiroidizm
 - Yetersiz beslenme

➤ **Trigliseridler (TG)**

Gliserolün üç tane hidroksil grubu ile yağ asitlerinin oluşturdukları esterlerdir. Bu yapıdan dolayı yağlara; trigliseritler ya da triaçil gliserol denir.

Trigliseridler, yağ asitlerinin başlıca depo şeklidir. Eğer gliserolün her üç -OH grubuna aynı yağ asidi bağlanmış ise basit trigliserid; yağ asitlerinden biri farklı ise bileşik (karma) trigliserid adı verilir. Trigliseridler yağ dokusunda büyük lipid damlacıkları halinde saklanırlar. Trigliseridler yağ hücresi içinde veya lipoprotein partikülü üzerinde hidroliz edildiği zaman, enerji kaynağı olarak kullanılmak üzere serbest yağ asitleri açığa çıkar. Trigliseridler, önemli biyolojik fonksiyonlara sahiptirler.

Plazma trigliseridleri yaş, cinsiyet ve bilhassa diyet ile ilgili olarak değişiklik gösterir. Karaciğer, yağ asitleri ve gliserolden endojen trigliserid sentezinde önemlidir. Sentezlenen trigliseridler VLDL ile plazmada yağ depolarına doğru taşınır.

➤ Yağ asitleri

Daha çok düz zincirli monokarboksilik asitlerdir. Bunlar başlıca diyet trigliseridlerinden kaynaklanır. Yağ asitleri glikoza alternatif ya da onun yerine geçebilecek bir enerji kaynağı olarak rol oynar.

➤ Fosfolipidler

Trigliseridlere benzer yapıdadırlar ancak, onlardan daha çok komplekstir. Üç yağ asidinden bir polar baş grup tarafından doldurulur. Polar ve apolar gruplara sahip olması fosfolipidlere deterjan özelliği kazandırır. Fosfolipidler başlıca karaciğerde ve ince bağırsakta sentezlenir. Bunlar hücrelerin en önemli üyelerinden biridir. Hücre membranında her zaman bulunur.

1.3. Serum Proteinleri

Organik bileşiklerin büyük bir grubu olan proteinler, organizmada ve özellikle hücrelerde en çok bulunan maddelerdir. Proteinler canlı organizmanın çok önemli bir yapı taşıdır. Bütün canlıların hücreleri protein ihtiva eder. Kas, karaciğer gibi organ ve dokuların % 80 – 90'ı proteindir. Proteinler aminoasitlerin birleşmesinden meydana gelen karmaşık yapıları organik moleküllerdir. Vücut ağırlığının % 18'ini, hayatın temelini oluşturan bu kompleks organik bileşiklere protein denir. Hücre içinde meydana gelen çeşitli faaliyetler doğrudan proteinler tarafından yapılır. Hücre içinde 2000'e yakın değişik protein olduğu sanılmaktadır.

Proteinler uzun süren açlık durumlarında enerji kaynağı olarak da kullanılır. Enerji verme açısından yağlardan sonra gelir. Kullanım olarak 3. organik bileşiktir. 1 gram protein yakıldığında 4,3 kilo kalori enerji açığa çıkar.

Proteinler, peptit bağlarıyla kovalent olarak bağlanmış aminoasit polimerleridir. Proteinler, karbon (C), hidrojen (H), oksijen (O), azot (N), kükürt (S) elementlerini kapsar. Bazılarında fosfor (P) bulunur.

Değişik fizyolojik ve patolojik durumlarda serumda proteinler değişik miktarlarda bulunur. Serum proteinleri çok sayıda değişik fonksiyonları yerine getirir. Lipidler, hormonlar, vitaminler ve metaller için taşıyıcı moleküller olarak işlev yapar. Ozmotik basıncın sağlanmasına yardımcı olur. Hücre aktivitesinin düzenlenmesi, enfeksiyonlara karşı savunmada önemli rol oynar.

Normal bir serum protein elektroforezi sonucunda; albümin, alfa1, alfa2, beta ve gama globülinden oluşmuş beş temel fraksiyon içerir. Selüloz asetat elektroforezi ile elde edilen bu bantların sayısı hayvan türlerine göre değişir.

1.4. Kanda Bilirubin

Bilirubin, eritrositteki hemoglobinin karaciğer, kemik iliği ve dalakta yıkıma uğramasıyla ortaya çıkan safra renkli bir maddedir.

Eritrositler kan dolaşımında ortalama 120 gün kaldıktan sonra retikülo endotelyal sistem (RES) hücreleri tarafından yıkılarak hemoglobinin yapısını oluşturan hem ve globuline ayrılır. Globulin, protein havuzuna katılır. Hemden (Fe) demirin ayrılmasıyla geriye kalan toksik madde biliverdin hücre içinde oksitlenir ve bilirubine dönüşür.

Bu bilirubine **endirekt bilirubin** (serbest) veya **anjonje bilirubin** denir. Bu bilirubin suda çözünmez iken kloroformda çözünür. Kanda bilirubinin artması albümine bağlı olduğundan ve suda çözünmediğinden idrara çıkmaz.

İndirekt bilirubin, karaciğerde glukoronik transferaz enzim aracılığı ile glukoronik asitle birleşmesi sonucu direkt (konjuge) bilirubine dönüşür. Direkt bilirubin, suda eriyerek vücuttan atılabilir hâle gelir. Kanda artması hâlinde böbrek eşiği olan % 1,7 – 2 mg'ı aşar ve idrarda görünür.

Kanda bilirubin miktarının yükselmesine hiperbilirubinemi denir. Dolaşımda bilirubinin yüksek seyretmesinin nedenleri üç aşamaya bağlı olarak görülür.

- **Prehepatik sarılık (karaciğer öncesi):** Sağlıklı bir karaciğerin atabileceğinden fazla bilirubin yapılması sonucu gelişir.
- **Hepatik sarılık (karaciğerde):** Hastalığa bağlı olarak görevini yerine getiremeyen karaciğerin normal miktarlarda üretilen bilirubini atamaması sonucu gelişir.
- **Posthepatik (karaciğer sonrası):** Karaciğerden sonraki dışa açılan kanalların tıkanması sonucu gelişir.

Bu nedenlere bağlı olarak kanda bilirubin birikir ve belli bir konsantrasyona eriştiğinde dokulara diffüze ederek dokuları sarıya boyar ve sarılık (ikter) meydana gelir.

1.5. Spektrofotometrik Yöntemle Kanda Glikoz, Lipit, Protein ve Toplam Bilirubin Tayini

- **Kanda glikoz tayini**
 - **Metot:** Glikoz oksidaz
 - **Prensip:** Glukoz oksidaz enzimi, suda erimiş moleküler oksijeni kullanarak glukozdan glukonik asit ve hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşturur. Oluşan hidrojen peroksit, (H_2O_2) fenol ve ampiron gibi maddelerle peroksidaz enzimi varlığında reaksiyona girerek renkli bir kompleks oluşturur. Rengin şiddeti, ortamdaki glukoz miktarı ile doğru orantılıdır.

- **Reaktifler**
 - 1M Sodyum Hidroksit (NaOH)
 - 0.5 M Çinko Sülfat (ZnSO₄)
 - Enzim- renk ayıracı (glikoz oksidaz enzimi)
 - Glikoz standardı (%100 mg)
- **Teknik**
 - İki tüp alınır ve içlerine 3- 6 ml distile su konur.
 - Tüpün birisine 0,4 ml kan veya serum konur.



Resim 1.5: Tüpe serum konması

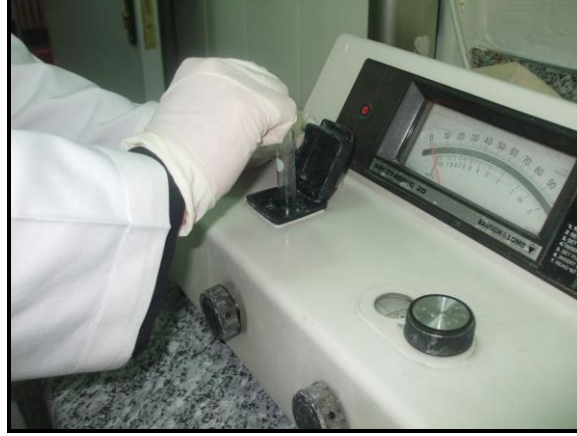
- Diğer tüpe standart çözeltisi konur ve karıştırılır.
- Üzerlerine 0,5 ml 1M NaOH konur ve karıştırılır.
- Sonra 0,5 ml 0.5 M ZnSO₄ konur ve karıştırılır.
- Beş dakika 2000 - 3000 rpm'de santrifüj edilir.



Resim 1.6: Karışımın santrifüj edilmesi

- Üç temiz tüp alınır; test, standart ve kör olarak işaretlenir.
- Test tüpüne 0,1 ml süpernatant (kan veya serumdan elde edilen berrak kısım) konur.
- Standart tüpüne 0,1 ml standarttan, köre de 0,1 ml distile su konur.
- Üç tüpe de 5'er ml enzim ayırıcı ilave edilir.

- 37°C'lik su banyosuna konur ve 15 dakika bekletilir.
- Sonra 5 dakika bekletilerek oda ısısına gelmesi beklenir.
- K r ile sıfır ayarı yapılarak test ve standart tüplerin optik dansiteleri 415 nm'de okunur.



Resim 1.6: Spektrofotometrede okuma

➤ **Serumda toplam lipid tayini**

Serumda dolaşan tüm lipidlerin toplamıdır. Total lipidin içerisinde klinik önemi en çok olan, kolesterol ve trigliserittir. Total lipid tayini ile serumda tüm lipidler (trigliserid, fosfolipid, kolesterol, yağ asidi, v.s.) tayin edilmiş olur.

- **Metot:** Kunkel
- **Prensip:** Serum, yüksek konsantrasyonlu tuz  zeltisi ile hazırlanan % 1 fenol  zeltisi ile muamele edilirse serum lipidleri  oker ve bir bulanıklık meydana gelir. Bu işlemde meydana gelen bulanıklık serum toplam lipid konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Proteinler bu reaksiyonu bozmaz.
- **Ayır lar**
 - **Fenol ayıracı:** 1 gr fenol 12 gr NaCl tartılarak 100 ml'lik bir balona konur. Bir miktar distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu  zelti buzdolabında saklanmalıdır.
- **Teknik**
 - Test ve blank için iki adet spektrofotometre küveti alınır.
 - Test işaretli spektrofotometre küvetine 3,6 ml fenol ayıracı ve 0,2 ml serum konur, lamel kapatılır ve alt üst edilerek karıştırılır.
 - Blank işaretli küvete sadece 3,8 ml fenol ayıracı konur.
 - Spektrofotometre küvetleri laboratuvar sıcaklığında 30 dakika bekletilir.
 - Blanka göre spektrofotometre sıfıra ayarlanır. Testin optik dansitesi 650 nm'de  l l r.

➤ **Serumda bilirubin tayini**

- **Metot:** Modifiye Malloy Eveleyn, Vander Berg

- **Prensip:** Plazma veya serum Ehrlich (Diazo) ayıracı (diazotize sülfanilik asit) ile reaksiyona sokulur. Ortamdaki bilirubin, ayıraçla reaksiyona girer ve bilirubin miktarı ile doğru orantılı olarak renkli bir bileşik (pembe- kırmızı) olan azobilirubini oluşturur. Renk 2 saat kadar dayanıklıdır. Oluşan azo bilirubinin optik dansitesi spektrofotometrede ölçülerek bilirubin miktarına çevrilir.
- **Ayıraçlar**
 - **Diazo A ayıracı:** 1 gr sülfonilik asit üzerine 15 ml yoğun HCl eklenir. Süzülür ve distile su ile litreye tamamlanır. Uzun zaman dayanıklıdır.
 - **Diazo B ayıracı:** 0,5 gr NaNO₄ suda çözünerek distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Işıktan korunmalı ve renk sarıya dönünce atılmalıdır.
 - **Diazo ayıracı:** Analizden hemen önce 10 ml diazo A ve 0,3 ml diazo B karıştırılarak taze hazırlanır.
 - Metil alkol (metanol)
 - **%1.5'lik HCl:** 15 ml yoğun HCl distile su ile bir litreye tamamlanır. Ayıraç uzun süre dayanıklıdır.
 - **Bilirubin stok standart çözeltisi:** 10 mg bilirubin 100 ml'lik balon içerisinde bir miktar kloroform ile çözülür ve kloroform ile 100 ml'ye tamamlanır. Koyu renkli şişede ve buzdolabında saklanır.
 - **Bilirubin çalışma standart çözeltisi:** 10 ml stok çözeltiden alınarak metil alkol ile 100 ml'ye tamamlanır. Bunun 1 ml'sinde 0,01 mg (yada 1 mg/dl) bilirubin vardır.
- **Standart eğrinin çizilmesi:** Metil alkol kullanılarak bilirubin stok standart çözeltisinden (%10 mg) %0.1 mg, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg ve 3 mg'lık standart çözeltiler hazırlanır. Bu standart çözeltilerden 9 ml ve kör için 9 ml metanol alınır. Üzerlerine 1'er ml diazo ayıracı eklenir ve oda ısısında 30 dakika bekletilir. Sürenin sonunda 540 nm'de spektrofotometrede optik dansiteler okunur. Sonuçlar, bilirubin konsantrasyonları ile birlikte milimetrik kâğıda işlenir ve standart eğri çizilir. Test sonuçları % mg (ya da mg/dl) olarak bu eğriden hesaplanır.
- **Teknik**
 - Serum taze ve hemolizsiz olmalıdır.
 - 1 ml serum alınır ve distile su ile 10 kez sulandırılır.
 - İki deney tüpü alınır, kör ve test olarak işaretlenir.
 - Kör işaretli tüpe 5 ml metanol ve 1 ml % 1,5 HCl,
 - Test işaretli tüpe 5 ml metanol ve 1 ml diazo ayıracı konur, karıştırılır.
 - Kör ve test işaretli tüplere daha sonra 4'er ml sulandırılmış serum eklenir.
 - Karıştırılır ve oda ısısında 15 dakika beklenir.
 - Daha sonra 540 nm'de köre karşı testin absorbansı okunur.

- **Serumda toplam protein tayini**
- **Metot:** Biüret
 - **Prensip:** Proteinleri teşkil eden amino asitlerin tabiatı ne olursa olsun bütün proteinler peptid bağı ihtiva ederler. Peptid bağları kuvvetli alkali çözeltide Cu^{++} iyonları ile bağlanarak menekşe renkli bir kompleks oluştururlar. Rengin şiddeti, peptid bağlarının sayısı ve dolayısıyla protein miktarı ile orantılıdır.
 - **Ayırıcılar**
 - **Biüret reaktifi:** 400 ml taze hazırlanmış, karbonatsız 0,2 N. NaOH içinde 9 gr sodyum potasyum tartarat ve 3 gr CuSO_4 eritilir. Üzerine KI eklenip eritilir ve 0,2 N NaOH ile litreye tamamlanır. Karanlıkta ve polietilen şişede saklanır.
 - **Fizyolojik tuzlu su:** 8.5 gr NaCl bir miktar distile suda eritilerek litreye tamamlanır.
 - **0.2 N NaOH:** 8 gr NaOH distile su ile çözünür ve bir litreye tamamlanır.
 - **Teknik**
 - Üç deney tüpü alınır.
 - Test, standart ve blank olarak işaretlenir.
 - Test tüpüne 4,9 ml % 0.85'lik NaCl çözeltisi, üzerine 0,1 ml serum konur.
 - Standart tüpüne 4,9 ml %0.85'lik NaCl çözeltisi, üzerine 0,1 ml standart eklenir.
 - Blank işaretli tüpe 5 ml % 0.85 NaCl çözeltisi konur.
 - Her üç tüpe 5'er ml biüret reaktifi ilave edilerek karıştırılır.
 - 30- 35 °C'de su banyosunda 30 dakika bekletilir.
 - Kolorimetrede 555 nm'de okunur.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak serumda toplam protein tayini işlemlerini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Gerekli araç ve gereçleri hazırlayınız.	➤ Araç, gereçlerin tam olduğundan emin olunuz.
➤ Üç deney tüpü olarak bunları test, standart ve blank olarak işaretleyiniz.	➤ Cam yazar (asetat) kalemi kullanınız.
➤ Test tüpüne 4,9 ml % 0.85'lik NaCl çözeltisi, üzerine 0.1 ml serum ekleyiniz.	➤ Hacim ölçme kurallarına uyunuz.
➤ Standart tüpüne 4,9 ml %0.85'lik NaCl çözeltisi, üzerine 0,1 ml standart ekleyiniz.	➤ Hacim ölçme kurallarına uyunuz.
➤ Blank işaretli tüpe 5 ml % 0.85 NaCl çözeltisi ekleyiniz.	➤ Hacim ölçme kurallarına uyunuz.
➤ Her üç tüpe 5'er ml büret reaktifi ilave edilerek karıştırınız.	➤ Hacim ölçme kurallarına uyunuz.
➤ 30- 35 °C'de su banyosunda 30 dakika bekletiniz.	➤ Sıcaklık ve süre ayarlarına dikkat ediniz.
➤ Kolorimetrede 555 nm'de okuma yapınız.	➤ Dalga boyunu ayarlamayı unutmayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Kan dolaşımına katılan kan şekerinin (glikoz) düzeyinin normal seviyede olması aşağıdakilerden hangisidir?
A) Glisemi
B) Normoglisemi
C) Hipoglisemi
D) Hiperglisemi
E) Glikozomi
2. Kan glikozunun yükselmesini önleyen hormon aşağıdakilerden hangisidir?
A) İnsülin
B) Glukagon
C) Büyüme hormonu
D) Prolaktin
E) Hiçbiri
3. Suda çözünmeyip, eter, kloroform ve benzen gibi polar olmayan çözücülerde çözünen madde aşağıdakilerden hangisidir?
A) Glikoz
B) Lipit
C) Amino asit
D) Protein
E) Üreaz
4. Klinik biyokimya laboratuvarında Diazo reaksiyonu hangi maddenin miktarını ölçmek için kullanılır?
A) Üre
B) Kolesterol
C) Bilirübin
D) Kreatinin
E) AKŞ
5. Eritrositteki hemoglobinin karaciğer, kemik iliği ve dalakta yıkıma uğramasıyla ortaya çıkan safra renkli madde aşağıdakilerden hangisidir?
A) Üre
B) Kolesterol
C) Kreatinin
D) Bilirübin
E) AKŞ

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

ÖĞRENME KAZANIMI

Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak spektrofotometre ile kanda enzim aktivitelerini ölçüm işlemlerini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Enzimlerin metabolizmalarını araştırınız.
- Enzim analizleri hakkında araştırma yapınız.

2. SERUM ENZİMLERİ

2.1. Enzimler ve İşlevleri

Hücrelerde yapılan protein, karbonhidrat ve lipit gibi maddelerden biri olan enzimler, protein yapısındadır. Fakat öbür proteinlerden en büyük farkı, hücre içinde veya bazı vücut sıvılarında geçen biyolojik reaksiyonları özel olarak kataliz edebilmesidir. Çok sınırlı miktarlarla kimyasal reaksiyonun aktivasyon enerjisini (tepkimeye verilen ilk enerji) düşürerek reaksiyonu hızlandıran, reaksiyon sonucunda hiç bir değişikliğe uğramadan çıkan biyolojik katalizörlere enzim denir. Katalizör olarak bir enzimin fonksiyonu, aktivasyon enerjisini düşürmek suretiyle bir reaksiyonun hızını artırmaktır.

- **Enzimlerin Özellikleri**
 - Kimyasal tepkimelerin hızını artırır.
 - Kimyasal tepkime sonunda değişmeden serbest kalır.
 - Kimyasal tepkimelerin ulaşacağı son denge durumuna yani oluşan ürün miktarına etki etmez.
 - Isı ve pH değişikliklerinde etkilenir.
 - Enzimler, tekrar tekrar kullanılabilir.
 - Enzimler, substratlardan oldukça büyüktür.
 - Enzimler, kimyasal tepkimeleri az enerji ve vücut ısısında başarır.
 - Enzimler, canlı hücreler tarafından biyolojik şartlarda ve genetik bilgi ile sentezlenir.
 - Enzimler, aktivitelerini hücre içinde gösterdiği gibi hücre dışında da uygun şartlarda gösterir.

➤ Enzimlerin Genel Yapısı

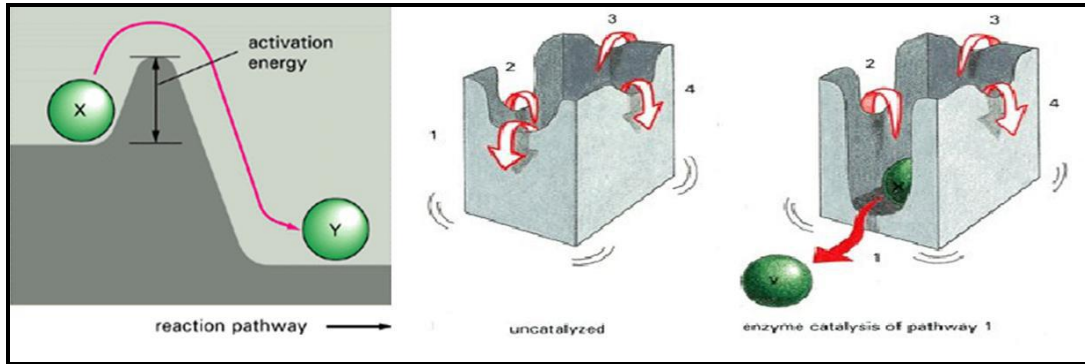
Enzimler iki grupta incelenir:

- **Basit enzimler:** Bu tip enzimlerin yapılarında sadece protein vardır.
- **Birleşik enzimler:**
 - Bu tip enzimler proteinlerle birlikte organik ya da inorganik kısımlara sahiptir.
 - Birleşik proteinlerin proteinli kısmına **apoenzim** denir.
 - Apoenzime bağlı olan organik ya da inorganik maddelerin bulunduğu kısma **ko kısım** denir. Ko kısım hafif metal iyonlarından (Ca , K , Mg , Zn , Fe) oluşmuş ise **kofaktör**, küçük organik moleküllerden (vitamin) oluşmuşsa **koenzim** denir.
 - Apoenzim ve ko kısımların birlikte oluşturdukları yapıya da **haloenzim** denir.

Bir enzimin biyolojik katalizör olarak aktif olabilmesi için apoenzim ve koenzim kısmın birlikte olması gerekir. Yani kendi kendilerine etkili olamaz. Kimyasal tepkimelere giren ve etkilenen maddelere substrat denir. Enzimin hangi substratla reaksiyona gireceğini belirleyen kısmı apoenzimidir.

➤ Enzimlerin İsimlendirilmesi

Enzimlerin büyük bir kısmı keşfi sırasında aldıkları sistemsiz adlarla anılır. Örnek: Tripsin, pepsin gibi substratların adının sonuna veya katalizlediği reaksiyon adının sonuna -az , -oz, -ase getirilerek adlandırılmıştır. Örnek: Nişastayı etkileyen enzim amilaz, yağları etkileyen enzim lipaz, üreyi etkileyen enzim üreaz, proteinleri etkileyen enzim proteinaz gibi.



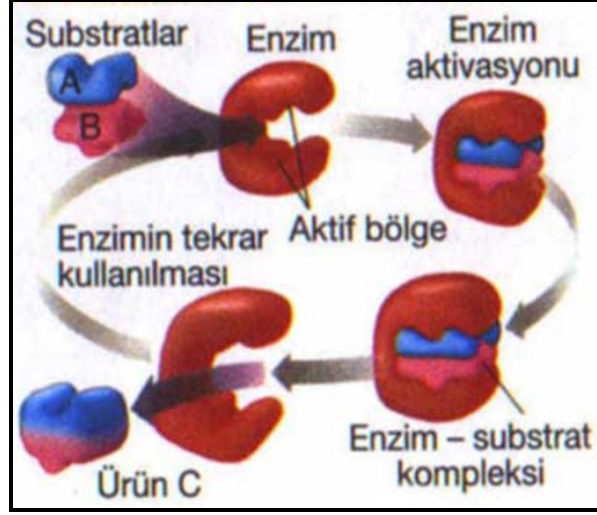
Resim 2.1: Enzim etkisi

Enzimin özgül olarak etki ettiği maddeye veya madde karışımına bu enzimin substratı denir. Reaksiyon sonunda meydana gelen maddeye ise **ürün** adı verilir. Genel olarak reaksiyonu şu şekilde şematize edebiliriz.



(E = Enzim, S = Substrat , P = Ürün)

Bir hücre içinde yapıldıktan sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere **endo enzimler** denir.



Resim 2.3: Enzim - substrat ilişkisi sonucu oluşan ürün

2.2. Enzimlerin Klinik Tanıda Önemi

Enzim testlerinin tanıda kullanılması hücre içindeki enzim konsantrasyonunun plazma enzim konsantrasyonundan daha fazla olması esasına dayanır.

Hastalık veya travma sonucu hücre yıkımında enzim hücreden plazmaya geçeceğinden plazma enzim aktivitesi artar. Doku kaynağına göre ölçülen enzim tanıda özellikle karaciğer enfarktüsünde yardımcı olur.

2.3. Transaminazlar

Transaminazlar karaciğer hücrelerinde bulunan enzimlerdir. Karaciğer hasarında hücre dışına sızarlar. Çeşitli dokularda bulunan transaminazlar ketoasitlerle aminoasitlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen enzimlerdir. Aminoasidin amino grubu, bir keto aside transfer edilir. Böylece keto asit aminoasit olurken amino grubunu kaybeden aminoasit keto aside dönüşmüş olur. Serumda etkilediği madde ve buldukları yer açısından birbirinden farklı iki transaminaz enzimi vardır.

Aspartat amino transaminaz [(AST)/Serum glutamik oksalasetik transaminaz (SGOT)]
Alanin transaminaz [(ALT)/Serum glutamik pirüvik asit transaminaz (SGPT)]

L – Aspartat + α – ketoglutarat $\xrightarrow{\text{SGOT /AST}}$ **Okzalasetat + Glutamat**

L – Alanin + α – ketoglutarat $\xrightarrow{\text{SGPT /ALT}}$ **Glutamat + Piruvat**

Normal olarak bu enzimler kanda oldukça düşük konsantrasyonlarda bulunur. Dokularda ve bilhassa eritrosit, kalp kası, karaciğer ve akciğerde daha fazla miktarda bulunur.

2.4. Transferazlar

Substratlarındaki bir kimyasal grubu ikinci bir substrata aktaran enzimlerdir. Bu sınıftaki bir enzimin substrattan aldığı grup, hidrojen atomu veya elektron olamaz.

➤ **Aspartat – aminotransferaz (AST) (Glutamat- okzalasetat transaminaz GOT)**

Bu birçok dokuda bulunur, fakat özellikle iskelet ve kalp kaslarında karaciğer ve böbrekte bulunur. Kalp infarktüsü ve karaciğer hastalıklarından şüpheli hastalarda tanıda kullanılır. Plazma yarı ömrü yaklaşık olarak köpekte 12 saat, kedide daha kısa, domuzda 18 saat ve at ve inekte oldukça uzundur. AST tayininde dikkat edilecek hususlar ALT ile aynıdır. Plazma AST artışı karaciğer ve kas hücre permealitesinde değişikliklerle gerçekleşir.

AST'ın kedi ve köpekte karaciğer spesifitesi nedeniyle ALT çok sık kullanılır. Karaciğer hastalıklı hayvanlarda ALT değeri AST'dan daha yüksektir.

➤ **Alanin- aminotransferaz (ALT) (Glutamat- piruvat transaminaz GPT)**

Bu da oldukça yaygındır. Birçok dokudaki konsantrasyonu AST'den az olmakla birlikte karaciğerde her iki enzimin aktivitesi aynıdır. ALT aktivitesi karaciğer fonksiyon testi olarak hepatosellüler yıkımda kriterdir. Çünkü karaciğerde AST'den daha spesifiktir.

Enzim sitozolik olup kedi ve köpeklerde karaciğer spesifik enzim olarak tanısıl değerdedir. Plazma yarı ömrü köpekte 60 saat civarında, kedide ise daha kısadır. Enzim 0°C-+4°C arasında birkaç gün dayanıklıdır. Hemolizden sakınılmalıdır. Referans değerler değişkendir. Hepatosellüler permeabilite değişiklikle serum ALT değeri artar. Serum ALT artışı hepatositte enzim indiksiyonu sonucu olabilir. Glikokortikoidler hepatic ALT'de artışa neden olur.

ALT enzimi kedi ve köpekler için karaciğere spesifiktir. Hepatik ALT at, inek, koyun, keçi ve domuzlarda çok düşüktür. Serum ALT inek, koyun ve domuz kan hastalıklarında da hafifçe artar.

➤ **γ Glutamil transferaz (GGT) (Sinonimi γ- glutamil transpeptidaz)**

Bu enzime bazen γ glutamil transpeptidaz da denir. Başlıca böbrek, karaciğer, safra kanalları ve pankreas da bulunur. En büyük tanısıl şekli karaciğerde ve ALP'de (Alkalen fosfataz) olduğu gibi safra kanalcıklarına bitişik olan hücre membranları ile birlikte görülür. ALP'de olduğu gibi tanı için en önemli organ karaciğerdir. Karaciğer hastalıklarında plazma GGT aktivitesi genellikle ALP'ye paralel olarak artar. Örneğin kolestaz olduğu zaman çoğu kez artar. Ancak hepatic enzim sentezi alkol ile ve birçok ilaç ile artırılır. Böylece GGT plazma düzeyi yükselir. Kemik hastalıklarında yükselmez. GGT artışı plazma ALP aktivitesinin kaynağını tanımlar.

GGT kedi ve köpekte kolestazisin tesbitinde kullanılır. Serum GGT değeri at, inek, koyun ve domuzda kolestatik hastalıklarda yükselir.

2.5. Fosfatazlar (Alkali fosfataz= ALP)

Oldukça geniş bir dağılım gösterir. Plazma ALP aktivitesi için karaciğer, kemik, plasenta ve bağırsaklar klinik olarak önemli kaynaktır. Yüksek serum ALP aktivitesinin kaynağının hangi doku olduğunu anlayabilmek için elektroforez, immunoassay veya diğer metotlar kullanılır.

Birçok dokuda hücre membranında bulunuşu, ALP aktivitesi ile membran transportu arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Sağlıklı hayvanlarda serum ALP değeri kedi, köpek ve atlarda primer olarak karaciğer kaynaklıdır. Plasental ALP izoenzimi sağlı hamilelerin serumunda bulunur. Kemik ALP izoenzimi gençlerde ve büyümekte olan sağlıklı hayvanlarda da bulunur.

2.6. Serum Enzimlerini Tayin Yöntemleri

- **Kinetik ölçüm yöntemleri:** Birim zamandaki absorbans değişimi ölçülür. Enzimlerin katalitik aktivitelerinin tayininde kullanılan yöntemdir. Deney metodunda belirtilen bir süre sonra ilk absorbans değerleri okunur. Daha sonra birer dakika aralıklarla 2-3 defa daha absorbans değerleri okunur. Her iki okumanın farkı alınır. Bu okuma şekline $\Delta A / \text{dakika}$ yani delta dakika arası okuma denir. Dakika arası absorbans farkları toplanıp okuma aralığı sayısına bölünerek dakikadaki ortalama absorbans değişimi ($\Delta A / \text{dakika}$) bulunur.

$\Delta A_1 = A_2 - A_1$: İkinci dakika absorbans değerinden birinci dakika absorbans değeri çıkarılarak ΔA_1 değeri bulunur.

$\Delta A_2 = A_3 - A_2$: Üçüncü dakika absorbans değerinden ikinci dakika absorbans değeri çıkarılarak ΔA_2 değeri bulunur.

$\Delta A_3 = A_4 - A_3$: Dördüncü dakika absorbans değerinden üçüncü dakika absorbans değeri çıkarılarak ΔA_3 değeri bulunur.

Örnek:

$$\Delta A_1 = A_2 - A_1 = 0.15$$

$$\Delta A_2 = A_3 - A_2 = 0.17$$

$$\Delta A_3 = A_4 - A_3 = 0.14$$

$$\Delta A_1 + \Delta A_2 + \Delta A_3 = 0.15 + 0.17 + 0.14 = 0.46$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.46 / 3 = 0.153$$

- **End-point ölçüm yöntemleri:** Spektrofotometrik okumanın reaksiyon tamamlandıktan sonra tek seferde yapıldığı okumalardır.

Rutin ve araştırma laboratuvarlarında yapılan enzim aktivitesi tayinlerinin sonuçlarını karşılaştırmak için İnternasyonal Ünite (IU) birimi kullanılmaktadır. İnternasyonal ünite, belirli şartlar altında bir dakikada 1 mikro mol substratı ürüne çeviren enzim miktarıdır.

2.7. Spektrofotometrik Yöntemle Serum Enzimleri Tayini

- **Serum aspartat aminotransferaz aktivitesinin tayini**
- **Metot:** Kolorimetrik
 - **Prensip:** Bu metotla aspartat aminotransferaz (AST/SGOT) aktivitesinin tayini esası aşağıdaki reaksiyonda gösterilmiştir.



Oluşan okzalasetat, alkali ortamda 2.4 dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girer. Oluşan fenilhidrazonların renk şiddeti AST aktivitesi ile doğru orantılıdır.

- **Ayırıcılar**
- **Substrat:** Fosfat tamponunda 200mmol/ L aspartat, 2 mmol/L ketoglutarat içerir.
- **Renk ayırıcı**
 - 1mmol/L 2.4- dinitrofenilhidrazin içerir.
 - 0.4 N sodyum hidroksit
 - Standart 2 mmol/L piruvat içerir.
 - **Standart eğrinin çizilmesi:** Standart çözelti kullanılarak 0.22, 55, 95, 150 ve 215 SFU/ml (sigma- frankel ünitesi/ml) ALT aktivitesine karşı gelecek şekilde hazırlanan sulandırmalar aşağıdaki çalışma tablosunda verildiği üzere teste alınır. Bunlara karşı gelen optik dansiteler okunur. Optik dansiteler ve bunlara karşı gelen AST ve ALT aktiviteleri kullanılarak bir milimetrik kâğıt üzerinde standart eğri çizilir.
- **Teknik**
 - Bir deney tüpüne 0.5 ml substrat konulup, 37°C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilir.
 - Sonra 0.1 ml serum ilave edilir, çalkalanır, hemen su banyosuna tekrar konur ve 30 dakika inkübe edilir.
 - 30 dakika sonra su banyosundan çıkarılarak 0,5 ml renk ayırıcı eklenip, karıştırılır. 20 dakika oda ısısında bekletilir.
 - Daha sonra 5 ml 0,4 N NaOH eklenir, karıştırılır.
 - 5 dakika sonra spektrofotometrede 490 nm'de bidistile suya karşı okunur.

Tüp no	Standart çözelti	Substrat	Distile su	Serum AST	Serum ALT	Birim
1	0.000ml	0.500ml	0.1ml	0	0	SFU/mm ³
2	0.050ml	0.450ml	0.1ml	20	23	SFU/mm ³
3	0.100ml	0.400ml	0.1ml	55	50	SFU/mm ³
4	0.150ml	0.350ml	0.1ml	95	83	SFU/mm ³
5	0.200ml	0.300ml	0.1ml	148	125	SFU/mm ³
6	0.250ml	0.250ml	0.1ml	216	-	SFU/mm ³

- **Hesaplanması:** Standart eğriden okunan dansiteye karşılık gelen SFU/ml değerleri bulunur. İstenirse bu değerler 0,48 ile çarpılarak IU/L değerine çevrilebilir.

➤ **Serum alanin aminotransferaz (ALT/SGPT) aktivitesinin tayini**

- **Metot:** Kolorimetrik (test kitleri ile)
- **Prensip:** Bu metotla alanin aminotransferaz (ALT) aktivitesi tayininin esası aşağıdaki reaksiyonda gösterilmiştir.

ALT

Alfa- keto- glutarat+ alanin ←————→ Piruvat + L- glutamat

ALT etkisiyle alanin α - ketoglutarik asitle reaksiyona girer ve piruvat ile L- glutamata verir. Oluşan piruvat, alkali ortamda 2,4 dinitrofenilhidrazin ile reaksiyona girer. Oluşan fenilhidrazonların renk şiddeti ALT aktivitesi ile doğru orantılıdır.

- **Ayırıcılar**
- **Substrat:** Fosfat tamponunda 200mmol/L alanin, 2 mmol/L keto-glutarat içerir.
- **Renk ayırıcı**
 - 1mmol/L 2,4- dinitrofenilhidrazin içerir.
 - 0,4 N sodyum hidroksit
 - Standart 2 mmol/L piruvat içerir.
- **Standart eğrinin çizilmesi:** AST için standart eğrinin çizilmesi bölümünde verildi.
- **Teknik**
 - Bir deney tüpüne 0,5 ml substrat konulup, 37°C'deki su banyosunda 5 dakika bekletilir.
 - Sonra 0,1 ml serum ilave edilir, çalkalanır, hemen su banyosuna tekrar konur ve 60 dakika inkübe edilir.
 - 60 dakika sonra su banyosundan çıkarılarak 0,5 ml renk ayırıcı eklenip, karıştırılır. 20 dakika oda ısısında bekletilir.
 - Daha sonra 5 ml 4 N NaOH eklenir, karıştırılır, ve 5 dakika oda sıcaklığında bırakılır.
 - 5 dakika sonra spektrofotometrede 490 nm'de bidistile suya karşı okunur.

- **Hesaplanması:** Standart eğriden okunan optik dansiteye karşılık gelen SFU/ml değerleri bulunur. İstenirse bu değerler 0,48 ile çarpılarak IU/L değerine çevrilebilir.
- **Açıklama:** Materyal olarak serum veya plazma kullanılabilir. Serum hemolizsiz olmalıdır. Plazma heparin, okzalot veya sitrat kullanılarak elde edilebilir. AST ve ALT aktiviteleri üzerinde örneklerin saklama koşullarının önemli etkisi vardır. AST aktivitesi tayini için örnekler 25 °C'de 3 gün, 0- 4°C'de 1- 2 hafta ve 25 °C'de 1 ay dayanırken, ALT aktivitesi tayini için bu süreler 25 °C'de 2 gün, 0- 4°C'de 1 hafta ve 25 °C'de ise dayanıksız şeklindedir.

➤ **Karaciğer hastalıkları ile ilişkileri**

Transaminazlar (AST, ALT) bir amino asidin amino grubunu bir hidrokarbona aktararak yeni bir amino asit oluşturan enzimlerdir. Alanin amino transferaz (ALT yada GPT), aspartat amino transferaz (AST yada GOT), alkalen fosfataz (ALP) ve gama glutamil transferaz (GGT) karaciğer hastalıklarını tanımada klinik olarak sık kullanılan karaciğer enzimleridir. Ancak, bu değerler her zaman karaciğer fonksiyonlarını değerlendirmede kullanılamaz. Bazı karaciğer fonksiyon bozukluğu olaylarında tamamen normal olabilirler veya enzim düzeylerinde anormallik varken karaciğer fonksiyonları normal olabilir.

AST, CK ve LDH orta süreli bir yarı ömre sahip oldukları için bütün türlerde kas hasarını ve büyükbaş hayvanlarda karaciğer hastalıklarını araştırmada kullanılır. Buzağılarda kanarya otu zehirlenmesi, kontamina ringa balığı unu tüketen koyun ve ineklerin toksik hepatozu, atlarda kloroform ve halotan anestezisi ve atların karbontetraklorür zehirlenmesinde serum AST'de artış gözlenir.

Kedi ve köpeklerde serum AST'ı vücutta diğer dokulardan da (kalp, iskelet kası, böbrek ve beyin) köken alabilir. Karaciğer hastalıkları için serum AST spesifitesi ALT'den yüksek, fakat duyarlılığı düşüktür. Bu düşük duyarlılık yüksek bir negatif yanıtı verir. Bu yüzden serum AST değeri karaciğer hastalıkları için zayıf bir belirleme testidir. Buna rağmen, köpeklere oranla kedilerde daha iyi bir gösterge olarak kabul edilir.

ALT kedi ve köpeklerde özellikle karaciğer hücre hasarı açısından spesifik bir enzimdir. 100 İÜ/L altında olan normal plazma aktivitesi akut hepatit gibi hızlı gelişen durumlarda 5000 İÜ/L düzeyine çıkabilir. Genelde 150- 200 İÜ/L'den daha yüksek aktiviteler klinik olarak önemlidir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıda verilen işlem basamakları ve önerileri takip ederek ALP (Alkelen Fosfataz) tayini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kandan serum elde ediniz.	➤ Serum elde etme öğrenme faaliyetinden faydalanabilirsiniz.
➤ Cihazı (Spektrofotometre) çalıştırınız.	➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
➤ Cihazın göstergesinden “kinetik” yöntemi işaretleyiniz.	➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
➤ Cihazın göstergesinden “tekli veya çoklu analiz” seçimi yapınız.	➤ Amacınıza uygun seçim yapınız.
➤ Numune küvetine 4 ml reaktif I, 1 ml reaktif II ve 20 µl serum koyunuz.	➤ Hacim ölçümlerine dikkat ediniz.
➤ Kör küvetine 1 ml distile su koyunuz.	
➤ Küvetleri cihaza yerleştiriniz.	➤ Küvetlerin yönlerine dikkat ediniz.
➤ Absorbansı sıfırlayınız.	➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
➤ 405 veya 410 nm’de absorbansı okuyunuz.	➤ Dalga boyu ayarını kontrol ediniz.
➤ Sonucu hesaplayınız.	➤ Sonuçları kaydetmeyi unutmayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Birleşik proteinlerin proteinli kısmı aşağıdakilerden hangisidir?
A) Ko enzim
B) Haloenzim
C) Apo enzim
D) Aktivasyon enerjisi
E) Paralel enerji
2. Enzim reaksiyonu sonunda meydana gelen maddeye ne denir?
A) Ürün
B) Proteinaz
C) Haloenzim
D) Enzimin substratı
E) İzoenzim
3. Bir hücre içinde yapıldıktan sonra görev yapacağı hücre dışı ortama salınan enzimlere ne denir?
A) Koenzim
B) Haloenzim
C) Endo enzim
D) Enzimin substratı
E) Laktik dehidrogenaz
4. Ketoasitlerle aminoasitlerin birbirlerine dönüşümünü katalizleyen enzim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Transferaz
B) Transaminaz
C) Hekzokinaz
D) İzomeraz
E) Fosfataz
5. Aşağıdakilerden hangisi, kedi ve köpeklerde özellikle karaciğer hücre hasarı açısından spesifik bir enzimdir?
A) LDH
B) AST
C) CK
D) ALP
E) ALT

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

ÖĞRENME KAZANIMI

Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak flame fotometre ile kanda sodyum ve potasyum tayini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Kanda sodyum ve potasyumun yapılarını, özelliklerini kaynak kitap, anatomi atlası ve internet sitelerinden inceleyiniz.

3. KANDA SODYUM VE POTASYUM

3.1. Kanda Sodyum

Tuzun insan ve hayvan besinlerinin vazgeçilmez bir parçası olduğu eskiden beri bilinmektedir. Tuz, hem sodyum hem klor içerir ve bu iki elementin başlıca kaynağıdır. Sodyum doğada serbest formda bulunmaz, doğrudan doğruya halojenlerle (büyük ölçüde klorla) ve fosforla birleşmiş formda bulunur.

Klor, halojen ailesinden, sarı-yeşil renkte boğucu kokulu bir gazdır. Klor, sodyumdan farklı olarak, hem hücre içinde hem hücre dışında yüksek yoğunluklarda bulunur. Vücutta bulunan klorun, aşağı yukarı %85'i hücre arası sıvılarda yer alır. Geriye kalan klorun büyük bir kısmı kırmızı kan küreciklerinde ve bağırsaklarında bulunur. Deride, kaslarda, sinirlerde, kanda oldukça fazla miktarda klor vardır.

➤ Fonksiyonları

- Sodyum ve klor, potasyum ile birlikte osmotik basıncı korur ve asit-baz dengesini düzenler.
- Sodyum ve klor, besin maddelerinin hücrelere geçişlerini ve artık ürünlerin çıkışlarını kontrol eder.
- Kandaki katyonların %90'ını sodyum, anyonların ise üçte ikisini klor oluşturur.
- Sodyum ve klor, suyu organizmaya dağıtarak organizmanın normal sıvı volümünü düzenler.
- Sodyum, sinir uyarımlarının iletilmesinde, kas ve kalp kontraksiyonlarının muhafazasında başrolü oynar.
- Sodyum, kemiklerin bileşimine girer.

➤ **Sodyum yetersizliği**

- **Sodyum yetersizliğine maruz kümes kanatlılarında;** büyüme geriler, kemikler yumuşar, kornea keratinize olur, adrenaller aşırı büyür, yemi değerlendirme yeteneği geriler ve plazma sıvı volümü azalır.
- **Büyüme dönemindeki kanatlılarda sodyum yetersizliği;** birkaç hafta içinde, büyümede gerileme, yemi değerlendirme etkinliğinde azalma, su tüketiminde artma, protein ve enerji metabolizmalarında bozulma ile ortaya çıkar. Tuz bakımından yetersiz rasyonlar yedirilen tavuklar ağırlık kaybederler ve kannibalizme (yumurta tavuklarının birbirlerini gagaladıkları ve tüylerini yoldukları bir davranış şekli) eğilimli olurlar. Bunların yumurta verimleri ve yumurta ağırlıkları azalır.

3.2. Kanda Potasyum

Potasyumun insan ve hayvanlar için besinsel önemi eskiden beri bilinmektedir. Potasyum ilk kez, 1807 yılında Sir Humprey Davey tarafından izole edilmiştir. Ancak bitkiler alemindeki önemi 1840, hayvansal dokulardaki önemi ise 1883 yılında anlaşılmıştır. O zamandan bu yana, potasyumun fizyolojik önemi üzerinde ayrıntılı çalışmalar yapılmaktadır.

➤ **Fonksiyonları**

- Potasyum dokularda ve kan hücrelerinde bulunan başlıca bazdır ve asit-baz dengesinin düzenlenmesinde önemli rol oynar.
- Kanda hemaglobinle birlikte oksijen ve karbondioksitin taşınmasını sağlar.
- Sinir uyarımlarının kas liflerine iletilmelerini ve kasların kotraksiyonlarını, özellikle kalp kaslarının ritmik çalışmalarını sağlar.
- Birçok enzim sistemini kofaktör olarak etkiler.
- Hücre içi sıvıların osmotik basınçlarının yaklaşık %50'sini sağlar.

➤ **Potasyum yetersizliği**

Potasyum düzeyi düşük deneme rasyonu yedirilen tavuklarda potasyum yetersizliğinin işareti olarak tüm kaslarda ve ayaklarda zayıflık, kalp yetersizliği, bağırsak hareketlerinde gerileme ve solunum kaslarında zayıflık görülür.

Büyümede gerileme ve ölüm oranında artış, civcivlerde potasyum yetersizliğinin başlıca işaretleridir. Bu işaretler yem tüketimindeki azalma ve protein metabolizmasının bozulmasının bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.

Potasyumca yetersiz rasyon tüketen civcivler, 50 günlükken ölebilirler. Ölümden önce tetanik felçler de kaslar gevşeyemezler, zayıflık, ayakları kullanma kaybı, fazla miktarda su atımı, böbreklerde lezyonlar görülür.

Potasyum yetersizliği bazı tür streslerde de ileri gelebilir. Stres süresince, aldosteron hormonun etkisi ile idrar üzerinden potasyum atımı artar. Sıcak stresine maruz broylelere ek potasyum verilmesinin ağırlık kazancını arttırdığı bildirilmiştir.

3.3. Kanda Sodyum ve Potasyum Tayini

- **Serumda sodyum miktar tayini (Alev fotometresi ile)**
 - **Prensip:** Metal iyonları alevde yakıldığı zaman iyonların enerji vermesi ve karakteristik bir ışık yayması esasına dayanır. Sodyum yanarken aleve sarı renk, potasyum yanarken aleve mor renk verir. Oluşan rengin şiddeti alevde yakılan metalin miktarı ile doğru orantılıdır.
 - **Ayırıcılar**

%50 mg Na standardı (NaCl ile hazırlanır.). Bu çözeltiden aşağıdaki şekilde standartlar hazırlanır.

	%1 mg	%2 mg	%3 mg	%4 mg	%5 mg
Deiyonize su	9.8ml	9.6ml	9.4ml	9.2ml	9ml
Na çözeltisi	0.2ml	0.4ml	0.6ml	0.8ml	1ml

- **Serum örneğinin hazırlanması:** Serum 100 defa sulandırılır. Bunun için 0.1ml serum 9.9 ml deiyonize su ile karıştırılır.
- **Teknik**
 - Alev fotometresinde Na filtresi takılı iken deiyonize su ile cihazın '0' sıfır ayarı %5 mg'lık standart tüp ile 100 ayarı yapılır.
 - Sıfır ve 100 ayarı yapılmış alette sırayla standart tüpler okunur.
 - Aynı şekilde sulandırılmış serum örneği de okunur.
- **Hesaplama**

Standart tüpler ile çizilen grafikten serum için %mg olarak Na okunur, okunan değer 100 ile (sulandırma sayısı ile) çarpılır.

- **Serumda potasyum miktar tayini (Alev fotometresi ile)**

- **Prensip:** Serumda sodyum miktar tayini ile aynıdır.
- **Ayırıcılar**

%50 mg K standardı (KCl ile hazırlanır.). Bu çözeltiden aşağıdaki şekilde bir seri standartlar hazırlanır.

	%1 mg	%1.5mg	%2mg	%3 mg
Deiyonize su	9.8ml	9.7ml	9.6ml	9.4ml
K çözeltisi	0.2ml	0.3ml	0.4ml	0.6ml

- **Serum örneğinin hazırlanması:** Hücre içi K varlığı deneyin sonucunu etkiler, bu nedenle serum hemolizsiz olmalıdır. Serum 10 kez sulandırılır. Bunun için 1 ml serum 9 ml deiyonize su ile karıştırılır.
- **Teknik**
 - Alev fotometresinde K filtresi takılı iken deiyonize su ile cihazın '0' sıfır ayarı %3 mg'lık standart tüp ile 100 ayarı yapılır.
 - Sıfır ve 100 ayarı yapılmış alette sırayla standart tüpler okunur.
 - Aynı şekilde sulandırılmış serum örneği de okunur.
- **Hesaplama**

Standart tüpler ile çizilen grafikten serum için %mg olarak K okunur, okunan değer 10 ile (sulandırma sayısı ile) çarpılır.

- **Na ve K miktarı tayininde kullanılan stok K ve Na çözeltileri**

KCl ve NaCl etüvde 110°C'de kurutulup desikatörde soğutulur. Bu şekilde hazırlanan NaCl'den 0.634 gr tartılıp 500 ml'lik balona konur, bidistile su ile eritilip 500 ml'ye tamamlanır. Bu stok çözeltinin 100 ml'sinde 50 mg Na bulunur. KCl'den de 0.477 gr tartılıp bidistile su ile eritilip, 500 ml'ye tamamlanır. Bununda 100 ml'sinde 50 mg K bulunur. Bu stok çözeltiler polietilen kaplarda saklanır. Bunlar 3- 4 ayda bir yenilenmelidir. Bu stok çözeltilerin muhafaza edildikleri yerde hava cereyanı ve toz bulunmamalıdır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak kanda sodyum ve potasyum tayini işlemlerini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
<ul style="list-style-type: none">➤ Kanda sodyum tayini➤ Analiz için gerekli araç-gereçleri hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Araç, gereçlerin tam olduğundan emin olunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Serum elde ediniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Serum elde etme öğrenme faaliyetinden faydalanabilirsiniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Standart çözeltileri hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Çözelti hazırlama kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Flame fotometresinin ısı ayarını yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Cihazı 589 nm'ye ayarlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Dalga boyu ayarını kontrol ediniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Saf su ve standart çözelti ile cihazı ayarlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Kalibrasyon grafiği çiziniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Bilgisayarda excell programından faydalanabilirsiniz. Klasik yöntemle yaparsanız milimetrik kâğıt kullanınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Numuneyi cihaza yerleştirerek okuma yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Örnekteki sodyum miktarını grafikten bulunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Grafik okuma kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Kanda potasyum tayini➤ Analiz için gerekli araç-gereçleri hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Araç, gereçlerin tam olduğundan emin olunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Serum elde ediniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Serum elde etme öğrenme faaliyetinden faydalanabilirsiniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Standart çözeltileri hazırlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Çözelti hazırlama kurallarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Flame fotometresinin ısı ayarını yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Cihazı 767 nm'ye ayarlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Dalga boyu ayarını kontrol ediniz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Saf su ve standart çözelti ile cihazı ayarlayınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Kalibrasyon grafiği çiziniz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Bilgisayarda excell programından faydalanabilirsiniz. Klasik yöntemle yaparsanız milimetrik kâğıt kullanınız.
<ul style="list-style-type: none">➤ Numuneyi cihaza yerleştirerek okuma yapınız.	<ul style="list-style-type: none">➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
<ul style="list-style-type: none">➤ Örnekteki potasyum miktarını grafikten bulunuz.	<ul style="list-style-type: none">➤ Grafik okuma kurallarına uyunuz.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Vücutta bulunan klorun, yüzde (%) kaç hücre arası sıvılarda yer alır?
A) %55
B) %60
C) %65
D) %75
E) %85
2. Metal iyonlarından sodyum alevde yandığı zaman oluşan renk aşağıdakilerden hangisidir?
A) Yeşil
B) Sarı
C) Mavi
D) Kırmızı
E) Turuncu
3. Aşağıda sodyum için verilen bilgilerden hangisi yanlıştır?
A) Sodyum, kemiklerin bileşimine girer.
B) Sodyum ve klor, potasyum ile birlikte osmotik basıncı korur ve asit-baz dengesini düzenler.
C) Kandaki katyonların %90'ını sodyum, anyonların ise üçte ikisini klor oluşturur.
D) Sodyum ve klor, besin maddelerinin hücrelere alınımını ve artık ürünlerin hücre içinde depolanmasını sağlar.
E) Sodyum, sinir uyarımlarının iletilmesinde, kas ve kalp kontraksiyonlarının muhafazasında baş rolü oynar.
4. Aşağıdaki maddelerin hangisinin eksikliğinde kümes kanatlılarında; büyüme geriler, kemikler yumuşar, kornea keratinize olur, adrenaller aşırı büyür, yemi değerlendirme yeteneği geriler?
A) Klor
B) Sodyum
C) Potasyum
D) Kalsiyum
E) Fosfor

5. Aşağıdaki maddelerin hangisinin eksikliğinde kümes kanatlılarında; tüm kaslarda ve ayaklarda zayıflık, kalp yetersizliği, bağırsak hareketlerinde gerileme ve solunum kaslarında zayıflık görülür?
- A) Klor
 - B) Sodyum
 - C) Potasyum
 - D) Kalsiyum
 - E) Fosfor

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-4

ÖĞRENME KAZANIMI

Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak spektrofotometre ile kanda kalsiyum ve fosfor tayini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Kanda kalsiyum ve fosforun yapılarını, özelliklerini kaynak kitap, anatomi atlası ve internet sitelerinden inceleyiniz.

4. KANDA KALSİYUM VE FOSFOR

4.1. Kanda Kalsiyum

Vücutta bulunan kalsiyumun (Ca) büyük bir kısmı kemik dokusunda fosfatla (P) birlikte bulunur. Vücut teşekkülünün %70'den fazlasını Ca ve P oluşturur.

Kalsiyum omurgalı hayvanların homeostazisinin (hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için, iç ortamın dengesini koruması) muhafazasında rol alan önemli bir mineraldir. Kalsiyum, kayalarda kireç taşı, mermer ya da tebeşir formunda yaygın olarak bulunan yumuşak ve beyaz renkli bir elementtir. Sodyumdan daha sert, fakat alüminyum ve magnezyumdan daha yumuşaktır. Kalsiyum hayvan vücudunda en fazla bulunan elementtir. Vücuttaki kalsiyumun %99'u kemiklerde geriye kalan kısmı ise vücut sıvılarında bulunur.

Kalsiyum konsantrasyonun, dışardan alımlar ve vücuttan atılımların çeşitliliğine rağmen, korunması için 3 ana hormonal kontrol mekanizması gelişmiştir. Bunlar paratiroid hormon (PTH), kalsitonin (CT) ve vitamin D'dir. Bu hormonlar dışındaki bazı hormonlarda kalsiyum dengesinin korunmasında belli koşullarda etkili olabilir. Kalsiyum konsantrasyonundaki dengesizlikler metabolik hastalıklara yol açar. Bu dengesizlikler fazlalık olarak veya azlık olarak karşımıza çıkar. Fazlalığına hiperkalsemi, azlığına hipokalsemi denir.

- **Fonksiyonları**
 - Kemiklerin en önemli ögesidir.
 - Kanın pıhtılaşma mekanizmasında protrombinin trombine dönüşmesi için kanda bulunması zorunludur.
 - Bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim ya da enzim aktivatörü olarak görev yapar.
 - Serum kalsiyum düzeyi düştüğü zaman sinirlerin duyarlılığı artar, aşırı düşüklük tetaniye neden olur ve tedavi edilmez ise ölüme götürür.

- Sodyum ve potasyum ile birlikte kalp atışını düzenler.
- Kas kontraksiyonu, hücre zarı geçirgenliği ve kalp kasları fonksiyonları için gereklidir.

➤ **Kalsiyum yetersizliği**

Büyüme dönemindeki kanatlılarda hem kalsiyum hem de fosfor yetersizliğinde görülen başlıca semptomlar; kemik mineralizasyonunda gerileme, kemiklerin kolayca kırılmaları, kül ve kalsiyum içeriklerinin normalin yarısına kadar düşmesidir.

Yumurta kabuğu kalitesinin korunmasında en önemli mineral kalsiyumdur. Kalsiyum yetersizliğinin yumurta tavuklarında klinik belirtileri;

- Yumurta veriminin azalması ya da durması
- Yem tüketiminin ve yemi değerlendirmenin gerilemesi
- Yumurta kabuğu kalitesinin azalması
- Yumurta içi kalitesinde düşüş (kan lekeleri ve yumurta sarısında benekler)
- Döl verimi bozukluklarıdır (çıkış gücünde azalma, zayıf embriyo ve embriyoda deformasyon).

İskelette; kemik rezorpsiyonunda artış, kafes yorgunluğu, osteoporoz, raşitizm, yumuşak gaga, felç, kaslarda katılık, topallık, kaburgalarda yumrular, eklemlerde genişleme, anormal duruş ve biçimsiz kemik oluşumu (sırtta kavislenme, uzun kemiklerde dışa doğru eğilme) gibi semptomlar ortaya çıkar.

Piliçler, yumurtlama periyodu başında, yumurta kabuğu oluşturmak için yumurtalığa kalsiyum sağlama gereksinimi ile önemli bir metabolik strese maruz kalırlar. Bu periyot süresince, bazı hayvanlar kemiklerden fazla miktarda kalsiyum mobilize ederler. Bu durumda kemikler o kadar fazla mineral kaybederler ki, hayvanlar ayakta duramayacak hale gelirler ve felç olmuş izlenimi verirler. Bunların göğüs ve kaburga kemikleri deforme olur ve tüm kemikler kolaylıkla kırılabilir. Bu durum, genellikle kafes yorgunluğu terimi ile tanımlanır. Kafes yorgunluğuna maruz hayvanlar felçli görünümde dirler. Bunlar ayağa kalkamazlar ya da ayakta duramazlar.

4.2. Kanda Fosfor

Fosfor doğada serbest formda bulunmaz. Yeryüzünde bulunan en yaygın fosfor kaynağı volkanik kayalardır. Fosfor bütün yemlerde bulunur. Kemik unu, et-kemik unu ve balık unu gibi hayvansal kaynaklı yemler, fazla miktarda hem kalsiyum hem de fosfor içerirler.

➤ **Fonksiyonları**

- Kemiklerin ana öğelerindendir.
- Nükleik asitlerin ve fosfoproteinlerin öğesidir.
- Enerji yönünden zengin fosfatların ve fosfolipidlerin öğesidir.
- Kanda ve diğer vücut sıvılarında tampon maddedir.

➤ Fosfor yetersizliği

Kümes kanatlılarında fosfor yetersizliğinin ilk klinik işareti anoreksiya (iştahsızlık) dır. Ancak anoreksiya, spesifik bir fosfor yetersizliği işareti değildir. Fosfor yetersizliği, yumurtlayan tavuklarda ölüm oranını arttırır. Aşırı fosfor yetersizliğinde, 10-12 gün içinde iştah kaybı, zayıflık ve ölüm oranında artış ortaya çıkar. Daha hafif bir fosfor yetersizliği, raşitizme ve büyümenin durmasına neden olur.

Büyüme dönemindeki hayvanlarda fosfor yetersizliğinin başlıca klinik işareti, kalsiyum yetersizliğinde olduğu gibi kemik mineralizasyonunun azalması sonucu kemiklerin kolaylıkla kırılabilir hale gelmesi ve kemiklerin kül içeriğinin normalin yarısına kadar düşmesidir.

4.3. Kanda Kalsiyum ve Fosfor Tayini

➤ Kramer-Tisdall metodu ile serum kalsiyum tayini

- **Metot:** Titrimetrik
- **Prensip:** Kalsiyum, amonyum okzalat ile kalsiyum okzalat halinde çöktürülür. Tortu, sulu amonyak ile yıkanır, H₂SO₄ ilave edilir. Bu suretle serbest hale geçirilen okzalik asit, potasyum permanganat ile titre edilir.
- **Ayırıcılar**
 - %4 Amonyum okzalat
 - 0.01 N Potasyum permanganat(KMnO₄)
 - Sulu amonyak
 - 1N H₂SO₄
- **Teknik**
 - Bir santrifüj tüpüne 2 ml serum konur.
 - Üzerine 2 ml distile su, 1ml %4 amonyum okzalat konur ve karıştırılır.
 - En az 30 dakika bekletilir.
 - Sonra tüpün altından fiskelemek suretiyle tekrar karıştırılır.
 - 5 dakika 1500 rpm'de santrifüj edilir.
 - Üstteki sıvı dikkatle dökülür.
 - Santrifüj tüpü temiz bir tabaka süzgeç kâğıdı üzerine baş aşağı konur ve böylece arta kalan sıvı uzaklaştırılmış olur.
 - Tüpün iç yüzü 3 ml sulu amonyak ile yıkanır.
 - Tekrar santrifüj edilir.
 - Üstteki sıvı uzaklaştırılır.
 - Amonyakla yıkama bir defa daha yapılır.
 - Yıkama suyu uzaklaştırıldıktan sonra üzerine 2 ml 1 N H₂SO₄ ilave edilir.
 - Tüp kaynar su banyosunda 1 dakika tutulduktan sonra en az 1 dakika içinde değişmeyen gül rengi oluşuncaya kadar 0.01 N KMnO₄ ile titre edilir.
 - Harcanan her ml 0.01 N KMnO₄ 0.2 mg kalsiyuma denk gelir.

- **Hesaplanması**
 - $\text{mg/dl Ca} = (\text{Harcanan KMnO}_4 (\text{ml}) \cdot 0,2 \cdot 100) / 2$

➤ **İnorganik serum fosfor tayini**

- **Metot:** Modifiye Younburg
- **Prensip:** Proteinsiz serumda fosfor, sülfomolibdik asit ile reaksiyona girerek fosfomolibdik asit oluşturur. Fosfomolibdik asit ise SnCl_2 tarafından mavi renkli kompleks bileşiklere (koloidal molibden oksit) indirgenir. Testlerde oluşan renkler standart fosfat çözeltilerinde oluşan mavi renkler ile karşılaştırılır.
- **Ayırıcılar**
 - **%10 Triklor asetik asit (TCA):** 10 gr TCA tartılır ve distile su ile çözülüp 100 ml'ye tamamlanır.
 - **Stok fosfat çözeltisi:** 0.4389 gr KH_2PO_4 bir litre distile suda eritilerek hazırlanır. Muhafaza için birkaç damla kloroform ilave edilmelidir.
 - **Standart fosfat çözeltisi:** 10 ml stok fosfat çözeltisinden alınarak distile su ile 100 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin 1 ml'si 0.01 mg P içerir.
 - **Sülfomolibdik asit:** Eşit miktarda 10 N H_2SO_4 ve %7.8 sodyum molibdat çözeltisi karıştırılarak hazırlanır.
 - **Stok kalay (II)- klorür çözeltisi:** 10 gr SnCl_2 25 ml yoğun HCl içerisinde çözülür.
 - **Dilüe kalay (II)- klorür çözeltisi:** 1 ml stok SnCl_2 çözeltisi alınır ve distile su ile 200 ml'ye tamamlanır.
- **Teknik**
 - 1 ml serum üzerine 4 ml %10'luk TCA eklenir ve karıştırılır.
 - İki dakika sonra fosforsuz filtre kâğıdından süzülür.
 - Süzüntüden 1 ml alınır, üzerine 13 ml distile su ve 4 ml sülfomolibdik asit ile 2 ml dilüe SnCl_2 çözeltisi eklenir ve hemen karıştırılır.
 - 15 dakika sonra, oluşan rengin transmisyonu bidistile su ile 100 ayarı yapılarak, 520 nm'de blanka karşı spektrofotometrede okunur.
- **Standart eğrinin çizilmesi**
 - 50 ml'lik 6 erlanmayer alınır ve ml olarak tabloda gösterilen miktarlarda ayırıcılar konur.

	%0 mg P	%2.5mg P	%5mg P	%7.5mg P	%10 mg P	%15mg P
Standart P çözeltisi	0.0	0.5 ml	1 ml	1.5 ml	2 ml	3 ml
Deiyonize su	14 ml	13.5 ml	13 ml	12.5 ml	12 ml	11 ml
Molibdik sülfürik asit ayıracı	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml	4 ml
Dilüe SnCl ₂	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml

- Karıştırılır 15 dakika bekletilir.
- 520 nm ayarlı spektrofotometrede okunur.
- Erlenlerden her birisi sıra ile kanda % 2.5, 5, 7.5, 10 ve 15 mg anorganik fosfor konsantrasyonuna tekabül eder.
- Elde edilen transmisyonlar ile kalibrasyon grafiği hazırlanır.

➤ **Toplam fosfor tayini**

Toplam fosfor tayini için serum örnekleri yakma işlemine tabi tutulur. Böylece, kademeli olarak artan ısıda küllendirilen serum örneklerinde mevcut fosfor daha sonra mineral asit ile (3 N HCl) yeniden kristalleştirilerek çözelti haline getirilir. Bundan sonra, aynen inorganik fosfor analizinde olduğu gibi işleme devam edilir.

Toplam fosfor tayini için 1'er ml'lik serum örnekleri, önceden asitten geçirilip yıkanmış, porselen krezeller içerisine konulup yakma fırınında sırasıyla 100°C, 200°C ve 300°C'de birer saat ve daha sonra 550°C'de 10 saat yakma işlemine tabi tutulur. Her örneğin çift çalışılması önerilir. Yakma işlemi tamamlandığı zaman kül haline gelmiş örneklerin her biri 4'er ml 3N HCl ile muamele edilerek fosfor kristal haline getirilir. Elde edilen bu çözelti şayet mineral madde açısından çok yoğun ise sulandırma işlemine tabi tutulur.

Bundan sonra inorganik fosfor için bildirilen yöntem uygulanarak fosfor tayini gerçekleştirilir. Sonuçta, bulunan toplam ve inorganik fosfor değerlerinden yararlanarak, organik fosfor değerleri de toplamdan inorganikliği çıkarmak suretiyle hesaplanır.

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak kanda kalsiyum ve fosfor tayini işlemlerini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
Kanda kalsiyum tayini ➤ Analiz için gerekli araç gereçleri hazırlayınız.	➤ Araç, gereçlerin tam olduğundan emin olunuz.
➤ Serum elde ediniz.	➤ Serum elde etme öğrenme faaliyetinden faydalanabilirsiniz.
➤ Numune küvetine 20 µl serum ve 2 ml reaktif koyunuz.	➤ Hacim ölçme kurallarına uyunuz.
➤ Standart küvetine 20 µl standart çözelti ve 2 ml reaktif koyunuz.	
➤ Kör (blank) küvetine 20 µl distile su ve 2 ml reaktif koyunuz.	
➤ Oda ısısında 3 dakika bekletiniz.	➤ Sıcaklık ve süre ayarlarına dikkat ediniz.
➤ 573 (560–580) nm’ de okuma yapınız.	➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz. ➤ Dalga boyu ayarını kontrol ediniz.
➤ Hesaplama yapınız.	➤ Sonuçları kaydetmeyi unutmayınız.
Kanda fosfor tayini ➤ Analiz için gerekli araç gereçleri hazırlayınız.	➤ Araç, gereçlerin tam olduğundan emin olunuz.
➤ Serum elde ediniz.	➤ Serum elde etme öğrenme faaliyetinden faydalanabilirsiniz.
➤ Numune küvetine 20 µl serum ve 2 ml reaktif koyunuz.	➤ Hacim ölçme kurallarına uyunuz.
➤ Standart küvetine 20 µl standart çözelti ve 2 ml reaktif koyunuz.	
➤ Numune kör (blank) küvetine 50 µl sitrik asit 20 µl serum ve 2 ml reaktif koyunuz.	
➤ Reaktif kör küvetine 20 µl distile su ve 2 ml reaktif koyunuz.	
➤ Oda ısısında 5 dakika bekletiniz.	➤ Sıcaklık ve süre ayarlarına dikkat ediniz.
➤ 340 nm’ de okuma yapınız.	➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz. ➤ Dalga boyu ayarını kontrol ediniz.
➤ Hesaplama yapınız.	➤ Sonuçları kaydetmeyi unutmayınız.

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Omurgalı hayvanların homeostazisinin (hücresinin yaşamını sürdürebilmesi için, iç ortamın dengesini koruması) muhafazasında rol alan mineral aşağıdakilerden hangisidir?
A) Potasyum
B) Fosfor
C) Kalsiyum
D) Sodyum
E) Magnezyum
2. Kalsiyum fazlalığına verilen ad aşağıdakilerden hangisidir?
A) Hiperkalsemi
B) Hipernatremi
C) Hipokalsemi
D) Hiponatremi
E) Hematüri
3. Aşağıdakilerden hangisi, kalsiyumun görevlerinden değildir?
A) A) Kemiklerin en önemli ögesi.
B) B) Kas kontraksiyonu, hücre zarı geçirgenliği ve kalp kasları fonksiyonları için gereklidir.
C) C) Sodyum ve potasyum ile birlikte kalp atışını düzenler.
D) D) Kanda ve diğer vücut sıvılarında tampon maddedir.
E) E) Bazı enzimatik reaksiyonlarda koenzim ya da enzim aktivatörü olarak görev yapar.
4. Yumurta kabuğu kalitesinin korunmasında en önemli mineral aşağıdakilerden hangisidir?
A) Potasyum
B) Fosfor
C) Sodyum
D) Magnezyum
E) Kalsiyum
5. Aşağıdakilerden hangisi büyüme dönemindeki kanatlılarda hem kalsiyum hem de fosfor yetersizliğinde görülen başlıca semptomlardan birisi değildir?
A) Kemik mineralizasyonunda gerileme
B) Kemiklerin kolayca kırılmaları
C) Kül ve kalsiyum içeriklerinin normalin yarısına kadar düşmesidir
D) İştah kaybı, zayıflık ve ölüm oranında artış
E) Hiçbiri

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki öğrenme faaliyetine geçiniz.

ÖĞRENME FAALİYETİ-5

ÖĞRENME KAZANIMI

Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak otoanalizör ile tekniğine uygun biyokimyasal testler yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Otoanalizörlerle yapılan analizler hakkında bilgi edininiz.
- Otoanalizörlerin çalışma sistemleri ve prensipleri hakkında araştırma yapınız.

5. OTOANALİZÖR İLE BİYOKİMYASAL TESTLER

Otomasyon, bir işin insan ile makine arasında paylaşılmasıdır. Toplam işin paylaşım yüzdesi otomasyonun düzeyini belirler. Otomasyon açısından sağlık alanı hızla gelişip, yenilenmektedir. Bu gelişmeye paralel olarak yeni hastalıklar ve hastalıkların tedavisi için yeni yöntem ve tekniklerle, laboratuvar testleri ve analiz yöntemleri geliştirilmektedir. Klinik laboratuvarlarda analizi istenen testlerin sayısının giderek artması iş yoğunluğunun ve hata oranlarının da artmasına neden olmuştur. Laboratuvar çalışmalarında analizleri hızlı, standart, güvenli ve verimli kılmak otomasyonu zorunluluk hâline getirmiştir.

5.1. Otoanalizörler

Kan, serum, plazma, idrar gibi biyolojik maddelerin içinde bulunan organik ve inorganik maddeleri çeşitli parametreler kullanarak otomatik olarak analiz eden cihazlara **otoanalizör** denir.

Otoanalizörler, her numuneden sadece istenilen testlerin analizini yapar. Analizleri yaparken mikroişlemciler kullanılmaktadır. Reaktiflerin katkısı ile meydana getirilen biyokimyasal olaylar **reaksiyon cell** adı verilen özel havuzlarda meydana gelmekte ve ölçümler de burada yapılmaktadır. Tüm reaksiyon celler, reaksiyon disk üzerinde toplanmıştır. Bu reaksiyon disk ise ısısı normal vücut ısısına eşit olan bir su havuzu, jel havuzu veya hava havuzu içine yerleştirilmiştir. Böylece reaksiyonlar gerçek ortama en yakın koşullarda meydana getirilebilmektedir.

Klinikte hastalıkların teşhisi, birbirine benzer hastalıkların ayırt edilmesi ve tedavilerinin izlenebilmesi amacıyla yapılan analizlerin standart, güvenli, hızlı yapılabilmesi için ayrıca verilerin merkezî sistemle toplanması, laboratuvar sonuçlarının takip edilmesi,

arşiv sorununun çözülmesi ve nihayet hasta memnuniyeti otoanalizörlerin önemini ortaya koymaktadır.

➤ **Otoanalizörlerin çalışma sistemi**

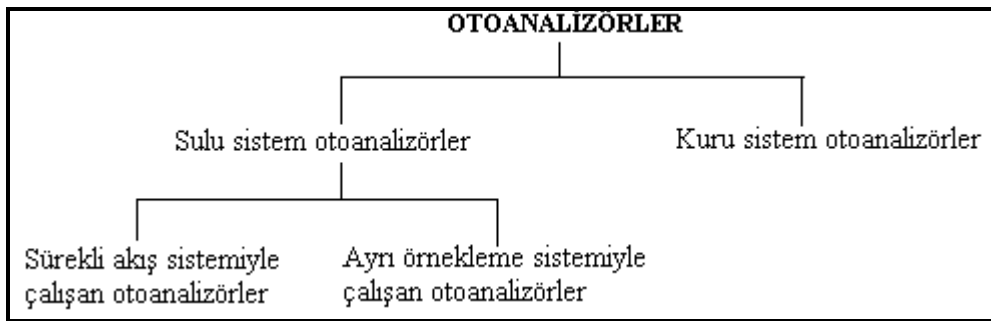
Laboratuvarlarda kullanılan otoanalizörlerin çalışma sistemi çok basittir. Her test için ayrı kit kullanılır. Hasta numunesi ve reaktifler laboratuvar teknisyeni tarafından cihazın ilgili aparatlarına konur. Sonuçlar otomatik olarak hesaplanır ve kayıt edilir. Otoanalizörün yazıcısından analiz sonuçları rapor hâlinde alınır.

➤ **Otoanalizörlerin önemli özellikleri**

- Küvetler ve godeler, tek kullanımlık olmalı veya özel camdan yapılmış olup cihaz tarafından yıkanabilir olmalıdır.
- Proplar reaktif ve serum seviyesine karşı sensörlü olmalıdır.
- Pıhtı ve köpüğe karşı dedektörlü olmalıdır.
- Otomatik dilüsyonlu olmalıdır.
- Reaktif bölmesi ile kontrol ve kalibratörlerin bölmesi soğutmalı olmalıdır.
- Bazı önemli uyarıları sesli mesaj şeklinde bildirmelidir.
- Kapsamlı bir kalite kontrol programına sahip olmalıdır.
- Acil numune girişi olmalıdır.
- İkterik (sarılık), lipemik (bulanık) ve hemolizli serumlara karşı duyarlı olmalıdır.

➤ **Otoanalizör çeşitleri**

Otoanalizörler, çalışma sistemi olarak kuru sistem otoanalizörler ve sulu sistem otoanalizörler olmak üzere iki gruba ayrılır.



Şema 5.1: Otoanalizör çeşitleri

- **Kuru sistem otoanalizörler ve çalışma prensibi**

Kuru sistem otoanalizörler, çok küçük hasta materyallerini rahatça analiz edebilir ve çalışma sırasında kalite kontrolünü yapabilir. Bu özelliği diğer sistemlerden farkını gösterir. Hata kaynaklarını daha iyi belirleyerek sonuçların doğruluğunu ve geçerliliğini artırır. Çok katlı kuru slayt otoanalizörleri yoğun olarak idrar analizlerinde kullanılır. Analizlerde slaytlar değerlendirilir. Slaytlar, birkaç katlı jelatin tabakadan meydana gelmiştir. Her tabakanın kimyasal yapısı farklıdır. Analiz için kullanılan slaytlar genellikle üç tabakadan oluşur.

Yayılma tabakası: Üzerine tatbik edilen hasta materyalini çok çabuk absorbe ederek slayt üzerine yayılmasını sağlar. Mikro filtre işlemi yaparak hasta materyali içinde bulunan büyük partiküllerin absorbe edilmesini önler. Hasta materyalinin kılcal etkiyle çok hızlı olarak her tarafa yayılmasını sağlar. Materyal biyolojik reaksiyonun sonuna kadar burada tutulur. Reaksiyonlar sonucu oluşan renklerin şiddetinin değerlendirilmesi için yansıtmayı sağlayan beyaz boyayı da bünyesinde bulundurur.

Reaktif tabakası: Analizi yapılacak madde ile reaksiyona girebilecek kuru reaktifleri bünyesinde bulunduran tabakadır.

Okuma tabakası: Yayma tabakasındaki beyaz boya, birinci tabakada tutulan farklı maddelerin oluşturduğu rengin okuma tabakasına etki etmesini engeller. Son tabakada oluşan rengin okunması, slaytın ortasındaki küçük bölgede yapılarak sonucun materyal hacmindeki küçük değişikliklerden etkilenmemesi sağlanır. Reaksiyon sonucu oluşan renklerin şiddeti, slaytın yansıyan ışığıyla ölçülür.

Kuru sistem analizörler; etkileşimi en aza, kimyasal reaksiyonları en iyiye yönelterek tüm analizlerin daha kolay ve daha ekonomik tam kuru metotlarla yapılmasını sağlar.

- **Sulu sistem otoanalizörler ve çalışma prensibi**

Bünyelerinde analiz için kullandıkları reaktifler sıvıdır. Seyreltme, yıkama ve boşaltma işlemleri yapabilen sistemleri, ayrıca her reaksiyon için özel reaksiyon küveti üretebilen çeşitleri de vardır. Sulu sistem otoanalizörler, yapı olarak sürekli akış sistemi ve ayrı örnekleme sistemiyle çalışan otoanalizörler olarak iki çeşittir.

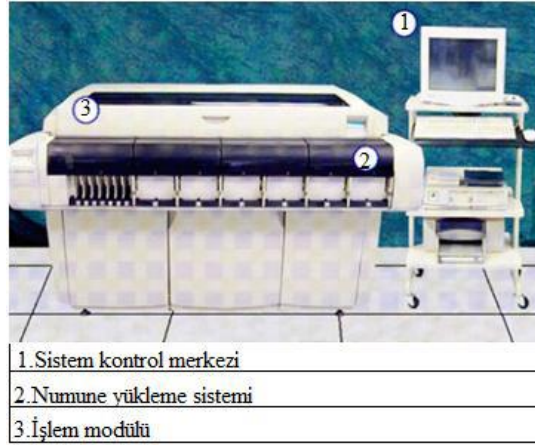
Sürekli akış sistemi ile çalışan otoanalizörlerin özellikleri: Hasta numunelerinin yerleştirilmesinden, sonuçlarının alınmasına kadar olan tüm işlemleri laboratuvar teknisyeninin müdahalesini gerektirmeden otomatik olarak yapar. Tüm yıkama işlemleri cihazla birlikte monte edilen deiyonize su sistemi ile gerçekleştirilir.

Ayrı örnekleme sistemiyle çalışan otoanalizörler: Hasta materyali ve reaktifler, istenilen hacimlerde ayrı ayrı uygun kaplar içine pipetlenir. Test tekniğine uygun olarak istenilen süre bekletilir. Süre sonunda oluşan renkli karışımın renk şiddeti analizörün fotometresi tarafından ölçülür, çıkan değerler sayısal işlemlere dönüştürülerek yazıcıdan verilir.

- **Otoanalizörün genel yapısı**

Laboratuvarlarda kullanılan otoanalizörlerin çalışma sistemi ve prensipleri aynı olmakla birlikte kapasite ve görüntü bakımından değişiklikler gösterebilir. Burada anlatılan sulu sistem bir otoanalizör olup biyokimya laboratuvarlarında kullanılan son derece gelişmiş bir cihazdır.

Otoanalizörler; sistem kontrol merkezi, numune yükleme sistemi, işlem modülü olmak üzere üç bölümden oluşur.



Resim 5.1: Otoanalizör bölümleri

Sistem kontrol merkezi: Sistem kontrol merkezi, kullanıcı ara yüzü olup bilgi yönetim ve giriş merkezidir. Bu sistemden haricî bir bilgi bankasına çift taraflı bilgi göndermek ve almak mümkündür. Sistem kontrol merkezi bunların dışında; kalibratör, kontrol ve hasta test taleplerinin girişi, kalibratör, kontrol ve hasta test sonuçlarının izlenmesi, bakım ve onarım çalışmalarının yönetilmesi, sistem kontrolünün yapılması işlemlerini kapsar.

Numune yükleme sistemi (Retest Sample Handler / RSH): Kalibratör, kontrol ve hasta numunelerinin yüklendiği sistemdir. Standart ve laboratuvar otomasyon modeli olmak üzere iki şekilde üretilir.

İşlem modülü: İşlem modülü, örnek işlemleri gerçekleştiren kimyasal bir analiz cihazıdır. Modül, cihaz üzerinde sıcaklık kontrollü iki ayrı reaktif kaynağı merkezinden 56 – 65 reaktif kullanarak örnek/ saat başı 800'e (Bu sayı seçilen cihazın özelliğine bağlı olarak değişir.) kadar fotometrik ve 600'e kadar potansiyometrik test gerçekleştirir.

5.2. Otoanalizörlerle Ölçüm Yapma

- Otoanalizörle çalışma öncesinde yapılması gerekli ön işlemler
 - Reaktif pipetleme mekanizması probunun sağlam olup olmadığı kontrol edilir.
 - Reaktif disklerinde bulunan çözeltilerin dolu olup olmadığı kontrol edilir.
 - Mikrobilgisayar üzerinde bulunan disketlerin, sürücüde sistem ve veri olarak yerleştirilmiş şekilde olup olmadığı kontrol edilir.
 - Pipetörlerden herhangi bir sızma olup olmadığı kontrol edilir.
 - Reaktif 1 (R1) ve Reaktif 2 (R2) disklerindeki reaktiflerin yeterli olup olmadığı kontrol edilir. Eksik olanlar tamamlanır, yenilenmesi gerekenler yenilenir.
 - Otoanalizörün atık kabının dolu olup olmadığı kontrol edilir.
 - Reaksiyon diski yıkama çözeltisinin dolu olup olmadığı kontrol edilir, boş ise doldurulur.
 - Çalışma süresince yeterli kâğıt olup olmadığı kontrol edilir.
 - Yazıcının açık olup olmadığı kontrol edilir.
 - Deionize su cihazı açılır.
 - Cihazın ana düğmesi açılarak çalıştırılır. Analize hazır hâle gelmesi için 10 dakika beklenir.

Çalışma öncesinde yapılması gerekli ön işlemlerin tamamını otomatik olarak yapan, ayrıca programlanan saatte kendisini otomatik olarak açıp istenilen süre çalışıp otomatik olarak kendini kapatan cihazlar da vardır.

- **Otoanalizörde kalibrasyon yapılması**
 - Otoanalizörlerle günlük rutin çalışmalara başlamadan önce, cihazların kalibrasyonları yapılarak kontrol serumları okutulmalıdır.



Resim 5.24: Cihazın hazırlanması

- Bu iş için otoanalizörün kitleri, kontrol solüsyonları tamamlanır.
- Kitler hazır solüsyon hâlinde veya liyofilize (suyu alınmış) olabilir.
- Hazır solüsyon (sıvı) kontrol kitleri buzdolabından çıkarıldığında kullanmadan önce 5 dakika elde alt üst edilerek ısınması ve homojen hâle gelmesi sağlanarak kullanılır.
- Liyofilize olan kontrol kitleri ise istenilen oranlarda distile su ile sulandırılır, homojen hâle getirilerek kullanılır.
- Bu serumlardan otoanalizörün önceden belirlenmiş pozisyonlarına konularak her sabah kontrol işlemi yapılır.



Resim 5.25: Serum kontrolü

- Kontroldeki amaç, otoanalizörün doğru ölçüm yapıp yapmadığını tespit etmektir.
- Her test için sonucu önceden belirlenmiş kontrol serumları, distile su ile sulandırılarak cihaza okutulur ve cihazın hafızasına önceden girilmiş kontrol eğrileri ile karşılaştırılır.



Resim 5.26: Cihazda okuma

- ± 2 SD (standart deviation / standart sapma) değerleri civarındaki kontrol değerleri kabul edilebilir olarak tanımlanmıştır.
- Bu değerler elde edildiğinde, kontrol işlemi başarı ile tamamlanmış olup hasta serumları güvenle çalışılabilir.

- Kontrol sonuçlarında ± 2 SD değerleri dışında çıkan testler ile karşılaşılmış ise bu testler için kalibrasyon yapılması önerilir.
- Ayrıca her test için kullanılan kitler değiştirildiği zaman da kalibrasyon yapılmalıdır.
- Çünkü değişen her kit farklı özelliklere sahip olduğu için o kitin özelliğine uygun olarak cihazın kalibrasyonu tanınması gerekir.
- Cihazdaki herhangi bir kirlilik, kullanılan kitlerdeki bozulma veya kontrol serumlarından kaynaklanan bir hatadan dolayı istenilen kontrol değerleri elde edilemeyebilir.
- Bu durumlarda ticari olarak önceden hazırlanmış kalibrasyon serumları kullanılır.
- Otoanalizörde kalibrasyon işlemi için cihaz uygun pozisyona getirilerek kalibrasyon serumu konur ve kalibrasyonu istenilen testin otoanalizörden girişi yapılarak kalibrasyon işlemine başlanır.
- Bu işlemle otoanalizöre önceden kaydedilmiş kalibrasyon eğrisine ulaşmak hedeflenir.
- İstenilen kalibrasyon eğrisi elde edilince bu kalibrasyona uygun kontroller tekrar çalışılarak kontrol işlemindeki ± 2 SD değerlere ulaşılır.
- Kontrol için gelen testlerin kontrol değerleri istenilen sınırlarda ise hasta numuneleri çalışılmaya başlanabilir.



Resim 5.27: Cihazın çalışması

➤ **Otoanalizörle çalışırken alınacak önlemler**

- Kan veya serum içeren tüm klinik örnek, reaktif, kontrol ve kalibratörler gibi sıvı atıklar bulaşıcı kabul edilir.
- Sıvı atıklar, imha edilmeden önce dezenfektan tatbik edilmelidir.
- Atık kabına dezenfektan eklenmesi, atık içinde toplanan bulaşıcı mikroorganizmaların etkisiz hâle getirilmesini sağlar.
- Böylece bu materyali kullanan personelin maruz kaldığı risk azalmış olur.
- Sodyum hipoklorat ve glutaralid solüsyonlarının HBV, HCV ve HIV gibi organizmaları etkisiz hâle getirmekte etkin olduğu görülmüştür. Dolayısıyla bu amaçla kullanılır.
- Personel, bu tür materyalleri kullanırken eldiven, önlük giymeli, gerektiğinde gözlük, maske ve bone takmalıdır.

- Örneğin; proplar keskin oldukları ve bulaşıcı olması muhtemel materyallerle kirlendikleri için bunlara çıplak elle temas edilmemelidir.
- Çalışma bitiminde tek kullanımlık kirli araç gereçler, tıbbi atık kutusunda toplanarak imha edilmek üzere ilgili birimlere gönderilir.

Parametre	Birim	At	İnek	Koyun	Keçi	Köpek	Kedi	Tavuk
Albümin	g/l	25- 37	29- 39	28- 34	27- 39	31- 40	35- 45	21- 35
Bilirubin	µmol/l	17-34	0.6-5	06- 84	0.1-71	0.6-84	0.0-6.84	0.0- 3.42
Fibrinojen	mg/dl	200-400	200-500	150- 400	600	200- 400	100- 400	-
Globülin	g/l	35- 48	31- 55	32- 43	27- 41	18- 38	25- 35	19
Glikoz	mg/dl	75- 115	45- 75	50- 80	50- 75	65- 118	70- 110	200- 250
T.kolesterol	mg/dl	75- 150	50- 230	100- 150	55-200	125- 250	90- 110	125-200
Trigliserid	mg/dl	< 50	-	-	-	50- 100	50- 100	-
T. lipid	mg/dl	-	150- 450	-	-	470- 725	145- 600	450- 550
T. protein	g/l	60- 73	53- 75	66- 75	60- 70	53- 73	55- 78	52- 69
Kalsiyum	mg/dl	11.2- 13.8	9.7- 12.4	11.5- 12.8	8.9- 11.7	9.0- 11.3	6.2- 10.2	23.5- 29.1
Potasyum	mmol/l	2.4- 4.7	3.9- 5.8	3.9- 5.4	3.5- 6.7	4.37- 5.65	4.0- 4.5	4.6- 6.5
Sodyum	mmol/l	134- 150	132- 152	142- 160	142- 155	139- 154	145- 156	146- 169
GGT	IU/l	12.0	5.5- 16.0	19.5- 22.5	-	6- 28	6- 28	9.0- 22
AST	IU/l	45- 145	78- 132	20- 60	167- 513	23- 66	10- 27	30- 170
ALT	IU/l	3- 23	14- 38	4- 15	24- 83	21- 102	10- 25	4- 20
LDH	IU/l	162- 412	692- 1445	238- 440	123- 392	45- 233	63- 273	99- 281

Tablo: Çeşitli hayvanlarda kan parametrelerine ait normal değerler

UYGULAMA FAALİYETİ

Aşağıdaki işlem basamakları ve önerileri dikkate alarak otoanalizör ile biyokimyasal test işlemlerini yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
Cihazın stabil çalıştığına kontrolü (kalibrasyon) ➤ Cihazda ölçümü yapılacak parametreleri belirleyerek girişini yapınız.	➤ Amacınıza uygun parametreleri seçiniz.
➤ Cihaz kullanma talimatlarına uygun olarak raklara kontrol çözeltilerini sırasıyla yerleştiriniz.	➤ Cihaz kullanma talimatlarına uyunuz.
➤ Rakları cihaza yerleştirerek okuma yapmasını sağlayınız.	➤ Rakları doğru yerleştirdiğinizden emin olunuz.
➤ Okunan değerleri kontrol ediniz.	➤ Değerlerin stabil olup olmadığını belirleyiniz.
➤ Değerler stabil değilse cihazın temizliği ve kontrolleri yapılarak işlemleri tekrarlayınız.	➤ Değerler stabil oluncaya kadar işleme devam ediniz.
➤ Numune okuması ➤ Ölçümü yapılacak parametreleri belirleyerek girişini yapınız.	➤ Amacınıza uygun parametreleri seçiniz.
➤ Numune bilgilerini giriniz.	➤ Numune ve bilgilerin doğru eşleştirildiğinden emin olunuz.
➤ Numuneyi (kan serumu) raka yerleştiriniz.	
➤ Rakı cihaza yerleştirerek okuma yapmasını sağlayınız.	➤ Rakları doğru yerleştirdiğinizden emin olunuz
➤ Sonuçları kaydediniz.	➤ İşlem bitmeden cihazı kapatmayınız.
➤ Cihazın temizlik ve otokontrol yapması için bekleyiniz.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Aşağıdakilerden hangisi otoanalizörlerde her çalışma öncesinde mutlaka yapılması gerekli ön işlemlerden birisi değildir?
A) Reaktif pipetleme mekanizması probunun sağlam olup olmadığı kontrol edilir
B) Reaktif disklerinde bulunan çözeltilerin dolu olup olmadığı kontrol edilir
C) Otoanalizörün atık kabı boş ise doldurulur
D) Pipetörlerden herhangi bir sızma olup olmadığı kontrol edilir
E) Hiçbiri
2. Aşağıdakilerden hangisi kuru sistem otoanalizörler de analiz için kullanılan slaytlardaki tabakalardan birisi değildir?
A) Yayılma tabakası
B) Okuma tabakası
C) Reaksiyon tabakası
D) Reaktif tabakası
E) Hiçbiri
3. Otomasyonun düzeyini belirleyen ölçüt aşağıdakilerden hangisidir?
A) Cihazın genel görüntüsü
B) Cihazın yeni olması
C) Cihazın kullanımının karmaşık olması
D) İşin paylaşım yüzdesi
E) Yaptığı analizin çokluğu
4. Aşağıdaki ifadelerden hangisi otoanalizörün önemli özelliklerinden değildir?
A) Küvetler ve godeler tek kullanımlık olmalı
B) Pıhtı ve köpüğe karşı dedektörlü olmalı
C) Acil numune girişi olmalı
D) İkterik ve lipemik serumlara karşı duyarlı olmalı
E) Manuel dilüsyonlu olmalı
5. Otoanalizörler de kalibrasyon hangi sıklıkta yapılmalıdır?
A) Günlük
B) Haftalık
C) Aylık
D) Arada bir
E) Her numune öncesi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise “Modül Değerlendirme”ye geçiniz.

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyunuz ve doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Metabolizma reaksiyonlarını hızlandıran biyolojik katalizörlere verilen isim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Hormon
B) Vitamin
C) Enzim
D) Koenzim
E) Hiçbiri
2. Ko kısım küçük organik moleküllerden (vitamin) oluşmuşsa buna verilen isim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Apoenzim
B) Haloenzim
C) Kofaktör
D) Koenzim
E) Aminoasit
3. Apoenzim ve ko kısımların birlikte oluşturdukları yapıya verilen isim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Apoenzim
B) Haloenzim
C) İzoenzim
D) Kofaktör
E) Aminoasit
4. Rutin ve araştırma laboratuvarlarında yapılan enzim aktivitesi tayinlerinin sonuçlarını karşılaştırmak için kullanılan ölçme birimi aşağıdakilerden hangisidir?
A) μg
B) mg
C) $\mu\text{.mol}$
D) m.mol
E) İnternasyonal Ünite (IU)
5. Yağ asitlerinin gliserol ile yaptıkları esterlere ne denir?
A) Trigliseridler
B) Fosfolipitler
C) Şilomikronlar
D) Glikolipitler
E) Sfingolipitler

6. Aşağıdakilerden hangisi otoanalizörlerin özelliklerinden değildir?
- A) Propları reaktif ve serum seviyesine karşı sensörlü olmalıdır.
B) Pıhtı ve köpüğe karşı dedektörlü olmalıdır.
C) Reaktif bölmesi ile kontrol ve kalibratörlerin bölmesi soğutmalı olmalıdır.
D) Kalibrasyona ihtiyaç duymamalıdır.
E) Küvetler ve godeler, tek kullanımlık olmalı veya özel camdan yapılmış olup cihaz tarafından yıkanabilir olmalıdır.
7. “..... bakımından yetersiz rasyonlar yedirilen tavuklar ağırlık kaybederler, ve kannibalizme (yumurta tavuklarının birbirlerini gagaladıkları ve tüylerini yoldukları bir davranış şekli) eğilimli olurlar.”
Yukarıdaki ifadedeki boşluğa aşağıdakilerden hangisi getirilmelidir?
- A) Tuz
B) Fosfor
C) Kalsiyum
D) Magnezyum
E) Yağ
8. 8. Kan dolaşımına katılan kan şekerinin (glikoz) düzeyinin, normal seviyenin altında olması aşağıdakilerden hangisidir?
- A) Glisemi
B) Normoglisemi
C) Hipoglisemi
D) Hiperglisemi
E) Glikozomi

DEĞERLENDİRME

Cevaplarınızı cevap anahtarıyla karşılaştırınız. Yanlış cevap verdiğiniz ya da cevap verirken tereddüt ettiğiniz sorularla ilgili konuları faaliyete geri dönerek tekrarlayınız. Cevaplarınızın tümü doğru ise bir sonraki modüle geçmek için öğretmeninize başvurunuz.

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ-1'İN CEVAP ANAHTARI

1	B
2	A
3	C
4	C
5	D

ÖĞRENME FAALİYETİ-2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	A
3	C
4	B
5	E

ÖĞRENME FAALİYETİ-3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	E
2	B
3	D
4	B
5	C

ÖĞRENME FAALİYETİ-4'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	A
3	D
4	E
5	D

ÖĞRENME FAALİYETİ-5'İN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	C
3	D
4	E
5	A

MODÜL DEĞERLENDİRMENİN CEVAP ANAHTARI

1	C
2	D
3	B
4	E
5	A
6	D
7	A
8	C

KAYNAKÇA

- KARAGÜL Hilal, Arif ALTINTAŞ, Ulvi Reha FİDANCI, Tevhide SEL, **Klinik Biyokimya**, Medisan Yayın Serisi: 45
- KARAGÜL Hilal, Arif ALTINTAŞ, Ulvi Reha ALTINTAŞ, Tevhide SEL, **Temel Biyokimya Uygulamaları**, Medisan Yayın Serisi: 38
- AKSOY, A., S. Haşimoğlu ve A. Çakır, 1981. **Besin Maddeleri ve Hayvan Besleme. Atatürk Ü. Yay.** 570. Erzurum.
- ARAS, Kazım ve Gülsen ERŞEN, 1966. **Tıbbi Biyokimya. Karbonhidratlar.** A.Ü. Tıp fak. Biyokimya Enst. Özel Yayın. Ankara.
- DOĞAN, K. 1993. **Kümes Hayvanlarının Beslenmesi.** A.Ü. Zir. Fak. Yay. 1290. Ders Kitabı:368, Ankara.
- KACAR, B. 1977. **Bitki Besleme.** A.Ü. Zir. Fak. Yay. 637. Ankara.
- GÖZÜKARA, Engin M. **Biyokimya**, Ankara, Ofset Pepianat Ltd Şti, 1990.
- ARAS, Kazım ve Gülseren ERŞEN. **Klinik Biyokimya**, Ankara, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd, 1988.