

1. KARBOHİDRATLARA AİT TEPKİMELELER

Karbohidratlar, canlılarda bulunan organik moleküllerin üçüncü büyük grubunu oluşturmaktadır. Basit şekerler halinde bulundukları gibi, pek çok organik ve inorganik bileşiklere bağlanarak kompleks yapılar da oluşturmaktadırlar.

Karbohidratlar karbon, oksijen ve hidrojenden meydana gelmiş polihidroksialdehit ve **polihidroksi**ketonlar veya bunların türevleri olarak tanımlanabilirler.

Karbohidratlar, canlılarda çok çeşitli gayeler için kullanılmaktadır. Örneğin glukoz ve glikojen halinde hayvanların enerji kaynaklarının en önemlilerinden birini teşkil etmektedirler. Bitkilerde, fotosentez neticesinde oluşan nişasta, depo edilerek enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır. Karmaşık yapıli polimerler halinde mikroorganizmaların koruyucu hücre duvarı yapısında bulunmaktadır.

Basit karbohidratlar, genel anlamda şekerler olarak adlandırılmakta ve belirli bir kristal yapısına sahip olup suda çözünmekte ve genellikle tatlı lezzete sahip olmaktadır. Karbohidratlar adlandırılırken karbohidratın ana yapısının sonuna oz eki getirilir ve karbohidratın adı belirlenir.

Karbohidratlar, üç farklı sınıflandırmaya tabi tutulmaktadır.

- 1- Karbon atomu sayısına göre
- 2- Yapılarındaki aldehit ve keton grubuna göre
- 3- Yapılarında bulunan basit şeker sayısına göre.

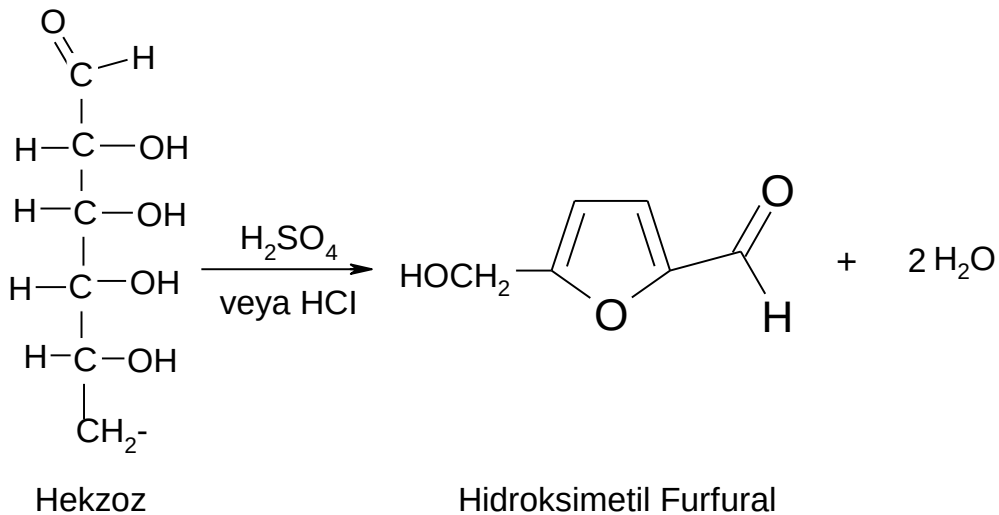
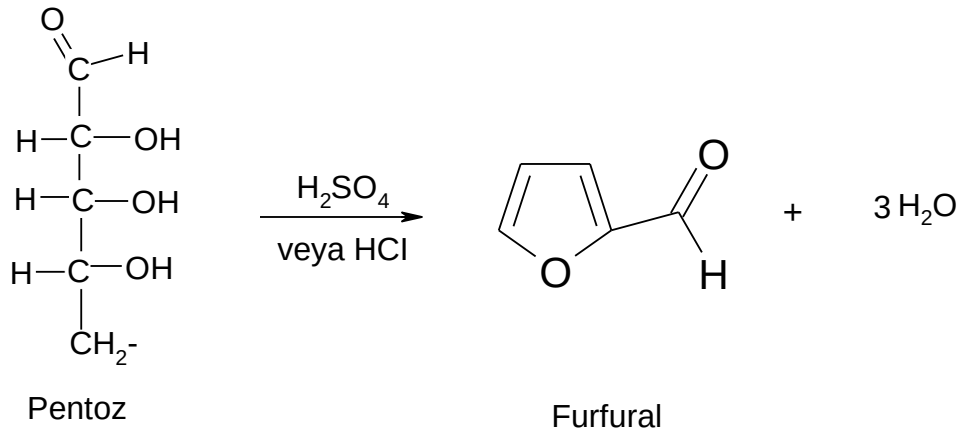
Yapılarında bulunan basit şeker sayısına göre Monosakkaritler, Disakkaritler, Oligosakkaritler, Polisakkaritler olmak üzere 4 gruba ayrılmaktadır. Bunlardan en basiti daha basit şekerlere hidroliz edilmeyen monosakkaritlerdir. Monosakkaritler, karbohidratlara ait tepkimelerin çoğunu verirler. Diğer gruptaki maddeler ise bu tepkimelerden bazılarını vermektedir. Bu tepkimeler özellikle şekerlerin cinsinin ve miktarının tayininde kullanılmaktadır. Glukoz, fruktoz, riboz, gliseraldehit önemli monosakkaritlerdir.

Karbohidratların yapısında fazla miktarda hidroksil grubu ve ayrıca bağlı veya serbest halde karbonil grubu (aldehit veya keton grubu) bulunmaktadır. Bu sebeple karbohidratlar, alkoller ve aldehit veya ketonların verdiği tepkimelerden çoğunu vermektedir. Bunların dışında bazı özel tepkimeleri vardır. Burada karbohidratlara ait tepkimelerden bazı örnekler verilmiştir.

A. Monosakkaritlerin Renkli Tepkimeleri

Monosakkaritler seyreltik asitlere karşı oldukça dayanıklıdırlar. Fakat derişik asitlerle ısıtıldıklarında yapıdan su ayrılır. Pentozlardan furfuraller, heksozlardan ise hidroksimetilfurfuraller meydana gelir. Furfuraller ise furanın aldehytleridir.

Meydana gelen furfural ve hidroksimetilfurfurallerin tepkime kabiliyeti çok fazladır. Fenolik veya diğ er bileşiklerle (α -naftol, rezersinol, orsinol, floroglusin gibi) tepkimeye girerek renkli kompleksler teşkil ederler. Bu renkli maddeler monosakkaritlerin tanınması ve miktarlarının tayininde kullanılabilir.



1. Molisch Testi:

Karbohidratlar için genel bir testtir. Herhangi bir şeker çözeltisinde ya da klinik amaçlı olarak idrarda karbohidrat bulunup bulunmadığını belirtmek için kullanılan bir testtir. Bu reaksiyonu şeker alkoller, karboksilli asitler, aminoşekerler ve dihidroksiaseton vermez. Bir deney tüpüne bilinmeyen numuneden 1 mL konur. Üzerine taze hazırlanmış %5 'lik α -Naftol çözeltisinden 2 damla ilave edilerek karıştırılır. Tüp eğilerek kenarından 1 mL *derişik* H_2SO_4 konarak karışımın altında bir tabaka teşkil etmesi sağlanır. 2 sıvının temas yüzeyinde *kırmızı-menekşe* renkli bir halkanın meydana gelmesi numunede karbohidrat bulunduğunu gösterir.

2. Seliwanoff 'un Rezorsinol Testi:

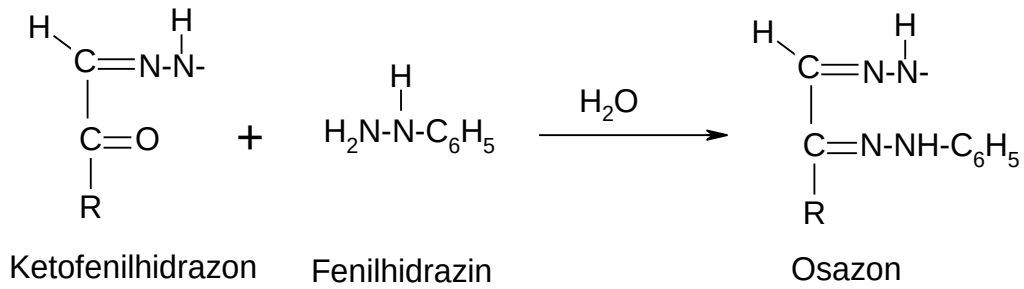
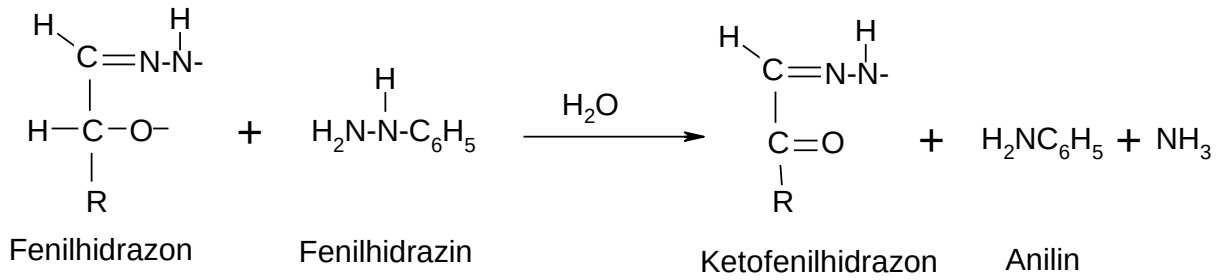
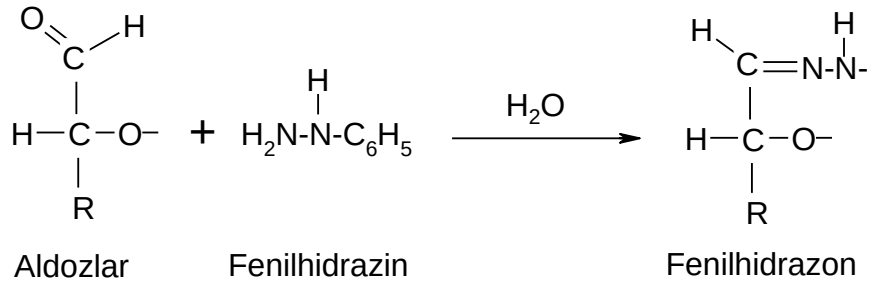
Ketozlar ve bilhassa ketoheksozlar için spesifik bir testtir. Ketozlar *derişik* HCl ile aldozlardan daha hızlı dehidrasyona uğrayarak furfural türevlerini meydana getirmektedirler. Bazı anormal durumlarda fruktozunda idrara karıştığı gözlenebilir. En çok fruktozu aramak için kullanılır. Bir deney tüpüne 1 mL numune alınır ve üzerine taze hazırlanmış Seliwanoff reaktifinden 5 mL konularak, karıştırılır. Kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilir. *Çilek kırmızısı* bir rengin oluşumu numunede fruktoz olduğunu gösterir.

Not: Bu deneyler esnasında önce furfural ve hidroksimetilfurfuraller meydana gelir. Sonra bunlar 1. deneyde α -Naftolle, 2. deneyde ise rezorsinolle renkli bileşikler oluştururlar. Monosakkarit dışındaki diğer karbohidratlar süre yeterli olduğu takdirde ortamda bulunan asitle hidroliz olarak monosakkaritleri ve dolayısıyla bu tepkimeleri verirler.

B. Osazon Deneyi:

Aktif aldehit veya keton grubu içeren karbohidratlar fenilhidrazinle ısıtıldıkları zaman ilk basamakta fenilhidrazonlar oluşmaktadır. Reaksiyonun devam etmesi halinde bir fenilhidrazin daha monosakkarit yapısına girerek osazon adı verilen sarı renkli kristal bileşikler oluşur. Osazonların her birinin karakteristik kristal şekilleri, erime noktaları ve çökelme zamanları vardır. Osazonlar türetildikleri şekerlerden daha zor olarak suda çözünmektedirler. Bu sebeple osazon deneyi şekerlerin cinsinin tespitinde kullanılmaktadır. Tüm indirgen şekerler fenil hidrazinle ısıtıldıklarında osazon oluşturabilirler. Reaksiyon sonucunda oluşan osazon kristallerinin mikroskopla incelenmesiyle hangi şeker olduğuna karar verilir.

Bu tepkime karbonil karbonu ile buna bitişik karbonu ilgilendirir (1 ve 2.C). Örnek olarak aldozlara ait tepkimeler aşağıda gösterilmiştir. Ketzozlar için olan tepkimeler de aynı şekilde meydana gelir.



Fenilhidrazin, şekerlerin 1. ve 2.C larına bağlandığı için ilk 2.C atomundan sonraki karbonların konfigürasyonları aynı olan şekerler aynı osazonu meydana getirirler. Bu sebeple glukoz, fruktoz ve mannoz aynı osazonu verirler. Bu üç şeker osazon deneyi ile birbirinden ayırmak mümkün değildir. Glukosazon kristalleri mikroskopta incelendiği zaman ekin

demetleri şeklinde görülür. Süt şekeri olan laktozdan oluşan laktosazon kristalleri ise atkestenesi şeklindedir. Bu sebeple glukosazon ve laktosazon kristalleri mikroskopta incelenerek kolayca birbirinden ayırabilirler. Bundan dolayı osazon deneyi idrardaki şekerin cinsinin (glukoz mu yoksa laktoz mu olduğunun) tespitinde kullanılmaktadır.

Glukoz, fruktoz, galaktoz, laktoz, maltoz ve ksilüloz bazı hallerde idrarda bulunur ve osazon testi bunların ayırt edilmesinde kullanılır.

Osazon oluşumu için en ideal pH 5 civarındadır. Bu sebeple deneyde fenilhidrazin hidroklorürle sodyum asetat veya fenilhidrazinle buzlu asetik asit kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne bir spatül ucu fenilhidrazin hidroklorür ve 2 spatül ucu da sodyum asetat konur. Üzerine 5 mL idrar ilave edilir ve karıştırılır. Kaynar su banyosunda 20 dakika bekletilir. Tüp kaynar su banyosundan çıkarılır ve soğuyuncaya kadar beklenir. Oluşan sarı renkli çökelekten pipetle alınarak bir lam üzerine yayılır ve kristallerin şekli mikroskopta incelenir. Aynı işlemler glukoz, laktoz çözeltileri ile yapılır. Elde edilen kristaller idrardaki ile karşılaştırılır.

Reaktifler:

1- α -Naftol reaktifi: α -naftolün alkoldeki % 5 lik çözeltisi.

2-Seliwanoff reaktifi: 50 mg rezorsinol 33 ml derişik HCl de çözülür ve hacim saf su ile 100 mL ye tamamlanır.

SORULAR

1-Karbohidrat nedir? Kaç sınıfa ayrılır? Açıklayınız.

2-Karbohidratlar nerelerde hangi amaçlarla kullanılırlar? Açıklayınız.

3-Glukoz hangi monosakkaritler sınıfına girer, kimyasal formülünü zincir, halka ve sandalye formu şeklinde gösteriniz.

4-Osazon deneyinin önemini belirterek hangi şekerlerin ayırt edilmesinde kullanılacağını açıklayınız.

2. NİŞASTANIN HİDROLİZİ

Nişasta bitkilerde karbohidratların depo şekli olup besin stoku olarak görev yapmaktadır. Nişastaya patates gibi yumrulu bitkilerde ve mısır, fasülye, buğday ve pirinç gibi tahıllarda daha çok rastlanmakla birlikte bütün bitki hücreleri nişasta yapma kabiliyetine sahiptir. Bütün bitkilerde yaygın olarak bulunan nişasta bitkilerinin tohum ve kök gibi kısımlarında bulunmaktadır. Genellikle hücrelerin sitoplazmasında büyük granüller şeklinde depolanır. Granüller mikroskopta görülebilir ve granüllerin şekli ve büyüklüğü çeşitli bitkilere göre değişiklik gösterir. Bileşimi de nişastanın elde edildiği kaynağa göre biraz farklıdır.

Nişastanın yapısında iki türlü polisakkarit bulunmaktadır. Bunlar amiloz ve amilopektindir. Her ikisi de glukoz moleküllerinden yapılmış olup amiloz, dallanma göstermeden düz zincirler halinde uzamakta ve glukoz moleküllerinin α (1 $\rightarrow$ 4) glikozit bağlarıyla bağlanmasından meydana gelmiş bir depo polisakkarittir. Molekül kütlesi birkaç binden 500000 daltona kadar değişmektedir. α - Amiloz suda çözünmez fakat su absorblayarak miseller haline gelebilir. Amilopektin ise daha yüksek molekül ağırlığına sahip ve dallanma gösteren bir depo polisakkarit olup dallı bir yapıya sahiptir ve α (1 $\rightarrow$ 4) bağlarıyla bağlanmış düz zincirler ve ayrıca α (1 $\rightarrow$ 6) bağlarından meydana gelen dallanma noktaları içerir. Türden türe değişmekle birlikte 20-30 glukoz ünitesinden sonra bir dallanma noktası ortaya çıkmaktadır. Amilopektin sulu çözeltilerde koloidal veya misel yapı gösterir. Mısır, buğday ve patates nişastası gibi nişastaların çoğu 1/3 oranında, takriben %20-28 amiloz ve %72-80 kadar da amilopektin ihtiva etmektedir. Fakat değişik kaynaklardan elde edilen nişastalardan elde edilen nişastalarda bu oran değişebilir. Nişasta indirgen özellik göstermez, iyotla mavi renk verir.

Nişasta asit ve enzimlerle hidroliz olmaktadır. Asitlerle hidroliz esnasında glikozid bağı rastgele parçalanarak molekül ağırlığı giderek azalan dekstrinler meydana gelir. Hidrolizin devam etmesiyle sonuçta glukoz oluşur.

Enzimatik hidroliz daha spesifiktir. Nişastayı hidroliz eden enzime amilaz adı verilir.

α -Amilaz ve β -Amilaz olmak üzere iki tipi vardır. α -Amilaz tükürük ve pankreas sıvısında bulunur ve nişastanın gastrointestinal kanalda sindirimi sağlar. α -Amilaz, amiloz ve

amilopektindeki α (1→4) glikozit bağlarını parçalar, α (1→6) bağına ise etki edemez. Bir hayli büyük olan bu dallı zincire limit dekstrin adı verilir.

Enzimatik hidroliz sonucunda molekül ağırlığı giderek azalan dekstrinler meydana gelir ve amilozdan maltoz oluşur. Amilopektinden ise artık daha fazla parçalanmayan sınır dekstrinler meydana gelir.

β -Amilazlar bitkilerde bulunur ve nişastanın indirgen olmayan ucundan düzenli bir şekilde maltoz ünitelerini ayırır. Sonuçta amilozdan maltoz, amilopektinden ise maltoz ve sınır dekstrinler oluşur.

Sonuç olarak α -Amilaz ve β -Amilaz enzimlerinin etkisi ile amiloz tamamen hidroliz olurken amilopektinin ancak düz zincir kısmı limit dekstrine kadar hidroliz edilmektedir.

Nişastanın α -Amilaz Enzimi ile Hidrolizi

Deneyin Yapılışı:

Nişastanın enzimatik hidrolizini takip etmek için 8 adet deney tüpü alınarak aşağıdaki tepkime şemasına göre çalışılacaktır.

Reaktifler	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>α-Amilaz çözeltisi (mL)</i>	-	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
<i>Saf su</i>	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3
<i>%0,1'lik nişasta çözeltisi (mL)</i>	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
<i>Tüpler karıştırılır, 37 °C su banyosunda 30 dakika bekletilir. Tüpler su banyosundan çıkarılır.</i>								
<i>Soğuk su (mL)</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
<i>0,005 M iyot çözeltisi (damla)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1

Tüpler karıştırılır ve meydana gelen renkler incelenir. Birinci tüpe amilaz çözeltisi konmadığı için, tüpte bulunan nişasta hidroliz olmayacak ve deney sonunda iyot damlatıldığı zaman mavi renk meydana gelecektir. İkinci tüpten sekizinci tüpe kadar deney tüplerine gittikçe artan miktarlarda amilaz çözeltisi konulmaktadır. Tüpte bulunan enzim miktarı ile orantılı olarak

nişastanın basamak basamak hidrolizi gerçekleşecektir. Her bir aşamada iyot ile oluşan renk belli olduğundan hidroliz basamaklarını bu renkler sayesinde takip etmek mümkün olacaktır. Tüpte bulunan enzim miktarı az olduğu zaman mevcut nişastanın hepsi hidroliz olamaz ve dekstrinler oluşur. Dekstrinlerin iyotla verdikleri renk tepkimeleri aşağıda gösterilmiştir.

✕ <i>Nişasta</i>	Mavi
✕ <i>Amilodekstrin</i>	Mor
✕ <i>Eritrodekstrin</i>	Kırmızı
✕ <i>Akrodekstrin</i>	Hafif sarımsı veya renksiz
✕ <i>Maltoz veya glukoz</i>	Renksiz

Zincir uzunluğu 12 glukoz ünitesinin altına indiği zaman iyotla renk vermezler. Bunlara akrodekstrin adı verilir. Maltoz da iyotla renk vermez.

Reaktifler:

1-% 2 lik stok nişasta çözeltisi.

2-% 0,1 lik nişasta çalışma çözeltisi: Stok çözeltiden 5 mL alınarak, saf su ile 100 mL ye tamamlanır.

3-Stok iyot çözeltisi(0,05 M): 3,657 g potasyum iyodat ve 45 g potasyum iyodür yaklaşık 800 mL saf suda çözülür. 9 ml derişik HCl ile karıştırılarak yavaş yavaş ilave edilir. Saf su ile hacim 1000 ml ye tamamlanır, kahverengi şişede saklanır.

4-İyot çalışma çözeltisi (0,005 M): Stok çözeltiden 10 ml alınarak saf su ile 100 mL ye tamamlanır. Kahverengi şişede, buzdolabında saklanır.

SORULAR

1-Nişasta hangi birimlerden oluşur? Yapısını yazınız.

2-Nişastanın asidik, bazik ve enzimatik hidrolizi mümkünmü dür? Varsa hidrolize ait reaksiyonları yazınız.

3-Nişasta indirgen özellik gösterir mi? Sebebini açıklayınız.

4-Deney tüplerini 37°C' da bekletmenin amacı nedir?

3. PROTEİNLERE AİT TEPKİMELER

Proteinler, tüm hücrelerde ve hücrelerin de tüm bölümlerinde en çok bulunan biyolojik makromoleküllerdir. Proteinler tek bir hücrede bile binlerce farklı çeşitte bulunurlar. Molekül büyüklükleri ise küçük peptitlerden milyonlarca molekül kütleli polimerlere kadar değişebilir. Ayrıca proteinler biyolojik işlevlerde aşırı çeşitlilik gösterirler.

Tüm proteinler, en eski çağlardaki bakterilerden veya en kompleks canlılardan olsun, varolan aynı 20 amino asidin karakteristik doğrusal diziler halinde peptit bağıyla bağlanmasıyla oluşur.

Farklı organizmalar bu amino asitlerden enzimler, hormonlar, antikorlar, taşıyıcılar, kaz, tüyler, örümcek ağıları, gergedan boynuzu, süt proteinleri, antibiyotikler, mantar zehirleri ve diğer farklı biyolojik aktiviteye sahip ürünler yapabilmektedir.

Proteinlerde bulunan 20 standart amino asidin hepsi de α -amino asittir. Bu yirmi amino asidin protein yapısında çok değişik kombinasyonlarda bulunması proteinlere çok değişik özellikler ve aktiviteler kazandırmaktadır.

Amino asitler renksiz, suda tamamen, etil alkolde ise kısmen çözünmelerine karşılık eterde hiç çözünmeyen organik bileşiklerdir.

Amino asitlerde değişik fonksiyonel gruplar vardır ve bunlar bazı reaktiflerle renkli bileşikler oluşturarak tanınabilirler.

A. Renk Tepkimeleri

Bu tür reaksiyonları, proteinlerde bulunan bazı grupların kimyasal reaktiflerle birleşip renkli kompleksler oluşturması şeklinde ortaya çıkar. Proteinlerin amino asit içeriği farklı olduğundan oluşacak renk ve şiddeti değişik olacaktır.

1. -SH grubuna ait tepkime

Kükürt içeren aminoasitler (sistin, sistein) kurşun tuzlarıyla reaksiyona girdiğinde kurşun sülfür çökeleği oluşur. Bu tepkime kurşunun, bu amino asitlerdeki -SH grubu kükürdüne aşırı ilgisinden meydana gelir.

Deneyin Yapılışı:

Kükürt ihtiva eden bir aminoasit olan sistinin %1 'lik çözeltisinden 0,5 mL alınarak üzerine 2 damla %10 'luk kurşun asetat çözeltisinden ilave edilir. Daha sonra ortam 2 damla %40 'lık sodyum hidroksit ile kuvvetlice bazikleştirilir(pH kağıdı ile kontrol edilir) ve 2-3 dakika kaynatılır. Kaynatma işleminden sonra *kahverengi-siyah* renkli PbS çökeleği oluşur.

Reaktifler:

1-% 10 luk kurşun asetat

2-% 40 lık NaOH

3-% 1 lik sistin: 10g sistin litrelik bir balon jodede 800 mL saf su ile karıştırılır, çözünene kadar % 40 lık NaOH damla damla ilave edilir, gerekirse ısıtılır ve çözünme bitince litreye tamamlanır.

2. Fenil grubuna ait tepkime

Ksantoprotein tepkimesi: Fenil grubu ihtiva eden bileşikler genellikle nitrik asit ile muamele edildikleri zaman fenil halkası nitrolanır. Oluşan bu nitro bileşikleri sarı-turuncu renkleri ile tanımlanırlar. Fenil grubu ihtiva eden trozin, triptofan, fenilalenin gibi aminoasitler ve bunları içeren proteinler nitrolanma tepkimesini verirler, buna ksantoprotein tepkimesi denir.

Deneyin Yapılışı:

1 mL yumurta albumini çözeltisine 0,5 mL derişik nitrik asit konur. Beyaz bir çökelek oluşur. Çökelek ısıtılırsa sarı renk alarak çözünür. Tüp musluk suyu altında soğutulur. 4 mL %10 'luk NaOH ile bazikleştirilir. *Sarı* renk *turuncuya* dönüşür.

Reaktifler:

1-Yumurta albumini çözeltisi

2-Derişik nitrik asit

3-% 10 luk NaOH

3. Peptit bağlarına ait tepkime (biüre deneyi)

Proteinlerin en karakteristik renk reaksiyonu biüret reaksiyonudur. Peptit bağları bazik ortamda Cu^{+2} iyonlarıyla *mor* renkli bir kompleks verirler. Ürenin ısıtılmasıyla meydana gelen biüre de aynı tepkimeyi verdiğiinden bu deneye biüre deneyi denmektedir.

Deneyin Yapılışı:

Deney tüpüne 1 mL yumurta albumini çözeltisi konur. 2 mL %10 'luk NaOH ilave edilir ve % 0,5'lik CuSO_4 çözeltisinden *mor* renk meydana gelene kadar ilave edilir. CuSO_4 'ın fazlasından kaçınmak gerekir. Tepkimeye girmeyen Cu^{++} iyonları *mavi* renkli bakır hidroksit çözeltisini vereceğinden *mor* renk gözden kaçabilir.

Reaktifler:

1-% 10 luk NaOH

2-%0,5 CuSO_4

3-Yumurta albumini

B. Proteinlerin Çöktürülmesi

Protein molekülünün üzerinde pozitif ve negatif yüklü kısımlar vardır. Bir molekülün üzerinde ne kadar yüklü kısım varsa, o molekül su gibi polar bir çözücünde o kadar kolay çözünebilir, yüklerini kaybettiği zaman ise kolaylıkla çökebilir. Protein molekülünde (+) ve (-) yüklerin eşit olduğu pH ya izoelektrik nokta denir. Bunun altındaki pH larda molekül (+) üstündeki pH larda (-) yüklüdür. '***İzoelektrik nokta***' protein molekülünün en kolaylıkla çöktüğü pH dır.

Proteinlerin çöktürülmesi için birçok fiziksel ve kimyasal metotlar vardır. Fiziksel metotlar, ısı, ışın (x-ışınları, ultraviyole ışınları), ses ve ultrafiltrasyondur. Kimyasal metotların başında çözünmeyen tuz teşkili gelir. Triklor asetik asit, pikrik asit, tungstik asit gibi asitler protein moleküllerinin üzerindeki (+) yüklü kısımlara bağlanarak çözünmeyen tuzları teşkil ederler. Böylece proteinler çöker, ağır metallerin katyonları da aynı şekilde proteinlerin üzerindeki (-) yüklü kısımlarla çözünmeyen bileşikler verirler. Bu maksatla civa, demir, çinko, bakır ve nikel tuzları kullanılır.

1.Ferrosiyanür İle Proteinlerin Çöktürülmesi:

$K_4Fe(CN)_6$ tuzunda (-4) değerli olan ferrosiyanür kompleksi de tuz teşkil ederek proteinleri çöktürmede kullanılır.

Deneyin Yapılışı:

1 ml yumurta albumini çözeltisine 3 damla %10 'luk HCl konur. Tüp çalkalanır %5 'lik $K_4Fe(CN)_6$ çözeltisinden çökelme başlayana kadar damla damla ilave edilir.

Reaktifler:

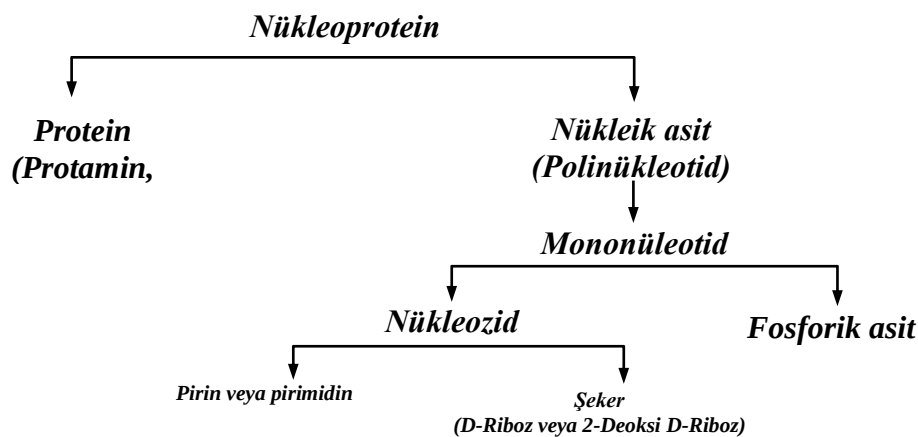
- 1-Yumurta albumini çözeltisi
- 2-% 10 luk(v/v) HCL çözeltisi
- 3-% 5 $K_4Fe(CN)_6$

SORULAR

- 1-Proteinlerin çöktürülmesinin ana prensibi nedir? Açıklayınız.
- 2-İzoelektrik pH' yı tarif ederek, bu pH'nın altında ve üstünde protein in hangi yüke sahip olacağını belirtiniz.
- 3-Peptit bağını tarif ederek, peptit bağının oluşumunu gösteriniz.
- 4-Peptit bağının tanınmasında kullanılan biüre reaksiyonunu yazınız. Bu reaksiyonu amino asitler verebilir mi?

4. NÜKLEİK ASİTLERE AİT REAKSİYONLAR

Yaşam bilgilerini içeren, bunları saklayan, kuşaktan kuşağa aktaran ve bunların proteine dönüştürülmesini gerçekleştiren biyopolimere ‘Nükleik asitler’ adı verilmektedir. Nükleik asitler bugün hayatın anahtar molekülü sayılmaktadır. Kas dokusu vücut ağırlığının takriben %40’ını teşkil eder. Kasın yapısı yaklaşık %75 su, %20 protein, %5 anorganik ve organik maddelerden ibarettir. Kasta bulunan proteinlerin bir kısmı nükleoprotein yapısındadır. Nükleoproteinler bileşik proteinlerdir. Nükleik asitlerin en küçük birimleri nükleotitlerdir. Şeker molekülünün riboz veya deoksiriboz olmasına göre nükleotit veya deoksiribonükleotitler meydana gelmektedir. Yapıları şematik olarak aşağıda gösterilmiştir.



Deneyin Yapılışı:

Kasta nükleoproteinlerin belirtilmesi için önce, hidroliz edilerek protein ve nükleik asitler ayrılır ve bundan sonra çöken proteinler süzülerek ayrılır. Süzüntüde kalan nükleik asit bileşenleri kendilerine ait testlerle belirtilir.

Nükleotid Hidrolizatının Elde Edilişi:

Bir tüp içine 0,5 g kas, 10 mL %10 'luk triklor asetik asit konur ve kaynar su banyosunda 10 dakika kaynatılır. Bu esnada asit etkisiyle hidroliz meydana gelir, ayrılan proteinler çöker, karışım süzülerek uzaklaştırılır.

1.Pürinlere Ait Tepkimler:

Pürin bazları gümüş tuzları ile çözünmeyen beyazımsı tuzlar teşkil ederler. Bir tüpe 1 mL hidrolizat konur. İçine bir parça turnusol kâğıdı konur. Turnusolun rengi kırmızıdan maviye

dönünceye kadar damla damla amonyak ilave edilir Fazla NH_3 ilavesinden kaçınılmalıdır. Tüpe 0,5 mL AgNO_3 konur, *beyazımsı* çökelek pürinlerin mevcudiyetini gösterir.

2.Pentoz Renk Tepkimesi:

Kuvvetli asit ortamda pentozlar ısıtıldıkları zaman furfuralleri verirler. Furfuraller fenollerle renkli bileşikler yaparlar. Bial reaktifinde bulunan orsinol de bir fenoldür. Bu tepkimeyi nükleotidlerde bulunan pentozlardan yalnızca riboz verir.

Bir tüpe 0,5 mL hidrolizat, 1 mL bial reaktifi konur. Yarım dakika çıplak alevde kaynatılır. *Yeşil* rengin görülmesi pentoz mevcudiyetini gösterir.

3.Fosfatlara Ait Tepkime (Amonyum Molibdat Deneyi):

Fosfat iyonları amonyum molibdat ile sarı renkli amonyum fosfomolibdat çökeğini verirler. Bir tüpte 1 mL hidrolizat, üzerine 1 mL amonyum molibdat konur, kaynatılır. Sarı çökelek fosfat iyonlarının varlığını gösterir.

Reaktifler:

1-% 10 luk triklorasetik asit

2-Amonyak

3-% 2,6 AgNO_3

4-Bial reaktifi: 1,5 g orsin, 500 mL der.HCL ile çözülür ve üzerine 2 mL %10 FeCl_3 ilave edilir.

5-Amonyum molibdat:45 g amonyum molibdat 150 mL saf suda çözülür, üzerine 250 mL der. HNO_3 ün 500 mL sudaki çözeltisi damla damla ilave edilir. Saf su ile litreye tamamlanır.

SORULAR

1-Nükleosit ve nükleotit nedir? Yapılarını çiziniz.

2-Hidrolizat nasıl hazırlanır? Açıklayınız.

3-Purinlere ait deneyde fazla amonyak ilavesi neden istenmeyen bir durumdur.

4-Hidrolizat hazırlanmasında ortamda protein bulunması neden istenmez? Proteinler ortamdan nasıl uzaklaştırılırlar?

5. İDRARIN FİZİKSEL VE MİKROSKOBİK TETKİKİ

1.İdrar Toplanması

İdrarda bulunan bazı maddelerin dengesiz olması ve idrarın mikroorganizmalar için çok uygun bir kültür ortamı oluşturması sebebiyle doğru sonuç alınabilmesi için idrar numunelerinin kimyasal bakımdan temiz, tercihen steril kaplarda toplanması gerekir. Ayrıca kapların ağızları çok sıkı kapanabilmeli ve numuneler 30 dak. içinde incelenmelidir. 30 dak. içinde tetkik mümkün olmadığı hallerde idrar numuneleri buzdolabında saklanmalı veya koruyucu bir madde ilave edilmelidir. Sedimentler buzdolabında bile dengesizdir. İdrar bazik olduğu zaman bozulma daha da çabuklaşır.

İdrarın toplanması, yapılacak analiz cinsine göre değişir. Çeşitli amaçlar için aşağıdaki idrar numuneleri kullanılabilir.

Rasgele İdrar Numunesi:

Herhangi bir anda alınan idrar numunesidir. İdrarın seyreltilmesi değişik olduğundan idrardaki katıların konsantrasyonu oldukça değişiklik gösterir. İdrar çok seyreltik olduğu zaman düşük konsantrasyondaki katılar gözden kaçabilir.

Sabah İlk İdrar Numunesi:

Rutin idrar analizleri için sabah idrarı tercih edilir. Çünkü gece idrarın konsantrasyonu gündüz idrarına göre oldukça sabittir, daha konsantredir ve daha asidiktir. Silindirler ve diğer şekilli elementler asidik idrarda daha dayanıklıdır.

Öğleden Sonra İdrarı:

Öğleden sonra saat 2 ile 4 arasında alınan idrarda ürobilinojen daha iyi tespit edilebilir.

Gündüz İdrarı:

Hasta kahvaltıdan önce sabah saat 8' de idrar yapar, bu idrar atılır. Bundan sonra bütün gün yaptığı bütün idrar bir kaba toplanır. En son akşam saat 8 de idrar yapar. Bu idrarda toplanan idrara ilave edilir. Toplanan idrar buzdolabında saklanmalı, gerekirse koruyucu bir madde ilave edilmelidir.

Gece İdrarı:

Hasta akşam saat 8 de idrar yapar, bu idrar atılır. Bundan sonra bütün gün yaptığı idrarlar bir kaba toplanır. Hasta sabah saat 8 de tekrar idrarını yapar ve bu de ilave edilir. İdrar buzdolabında saklanır gerekirse koruyucu madde ilave edilir.

24 Saatlik İdrar:

Kimyasal analizlerin çoğu bilhassa kantitatif analiz için 24 saatlik idrar gereklidir. Çünkü birçok katı maddeler gün boyunca değişme gösterirler. 24 saatlik idrar toplanması için hasta sabah 8 de idrar yapar, bu idrar atılır. Bundan sonra 24 saat boyunca yaptığı bütün idrarlar bir kaba toplanırlar. Ertesi sabah 8 deki idrarda buna ilave edilir. İdrar temiz, ağzı sıkı kapanan ve takriben 2000 mL alan bir kapta toplanmalıdır. Kap buzdolabında saklanmalı, gerekirse koruyucu bir madde ilave edilmelidir (koruyucu, şişeye idrar toplanmadan önce konur).

2.İdrarın Korunması

İdrarın korunması için ilave edilen maddeler;

- ✗ Bakterilerin üremesini
- ✗ İdrarda bulunan katı maddelerin bozunması
- ✗ Organik sedimentlerin bozulmasını
- ✗ pH ın değişmesini önler.

Koruyucu maddelerin çoğu bakteriyostatiktir ve pH'nın asit olmasını sağlar. Bakteri büyümesinin önlenmesi ise;

- 1.Üreyi parçalayan organizmalar tarafından ürenin amonyum karbonata çevrilmesine (alkali fermantasyon)
2. Bakteri ve mayalar tarafından glikozun parçalanmasına
3. Bakteriyel proteinlerin, protein testlerini karıştırmasına engel olur.

Koruyucu ilave edilmişse, bunun etikete yazılması gerekir. Koruyucu madde deneyi bozmamalıdır.

Koruma Metotları

Soğukta Muhafaza: İdrarın buzdolabında saklanması bakterilerin büyümesini önler ve silindirlerin, eritrosit ve lökositlerin, epitel hücrelerinin korunmasını ve kısa bir süre (takriben 8 saat) pH'nın asit kalmasını sağlar.

Kimyasal Koruyucular

Toluen: Yüzeyde ince bir tabaka yapacak şekilde ilave edilir. Testleri bozmaz.

Timol: 100 mL idrar için küçük bir timol kristali kullanılır. Fazla miktarda ilave edilirse albumin testlerinde yalancı pozitif sonuç verebilir ve safra testini bozabilir.

Formalin (%40): 30 mL idrar için 1 damla ilave edilir. Bu madde bilhassa idrar sedimendlerinin korunmasında çok faydalıdır. Fakat indikan aranmasında kullanılan obermayer testini önler, şeker testlerinde kullanılan alkali bakır çözeltilerini indirger ve fazla miktarları üre ile çökelek vererek mikroskobik tetkiki bozar.

Özel Koruyucular: Bazı testler için özel koruyucular gereklidir.

A. İdrarın Fiziksel tetkiki

Miktar (Hacim): İdrar hacmi dereceli silindirlerde ml olarak ölçülür. Normal değerler;

1 yaş	300 – 600 mL/24 saat
10 yaş	1000 – 1500 mL/24 saat
Erişkinler	1000 – 1800 mL/24 saat

Gece idrarın gündüz idrarına oranı 1/2 veya 1/3 dür. İdrar hacmi;

- ✘ İdrarla atılan katıların miktarına
- ✘ Terleme ve solunum havasında kaybedilen su miktarına
- ✘ Hastanın kalb ve böbrek durumuna bağlıdır.

İdrar hacminin normal değerinin üstüne çıkmasına **poliüri** adı verilir. Fazla miktarda su ve sulu besinler alınması, derinin soğuğa maruz kalması ve diüretikler poliüreye sebep olur. Ayrıca eksuda ve ödemlerin absorpsiyonu esnasında; kronik böbrek hastalıklarında diabetes

insipidusta, diabetes mellitusta, mental bozukluklarda, primer hiperaldosteronizm ve hiperparatiroidizm de vs. görülebilir.

İdrar miktarının azalmasına **oligüri**, hiç idrar yapılmamasına ise **anüri** adı verilir. Oligüri ve anürinin görüldüğü haller: Su alımının azalması veya kaybının artmasına bağlı dehidratasyon renal yetmezlik, kardiyak ve hepatik yetmezlik, aşağı nefron (transfüzyon tepkimesi, yanıklar, crush sendromu ve şok vs.). Anüri, taş, tümer vs. gibi sebeplerden ileri gelen idrar retansiyonu ile karıştırılmamalıdır.

1.Renk: İdrarın normal rengi sarıdır. Bu renk üroeritin, ürokrom ve porfirinler gibi pigmentlerden ileri gelir. Renk, yoğunluğa göre değişir. İdrar seyreltik olduğu zaman saman rengi olur, konsantre idrar ise portakal rengindedir. Çeşitli hallerde idrarın renginde ve renk şiddetinde değişiklikler meydana gelir. Mesela metabolik ürünler, besinler, ilaçlar ve pigmentler idrarın rengini etkiler. Bunlara aşağıdaki misaller verilebilir.

- ✘ Poliüri: İdrar hemen hemen renksizdir. Örnek: Diabetes mellitus ve diabetes insipidus vakaları
- ✘ *Pigmentler:* Örnek: İdrara bilirübin geçmesi, renk kirli koyu kahverengidir.
- ✘ İlaçlar: Alınan ilaçlara göre renk değişimi olur. B₂ vitamini idrara koyu sarı renk verir.
- ✘ Eritrositler: İdrarda eritrosit bulunduğu haller *HEMATÜRİ* denir. İdrarın rengi kirli kiremit rengi veya kirli kırmızıdır.
- ✘ Hemoglobin: İdrarda hemoglobin bulunduğu hallere *HEMOGLOBİNÜRİ* adı verilir. İdrarın rengi kırmızıdır.
- ✘ Porfirin: İdrarla atılan porfirin miktarının artmasına *PORFİNÜRİ* adı verilir. Şarap kırmızısı renk mevcuttur.
- ✘ Fosfat: İdrarda fosfat kristallerinin bulunmasına *FOSFATÜRİ* denir. Renk kirli beyazdır.

2.Koku:

İdrarın kendine has kokusu vardır. İdrarda aseton bulunması, bazı besinler veya bakteriyel parçalanma kokuyu değiştirir. Ayrıca bazı hastalık hallerinde idrar kokusunda karakteristik değişiklikler olur.

3.Görünüm:

Taze alınan idrar berraktır. İdrar durmakla berraklığını kaybeder bulanık bir görünüm alır. Ayrıca kabın dibinde çökelek oluşabilir.

Fosfat ve karbonatlar, üratlar, okzalatlar, eritrosit ve epitel hücreleri, bakteriler idrara bulanık bir görünüm verirler.

4.Tepkime:

İdrar normal olarak asidiktir ve pH sı 4,8-8,0 arasında değişir, ortalama 6,0 civarındadır.

İdrar pH sınırın ölçülmesi için indikatörlü özel pH kağıtları kullanılır ve kağıdın vardığı renge göre asit veya kalevi olduğu anlaşılır. Daha hassas ölçümler için pH metreler kullanılabilir.

Protein alımı fazla olduğu zaman ve sülfatların meydana gelmesi sebebiyle idrar asittir. Asidoziz ve ateşli hallerde de asitlik artar.

İdrar bekletildiği zaman pH alkali tarafa kayar. Bunun sebebi idrardaki ürenin amonyaga çevrilmesidir. Sebze diyetinde ve alkolozizde de idrar kalevidir.

5.Yoğunluk:

İdrar yoğunluğu, idrarda bulunan katı maddelerin miktarına bağlı olarak değişir ve böbreğin konsantrasyon ve dilüsyon kapasitesini gösterir. Erişkinlerde 24 saatlik idrarda normal hudutlar 1,016-1,025 arasındadır. Ortalama 1,020 dir. 24 saatlik idrar dışındaki rasgele numunelerde 1,003-1,030 arasında değerler bulunabilir.

İdrar yoğunluğunun ölçülmesi için ürinometre kullanılır. Bunun için önce, idrar iyice karıştırılır ve yoğunluğunun ölçülebileceği mezüre konur. Daha sonra ürinometre kabın içine daldırılır. Ürinometrenin kabın hiçbir yerine değmemesi ve serbestçe yüzmesi gerekir.

Bundan sonra yoğunluk ürinometreden okunur. Okunan rakamın sıcaklık, protein ve şeker miktarına göre düzeltilmesi gerekir.

✘ *Sıcaklığa göre yoğunluğun düzeltilmesi:* Ürinometrelerin çoğu 15 °C veya 20 °C lerde kalibre edilmiştir. Kalibrasyon derecesi ile idrarın sıcaklığı arasındaki her 3 °C lık fark için 0,001 düzeltme yapılır. Sıcaklık kalibrasyon sıcaklık derecesinden fazlaysa her 3 °C lık için 0,001 ilave edilir, azsa 0,001 çıkarılır.

✘ Proteinüri için düzeltme: Her %1 g protein için yoğunlukta 0,003 artış olur. Bu değer okunan yoğunluk değerinden çıkarılarak düzeltme yapılır.

✘ Glukozüri için düzeltme: Her %1 g glukoz için okunan yoğunluk değerinden 0,004 çıkarılır.

B. Mikroskobik Tetkik

İdrarda bulunan şekilli elementler santrifüjle çöktürülür ve sediment mikroskop altında incelenir. Mikroskobik tetkikte önemli olan hücresel elemanlar ve silindirlerdir. Bunlar üriner sistem hastalıkları hakkında önemli bilgiler verir.

Mikroskobik inceleme için sabah ilk idrarı tercih edilir. Bu idrarın 30 dakika içinde incelenmesi gerekir. Asit idrarlar buzdolabında saklanmadığı takdirde hücresel elemanlar, kristal ve silindirlerin ancak birkaç saat bozulmadan kalması mümkün olur.

Sedimentin Hazırlanması:

İdrar numunesi iyice karıştırıldıktan sonra santrifüj tüpüne 10-15 mL kadar idrar konur ve dakikada yaklaşık 1800 devirle 3-4 dakika santrifüj edilir. Üstteki berrak kısım dökülür. Santrifüj tüpü sallanarak kalan 1-2 damla idrarla sediment gevşek ve homojen hale getirilir. Bundan bir damla alınarak lam üzerine konur, bir lamel kapatıldıktan sonra mikroskop altında, azaltılmış ışıktaki incelenir. Önce küçük büyütme ile bütün sahalar taranır. Bundan sonra istenen bölgeler büyük büyütme ile incelenir.

İdrar Sedimentleri:

İnorganik sedimentler, organik sedimentler olmak üzere iki grupta incelenir.

1) İnorganik Sedimentler: Bunlar kristal veya amorf olabilir. İdrarda bulunan inorganik sedimentler fosfatlar, kalsiyum oksalat, kalsiyum karbonat, kalsiyum sülfat, ürik asit ve üreratlardır.

a) Fosfatlar: Amonyum magnezyum fosfat (tripl fosfat) kristalleri; alkali idrarlarda bulunur, renksizdirler, tabut kapağı veya çatı şeklinde görülürler.

Kalsiyum hidrojen fosfat; nötral pH da kristalleşir. Yıldız veya iğneler şeklinde görülürler.

Amorf fosfatlar renksizdir. İnce granüller veya küçük küreler şeklindedir. Fosfatlar seyreltik asetik asitte çözünürler.

b) Kalsiyum karbonat: Alkali idrarlarda bulunabilir. Nadir görülürler.

c) Kalsiyum oksalat: Hem asit hem de alkali idrarlarda bulunabilir. Sekiz yüzlü veya zarf şeklinde görülürler. Nadiren disk veya oval şekillerde olabilir. Fazla oksalatlı besinler alınırsa görülebilir.

d) Ürik asit: Asit idrarlarda bulunur. Saf ürik asit kristalleri renksiz olduğu halde idrarda bulunanlar çeşitli pigmentlerle boyandığından sarı veya kahverengi görülürler.

e) Üratlar: Amonyum ürat hariç diğerleri asit idrarlarda bulunurlar. Genellikle amorf şeklindedirler, renklidirler.

2) Organik Sedimentler: Eritrosit, epitel hücreleri, silindirler, bakteri, maya v.s. dir.

Eritrositler: Yuvarlak, parlak, bikonkav, çekirdeksiz hücrelerdir. Sarı renkte görülürler. Normal bulunmaz veya her sahada 1-2 tane olabilir. Bazı hatalıklarda glomerül ve tübüllerden idrara karışırlar.

Lökositler: Yuvarlak çekirdekli hücrelerdir. Eritrositlerden daha büyüktürler. Üriner sisteminin çeşitli iltihabi hastalıklarında idrara geçerler. Normalde bulunmaz veya her sahada 2-3 tane olabilir.

Epitel hücreler: Kadınların idrarında, erkeklerinkinden daha fazla olmak üzere normal idrarlarda az miktarda bulunabilirler. Büyük miktarı patolojik yönden önemlidir. Alındıkları yere göre değişik şekil ve büyüklükte olabilirler.

Silindirler: Böbrek tübülüslerinde oluşur ve tübülüslerin şeklini alırlar. İdrarda görülmeleri böbrek bozukluğunu gösterir. Yapılarına göre sınıflandırılırlar.

- ✘ **Hiyalin silindirler:** Soluk renkli, homojen silindirlerdir. Hücre ihtiva etmezler, orta derecede harabiyeti gösterirler.
- ✘ **Epitelyal silindirler:** Tübüler harabiyetlerde tüp epitellerinden meydana gelirler.
- ✘ **Eritrosit ve lökosit silindirleri:** Hemen daima kaide olarak böbrek hastalığının daha akut fazında, mesela akut glomerülonefritin erken safhalarda görülürler.
- ✘ **Granüler silindirler:** lökosit ve dejenere epitel hücrelerinden meydana gelirler. Daha ağır böbrek harabiyetini gösterirler.
- ✘ **Yağ silindirleri:** Tübüler epitelin yağlı dejenerasyonu sonunda meydana gelirler ve ağır böbrek harabiyetini gösterirler.
- ✘ **Mum silindirleri:** Kimyasal yapıları tam bilinmemektedir. Amiloid böbrek hastalığında görülürler.

Sayılanların dışında bazı hallerde çeşitli aminoasitler, kolesterol, hippürik asit, bilirübin ve bazı ilaçlar v.s. bulunabilirler.

Silindiriodler: Silindirlere benzeyen, fakat genellikle onlardan daha ince, uzun yapılardır. Silindirlerin kenarları paralel olduğu halde silindiriodlerin değildir.

Çoğunlukla normal idrarlarda bulunurlar ve mukusdan meydana gelirler. Saydam görünmeleri yönünden hiyalin silindirlere benzerler.

Bazik idrarda görülen kristal ve amorf sedimentler:

- ✘ Tripl fosfat kristalleri
- ✘ Amorf fosfatlar
- ✘ Amonyum urat
- ✘ Kalsiyum fosfat

Asidik idrarda görülen kristal ve amorf sedimentler:

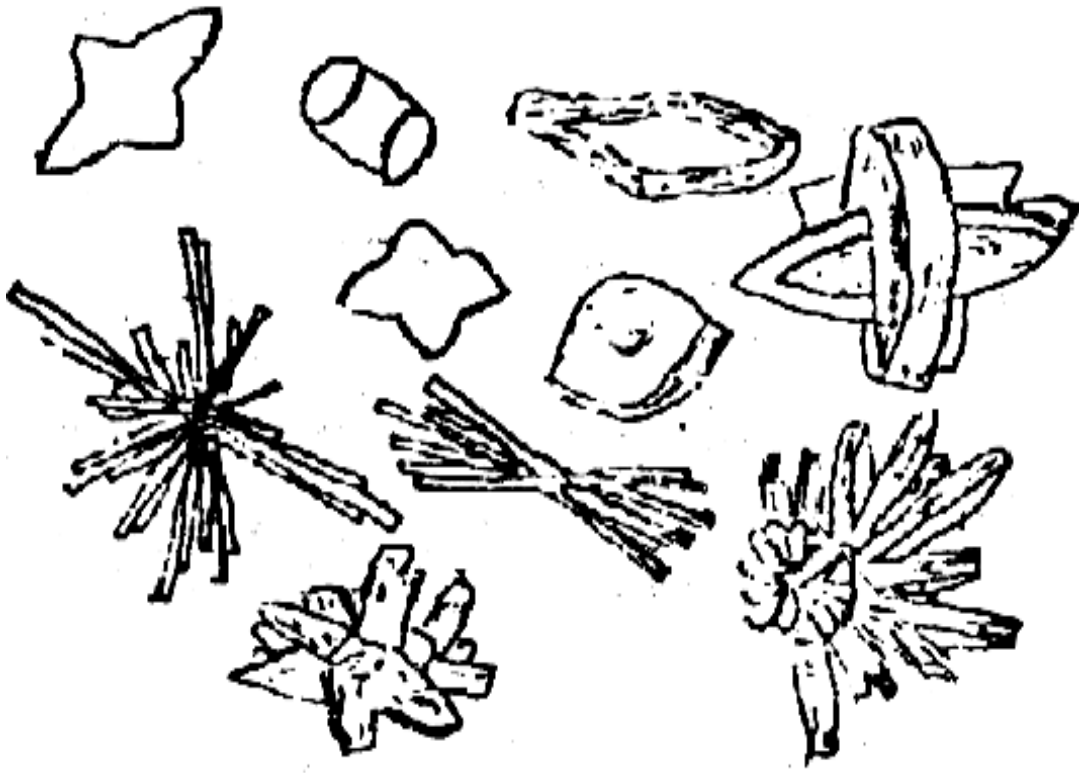
- ✗ Amorf üratlar
- ✗ Kalsiyum oksalat
- ✗ Ürik asit

Organik sedimentler:

- ✗ Granüler silindir
- ✗ Epitelyal silindirler
- ✗ Hiyalin silindir
- ✗ Lökositler
- ✗ Eritrositler
- ✗ Epitel hücreleri
- ✗ Eritrosit silindiri
- ✗ Silindrioid

SORULAR

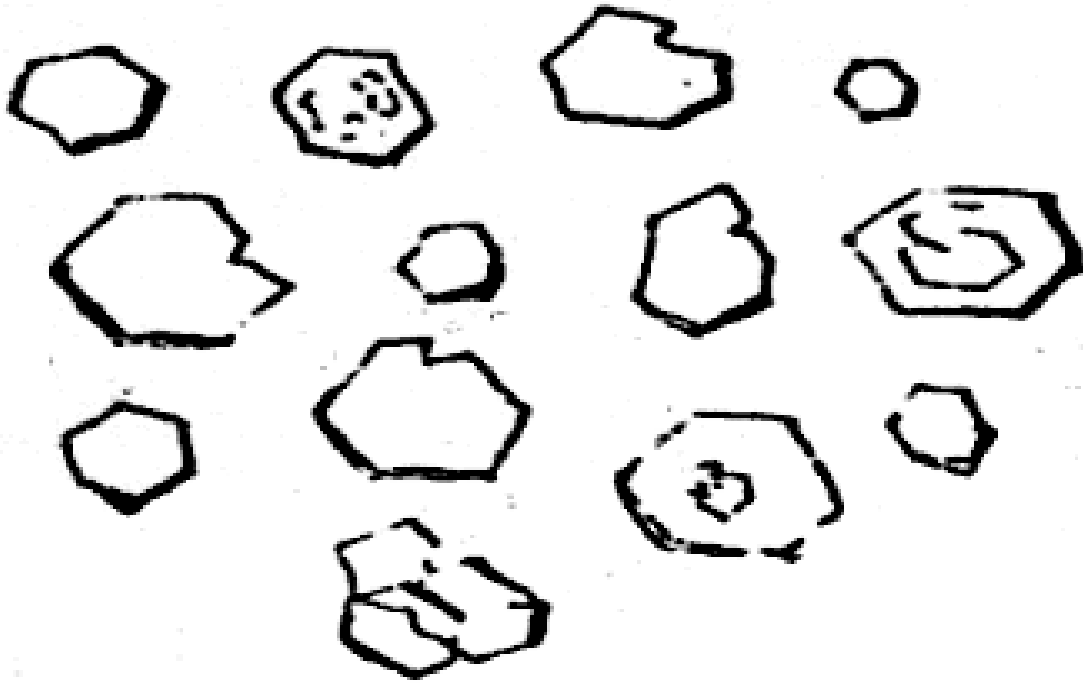
- 1-İdrarın farklı zamanlarda toplanması neden önemlidir?
- 2-İdrarın korunması neden önemlidir? Bu koruma kaç farklı şekilde yapılabilir?
- 3-Sediment nedir? Nasıl hazırlanır?
- 4-İdrarda yapılan fiziksel tetkikler nelerdir? Kısaca açıklayınız.
- 5-Organik ve inorganik sedimentler nelerdir? Açıklayınız.



Ürik Asit Kristalleri



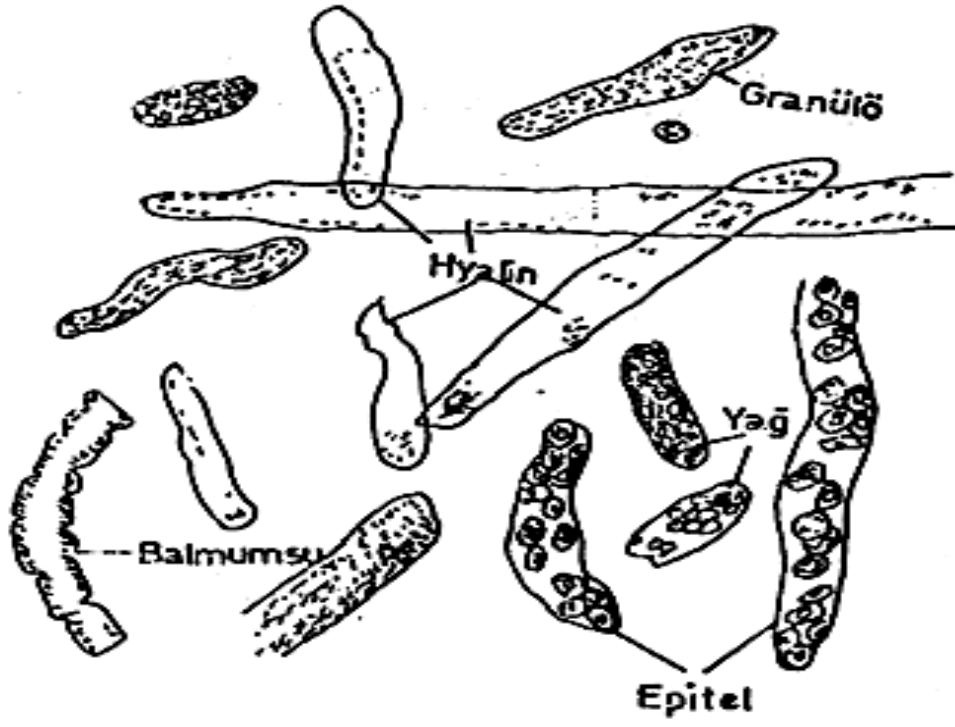
Amonyum Ürat Kristalleri



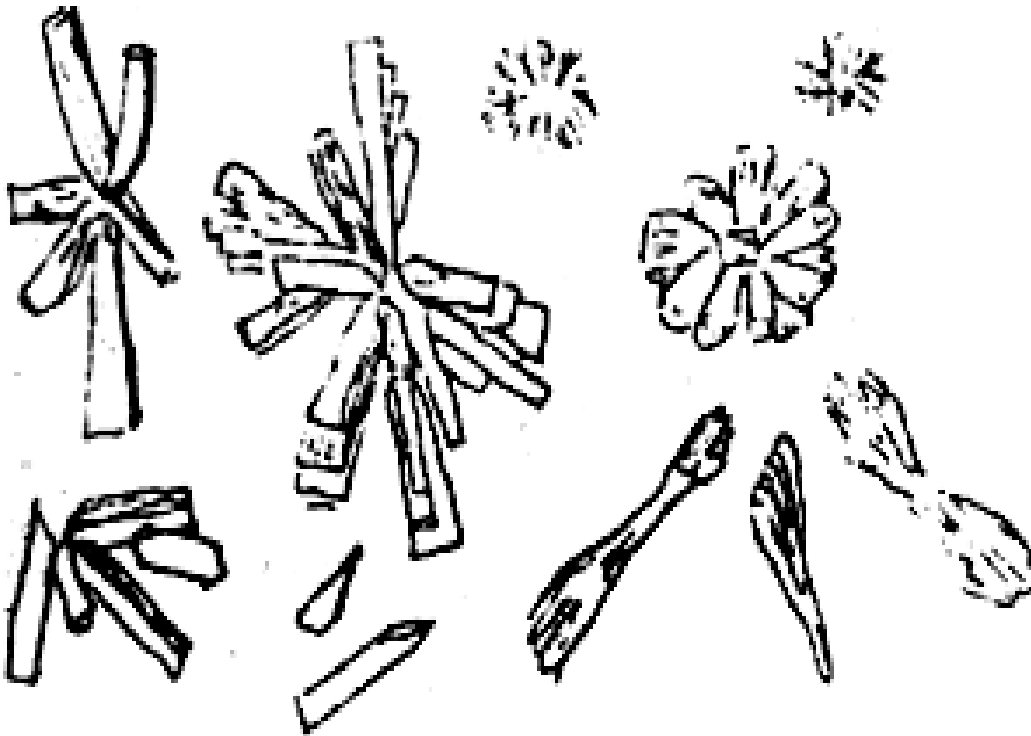
Sistın Kristalleri



Kalsiyum Oksalat Kristalleri



Silindirler



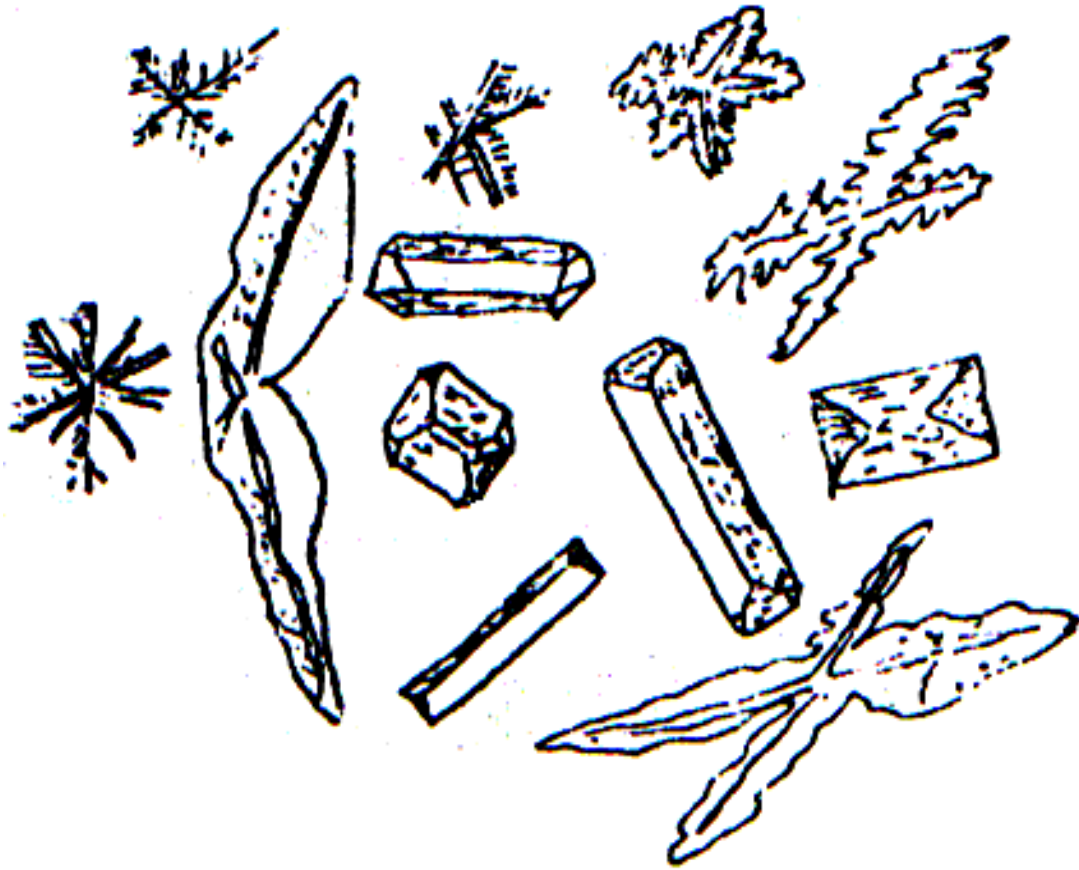
Kalsiyum Fosfat Kristalleri



Lösin ve Triozin Kristalleri



Kolesterol kristalleri



Amonyum Magnezyum Fosfat Kristalleri
(Tripl Fosfat)

6. İDRARDA GLUKOZ ARANMASI

Normal insanların idrarında çok az miktarlarda glukoz bulunur. Anormal durumlarda idrara geçebilen karbohidratların en önemlisi glukozdur. 24 saatte idrarla atılan glukoz miktarı genellikle 100 mg civarındadır. Bu miktar çok az olduğundan rutin olarak kullanılan metotlarla tespit edilmez, ancak kromatografi gibi hassas testlerle tespit edilebilir. Bu sebeple normal olarak idrarda glukoz bulunmadığı kabul edilmektedir.

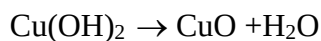
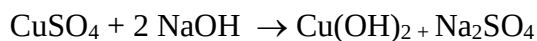
İdrarda glukoz bulunmasına glukozüri adı verilir. Glukozürinin görüldüğü haller arasında en önemlisi şeker hastalığı (*Diabetes mellitus*)dur. Bunun dışında diğer bazı endokrin bozukluklarında da idrarda glukoz görülebilir.

Metot

İdrarda glukoz aranması için en çok kullanılan metotlar Fehling ve Benedict metodlarıdır. Her ikisinin de prensibi aynı olup, glukozun indirgen özelliğine dayanmaktadır.

Prensip:

Bazik ortamda glukozun, +2 değerli bakır iyonlarını indirgeme özelliğine dayanır. Bazik ortamda kaynatıldığı zaman, kullanılan reaktifte bulunan CuSO_4 , $\text{Cu}(\text{OH})_2$ 'e çevrilir. Bunların her ikisinde de Cu, +2 değerliklidir ve *mavi* renklidir. Bu sebeple renk değişimi olmaz. Ortama glukoz gibi indirgeyici bir madde ilave edildikten sonra ısıtılırsa, glukoz, Cu^{+2} iyonlarını indirger ve CuOH oluşur. CuOH çökeleği *sarı* renklidir. Daha fazla kaynatılırsa CuOH su kaybederek kırmızı renkli Cu_2O çökeleği meydana gelir. Bunların her ikisinde de Cu, +1 değerliklidir.



1-Benedict Kalitatif Testi

Deneyin Yapılışı:

İki deney tüpüne 5'er mL Benedict reaktifi konur. Birinci tüpe 0,5 mL veya 8 damla idrar, ikinci tüpe 0,5 mL veya 8 damla standart glukoz çözeltisinden ilave edilir, karıştırılır ve 2 dakika kaynatılır. Soğuyuncaya kadar oda sıcaklığında bekletilir. Tüplerdeki renkler karşılaştırılır.

- İdrarda glukoz yoksa reaktifin mavi rengine *değişme* olmaz.
- İdrarda glukoz varsa *renk değişimi* görülür ve çökelek oluşur. İdrardaki glukoz miktarına bağlı olarak *yeşilden tuğla kırmızısına* kadar değişen renkler (yeşil, sarı, turuncu ve kırmızı) meydana gelir ve çökelek oluşur. Bu sebeple idrardaki glukoz miktarı hakkında bilgi verir. Şeker miktarı hakkında bilgi vermesi ve daha hassas olması sebebiyle Fehling deneyinden daha çok kullanılmaktadır.

2-Fehling Kalitatif Testi

Deneyin Yapılışı:

İki deney tüpü alınır. Birinci tüpe 2-3 mL Fehling kalitatif reaktifi konur ve birkaç saniye kaynatılır. Bu kaynatma sonrası reaktif berrak kalmalı ve renk değişimi olmamalıdır.

İkinci deney tüpüne Fehling reaktifine eşit hacimde incelenecek idrar konur. Bu idrardan azar azar Fehling reaktifi bulunan tüpe ilave edilir ve her ilaveden sonra tekrar kaynatılır. Aynı işlemler standart glukoz çözeltisi ile de yapılır ve sonuçlar idrardaki ile karşılaştırılır. İdrarda şeker varsa sarı veya tuğla kırmızısı bir çökelek meydana gelir. Şeker miktarı fazlaysa daha ilk ilaveden sonra renk değişimi ve çökelek oluşur. İdrarın tamamı ilave edildiği halde *sarı* veya *kırmızı* çökelek oluşmadığı takdirde idrarda glukoz yok demektir.

Reaktifler:

1-Benedict reaktifi: 173 g sodyum sitrat 100 g susuz sodyum karbonat ve 600 mL kadar saf su konur, karıştırılır. Isıtılarak çözünmesi sağlanır. Başka bir kaptaki 17,3 g bakır sülfat 100 mL saf suda çözülür ve daha önce hazırlana çözeltiliye devamlı karıştırılarak yavaş yavaş ilave edilir. Soğutulur, litrelik bir balon jojrye aktarılır ve hacim saf su ile 1000 mL ye tamamlanır.

2-Fehling reaktifi: Aşağıda anlatılan fehling A ve fehling B çözeltilerinin eşit miktarda karıştırılması ile hazırlanır. Dayanaksız olduğundan uzun süre bekletilmemelidir. Tercihen kullanılacağı zaman hazırlanmalıdır.

3-Fehling A çözeltisi:69,28 g bakır sülfat 600 mL saf su hafifce ısıtılarak çözülür. Hacim saf su ile 1000 ml ye tamamlanır.

4-Fehling B çözeltisi:346 g sodyum potasyum tartarat ve 120 g NaOH yaklaşık 600 mL saf suda çözülür ve hacim saf su ile 1000 mL ye tamamlanır.

5-Standart glukoz çözeltisi (%80 mg).

SORULAR

1-İdrarda glukozun varlığı biyokimyasal açıdan neden önemlidir? Açıklayınız.

2-İndirgen şeker nedir? Şekerler ne zaman indirgen özellik gösterirler?

3-Glukoz miktarının tayini yukarıda belirtilen yöntemlerden başka daha hassas bir şekilde nasıl yapılabilir.

4-İdrara glukozdan başka monosakkaritler geçebilir mi? Başka monosakkaritlerin varlığı biyokimyasal açıdan önemli midir?

7. İDRARDA PROTEİN ARANMASI

Normalde idrarda protein yoktur. Çeşitli patolojik hallerde proteinler idrara geçebilir. İdrarda görülen en önemli proteinler serum albumini ve globulindir. Bunlardan başka bazı hallerde fibrinojen, hemoglobin ve miyogloblin, Bence-Jones proteini gibi bazı anormal proteinler de idrara geçebilir.

Normal şartlarda idrarda protein bulunmamasının sebebi, protein moleküllerinin büyük olması sebebiyle glomerüllerden süzülerek idrara geçememeleridir. Fakat glomerül geçirgenliğinin bozulduğu hallerde glomerüllerden süzülerek idrara geçer. İdrarda protein bulunmasına **proteinüri** adı verilir. Molekül ağırlığının küçük olması sebebiyle patolojik hallerde idrara en kolay geçebilen ve bu sebeple idrarda en fazla bulunan plazma proteini albumindir. Bundan dolayı eskiden idrarda protein bulunmasına **albuminüri** adı verilmektedir. Bu isim bugün de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Proteinürilerin Sınıflandırılması

Herhangi bir organik bozuklukla ilişkisi olup olmaması göz önüne alınarak proteinüriler fonksiyonel ve organik olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

Fonksiyonel proteinüriler: Böbrekler veya başka hiçbir organ hastalığıyla ilişkisi gösterilmemiş proteinürilerdir. Yani proteinüri dışında başka bir organik bozukluk tespit edilemez. İdrardaki protein miktarı oldukça azdır ve gelip geçicidir. Ağır vücut hareketleri ve yoğunluklarında, gebeliğin son bir kaç haftasında, şiddetli soğuğa maruz kalındığı hallerde bu çeşit proteinüriler görülebilir. Postural proteinürilerde yatarken proteinüri görülmediği halde ayakta durulduğu zaman proteinüri meydana gelir.

Organik proteinüriler: Bunlar da bozukluğun böbreklerle olan ilişkisine göre 3 gruba ayrılır.

1. Pre-renal (böbrek-öncesi) proteinüriler: Esas hastalığın böbrekle ilişkisi yoktur ve çoğunda böbrekler sekonder olarak iştirak eder. Kalb hastalıkları, karında sıvı birikmesi veya tümörler ve karaciğer hastalıkları, böbrek dolaşımını bozarak proteinüriye yol açarlar. Ateşli hastalıklar, bazı ilaçlar ise böbrekte toksik etkiler göstererek proteinüriye sebep olurlar.

2. Renal proteinüriler: Glomerül harabiyetine sebep olan bütün böbrek hastalıklarında proteinüri mevcuttur. Bunlara misal olarak akut ve kronik nefritleri ve nefrozları verebiliriz. Bu hastalıklarda en çok görülen protein, plazma albumini ve globulindir.

3. Post-renal (böbrek-sonrası) proteinüriler: Renal pelvis, üreler, mesane, prostat ve üretradaki lezyonlardan ileri gelir. Burada idrara karışan proteinler albumin ve globulindn ziyade lökositler ve dejenere epitel hücrelerinin proteinleridir. İdrara vajina sekresyonları veya semen karışması da pozitif protein testine sebep olur.

1. Triklorasetik Asit Deneyi

İdrarın berrak olması gerekir. Eğer berrak değilse süzgeç kâğıdından süzülür.

Deneyin Yapılışı:

İki deney tüpü alınır. 1'inci tüpe 0,5 mL berrak idrar, 2'inci tüpe 0,5 mL standart albumin çözeltisi alınır. Üzerlerine 1-2 damla triklorasetik asit damlatılır. Bulanıklık veya çökelek olup olmadığına bakılır. Eğer protein varsa bulanıklık veya çökelek meydana gelir. Protein yoksa idrar berrak kalır. Meydana gelen bulanıklığın şiddeti ve çökeleğin miktarına göre sonuçlar: eser, 1+, 2+, 3+ veya 4+ olarak belirtilir.

2. Tanret Deneyi

Deneyin Yapılışı:

Deney tüpünün 2/3 üne kadar idrar konur. Sonra tüpün alt kısmından tutularak idrar tabakasının üst kısmı ısıtılır. Üzerine 3-4 damla Tanret reaktifi ilave edilir. Bulanıklık olup olmadığına bakılır. Bulanıklık yoksa idrarda protein yok demektir. Bulanıklık varsa protein bulunduğu anlaşılır. Aynı işlemler standart albumin çözeltisi ile de yapılır ve sonuçlar idrardaki ile karşılaştırılır. İdrarda Bulanıklığın şiddetine göre sonuçlar: eser, 1+, 2+, 3+ veya 4+ olarak belirtilir.

Reaktifler:

1-% 20 lik triklorasetik asit çözeltisi

2-Tanret reaktifi: 13,5 g civa (II)klorür 200 mL saf suda çözülür. Bunun üzerine 250 mL saf suda çözülmüş 33,2 g potasyum iyodür ilave edilir. Hacim saf su ile 600 mL ye tamamlandıktan sonra bu karışımın üzeri ne 200 mL buzlu asetik asit konup karıştırılır.

3-Standart albumin çözeltisi(% 4 g/dL)

SORULAR

1-Sağlıklı bir idrar örneğinde protein bulunurmu? Bulunursa bunlar hangileridir?

2- İdrarda protein varlığını deneysel olarak nasıl gösterirsiniz?

8. İDRARDA KETON CİSİMLERİNİN ARANMASI VE LİPİTLERE AİT TEPKİMELELER

A.Keton Cisimleri

Keton cisimleri aseton, asetoasetik (diasetik) asit ve β -hidroksibütirik asittir. Bu maddeler karaciğerde yağ asitlerinin oksidasyonu sonucunda oluşur. Fakat karaciğerde kullanılmaz. Karaciğerde kullanılmadıkları için kana geçer ve karaciğer dışı (ekstrahepatik) dokular tarafından alınarak okside edilirler. Bu sebeple normal olarak kandaki miktarları çok azdır ve 100 mL de 3 mg kadardır. İdrarla atılan miktar da çok az olup, 24 saatlik idrara maksimum 50 mg kadardır. Bu miktar kullanılan metotlarla gösterilemeyecek kadar az olduğundan pratik olarak normal idrarda keton cisimleri yoktur denilebilir.

Keton cisimlerinin sentezi ekstrahepatik dokuların oksidasyon kapasitesinin üzerine çıkarsa kandaki seviyeleri artar ve idrara geçerler. Bu olaylara sırayla **ketonami** ve **ketonüri**, ikisine birden **ketozis** adı verilir. Ketozisin başlıca sebebi karbohidratlardan yararlanılmadığı hallerde enerji temini için yağ asitlerinin kullanılmasıdır.

Ketozisin meydana geldiği en önemli haller şeker hastalığı, **yüksek yağlı düşük karbohidratlı beslenme, ileri derecede** açlık ve gebelik toksikozudur.

1.İdrarda Aseton Aranması (Lange Deneyi)

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 5 ml idrar 0,5 mL sodyum nitroprussiat, 0,5 mL buzlu asetik asit konur, çalkalanır, bundan sonra tüp hafifçe eğilerek bir tabaka teşkil edecek şekilde 2 ml amonyak konur. Tüp tekrar dikey duruma getirilir.

İki fazın temas yüzeyinde mor bir halka meydana gelirse aseton vardır denir. Sonuç mor halkanın kalınlığına ve rengin şiddetine bakılarak 1+, 2+, 3+ veya 4+ olarak gösterilir. Aynı işlemler standart aseton çözeltisi ile de yapılır ve sonuçlar idrardaki ile karşılaştırılır.

2.Asetoasetik Asit Aranması (Gerhardt Deneyi)

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 5 mL idrar konur, üzerine 1-2 damla %10 'luk FeCl_3 damlatılır. İdrarda fazla miktarda fosfatlar varsa ferrik fosfat teşkil ederek çökerler. İdrar süzülerek çökelek uzaklaştırılır.

Berrak süzüntüye tekrar 2-3 damla %10 'luk FeCl_3 damlatılır. İdrarda asetoasetik asit varsa *bordo kırmızısı* bir renk meydana gelir. Rengin şiddetine bakılarak sonuç 1+, 2+, 3+ veya 4+ şeklinde gösterilir.

Reaktifler:

1-% 10 luk sodyum nitroprussiat(taze hazırlanmış): 100 mL lik balon jojeye 10 g sodyum nitroprussiat konur. Saf su ile çözülür ve hacim saf su ile 100 mL ye tamamlanır.

2-Buzlu asetik asit

3-Derişik amonyak

4- Gerhard reaktifi(%10 luk FeCl_3):Bir balon jojeye 10 g FeCl_3 konur. Saf su ile çözülür ve hacim saf su ile 100 mL ye tamamlanır.

SORULAR

1-Keton cisimleri nelerdir, formülleri ile gösteriniz.

2-İdrarda aseton ve asetoasetik asit varlığı nasıl tesbit edilir?

3-Ketozis nedir, tanımlayınız?

B.Lipitlere Ait Tepkimeler

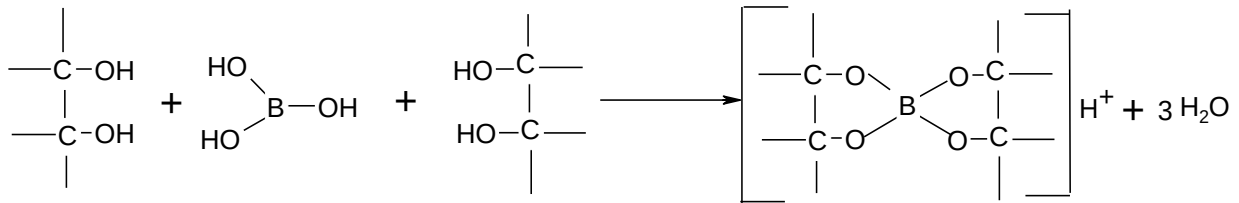
Lipitler genel olarak suda çözünmeyen, yağ çözücüleri adı da verilen eter, kloroform ve benzen gibi apolar organik çözücülerde çözünen maddelerdir. Besinlerimiz arasında önemli bir yer tutar ve organizmada başlıca enerji kaynağı olarak görev yaparlar.

Lipitler grubunda çeşitli maddeler bulunmaktadır. Bu maddelerin büyük bir kısmının yapısında gliserol vardır. Bu sebeple burada gliserolün tanınmasında kullanılan bir tepkime ile lipitler grubundan önemli bir bileşik olan kolesterole ait bir renk tepkimesi verilmiştir.

1.Gliserole Ait Tepkime

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne %1 'lik boraks çözeltisinden 1 ml konur. Üzerine birkaç damla fenolftalein damlatılır. *Pembe* bir renk meydana gelir. Gliserol ilave edilmesiyle renk kaybolur. Gliseroldeki 2 hidroksil grubunun borik asitle kombine olarak daha kuvvetli mono bazik asit teşkil etmesine dayanan bu tepkime gliserol için spesifik değildir. Gliserol dışındaki diğer polihidroksi alkoller de bu tepkimeyi vermektedir. Tepkime aşağıda gösterilmiştir.



2.Kolesterol İçin Salkowski Testi

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne kolesterolün kloroformdaki çözeltisinden 2 mL konur. Tüp hafifçe eğilerek dipte bir tabaka teşkil edecek şekilde 2 mL derişik H₂SO₄ ilave edilir. Çalkalamadan (tüp avuç içinde döndürülerek) hafifçe karıştırılır. Bir müddet bekletildikten sonra üstteki kloroform tabakasında *kırmızı* bir rengin oluşması kolesterol bulunduğunu gösterir.

Reaktifler:

1-% 10 luk sodyum nitroprussiat(taze hazırlanmış): 100 mL lik balon jojeye 10 g sodyum nitroprussiat konur. Saf su ile çözülür ve hacim saf su ile 100 mL ye tamamlanır.

2-Buzlu asetik asit

3-Derişik amonyak

4- Gerhard reaktifi(%10 luk FeCl₃):Bir balon jojeye 10 g FeCl₃ konur. Saf su ile çözülür ve hacim saf su ile 100 mL ye tamamlanır.

SORULAR

1-.Lipit nedir? Tanımlayınız.

2-Lipit ve yağ arasında fark var mıdır? Açıklayınız.

3- Kolesterol hangi lipit türündendir?

4-Gliserin ve kolesterol varlığını kalitatif olarak gösteriniz?

9. İDRARDA SAFRA BOYALARININ ARANMASI

Bilirubin

Bilirubin, retiküloendotelial sistemde eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkan hemoglobinden oluşur. Daha sonra kana geçerek karaciğere gelir. Kanda albumine bağlı olarak taşınan bu bilirubin suda çözünmez ve bundan dolayı idrara geçemez. Bu şekilde indirekt bilirubin denmektedir.

Bilirubin karaciğerde glukuronik asitle bağlanarak bilirubin glukuronidleri meydana getirir ve suda çözünür şekle çevrilir. Bu şekilde direkt bilirubin adı verilir ve safra ile barsağa atılır. Barsakta bakterilerin etkisiyle ürobilinojene indirgenir. Bu terim de ürobilinojen, mezobilirübinogen vs. sterkobilinojen 'i kapsar. Bunun bir kısmı barsaklardan emilerek vena porta yolu ile karaciğere gelir ve çoğu safra yollarına geçerek tekrar barsağa atılır. Ürobilinojenin az bir kısmı ise sistematik dolaşma geçerek idrarla atılır. Bu sebeple normal şartlarda idrarda az miktarda ürobilinojen bulunmaktadır (24 saatlik idrarda 4 mg kadar). Ürobilinojen hava ile temasa geçtiği zaman oksitlenerek ürobiline çevrilir. Absorbe edilmeyip barsaklarda kalan ürobilinojen (sterkobilinojen) ise feçesle atılır.

Normal şartlarda idrarda bilirubin yoktur. Fakat bazı patolojik hallerde idrara geçebilir. Buna **bilirubinüri** adı verilir. İdrara sadece glukuronik asitle bağlanmış olan, yani suda çözünebilir direkt bilirubin geçebilir.

Safra yollarının taş, tümör vs. ile tıkanığı hallerde safra barsağa akmaz. Safra yollarında biriken bilirubin kana ve buradan da idrara geçer. Bu tür sarılıklara **tıkanma sarılığı** adı verilir.

Tıkanma sarılığının safra barsağa akmadığı için tıkanma derecesine göre ürobilinojen yapımında azalma olur. Bundan dolayı idrar ve feçeste hemen hemen hiç ürobilinojen yoktur.

Karaciğer hastalıklarında mesela toksik ve viral hepatitlerde safra yollarına salgılanmasında bozukluk olur ve bir kısmı kana geçer, geri kalanı safra ile barsağa atılır. Ayrıca dokularda birikerek sarılık tablosunun ortaya çıkmasına sebep olur. Buna **hepatojen sarılık** adı verilir. Kana geçen direkt bilirubin idrarla atılır. Bu durumda idrarla atılan ürobilinojen miktarı da artar. Bunun sebebi karaciğer hücrelerindeki bozukluk dolayısıyla barsaklardan emilen

ürobilinojenlerin portal kandan alınarak safraya verilmesindeki yetersizliktir. Bu durum kandaki ve neticede idrardaki ürobilinojen seviyesinin artmasına yol açar.

Eritrosit yıkımının arttığı hemolitik hastalıklarda retiküloendotelyal sistemde oluşan bilirubin miktarı arttığında kandaki indirekt bilirubin seviyesi yükselir. Sarılık tablosu ortaya çıkar. Buna **hemolitik sarılık** adı verilir. Fakat bu bilirubin suda çözünmediğinden idrara geçemez. Karaciğere gelip glukuronik asitle bağlanarak safra ile barsağa atılır. Barsağa geçen bilirubin miktarı fazla olduğundan ürobilinojen oluşur. Bunun sonucunda idrarla atılan ürobilinojen miktarında da artma olur.

1-İdrarda Bilirubin Aranması (Rosin Deneyi)

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpünün 2/3 üne kadar idrar konur. Tüp hafifçe eğilerek tabaka yapacak şekilde 2 ml rosin reaktifi ilave edilir. İki sıvının temas yüzeyinde *yeşil* rengin meydana gelip gelmediğine bakılır.

Yeşil renk yoksa idrarda bilirubin yok demektir. *Yeşil* halkanın mevcudiyeti idrarda bilirubin bulunduğunu gösterir. Rengin şiddetine ve halkanın kalınlığına göre sonuçlar 1+, 2+, 3+ veya 4+ olarak gösterilir.

Rengin şiddeti 4+ olduğu zaman idrar 10, 20, 30 kere sulandırılarak pozitif tepkime veren seyreltme oranı tespit edilmelidir. Normal idrarlarda 1/20 seyreltmeden sonra renk meydana gelmez.

Reaktif:

1-Rosin reaktifi: Alkolde %0,5 g lık iyot çözeltisidir.

2-İdrarda Ürobilinojen Aranması (Erllich Deneyi)

Prensip:

Ürobilinojenin asit ortamda p-dimetilaminobenzaldehitte verdiği renk tepkimesine dayanır. Ürobilinojen taze idrarda, en iyisi saat 14-16 arasında toplanan idrarda, aranmasıdır. Çünkü idrar bekletilirse ürobilinojen oksitlenerek ürobiline çevrilir.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 10 mL taze idrar üzerine 1 mL Erlich reaktifi konur, karıştırılır, 3-5 dak. bekletilir. Bu sürenin sonunda *kiraz kırmızısı* bir rengin meydana gelip gelmediğine bakılır.

Normalde ancak beyaz zemin üzerine tüpün ağzından bakmakla görülebilen bir pembelik olur veya renk değişimi olmaz. Buna ürobilinojen normaldir denir.

Ürobilinojen artmışsa kiraz kırmızısı bir renk meydana gelir. Renk şiddetine göre 1+, 2+, 3+ veya 4+ şeklinde gösterilir.

Rengin şiddeti 4+ olduğu zaman idrar 10, 20, 30 kere sulandırılarak pozitif tepkime veren seyreltme oranı tespit edilmelidir. Normal idrarlarda 1/20 seyreltmeden sonra renk meydana gelmez.

Reaktif:

1-Ehrlich reaktifi:80 ml saf suya 20 mL derişik HCl konur, karıştırılır. Buna 2g p-dimetilaminobenzaldehit ilave edilerek çözülür.

SORULAR

- 1-.Safra boylarının adlarını belirtiniz.
- 2-Normal bir idrarda safra boyası bulunurmu? Açıklayınız.
- 3- İdrarda safra boylarının varlığını nasıl gösterirsiniz?

10. SÜTTE KAZEİNİN ÇÖKTÜRÜLMESİ, BELİRTİMİ VE SÜTTE LAKTOZ MİKTARININ TAYİNİ

Süt özellikle protein, kalsiyum, vitamin, mineral, enzim vb. gibi beslenmede çok önemli olan çeşitli besinleri bünyesinde barındıran temel gıda maddesidir. Canlı türü ne olursa olsun sütün bileşenleri:

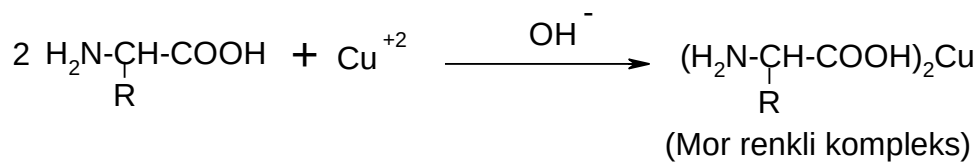
Su	% 86,6-89,5 arasında,
Kuru madde ağırlığı	% 11-38 arasında
Protein miktarı	% 2,5-15,0 arasında
Yağ miktarı	% 1,8-20 arasında
Laktoz (süt şekeri) miktarı	% 1,3-7,0 arasında
Kül (kuru madde) miktarı	% 0,5-2,5 arasındaki miktarlarda değiştiği söylenebilir.

1-Sütte Kazeinin Çöktürülmesi ve Belirtimi

Proteinler izoelektrik noktalarında kolayca pıhtılaşarak çökerler. Süt proteini olan kazeinin çöktürülmesi için süte buzlu asetik asit ilave edilmek suretiyle ortamın pH'sı kazeinin izoelektrik noktası olan pH= 4,6 ya getirilir.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 2,5 mL süt, 0,1 mL buzlu asetik asit konularak çalkalanır. Tüpün dibinde kalan çökeleğe 1 mL saf su katılarak çalkalanır ve çökelek süspansiyon haline getirilir. Bir deney tüpüne bu süspansiyondan 0,2 mL konur ve üzerine 2 mL biüre rektifi ve 1mL %10'luk NaOH rektifi ilave edilir. Meydana gelen mor renk peptid bağının varlığını gösterir.



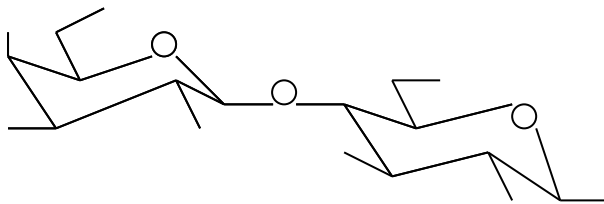
Biüre tepkimesi

2-Sütte Laktoz Tayini

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 2 mL çiğ süt, 1 mL %10'luk sodyum tungustat, 1 mL 2/3 N H₂SO₄ konularak çalkalanır. Çökme tam olmadığı taktirde tüpe birkaç damla buzlu asetik asit damlatılır. Birkaç dakika bekletildikten sonra 16 mL saf su ilave edilerek hacim 20 mL'ye tamamlanır, süzülür. Süzüntü bir bürete doldurulur.

Bir erlene 5 mL Benedict kantitatif reaktifi konur. Bir spatül ucu kristal sodyum karbonat katılır. Erlen ısıtılarak çözülmesi sağlanır. Çözelti kaynamaya başlayınca büretteki süzüntü damla damla erlene ilave edilir. Her damladan sonra erlendeki sıvı çalkalanır ve kaynatılır. Kırmızı çökelek oluşuncaya kadar titrasyona devam edilir. Kırmızı renk oluştuğu anda titrasyon durdurulur ve harcanan süzüntü miktarı büretten okunarak kaydedilir.



Laktoz (D-Galaktopiranozil-1β-O-4'-D-Glukopiranoz)

Örnek Hesaplama:

5 mL Benedict kantitatif reaktifine eşdeğer laktoz miktarı 13,4 mg'dır.

Harcanan süzüntü miktarı = 3 mL

3 mL süzüntüde 13,4 mg laktoz varsa

100 mL süzüntüde X mg laktoz

$$X = 447 \text{ mg laktoz} \times \text{Seyrelme faktörü} = 447 \times 10 = 4470 \text{ mg laktoz}$$

Analizde 2 mL çiğ süt alınıp 20 mL'ye tamamlandı. Bu yüzden 10 kat seyrelme var.

1 g 1000 mg ise

X g 4770 mg laktoz

$$X = 4,77 \text{ g laktoz} / 100 \text{ mL süt}$$

Reaktifler:

1-% 1'lik buzlu asetik asit

2- Biüre reaktifi (% 0,5'lik CuSO_4)

3-% 10'luk sodyum tungustat

4-0,3 M H_2SO_4

5- Benedict reaktifi: Litrelik bir behere 173 g sodyum sitrat, 100 g susuz sodyum karbonat ve 600 mL kadar saf su konur ve karıştırılır. Isıtılarak çözünmesi sağlanır. Başka bir beherde 17,3 g kristalize bakır sülfat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 100 mL saf suda çözülür ve daha önce hazırlanan çözeltiye devamlı karıştırılarak yavaş yavaş ilave edilir.

SORULAR

1-. Süt proteini nedir? Nasıl çöktürülür?

2-Peptit bağı nedir? Gösteriniz. Bir proteindeki peptit bağının varlığı nasıl anlaşılır? Reaksiyonu ile birlikte gösteriniz.

3-Laktozun yapısı nasıldır? Sütte laktoz tayini nasıl yapılır?

4-Sütte laktoz tayininde proteinler çöktürüldükten sonra elde edilen süzüntü bir bürete doldurulmuş ve bir erlenedeki 5 mL Benedict reaktifi ile titre edilmiştir. Süzüntüden 4 mL harcandığına göre sütteki laktoz miktarını mg/100 mL olarak bulunuz.

11. KANDA GLUKOZ TAYİNİ

Glukoz insan kanında bulunan en önemli monosakkarittir. Glukoz insan ve hayvan dokularının enerjisini sağlar. Bu canlıların kalori ihtiyaçlarının yarısından fazlası glukoz tarafından sağlanmaktadır. Glukoz altı karbona sahip bir aldoheksozdur.

Glukoz meyve sularında, nişastada, şeker kamışında, maltoz ve laktozda bulunur. Hidroliz ile açığa çıkar. Organizmanın kullandığı ve kanda taşınan en önemli şekerdir. Şeker hastalarının idrarında bulunur. İndirgeyici bir şekerdir.

Glukoz bağırsaklardan emilerek kana geçtikten sonra vücudun enerji ihtiyacı doğrultusunda glikoliz yoluyla piruvata kadar yıkılır. Glukozun piruvata yıkımı aerobik glikoliz ile olmaktadır ki bu yolu mitokondriye sahip hücreler kullanmaktadır. Eritrositler, kornea, lens ve retina hücreleri çok az mitokondri içerirler bu nedenle glikolitik yol bu dokuların primer enerji gereksinimlerini karşıladıkları yoldur. Bu dokularda anaerobik glikoliz olur ve son ürün laktik asittir.

Glukozun kandan hücrelere kullanılmak üzere girişinden sorumlu tek hormon insülin dir. İnsüline zıt olarak çalışan bir diğer hormon ise glukagon hormonudur. Dolayısıyla kandaki glukoz konsantrasyonu bu iki hormon tarafından öncelikli olarak etkilenmektedir. Kan glukozu azaldığında ve hücrelerin enerji ihtiyaçları arttığında glukagon hormonunu etkisi ile glikojen depoları boşalmaya ve kan şekeri artmaya başlar. Kan şekeri arttığında ise hücreler glikozun girişi insülin hormonu aracılığı ile olmaktadır. Kandaki glukoz seviyesi karaciğer tarafından düzenlenir. Kan şekeri belirli sınırlar arasında sabit tutulmaktadır. Kan şekerinin normal seviyesine glisemi denmektedir. Hastalık hallerinde normal sınırların üstüne çıkabilir. Yükselmesinde hiperglisemi, düşmesine ise hipoglisemi adı verilir.

Hipergliseminin görüldüğü başlıca haller şeker hastalığı ve tiroid, hipofiz ve adrenal glandların hiperaktivitesidir. Hipoglisemi ise, şeker hastalığı tedavisi esnasında yüksek dozda insülin verildiği zaman, insülin salgılanmasına yol açan pankreas tümerlerinde, adrenal korteks, hipofiz ve tiroid yetmezliklerinde ve diğer bazı hallerde meydana gelebilir.

Metot

Kanda glukoz miktarının ölçülmesi için değişik prensiplere dayanan çeşitli metotlar kullanılmaktadır. Burada Folin-Wu metodu verilmiştir.

Folin-Wu Metodu İle Kanda Şeker Tayini

Prensip:

Glukoz tayini yapılacak olan kan, plazma, ya da serum örneği içinden glukozun yanı sıra indirgeyici özelliği bulunan proteinler çöktürülerek uzaklaştırılır. Bu amaçla sodyum tungustat kullanılır. Daha sonra numune içine alkali bakır tartarat çözeltisi konulur. Glukozun indirgen özelliği sebebiyle Cu^{++} , Cu^{+} 'e indirgenir ve bakır (I) oksit meydana gelir. Cu_2O daha sonra ilave edilen renksiz fosfomolibdik asidi indirgeyerek mavi renkli fosfomolibdöz aside çevirir. Meydana gelen rengin şiddeti glukoz miktarı ile orantılıdır. Bu renk şiddeti bir glukoz standardı ile mukayese edilerek glukoz miktarı bulunur.

Deneyin Yapılışı:

Kör, numune ve standart için 3 tane deney tüpü alınarak aşağıdaki şekilde çalışılır.

Proteinsiz kan süzüntüsünün elde edilmesi:

Reaktifler	Kör	Numune	Standart
Distile su	8 mL	7 mL	7 mL
Antikoagulanlı kan	-	1 mL	-
%100 mg'lık glukoz standardı	-	-	1 mL
0,3 M H_2SO_4	1 mL	1 mL	1 mL
%10'luk Sodyum tungustat	1 mL	1 mL	1 mL

Tüpler çalkalanır, 5 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve sonra süzülür.

Üç tane temiz deney tüpü alınarak aşağıdaki şekilde çalışılır

	Kör	Numune	Standart
Kör süzüntüsü	1 mL	-	-
Numune süzüntüsü	-	1 mL	-
Standart süzüntüsü	-	-	1 mL
Alkali bakır tartarat çözeltisi	1 mL	1 mL	1 mL
Tüpler karıştırılır, 8 dak. kaynar su banyosunda tutulur, banyodan çıkarılır, soğutulur.			
Fosfomolibdik asit	1 mL	1 mL	1 mL

Karıştırılıp 5 dakika kaynar su banyosunda tutulur. Musluk suyu altında soğutulduktan sonra hacim distile su ile 12,5 mL 'ye tamamlanır (9,5 mL distile su ilave edilerek) . 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 640 nm'de köre karşı numune ve standart absorbensları okunur.

Hesabı:

$$\% \text{ mg glukoz} = \frac{\text{Numunenin absorbensı}}{\text{Standartın absorbensı}} \times \text{Standartın konsantrasyonu}$$

Normal Değerler:

Glukoz dışında kanda bulunan indirgen maddelerin de tepkimeye girmesi sebebiyle Folin-Wu metodu ile bulunan normal sınırlar diğer metotlara göre daha yüksek olup %80-120 mg arasındadır.

Reaktifler:

1-%10'luk sodyum tungustat:10 g sodyum tungustat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 100 mL'lik bir balon jojeye konur. Saf su ile çözülür ve hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2-0,3 M 1L H_2SO_4

3-Alkali bakır tartarat çözeltisi: litrelik bir balon jojeye 40 g anhidrat sodyum karbonat konur, yaklaşık 400 mL saf su ile çözülür. Üzerine 7,5 g tartarik asit ve 4,5 g kristalize bakır sülfat ilave edilir. Karıştırılarak çözüldükten sonra saf su ile litreye tamamlanır. Bulanıklık görüldüğü takdirde süzülür.

4-Fosfomolibdik asit çözeltisi: Litrelik bir erlene 200 mL saf su, 200 mL %10'luk NaOH, 25 g molibdik asit ve 5 g sodyum tungustat konur. Hiç amonyak kalmayıncaya kadar 30-40 dakika kuvvetle kaynatılır, soğutulur. 500 mL'lik balon jojeye aktarılır. Saf su ile hacim

yaklaşık 350 mL'ye getirilir ve üzerine 125 mL ortofosforik asit(%85'lik) ilave edilir. Soğutulduktan sonra saf su ile 500 mL'ye tamamlanır.

5-% 1'lik stok glukoz çözeltisi: 100 mL'lik balon jojeye 250 mg benzoik asit konur, üzerine 50 mL saf su ilave edilerek çözülür. Etüvde kurutulmuş 0,1 g saf glukoz konur ve çözüldükten sonra hacim 100 mL'ye tamamlanır. Buzdolabında saklanır.

6-Glukoz çalışma çözeltisi: Stok glukoz standardından 10 mL alınarak saf su ile 100 mL'ye tamamlanır. Bu çözelti kanda % 100 mg glukoz karşılık gelir.

7-Standart glukoz çözeltisi: 100 mg/ 100 mL glukoz

SORULAR

1-Glukozun yapısı nasıldır? Gösteriniz.

2-Glisemi, hiperglisemi ve hipoglisemi nedir? Açıklayınız.

3-Kanda glukoz tayininin prensibini reaksiyonu ile birlikte yazınız.

4-Kanda glukoz tayini yapılırken neden proteinsiz kan süzöntüsü kullanılır? Açıklayınız.

12. KANDA TOPLAM LİPİT ve KOLESTEROL TAYİNİ

Lipidler eter, kloroform ve aseton gibi apolar organik çözücülerde çözünüp, suda çözünmeyen maddelerdir. Serumda tayini edilen toplam lipid içerisinde başlıca nötral yağlar (trigliserit), serbest ve ester kolesterol, fosfolipidler ve serbest yağ asitleri bulunur. Dolaşımda lipoproteinler şeklinde bulunurlar. Lipoproteinler lipidler ile proteinlerin birleşmesinden meydana gelirler (Şilomikronlar, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler, düşük yoğunluklu proteinler, yüksek yoğunluklu lipoproteinler). Serbest yağ asitleri plazmada albumine bağlanarak taşınır.

Lipidlerin organizmada birçok görevi vardır. Bunlardan yapısal eleman oluşu, enerji kaynağı oluşu, enerjinin uzun süreli depo şekli oluşu, vitaminlerin bazıları için çözücü oluşu ve önemli bazı bileşiklere (safra asitleri, hormonlar vs) kaynaklık edişleri en önemlileridir.

Lipid metabolizması bozukluklarında toplam lipid miktarının teşhisteki önemi sınırlıdır. Klinik teşhiste başlıca rolü olan lipid reaksiyonları toplam kolesterol ve trigliseritlerdir.

Kanda toplam lipid miktarının artmasına **hiperlipidemi** denir. Hiperlipidemiler fizyolojik, esansiyel ve semptomatik olmak üzere 3 gruba ayrılır.

- a) *Fizyolojik hiperlipidemiler:* Yağlı yemeklerden sonra ve tamamen yağsız besinli diyetten sonra geçici olarak kanda lipid miktarının yükselmesidir.
- b) *Esansiyel (primer) hiperlipidemiler:* Bir genetik bozuklukluktan dolayı meydana gelen hiperlipidemilerdir.
- c) *Semptomatik (sekonder) hiperlipidemiler:* Çeşitli hastalıklarda görülen hiperlipidemilerdir.

Hiperlipidemiler, şeker hastalığı, kronik pankreas hastalığı, hipotiroidizm, gut ve hipofiz yetmezliği gibi hastalıklarda görülmektedir.

1-Fosfovanilin Metodu İle Serumda Toplam Lipid Tayini

Prensip:

Serum derişik H_2SO_4 ile ısıtılır. Üzerine fosforik asit-vanilin reaktifi ilave edilir. Serum lipidleri sülfosfosvanilin tepkimesi ile gül kırmızısı bir kompleks oluştururlar. Serumdaki lipid miktarı ile doğru orantılı olan bu rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçülür. Aynı şekilde bir standartla karşılaştırarak numunedeki toplam lipid miktarı tayin edilir.

Deneyin Yapılışı:

Kör, numune ve standart için 3 tane deney tüpü alınarak aşağıdaki şekilde çalışılır.

	Kör	Numune	Standart
Numune çözeltisi	-	0,2 mL	-
Standart çözeltisi	-	-	0,2 mL
Saf su	0,2 mL	-	-
Derişik H ₂ SO ₄	2 mL	2 mL	2 mL

Hazırlanan bu tüpler kaynar su banyosunda 10 dakika bekletilir. Musluk suyu altında soğutulur. Daha sonra standart, numune ve kör olarak işaretlenen tüplerin her birine 4 mL fosfovanilin renk reaktifinden konulur. 20 dakika sonra standart ve numunenin absorbensları 520 nm de köre karşı ölçülür.

Hesabı:

$$\% \text{ mg Lipid} = \frac{\text{Numunenin absorbensı}}{\text{Standartın absorbensı}} \times \text{Standartın konsantrasyonu}$$

Normal değerleri: %600-1000 mg

Reaktifler:

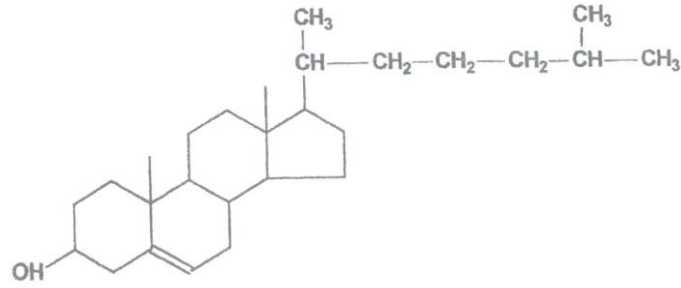
1-Derişik H₂SO₄

2-Standart: Kloroformdaki % 600-1000 mg'lik kolesterol çözeltisidir.

3-Renk reaktifi: 0,008 M (0,992 g/L) vanilin, 11,9 M H₃PO₄ de çözülerek hazırlanır.

2- Kanda Toplam Kolesterol Miktar Tayini (Zlatkis Deneyi)

Serum normal kolesterol düzeyi 110–200 mg dır. Kanda kolesterol düzenin çeşitli nedenler ile artması sonucunda hiperkolesterolemi oluşmaktadır. Kalıtsal ailesel kolesterolemide kolesterol çeşitli dokularda birikmektedir. Buna “Ksantomatoz” adı verilmektedir.



kolesterol

Prensip:

Glasiyel asetik asit ve derişik sülfürik asit karışımı içerisindeki demir (III) klorür ile kolesterol ve kolesteril esterleri arasında oluşan renk reaksiyonuna dayanan kolorimetrik bir metottur.

Deneyin Yapılışı:

7 adet deney tüpü alınarak aşağıdaki tabloya göre çalışılır.

TÜP →	Kör mL	Örnek mL	St.1 mL	St.2 mL	St.3 mL	St.4 mL	St.5 mL
Serum	-	0,1	-	-	-	-	-
Saf Su	0,1	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Glasiyel asetik asit	3	3	-	-	-	-	-
Kolesterol 0,1 g/l	-	-	3	-	-	-	-
Kolesterol 0,2 g/l	-	-	-	3	-	-	-
Kolesterol 0,5 g/l	-	-	-	-	3	-	-
Kolesterol 0,8 g/l	-	-	-	-	-	3	-
Kolesterol 1,0 g/l	-	-	-	-	-	-	3
Bütün Tüpler Karıştırılıp Oda Sıcaklığına Gelmesi Sağlanır							
Demir (III) Klorür	2	2	2	2	2	2	2

Tüpler iyice karıştırılır. Başlangıçta oluşan açık kahverengi 1 dakika içinde mor renge dönüşür. Bütün tüpler oda sıcaklığında 1 saat bekletilir daha sonra standart tüpler ve örnek tüpün absorbensları kör tüpüne karşı 560 nm dalga boyunda okunur.

Örnekteki toplam kolesterol miktarı, standart çözeltilere (g/L) karşı optik yoğunluk değerleri grafiğe geçilerek elde edilen standart kalibrasyon grafiği kullanılarak hesaplanır.

Reaktifler:

- 1- Kolesterol çözeltileri: Kolesterolün asetik asitteki çözeltileri
- 2- Demir klorür Çözeltisi ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): Stok Demir (III) klorür çözeltisi; 10 g Demir (III) klorür, 100 mL glasiyel asetik asit içinde çözünür; 2 mL stok çözelti alınarak 200 mL derişik H_2SO_4 ile seyreltilir.

SORULAR

- 1-Lipid nedir? Lipid ile yağ arasındaki fark nedir? Açıklayınız.
- 2-Hiperlipidemi nedir? Kaç gruba ayrılır. Açıklayınız.
- 3-Kanda toplam lipid tayininin nasıl yapıldığını açıklayınız.
- 4-Kanda toplam kolesterol tayini nasıl yapılır?

13. KANDA TOPLAM PROTEİN TAYİNİ

Sağlıklı erişkinlerde serum proteinleri 6-8 g/dL kadardır. Bunun %3,5-5,5 gramını albumin, geri kalanını α_1 , α_2 , β ve γ globulinler teşkil eder. Serum proteinlerinin ayrı ayrı toplamının ne kadarını teşkil ettiği de önemlidir, mesela albumin toplam proteinlerin %50,6-58,6 sını teşkil eder. Bazı hastalıklarda toplam protein miktarında azalma olduğu gibi protein fonksiyonlarında da değişmeler olabilir, bu karaciğer hastalıklarında toplam protein ve albumin miktarında düşme görülür.

Yetersiz beslenme, böbrek hastalıkları, karaciğer hastalıkları (siroz, kanser) ve kalp yetmezliğinde Hipoproteinemi görülmektedir.

Hiperproteinemide ise serum globulinlerinin artması görülür. Retiküloendotelyal sistem hastalıklarında globulin miktarı artar. Serum albuminin artması nadirdir.

Prensip:

Serumda toplam protein tayini, alkali ortamda protein molekülündeki peptid bağlarının Cu^{++} iyonlarıyla mor renkli kompleks teşkil etmesine dayanır. Buna biüre tepkimesi denir.

Deneyin Yapılışı:

Üç tüp alınır kör, standart ve numune tüpleri olarak işaretlenir, tabloda görüldüğü gibi hazırlanır:

	Kör	Standart	Numune
Serum fizyolojik	2,0 mL	1,9 mL	1,9 mL
Standart	–	0,1 mL	–
Serum	–	–	0,1 mL
Biüre reaktifi	8,0 mL	8,0 mL	8,0 mL

Tüpler çalkalanarak 30 dakika sonra köre karşı 540 nm de absorbansı okunur.

Hesaplama:

$$\text{Toplam protein g/dl} = \frac{\text{Numunenin absorbansı}}{\text{Standartın absorbansı}} \times \text{Standartın konsantrasyonu}$$

Reaktifler:

1-Fizyolojik serum: 8,5 g NaCl bir miktar suda çözülür ve litreye tamamlanır.

2-Biüre reaktifi: 1 litrelik balon jojeye 1,5 g kristalize CuSO_4 ve 6 g sodyum potasyum tartarat konur. 500 mL distile suda çözülür. Üzerine 300 mL karbonatsız % NaOH yavaş karıştırılarak ilave edilir. Distile su ile 1000 mL ye tamamlanır.

3-Standart albumin çözeltisi: 5 g albumini bir miktar suda çözülür ve 100 mL'ye tamamlanır

SORULAR

1-Serum proteinleri nelerdir?

2-Serumda toplam protein tayininin prensibini reaksiyonu ile birlikte açıklayınız?

14.KANDA KALSİYUM TAYİNİ

Vücutta bulunan kalsiyum çok büyük bir kısmı (yaklaşık %99 kadarı) kemik ve dişlerde, az bir kısmı ise vücut sıvılarında bulunmaktadır. Plazmada kalsiyum üç fraksiyon halinde bulunur:

1. İyonize kalsiyum (buna diffüzlenebilen kalsiyum da denir)
2. Proteine bağlı kalsiyum
3. Muhtemelen sitrat kompleksi halinde bulunan kalsiyum

Bu son iki fraksiyona diffüzlenemeyen kalsiyum denir.

Bunların en önemlisi iyonize kalsiyumdur ve kandaki seviyesi hormonal kontrol altındadır. İyonize kalsiyum kan pıhtılaşmasında, kalbin, kasların, silindirlerin fonksiyonlarında ve hücre membranı geçirgenliğinde büyük önem taşır.

Burada uygulanan kalsiyum tayini yönteminde bu üç fraksiyon birlikte ölçülmektedir.

Kalsiyum kanda %9-11 mg (4,5-5,5 mEq/l) arasında bulunur. Kalsiyum kandaki artışına hiperkalsemi denir, bu hiperparatiroidizm ve D vitamininin aşırı alındığı hallerde meydana gelir. Hipokalsemi ise hiperparatiroidizm, raşitizm ve ağır böbrek harabiyeti gibi hallerde görülür.

Prensip:

Burada kalsiyum tayini için titrimetrik bir yöntem kullanılacaktır. Bunun için serum kalsiyumu önce amonyum okzalatla çözünmeyen kalsiyum okzalat halinde çöktürülür. Fazla okzalatın uzaklaştırılması için çökelek amonyakla yıkanır. Sonra sülfürik asitle bu çökelek çözülür ve kalsiyuma eşdeğer miktardaki okzalat ayarlı KMnO_4 ile titre edilir.

Deneyin Yapılışı:

Kör ve numune için iki santrifüj tüpü alınır. Tabloda görüldüğü gibi tüpler hazırlanır:

	Kör	Numune
Distile su	4,0 mL	2,0 mL
Serum	—	2,0 mL
%4'lük amonyum okzalat	1,0 mL	1,0 mL

Tüpler karıştırılır ve 30 dakika 37 °C deki su banyosunda bekletilir. Su banyosundan alınan tüpler soğutulur ve 5 dakika santrifüjlenir. Üstteki sıvı atılır. Dipteki çökelti üzerine;

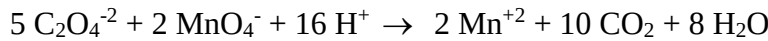
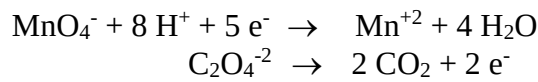
%2'lik Amonyak çözeltisi	2,0 mL	2,0 mL
--------------------------	--------	--------

Karıştırılır tekrar santrifüjlenir. Dipte kalan çökelti üzerine:

0,5 M H ₂ SO ₄	2,0 mL	2,0 mL
--------------------------------------	--------	--------

60-70 °C 'lık su banyosunda çökelek çözününceye kadar bekletilir ve sıcakken 0,001 M ayarlı KMnO₄ ile 2 dakika kalabilen pembelik elde edilene kadar titre edilir.

Hesaplama



Reaksiyonundan faydalananarak % kalsiyum hesaplanır örneğin:

Titrasyondaki dönüm noktasında harcanan KMnO₄ miktarı 5 mL'ise

$$5 \times 10^{-3} \times 4 \times 10^{-4} \text{ mol/L} = 2 \times 10^{-6} \text{ mol KMnO}_4$$

2,0 ml serumda bulunan Ca⁺² 'nin miktarı:

$$2 \times 10^{-6} \text{ mol KMnO}_4 \times \frac{1 \text{ mol MnO}_4^-}{1 \text{ mol KMnO}_4} \times \frac{5 \text{ mol C}_2\text{O}_4^{2-}}{2 \text{ mol MnO}_4^-} \times \frac{1 \text{ mol Ca}^{+2}}{1 \text{ mol C}_2\text{O}_4^{2-}} \times \frac{40 \text{ g Ca}^{+2}}{1 \text{ mol Ca}^{+2}} \times \frac{10^3 \text{ mg}}{1 \text{ g Ca}^{+2}} = 0,2 \text{ mg Ca}^{+2}$$

100 ml serumda bulunan Ca⁺² 'nin miktarı:

$$\frac{0,2 \text{ mg Ca}^{+2}}{2,0 \text{ ml Serum}} \times 100 \text{ ml Serum} = \% 10 \text{ mg Ca}^{+2}$$

Kandaki normal değerler: % 9-11 mg

Reaktifler:

1-%4 g'lık amonyum okzalat çözeltisi

2-%2'lik amonyak çözeltisi

3-0,5 M H₂SO₄ çözeltisi: 27 mL derişik H₂SO₄ 1 litreye tamamlanır

4-Ayarlı 0,01 M KMnO₄ çözeltisi: kullanmadan önce 1 litrelik balon jojeye 100 mL 0,01 M KMnO₄ çözeltisini distile suyla 1 litreye tamamlıyoruz.

SORULAR

1-Kalsiyumun plazmadaki fraksiyonlarını açıklayınız, ve bu fraksiyonların en önemli olanını belirtiniz?

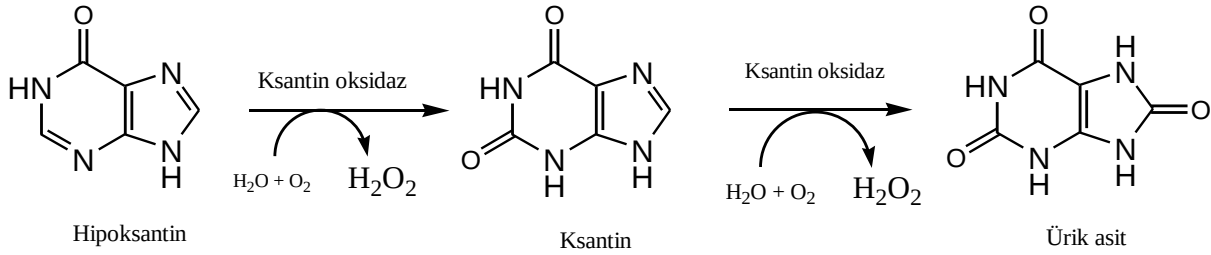
2-Kanda kalsiyum tayininin prensibini reaksiyonu ile birlikte açıklayınız?

3-4 mL kan örneği alınarak kandaki kalsiyum, amonyum okzalat ile çöktürülüyor oluşan çökelek H_2SO_4 'de çözülüyor ve 2×10^{-3} M KMnO_4 ile titre ediliyor titrasyon sonucunda 10 mL KMnO_4 harcanıldığına göre kandaki kalsiyum derişimini mg/100 mL olarak hesaplayınız? ($\text{Ca} = 40$ g/mol)

15. KANDA ÜRİK ASİT TAYİNİ

Memelilerde adenin, guanin, ksantin veya hipoksantin yapısındaki azotun çoğu, idrarda ürik asit veya allantoin olarak ortaya çıkmaktadır.

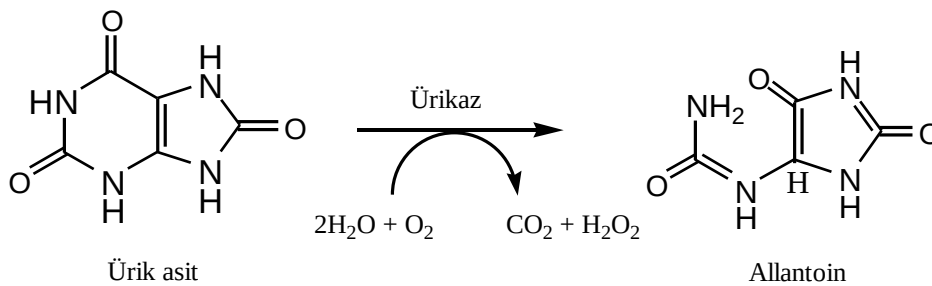
Hipoksantin ve ksantin, ksantin oksidaz enzimi ile son ürün olan ürik aside oksitlenir. Ürik asit, en çok karaciğer ve intestinal mukozada oluşmaktadır.



Zayıf asit olan ürik asit (pK 5,8), idrar pH'sına bağımlı olarak, görece suda çözünmeyen asit (asit pH'da) veya suda daha fazla çözünen sodyum ürat tuzu halinde (nötralliğe yakın pH'da) atılır. Ürat kristalleri, pürin katabolizmasının metabolik bir bozukluğu olan gutta tanı koydurur.

Yüksek primatlar dışında kalan memelilerde, ürikaz enzimi ürik asiti parçalar ve suda çok çözünen son ürün olan allantoin oluşturur.

Öte yandan, insanlarda ürikaz enzimi bulunmadığından, pürin katabolizmasının insandaki son ürünü ürik asittir. Amfibiler, kuşlar ve sürüngenlerde de ürikaz enzimi bulunmaz ve bu hayvanlar, pürin katabolizmasının son ürünü olarak ürik asit ve guanin atar.



Normal insanlarda total ürik asitin net atımı, ortalama 400-600 mg/24 saat'tir.

Kanda ürik asit seviyesinin yükseldiği durumlar:

1. Gut hastalığı
2. Uzun süren açlık halleri
3. Böbrek yetmezliği başlangıcı
4. Fazla miktarda diüretik alınması
5. Alkol zehirlenmesi
6. Anemi ve lösemi
7. Ateroskleroz
8. Gebelik

Kanda ürik asit seviyesinin düştüğü durumlar:

1. Pürinsiz besinlerle beslenme
2. Gut tedavisinden sonra

Prensip:

Ürik asit hafif asidik ortamda fosfotungustik asidi indirgiyerek mavi bir renk meydana getirir. Kolorimetrik olarak ölçülen bu mavi rengin koyuluğu ürik asit miktarı ile doğru orantılıdır.

Deneyin Yapılışı:

Bir deney tüpüne 1 mL serum, 7 mL distile su, 1 mL 0,3 M H_2SO_4 ve 1 mL %10 sodyum tungustat konur, karıştırılır 3 dakika bekletilir ve süzülür. Numune ve kör için üç deney tüpü alınır.

	Kör	Standart	Numune
Süzüntü	-	-	3,0 mL
Standart	-	3,0 mL	-
Distile su	3,0 mL	-	-
%14 Na_2CO_3	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Fosfotungstik asit	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Tüpler karıştırılır. 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir ve 660 nm dalga boyunda köre karşı okunur.

Hesaplama:

$$\% \text{ mg Ürik asit} = \frac{\text{Numunenin absorbansı}}{\text{Standardın absorbansı}} \times \text{Standardın konsantrasyonu}$$

Reaktifler:

1-0,3 M H₂SO₄

2-%10 sodyum tungstat

3-%14 sodyum karbonat

4-Fosfotungstik asit reaktifi: Yuvarlak bir balona 40 g molibdensiz sodyum tungstat (Na₂WO₄ 2H₂O) konularak takriben 300 mL distile suda çözülür. 32 ml %85'lik fosforik asit ilave edilir. Gerisoğutucu altında 2 saat yavaşça kaynatılır, soğutulur, litrelik bir balon jojeye aktarılır ve distile su ile litreye tamamlanır. Sonra içine 32 g lityum sülfat (Li₂SO₄ H₂O) konularak çözülür. Koyu renkli şişede buzdolabında saklanır.

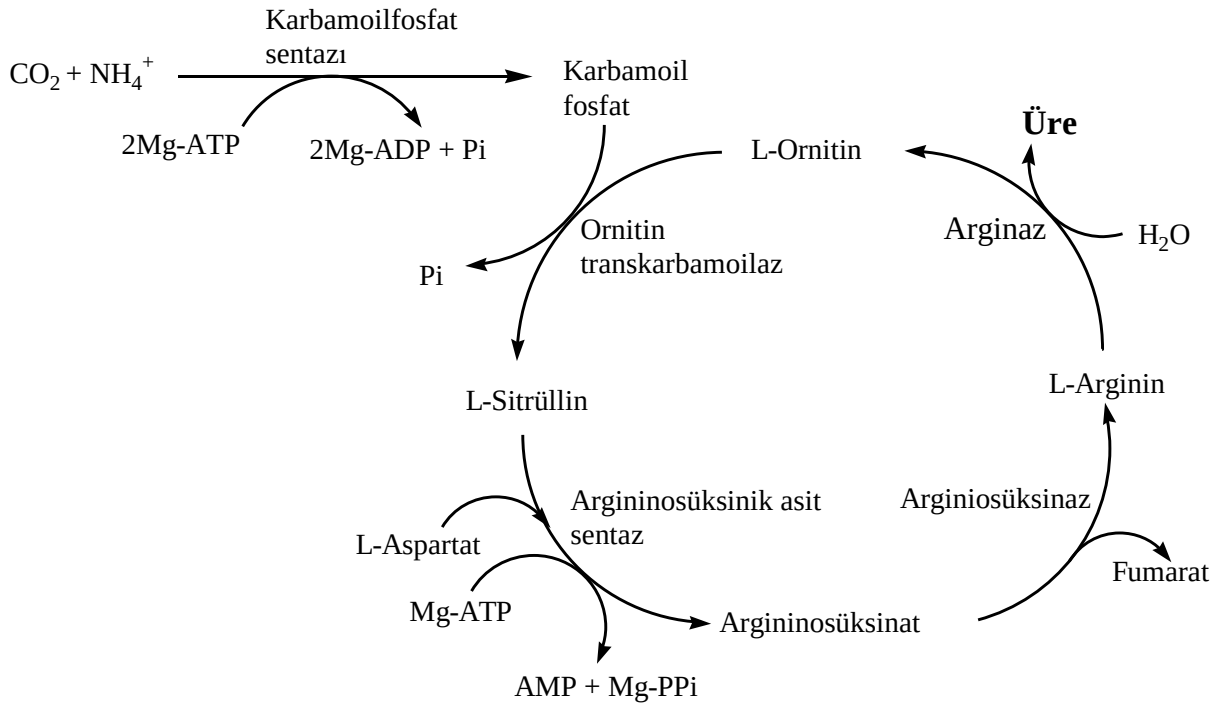
SORULAR:

1-Ürik asit tayininin prensibini açıklayın?

2-İnsanda ksantin ve hipoksantin oksitlenmesi sonucunda idrarda hangi ürün oluşur ve bu reaksiyonu katalize eden enzimi denklem yazarak açıklayınız?

16. KANDA ÜRE TAYİNİ

Memelilerde protein metabolizmasının son ürünü olan üre, iki mol amonyaktan bir mol üre yapımı karaciğerde beş aşamalı bir döngü ile gerçekleşmektedir. Sentezlenen üre kan yolu ile böbreklere gelmekte ve idrarla atılmaktadır.



Normal insanlarda 7-18 mg/dl kadar olan kan üre azotunun (BUN), üre ile arasındaki bağıntı, $\text{Üre} = \text{BUN} \times 2,14$ şeklindedir. Ürenin molekül kütlesi 60, azotun atom kütlesi 14 olduğundan bir molekül üre 2 azot atomu içerdiğine göre 1 molekül ürede bulunan azot miktarı, $\frac{60}{28} =$

2,14'tür

Sağlıklı insanlarda günde idrarla atılan üre miktarı 20-35 g arasında değişir. Ürenin kandaki normal seviyesi ise %20-40 mg dır.

Kan üre düzeyinin 80 mg/dL değerinden fazla olması böbrek fonksiyonlarının bozulduğunun en önemli belirtisidir. Bunun yanı sıra kan amonyak konsantrasyonunun yükselmesi, karaciğer fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak üre döngüsünün iyi çalışmadığını göstermektedir. Siroz ve akut hepatitte üre sentezi yavaşlamaktadır kan amonyak düzeyinin ölçümü karaciğer fonksiyonunun belirlenmesinde son derece yararlı olmaktadır.

Kandaki üre seviyesinin yükseldiği durumlar:

1. Çeşitli böbrek hastalıkları
2. Protein yıkım hızındaki artışı
3. Dolaşım bozuklukları
4. İdrar yolları tıkanmaları

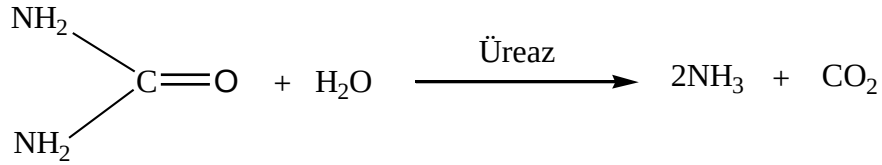
Kandaki üre seviyesinin düşük olduğu durumlar:

1. Karaciğer harabiyeti
2. Düşük proteinli diyet
3. İlaç zehirlenmeleri

Üreaz Metodu

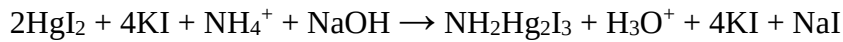
Prensip:

Üre, üreaz enziminin kataliziyle NH_3 ve CO_2 'e ayrılır. Açığa çıkan amonyak Nessler tepkimesi ile tayin edilir.



Nessler Tepkimesi:

İçerisinde HgI_2 ve KI bulunan Nessler reaktifi amonyum iyonları ile alkali çözeltide portakal sarısı koloidal bir bileşik teşkil eder. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen bu rengin şiddeti üre miktarıyla doğru orantılıdır.



Deneyin Yapılışı:

	Kör	Standart	Numune
Saf su	3,0 mL	2,8 mL	2,8 mL
Standart	-	0,2 mL	-
Serum	-	-	0,2 mL
Üreaz süspansiyonu	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL

56 °C de su banyosunda 15 dakika tutulur

O,3 M H ₂ SO ₄	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
%10 sodyum tungstat	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL

Bütün tüpler karıştırılır ve süzülür

Süzüntü	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Saf su	4,0 mL	4,0 mL	4,0 mL
Nessler reaktifi	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Standart ve numune tüpünün 490 nm’de köre karşı ölçülür.

Sonuçların Hesaplanması:

$$\text{Üre mg/dl} = \frac{\text{Numunenin absorbansı}}{\text{Standartın absorbans}} \times \text{Standartın konsantrasyonu}$$

Formülüyle hesaplanır, normal değerlerle karşılaştırılır.

Serum üre normal değeri: 15-39 mg/dL

Serum üre azotu (BUN) normal değeri: 7-18 mg/dL

Reaktifler:

1-Standart: %50 mg’lık üre çözeltisi

2-Üreaz çözeltisi: 67 mL gliserin, 33 ml distile su ile karıştırılır, üzerine 2 g üreaz ilave edilir.

Buzdolabında saklanır.

3-%10 sodyum tungstat

4-0,3 M H_2SO_4 : %98'lik H_2SO_4 den 18,01 mL alınarak distile su ile 1 litreye tamamlanır.

Nessler reaktifi: 10 g KI, 10 mL distile suda çözülür. Az miktarda kalıcı bir çökelek oluşana kadar doymuş $HgCl_2$ (60 g/L)'den azar azar eklenir. Sonra 80 mL 9M KOH ilave edilir ve distile suyla 200 mL'ye tamamlanır. Bir gece bekletilip oluşan çökelek ayrılıp süzerek süzöntü alınır.

SORULAR

- 1-**Kanda üre tayininin prensibini denklem yazarak açıklayınız?
- 2-**Kanda üre seviyesinin yükseldiği hastalıklar nelerdir?
- 3-**Üre hangi metabolizmanın son ürünüdür ve nerede oluşur?

17. KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİ I

Çok çeşitli sayıda fonksiyonları olan karaciğer, intermidyer metabolizmasının merkez laboratuvarı durumundadır. Karaciğer hastalıkları ile ilgili fonksiyon testleri başlıca iki maksatla yapılır:

1. Akut ve kronik hastalıkların ayırıcı teşhisi
2. Karaciğer hastalıklarının ağırlık derecesinin tespiti

Karaciğer hastalıklarının teşhisi için karaciğerin farklı fonksiyonlarına dayanan testlerden bir kaçının bir arada yapılması gerekir.

Flokülasyon Testleri

Prensip:

Karaciğer hastalıklarının ekserisinde karaciğerde sentez edilen serum albumin ve fibrinojen miktarları azalır. Bundan dolayı serum globulin miktarında albumine nazaran bir artma görülür. Globulinlerin bazı reaktiflerle çöktürülmesi sonucu meydana gelen bulanıklık ölçülerek karaciğerdeki bozukluğun derecesi tespit edilir.

Flokülasyon testlerinin en önemlileri Timol bulanıklık testi, çinko sülfat testi ve kadmiyum sülfat testidir. Bu testlerden çinko sülfat ve kadmiyum sülfat testlerinin yapılışı aşağıda gösterilmiştir.

1-Kadmiyum Sülfat Testi

Prensip:

Serumdaki alfa ve gama globülinler kadmiyum sülfatlı ortamda bulanıklık ve çökelti meydana getirirler.

Deneyin yapılışı:

İki deney tüpü alınır. Tüplerden birine 0,4 mL serum konur. Üzerine 0,2 mL kadmiyum sülfat ilave edilerek karıştırılır.

Diğer deney tüpüne 0.4 mL serum ve 0.2 mL fizyolojik serum konarak karıştırılır.

Beş dakika içerisinde ikinci tüpe göre birinci tüpte bir bulanıklık meydana gelip gelmediği araştırılır. Tüpte ileri derecede bir bulanıklık meydana geldiği durumlarda karar vermek kolaydır. Hafif bir bulanıklık olup olmadığını anlamak için her iki tüp göz hizasına kaldırılarak pencere tarafına bakılır. Tüplerin içinden görülen pencere çerçevelerinin netlik dereceleri mukayese edilir. Kadmiyumlu tüpten görülen çerçeve diğerlerine nazaran daha net

ise test (+) değerlendirilir. Pencere çerçevesinin görülmeyeceği kadar bulanıklık varsa (++); test başlangıcında üçüncü damladan itibaren bulanıklık görülürse (+++); birinci veya ikinci damladan sonra bulanıklık başlarsa (++++) olarak değerlendirilir.

Normalde test (-) negatiftir.

Kronik karaciğer hastalıkları ile serum globülin fraksiyonlarının yükselmesine yol açan diğer hastalıklarda test pozitifdir.

Reaktifler:

1-Kadmiyum sülfat çözeltisi (%4'lük): 4 g $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ bir miktar distile su ile 100 mL ye tamamlanır.

2-%0,9'luk NaCl çözeltisi

SORULAR

1-Flokülasyon testleri nelerdir ve hangi prensibe dayalı çalışır?

2-Karaciğer fonksiyon testleri hangi maksatla yapılır açıklayınız?

18.KARACİĞER FONKSİYON TESTLERİ II

Karaciğer, birinci işlevinin karaciğer dışı dokulara hizmet etmesi nedeniyle, glukoz ve amino asitler dahil kandaki birçok yapıtaşının miktarlarının düzenlenmesinde doğrudan rol oynar.

Karaciğer için spesifik olan önemli enzimlerden:

Glutamik-pirüvik transaminaz (GPT)

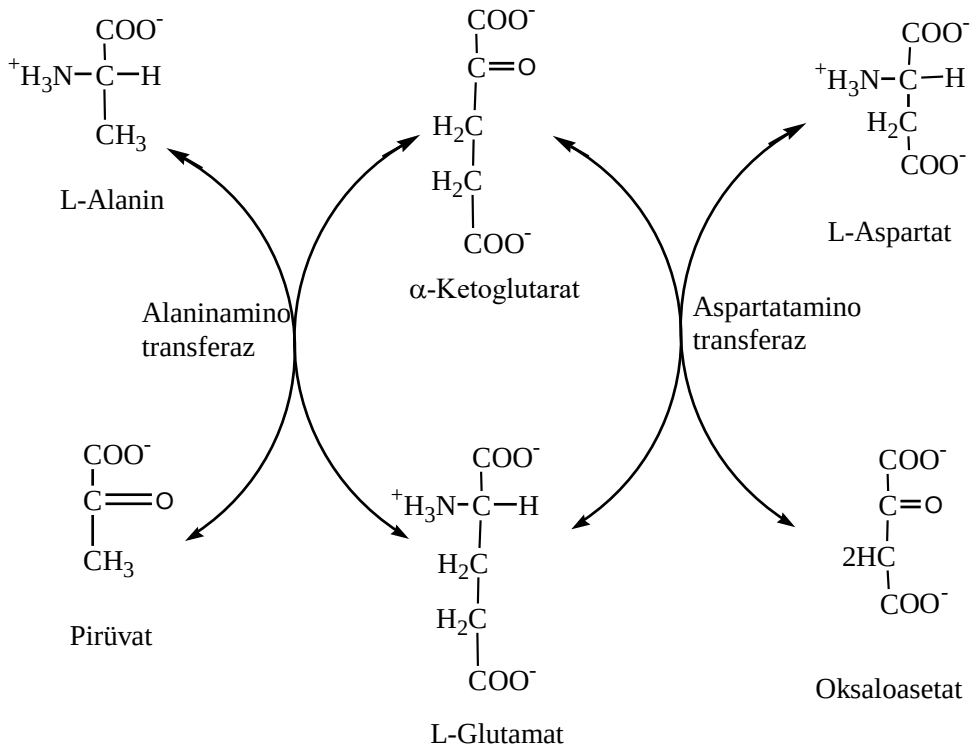
Glutamik-oksaloasetik transaminaz (GOT)

γ -glutamil transpeptidaz

Alkalın fosfataz

Bu enzimlerin bulunduğu hücrelerin harabiyeti veya hücrelerin membran geçirgenliğinin artması sonucunda hücre içinde bulunan enzimler hücre dışına çıkarak kana geçerler. Bundan dolayı bu enzimlerin kandaki aktiviteleri yükselir. Bu enzimlerin serumdaki aktivitelerinin ölçümü, klinikte ayırıcı tanı açısından önem taşımaktadır.

Transaminazlar, amino grubunun bir alfa amino asitten bir alfa keto aside aktarılmasını katalize eden enzimlerdir.



Transaminazlar karaciğer ve kas dokusu başta olmak üzere bütün dokularda yaygındır. Hücrenin sitozol ve mitokondri fraksiyonlarında bulunur. Transaminazlardan GPT ve GOT karaciğer, kas, beyin, böbrek ve testis dokusunda bulunmaktadır.

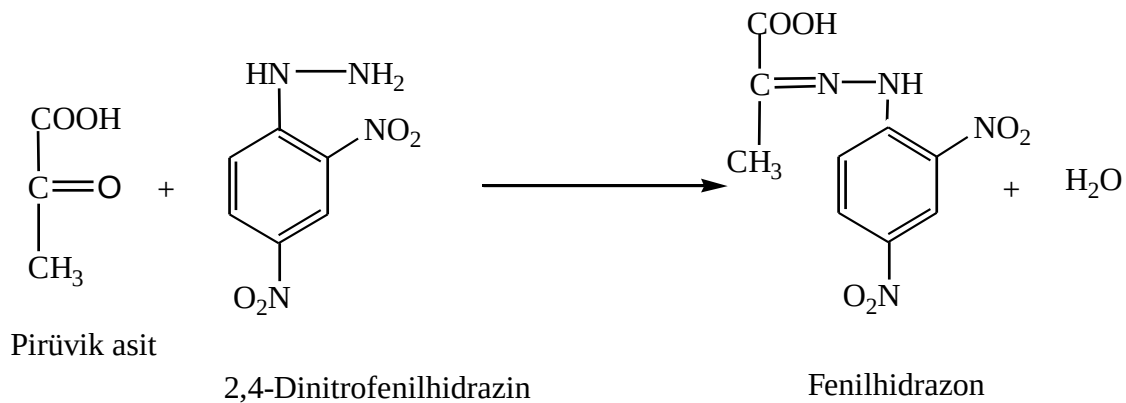
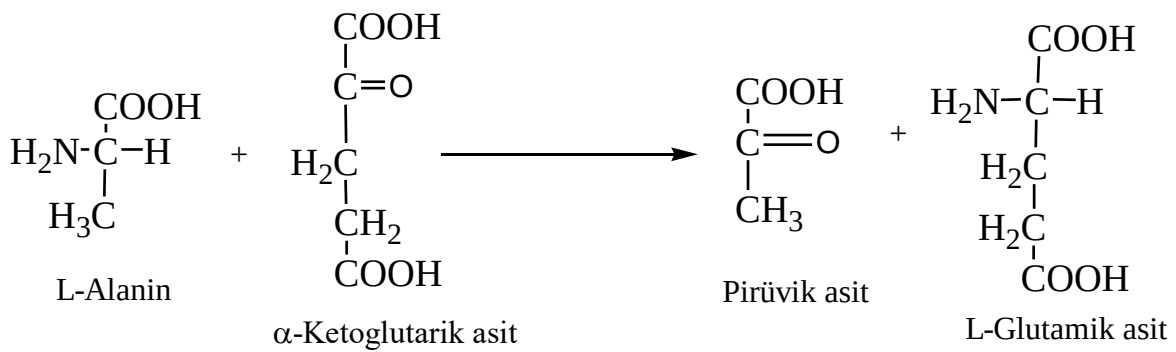
Transaminasyon tepkimeleri geri dönüşümlü oldukları için hem biyosentez, hemde katabolizmada kullanılabilmektedir. Endojen amino asitlerin sentezi için önemli bir metabolik yoldur.

Transaminazların kanda artığı durumlar:

1. Akut miyokard enfarktüs
2. Hepatosellüler hastalıklar
3. Aktif siroz, karaciğer tümörü
4. İnfeksiyöz ya da toksik hepatit

Prensip:

Glutamik pirüvik transaminaz (GPT) enziminin kataliziyle gerçekleşen transaminasyon tepkimesinde alanin ve alfa-ketoglutarik asitten pirüvik asit ve glutamik asit meydana gelir. Pirüvik asit 2,4-dinitrofenilhidrazin ile renkli hidrazon bileşiği oluşturur. Bazı ortamda kahverengi olan bu bileşiğin renk şiddeti GPT aktivitesiyle doğru orantılıdır.



Deneyin Yapılışı:

	Kör	Numune
Substrat	1,0 mL	1,0 mL

37 °C deki su banyosunda 3 dakika bekletilir

Saf su	0,2 mL	-
Serum	-	0,2 mL

37 °C deki su banyosunda 30 dakika bekletilir

2,4-Dinitrofenilhidrazin	1,0 mL	1,0 mL
--------------------------	--------	--------

Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir

0,4 M NaOH	10 mL	10 mL
------------	-------	-------

Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir, 510 nm de köre karşı ölçülür

Normal değerler: 5-35 ünitelidir.

Numunenin absorbansını okuduktan sonra numunedeki enzim aktivitesini hesaplamak için standart eğri çizilmelidir.

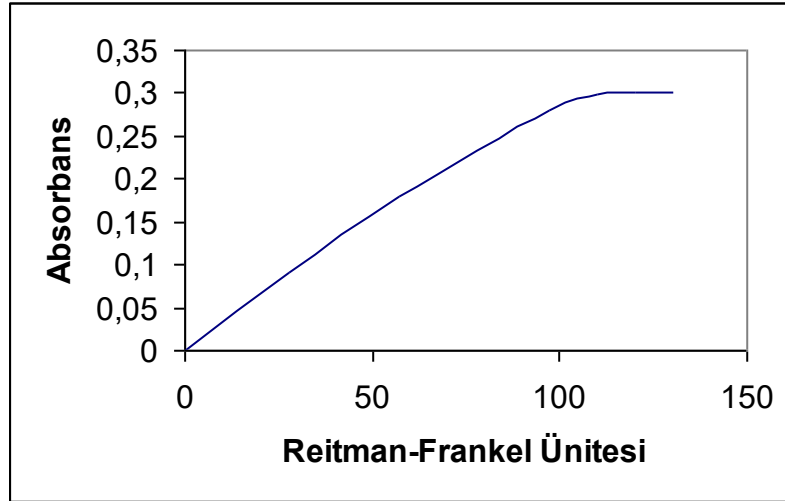
Standart Eğrinin Çizilmesi:

	Kör	Standart 1	Standart 2	Standart 3
Saf su	0,5 mL	0,4 mL	0,3 mL	0,2 mL
Sodyum pirüvat	-	0,1 mL	0,2 mL	0,3 mL
2,4-Dinitrofenilhidrazin	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL

Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilir

0,4 M NaOH	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Ünite	-	28	57	97

Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir, 510 nm de köre karşı ölçülür.



Reaktifler:

1-Fosfat tamponu: 13,97 g K_2HPO_4 ve 2,69 g KH_2PO_4 bir miktar distile suda çözülerek distile su ile litreye tamamlanır. (pH = 7,4) 4 °C de saklanır.

2-Substrat: 29,2 mg alfa-keto glutarik asit ve 1,78 g β -Alanin 1 M NaOH de çözülür, pH=7,4 e ayarlanır. Fosfat tamponu ile 100 mL fosfat tamponunda çözülür. Dondurularak saklanır.

3-Sodyum pirüvat: 22 mg sodyum pirüvat 100 mL fosfat tamponunda çözülür. Buzdolabında saklanır.

4-2,4-Dinitrofenilhidrazin: 19,8 mg 2,4-dinitrofenilhidrazin 10 mL derişik HCl de çözülür, distile su ile 100 mL ye tamamlanır. Oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklanır.

5-0,4 M NaOH

SORULAR

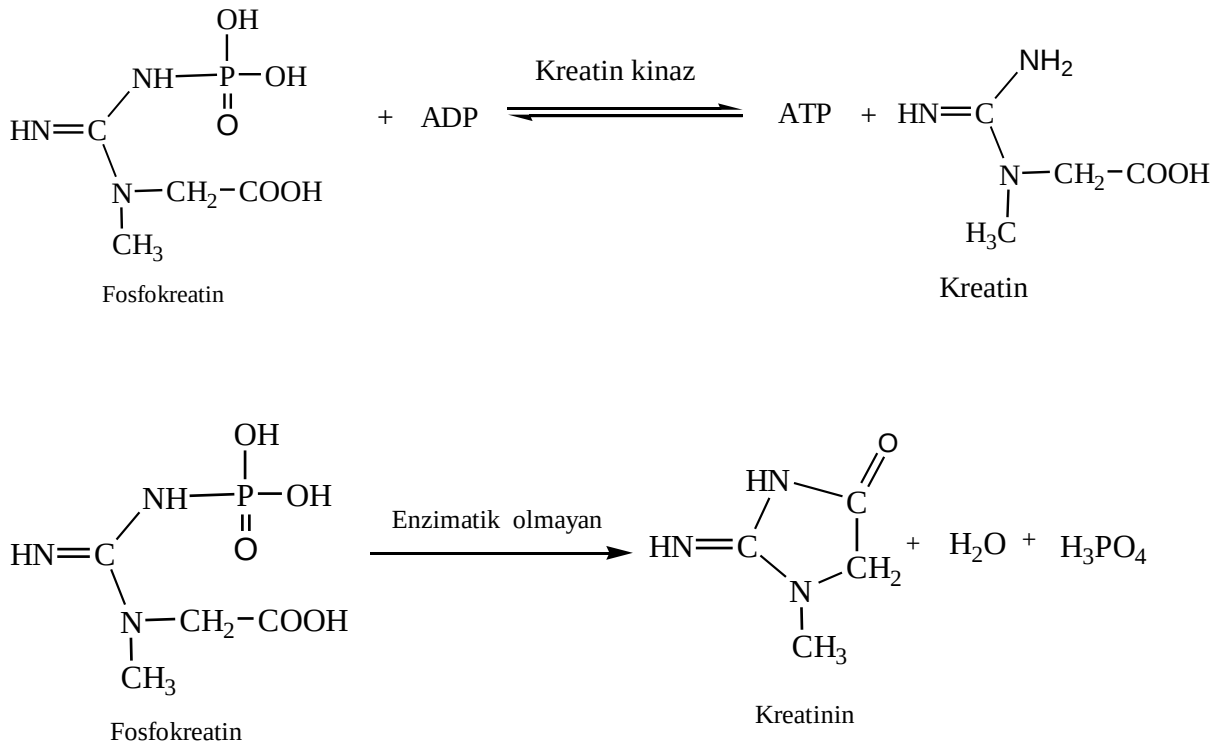
1-Karaciğer harabiyetini gösteren enzimler hangileridir?

2-Transaminaz enzimlerinin görevleri nedir?

3-Kanda GPT enziminin aktivitesi nasıl belirlenir? Denklem yazarak açıklayınız.

19-İDRARDA KREATİNİN TAYİNİ ve KREATİNİN KLERENS

Kreatin, böbrek ve karaciğerde iki enzimatik reaksiyon sonucu oluşur. Daha sonra kan yoluyla beyin, kas gibi organlara taşınır ve fosforile edilerek yüksek enerjili bileşik olan fosfokreatine dönüştürülür. Kas kasılması yoluyla büyük enerji isteyen hallerde mevcut ATP yeterli gelmez. O zaman kasta bulunan fosfokreatin kasın enerji deposu gibi görev görür. Fosfokreatin kendiliğinden fosfat ve su kaybederek kreatinine dönüşür. Böbreklerden kreatinin şeklinde atılır.



Günlük olarak kas kreatininin %1-2' si kreatinin'e çevrilir. Üretilen kreatinin, kas kitlesi ile orantılıdır ve serumdaki seviyeleri erkeklerde kadınlardakinden daha yüksektir. Kanda ortalama %1-2 mg kreatinin vardır. Diyetsetel değışiklikler günlük olarak kreatinin atılımında çok az değışikliğe sebep olur.

Kreatininin kanda yükselmesi çeşitli böbrek hastalıklarında ve idrar yolları tıkanmasında görülür.

İdrarda Kreatinin Miktar Tayini

Prensip:

Kreatinin bazik ortamda pikrik asit ile turuncu renkli bir kompleks oluşturur(Jaffe reaksiyonu). Bu kompleksin renk şiddetinin 520 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır.

Deneyin yapılışı:

1 mL idrar alınır ve saf su ile balon jode 100 mL’ye tamamlanır.

Reaktifler	Kör	Standart	Numune
1/100 seyreltilmiş idrar	-	4 mL(1mg/100mL)	4mL
Bazik pikrat çözeltisi	2mL	2mL	2mL
Saf su	4mL	-	-

Hazırlanan tüpler karıştırılır ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra 520nm dalga boyunda köre karşı numune ve standardın absorbansı okunur.

Sonucun hesaplanması:

$$\% \text{ mg Ürik asit} = \frac{\text{Numunenin absorbansı}}{\text{Standardın absorbansı}} \times \text{Standardın konsantrasyonu}$$

Kreatinin Klerens

Kreatinin klerens 1 dakikada kreatininden temizlenen plazma miktarıdır. Bu miktar yaklaşık olarak glomerül filtratına eşittir.

Deney için hasta sabahleyin aç gelir, idrarı alınır. Bu idrar atılır. Hastaya 1 bardak su içirilir. Hastadan kan alınarak serumdaki kreatinin miktarı ölçülür. İlk idrardan tam 1 saat sonra idrar alınır, hacim ölçülür, iki idrar numunesi birleştirilir, toplam hacimden faydalanılarak 1 dakikadaki idrar hacmi hesaplanır. İdrardaki kreatinin ölçülür.

$$\text{Kreatinin klerens} = \frac{U \times V}{B}$$

U= İdrardaki % mg kreatinin

V= 1 dakikadaki mL idrar hacmi

B= Serumdaki % mg kreatinin

Normal değerler= 100-180 mL/dak’dır.

Kreatinin klerens böbrek hastalıklarında azalır.

Reaktifler:

1-Doygun pikrik asit çözeltisi: 1,4 g pikrik asit 95 mL sıcak saf suda çözülür, soğutulur. 100 mL'lik balon jojeye aktarılır, 100 ml'ye saf su ile tamamlanır. Koyu renkli şişede saklanır.

2- %10 NaOH

3- Bazik pikrat çözeltisi: 5 hacim doymuş pikrik asit+ 1 hacim %10 NaOH karıştırılır. Bu çözelti kullanılmada hemen önce taze olarak hazırlanmalıdır.

4- Stok kreatinin çözeltisi(0,01g/100 mL): 0,01 g kreatinin alınır ve 0,1 M HCl içinde çözüldükten sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlanır.

5-Kreatinin çalışma çözeltisi(1 mg/100 mL): Stok kreatinin çözeltisinden 1mL alınır ve saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

SORULAR

1-Metabolizmada kreatinin nasıl oluşur? Denklemler ile gösteriniz.

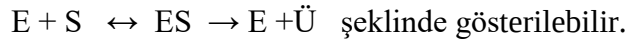
2-İdrarda kreatinin tayininin prensibini açıklayınız.

3- Kreatinin klerens nedir, açıklayınız.

20-SUBSTRAT DERİŞİMİNDEKİ DEĞİŞİKLİKLERİN ENZİMATİK TEPKİME HIZINA ETKİSİ

Enzimler, protein yapısında olan biyokimyasal katalizörlerdir. Reaksiyon sonucunda değişikliğe uğramazlar, sadece reaksiyonun hızını artırırılar. Enzimlerin bir kısmının aktiflik gösterebilmesi için ilave faktörlere ihtiyacı vardır. Bu tür enzimlerin protein kısımları inaktiftir. Enzimin bu haline apoenzim denir. Enzimin inaktif kısmına ilave faktörün bağlanmasıyla elde edilen enzime ise holoenzim denir.

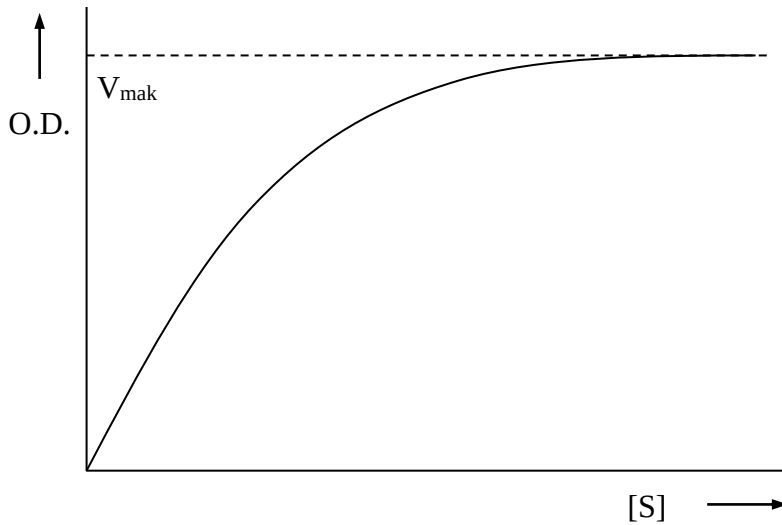
Bir enzim katalizli tepkime denklemi:



Enzimatik reaksiyon hızı substrat derişimine, enzim derişimine, ısıya ve pH'ya radyasyona vs. bağlıdır. Enzimatik reaksiyonlarda reaksiyon hızı ile substrat derişimi arasındaki ilişki Michealis-Menten eşitliği ile verilir.

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Bu denklemden faydalanılarak substrat derişimine karşı hız grafiği çizilebilir. Elde edilen hiberbolik eğriye Michealis-Menten eğrisi denir.



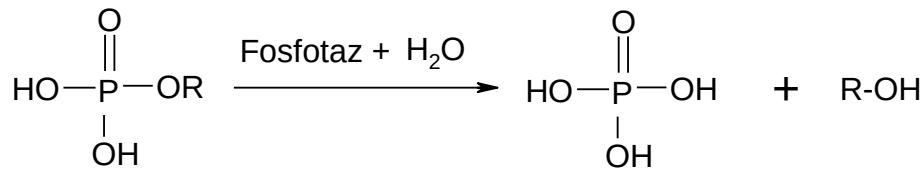
Diğer bütün şartlar sabit tutulup sadece substrat derişimi artırıldığı zaman enzim katalizli reaksiyon hızında bir artma olur. Bu artış belli bir noktaya kadar lineerdir. Bundan sonra hız maksimuma ulaşır ve sabit kalır. Bu noktada artık enzim molekülleri substratla doymuştur.

Maksimum hızın yarısına ($1/2 V_{\max}$) karşılık gelen substrat derişimine Michealis-Menten sabiti (K_m) denilir. K_m her enzim için özel bir parametredir. Enzimin substrata olan ilgisinin bir ölçüsüdür. K_m sabiti küçük olan enzimin substratına karşı ilgisi büyüktür.

Herhangi bir ortamdaki enzim miktarı (aktivite) “ünite” cinsinden verilir. Bir dakikada 1 μmol substratı ürüne dönüştüren veya 1 μmol ürün oluşturan enzim miktarına 1 internasyonel enzim ünitesi (IU) denir.

Serum, idrar, beyin omirilik sıvısı gibi çeşitli vücut sıvılarında ölçülen çeşitli enzim aktiviteleri sayesinde günümüzde birçok hastalığa tanı koyulabilmekte ve hastalıkların gidişi izlenebilmektedir. Bu bakımdan enzim analizleri çok önemlidir.

Fosfatazlar, alkalen(ALP) ve asit fosfatazlar(ACP) olmak üzere iki değişik grupta toplanan, sentezledikleri yerlerden kana geçerek fosfat esterlerini yıkan bir grup hidroliz enzimleridir. Alkalen ve asit fosfataz olarak ayrılmalarının nedeni etki gösterdikleri pH'nın farklı oluşundandır. Alkalen fosfataz pH 9 ve üzeri, asit fosfataz pH 5 ve altındaki pH'larda optimum aktivite gösterir.



Alkali fosfataz ince barsakta (barsak epiteli), kemikte, karaciğerde, böbrek ve plesentada çok bulunur. Asit fosfataz az miktarda kemik, böbrek, karaciğer ve pankreasta fazla miktarda prostat dokusunda bulunur.

prensip:

Enzim aktivitesini ölçmek için substrat olarak fenil fosfat, p-nitrofenil fosfat, β -glisero foafat, β -naftil fosfat gibi çeşitli fosfat esterleri kullanılabilir. Bu yöntemde substrat olarak β -glisero fosfat kullanıldı. Reaksiyon sonucu açığa çıkan inorganik fosfat anyonu sülfomolibdik asit ile renklendirilerek, absorbans okunur.

Deneyin yapılışı:

	Tüp 1	Kör 1	Tüp 2	Kör 2	Tüp 3	Kör 3	Tüp 4	Kör 4
Derişim(mM)	0,3		1		3		5	
Substrat(mL)	0,3	0,3	1	1	3	3	5	5
Saf su(mL)	4,7	5,7	4	5	2	3	-	1
Serum(mL)	1	-	1	-	1	-	1	-
Tüpler karıştırıldıktan sonra 37°C’de 30 dakika bekletilir								
% 10’luk TCA(mL)	4	4	4	4	4	4	4	4
Süzülür								
Süzüntü(mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
Saf su(mL)	3	3	3	3	3	3	3	3
Askorbik asit(mL)	2	2	2	2	2	2	2	2
Sülfomolibdik asit(mL)	2	2	2	2	2	2	2	2

Tüpler karıştırılır ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilir ve köre karşı absorbans okunur. Substrat derişimi arttıkça absorbandsda artar. Fosfataz aktivitesi de renkli maddenin absorbandsı ile doğru orantılıdır.

Eğrinin çizilmesi: Substrat derişimine karşı hızın değişimi grafikte incelenecektir. Apsis(x) eksenine substrat derişimleri, ordinat(y) eksenine hızla doğru orantılı olan absorbands değerleri konularak grafik çizilir.

Reaktifler:

- 1- Substrat çözeltisi: 1,890 g sodyum β -glisero fosfat ve sodyum barbital saf suda çözülür ve 1 litreye tamamlanır.
- 2- %10'luk Triklorasetik asit(TCA)
- 3-Sülfomolibdik asit: a) 500mL 10 M H_2SO_4 b)500mL %7 sodyum molibdat hazırlandıktan sonra a ile b karıştırılır.
- 4- % 1 Askorbik asit

SORULAR

- 1- Enzim, apoenzim, holoenzim, kofaktör, koenzim, substrat, K_m değeri nedir? Açıklayınız.
- 2- Enzimatik reaksiyon hızına etki eden faktörler nelerdir? Açıklayınız
- 3- Substrat derişimindeki değışikliklerin enzimatik reaksiyon hızına etkisini grafik çizerek açıklayınız.
- 4- Fosfataz enzimleri hakkında ne biliyorsunuz, kısaca açıklayınız.
- 5- Fosfataz enzinleri hangi reaksiyonu katalizler?

21. KAN GRUBU TAYİNİ

Kan grubu belirlenmesinde çalışmanın yapıldığı ortam önemlidir. Enfeksiyonlardan korunmak için aşağıdaki kurallara dikkat etmek gerekir.

Önce parmak eter-alkol çözeltisi ile silindir.

Her kişi için bir defaya mahsus olarak delici parmağa batırılır. Akan kan bir kapiler içine alınır. Parmağa pamuk bastırılır.

Kullanılan araç ve gereçler:

- ✕ Test serumu
- ✕ Eter-alkol
- ✕ Lam
- ✕ Kapiler
- ✕ Damlalık
- ✕ Pamuk

Deneyin Yapılışı:

Test serum maddelerimiz Anti-A, Anti-B, Anti-AB(R_H faktörü) dür. Önce lam üzerine birer damla belirteçlerden damlatılır. Üzerine kapilere alınmış kandan birer damla damlatılır ve karıştırılır. Eğer Anti-A nın bulunduğu kısımda bir çökme oluyorsa A grubudur denir. Çökme Anti-B de oluyorsa B grubudur ve her ikisinde de oluyorsa AB grubudur denir. Anti-A ve Anti-B de çökme olmuyorsa 0 grubu olur. Anti-AB nin damlatıldığı yerde çökme varsa pozitif, yoksa negatif dir denir.