

**T.C.
MİLLÎ EĞİTİM BAKANLIĞI**

TIBBİ LABORATUVAR

**KANDA BİLİRUBİN VE ENZİM
ANALİZLERİ
725TTT114**

Ankara, 2011

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

İÇİNDEKİLER

AÇIKLAMALAR.....	iii
GİRİŞ	1
ÖĞRENME FAALİYETİ-1	3
1. BİLİRUBİN ANALİZİ	3
1.1. Bilirubin	3
1.2. Bilirubin Metabolizması.....	3
1.3. Bilirubinün Klinik Önemi	6
1.4. Bilirubin Analiz Metotları	6
1.4.1. Total Bilirubin Analizi	6
1.4.2. Direkt Bilirubin Analizi	7
1.4.3. Total ve Direkt Bilirubin Analiz Tekniği.....	8
1.5. Endirekt Bilirubinün Arttığı Durumlar	10
1.6. Direk Bilirubinün Arttığı Durumlar.....	10
UYGULAMA FAALİYETİ.....	11
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	13
ÖĞRENME FAALİYETİ-2	14
2. TRANSAMİNAZ ANALİZİ.....	14
2.1. Enzimler	14
2.1.1. Enzimlerin Özellikleri.....	14
2.1.2. Enzimlerin Genel Yapısı	15
2.1.3. Enzimlerin İsimlendirilmesi	16
2.1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması	16
2.2. Enzimlerin Kimyasal Tepkimelerinin Hızını Etkileyen Faktörler	17
2.3. Enzim Aktivitelerinin Ölçüm Yöntemleri ve Kullanılan Ölçü Birimleri	19
2.4. Enzimlerin Vücuttaki Dağılımı.....	20
2.5. Transaminazlar	21
2.5.1. Aspartat Aminotransferaz / Serum Glutamat Oksalasetat Transaminazı (SGOT)	21
2.5.2. Alanin Aminotransferaz / Serum Glutamat pirüvat Transaminazı (SGPT).....	22
2.5.3. Gama Glutamil Transaminazı (GGT).....	22
2.6. Transaminazlar ve Analiz Metotları.....	22
2.6.1. Rietman-Frankel Metodu	22
2.7. SGOT enziminin Arttığı Durumlar	27
2.8. SGPT enziminin Arttığı Durumlar.....	27
UYGULAMA FAALİYETİ.....	28
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	30
ÖĞRENME FAALİYETİ-3	32
3. OKSİDOREDÜKTAZ ANALİZİ.....	32
3.1. Kanda Laktat Dehidrogenaz	32
3.1.1. LDH İzoenzimleri.....	32
3.2. Laktat Dehidrojenaz Analizi.....	33
3.2.1. Kinetik Metot	33
3.3. LDH Enziminin Arttığı Durumlar	35
UYGULAMA FAALİYETİ-1	36
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME.....	37

ÖĞRENME FAALİYETİ – 4	38
4. KREATİN KİNAZ ANALİZİ	38
4.1. Kreatin Kinaz.....	38
4.2. Kreatin Kinaz Analizi	41
4.2.1. Kinetik Metot	41
4.3. CK Enziminin Arttığı Durumlar	43
UYGULAMA FAALİYETİ.....	44
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	45
ÖĞRENME FAALİYETİ – 5	46
5. FOSFATAZ ANALİZİ	46
5.1. Alkalen Fosfataz (ALP)	46
5.2. Asit Fosfataz (ACP).....	47
5.3. Alkalen Fosfataz Analizi	47
5.3.1. Kolorimetrik, Endpoint Metot	47
5.3.2. Kinetik metot.....	47
5.4. Alkalen Fosfatazın Arttığı ve Azaldığı Durumlar.....	49
5.4.1. Alkalen Fosfatazın Arttığı Durumlar	49
5.4.2. Alkalen Fosfatazın Azaldığı Durumlar	50
UYGULAMA FAALİYETİ.....	51
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	52
ÖĞRENME FAALİYETİ - 6	53
6. AMİLAZ ANALİZİ.....	53
6.1. Kanda Amilaz	53
6.2. Lipaz	53
6.3. Kanda Amilaz Analizi	54
6.3.1. Kolorimetrik Metot.....	54
6.3.2. Kinetik Metot	54
6.4. Amilaz Enziminin Arttığı ve Azaldığı Durumlar	57
6.4.1. Amilaz Enziminin Arttığı Durumlar	57
6.4.1. Amilaz Enziminin Azaldığı Durumlar	57
UYGULAMA FAALİYETİ.....	58
ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME	60
MODÜL DEĞERLENDİRME.....	61
CEVAP ANAHTARLARI.....	63
ÖNERİLEN KAYNAKLAR.....	65
KAYNAKÇA	66

AÇIKLAMALAR

KOD	725TTT114
ALAN	Tıbbi Laboratuvar
DAL/MESLEK	Tıbbi Laboratuvar Teknisyenliği
MODÜLÜN ADI	Kanda Bilirubin ve Enzim Analizleri
MODÜLÜN TANIMI	Kanda bilirubinün oluşumu, görevleri, vücuttan atılımı ve vücuttaki enzimlerin yapıları, çeşitleri, görevleri ve bunların kantitatif ölçümleri ile ilgili bilgi ve becerilerin kazandırıldığı öğrenme materyalidir.
SÜRE	40/32
ÖNKOŞUL	Kan analizleri için ön hazırlık işlemleri ve ölçüme hazırlama modülünü almış olmak
YETERLİK	Kanda bilirubin ve enzim analizi yapmak
MODÜLÜN AMACI	Genel Amaç Kanda bilirubin ve enzim analizlerini yapabileceksiniz. Amaçlar 1. Total bilirubin ve direkt bilirubin analizi yapabileceksiniz. 2. Transaminaz enzimlerinden serum glutamat oksalasetat transaminaz (SGOT) ve serum glutamat pirtivat transaminaz (SGPT) analizini yapabileceksiniz. 3. Oksidoredüktaz enzimlerinden laktat dehidrogenaz (LDH) analizini yapabileceksiniz. 4. Kreatin enzimlerinden kreatin kinaz (CK) analizini yapabileceksiniz. 5. Fosfatazlardan alkalin fosfataz (ALP) ve asit fosfataz (ACP) analizini yapabileceksiniz. 6. Sindirim enzimlerinden amilaz analizini yapabileceksiniz.
EĞİTİM ÖĞRETİM ORTAMLARI VE DONANIMLARI	Ortam ve Donanım: Tıbbi biyokimya laboratuvarı, hasta kanı, santrifüj, santrifüj tüpü, deney tüpü, spor, otomatik pipet, cam pipet, distile su cihazı, santrifüj cihazı, spektrofotometre cihazı, spektrofotometre tüpü, bilirubin ve enzim analiz reaktifleri

**ÖLÇME VE
DEĞERLENDİRME**

Modül içinde yer alan her öğrenme faaliyetinden sonra verilen ölçme araçları ile kendinizi değerlendireceksiniz.

Öğretmen modül sonunda ölçme aracı (çoktan seçmeli test, doğru-yanlış testi, boşluk doldurma, eşleştirme vb.) kullanarak modül uygulamaları ile kazandığınız bilgi ve becerileri ölçerek sizi değerlendirecektir.

GİRİŞ

Sevgili Öğrenci,

Bu modülde klinik açıdan hastalıkların teşhis ve tedavisinde önemli rol oynayan bilirubin ve enzimlerin yapısı, görevleri, metabolizmadaki fonksiyonları, sınıflandırılması ve analiz yöntem ve tekniklerini öğreneceksiniz.

Vücuttaki biyokimyasal reaksiyonların nasıl geliştiğini, enzim-substrat ya da anahtar-kilit ilişkisi sonucu ürün oluştuğunu göreceksiniz.

Enzimlerin miktarını uygun yöntem ve tekniklerle kantitatif ölçüm yaparak vücutta harabiyet olup olmadığını ortaya çıkaracaksınız. Böylece hastalıkların teşhis ve tedavisinde hekime yol göstererek yardımcı olacaksınız.

ÖĞRENME FAALİYETİ-1

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile total bilirubin ve direkt bilirubinün kantitatif ölçümünü tekniğine uygun olarak yapabileceksiniz.

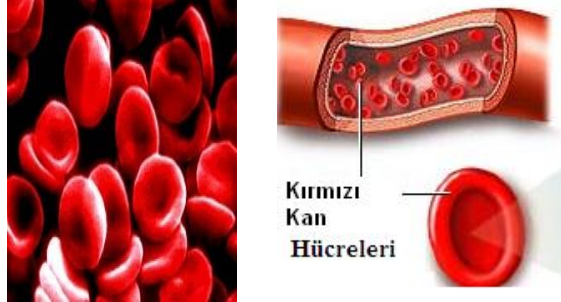
ARAŞTIRMA

- İnsan metabolizmasında bilirubin oluşumu ve atılımını araştırınız.
- Bilirubin analizinin çalışma metodu ve teknikleri hakkında bilgi toplayınız.
- Bilirubin analiz çalışmalarını sağlık kuruluşunda izleyiniz.

1. BİLİRUBİN ANALİZİ

1.1. Bilirubin

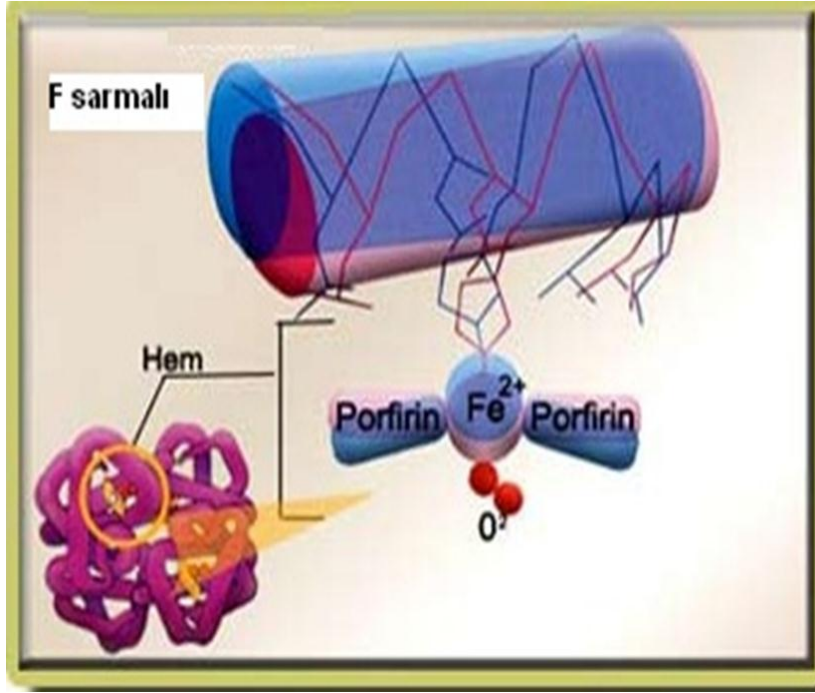
Eritrositteki hemoglobinin karaciğer, kemik iliği ve dalakta yıkıma uğramasıyla ortaya çıkan safra renkli bir maddedir.



Resim1.1: Eritrositler

1.2. Bilirubin Metabolizması

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



Resim 1.2: Hemin yıkımı

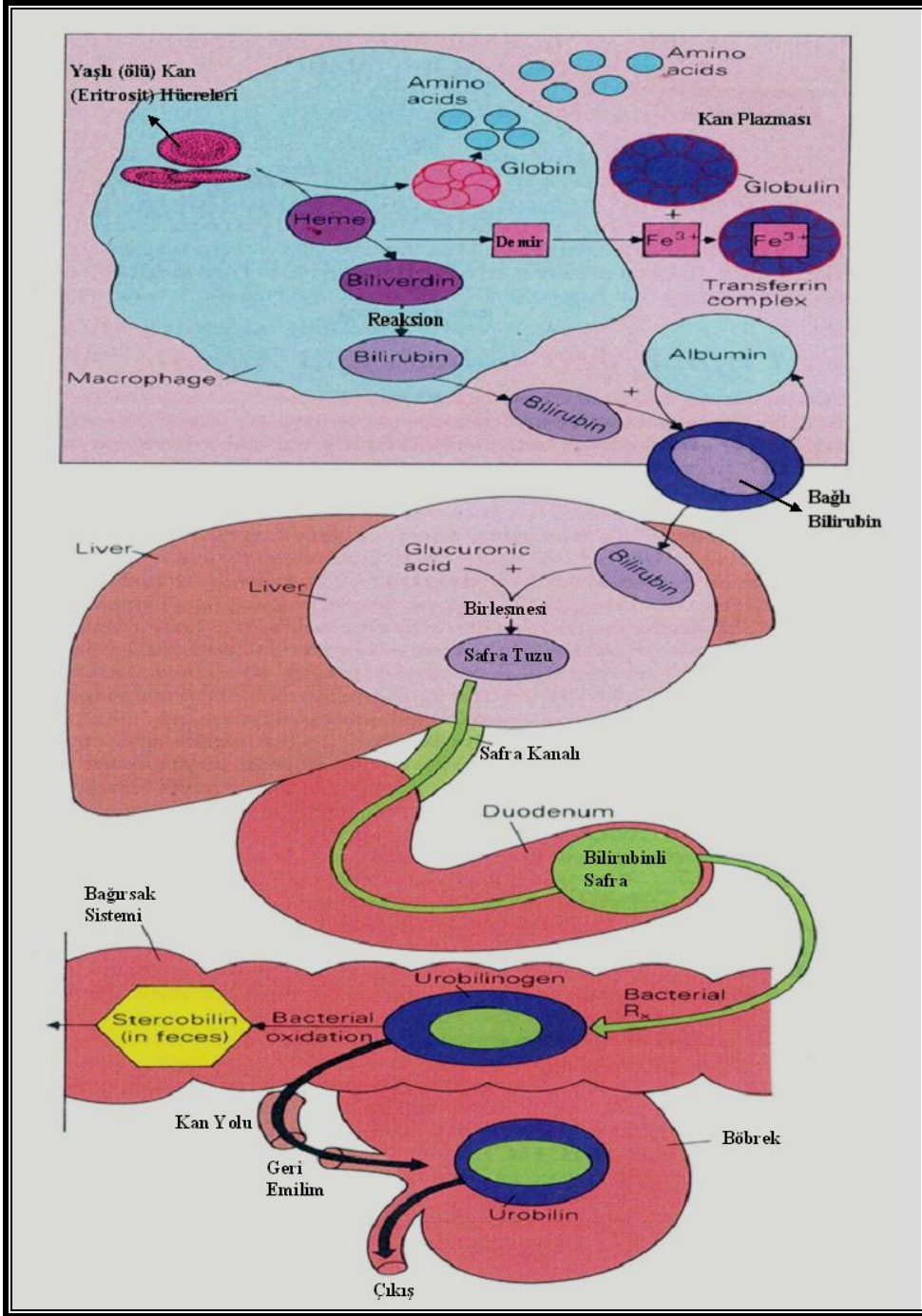
Bu bilirubine **endirekt bilirubin** (serbest) veya **ankonjuge bilirubin** denir. Bu bilirubin suda çözünmez iken kloroformda çözünür. Kanda bilirubinun artması albümine bağlı olduğundan ve suda çözünmediğinden idrara çıkmaz.

Bilirubinun % 80'i RES sistemde oluşurken geri kalan % 15'lik kısmı da gelişimini tamamlamamış kırmızı kan hücrelerinden, myoglobin ve sitokromlar gibi kimyasal olarak hemoglobinle ilişkili bileşiklerden oluşur.

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

Karaciğerde meydana gelen direkt bilirubin safra ile bağırsaklara atılır. Burada glukoronidaz enzimi ile endirekt bilirubine dönüştürülür. Serbest bilirubin, bağırsak floraları tarafından ürobilinojenler dediğimiz bir grup renksiz (**ürobilinojen, sterkobilinojen, mezobilinojen**) maddelere dönüştürülür. Ürobilinojenlerin % 20'si geri emilerek karaciğere gelir. Tekrar safra ile bağırsağa atılması olayına **enterohepatik dolaşım** denir. Kanda kalan az bir kısım ürobilinojen (% 2 – 5) oranı idrarla dışarı atılır. Ürobilinojenler daha da indirgenerek renkli ürobilinlere dönüşür. Bu renkli maddeler; **ürobilin, sterkobilin, mezobilindir**. Gaita ve idrarın rengi bu maddelerden kaynaklanır. İdrardaki ürobilinojenin karşılığı, gaitada **sterkobilinojendir**. Bağırsak florası yok olduğunda bilirubin oksitlenmeden olduğu gibi dışarı atılır. Dışarı atılan gaita hava ile temas sonucu okside olarak biliverdin oluşur ve gaita yeşil renge dönüşür.

Yeni doğan çocuklarda total bilirubin miktarının ilk günlerde yüksek seyretmesine **fizyolojik sarılık** denir. Fizyolojik sarılığın yüksek seyretmesinin sebebi, ilk günlerde karaciğerde glukoronil transferaz enziminin tam teşekkül etmemiş olması ve bebeklerde hızlı bir eritrosit yıkımına bağlıdır. Bilirubin yüksekliği bir hafta içerisinde normale döner.



Resim 1.3: Eritrositlerin yıkımı ve bilirubin oluşumu

1.3. Bilirubin Klinik Önemi

Kanda bilirubin miktarının yükselmesine **hiperbilirubinemi** denir. Dolaşımında bilirubinün yüksek seyretmesinin nedenleri üç aşamaya bağlı olarak görülür.

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

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

1.4. Bilirubin Analiz Metotları

Biyokimya laboratuvarında total bilirubin, direkt bilirubin ve indirekt bilirubin çalışılmaktadır.

1.4.1. Total Bilirubin Analizi

- **Tanımı:** Eritrositler 120 günlük normal yaşam süresinin sonunda RES hücreleri tarafından yıkılır. Eritrositlerdeki hemoglobinin yıkımı sonucu oluşan toplam bilirubin miktarıdır.
- **Van Den Berg ve Snapper - Malloy – Evelyn Metodu**
 - **Amacı:** Kanda bulunan bilirubin miktarının kantitatif ölçümünü yapmaktır.
 - **Prinsip:** Direkt bilirubin, diazo reaktifi ile birleşerek pembe renkli azobilirubini oluşturur. Buna diazo reaksiyonu denir. Oluşan pembe rengin şiddetinin ölçülmesi direkt bilirubin miktarını verir. Diazo reaksiyonu metil alkol ile yapılırsa oluşan pembe renk total bilirubini (direkt ve indirekt) birlikte verir.
- **Kullanılan araç gereç ve cihazlar**
 - Distile su cihazı
 - Santrifüj cihazı
 - Spektrofotometre cihazı
 - Deney tüpü
 - Otomatik pipet/ pipet
 - Parafilm
 - Tüp sporu
 - Laboratuvar saati

➤ **Reaktifler**

- **Reaktif 1:**
 - Sülfanilik asit
 - HCl
 - Dimetilsülfoksit (DMSO)
- **Reaktif 2:**
 - Sodyum nitrit
- **Reaktifin hazırlanması:** Kitin içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden total bilirubin çalışma reaktifi hazırlanması için 1 kısım sodyum nitrit, 50 kısım total bilirubin kiti (reaktif 1) karıştırılır. Örnek:10 ml total bilirubine 0.2 ml sodyum nitrit ilave edilir. Diazo reaktifi, sülfanilik asit - sodyum nitritten meydana gelir. Bu birleşme olayına diazotize sülfanilik asit denir.

NOT: Total bilirubin analizi için önce albümine bağlı olan indirekt bilirubin metanol dimetilsülfoksit (DMSO) madde ile proteinden uzaklaştırılır. Daha sonra diazo reaksiyonu ile bilirubin tayini yapılır.

- **Reaktifin depolanması:** Bilirubin reaktifi dondurulmamalı, doğrudan güneş ışığına bırakılmamalıdır. Bırakılması durumunda reaktif bozulur.
- **Reaktifin kullanılmaması gereken durumlar:**
 - Reaktif, 550 nm suya karşı ölçülen absorbans 100 den fazla ise
 - Tortulaşma görüldüğünde
 - Reaktif parametreleri performans parametrelerini karşılamıyor ise
 - Çalışma reaktifi fazla bekletildiğinde sarı turuncu renk oluşur, bu durumda da çalışmaz.
- **Bilirubin analizinde kullanılan serumun özelliği**
 - Taze ve hemolizsiz serum tercih edilir.
 - Serum; oda sıcaklığında karanlıkta tutulursa iki saat içinde, buzdolabında 2 – 8 °C’de saklanırsa on iki saat içinde analiz çalışılmalıdır.
 - Serum dondurularak - 20 °C’de muhafaza edilip ışıktan korunduğunda üç ay dayanır.
 - Güneş ışığına direk maruz kalan bilirubin bir saatte % 50 kayba neden olur.

1.4.2. Direkt Bilirubin Analizi

- **Tanımı:** Karaciğer, RES hücrelerinin yıkımı sonucu oluşan bilirubinü glukoronik asitle birleştirerek suda kolay eriyebilen ve kolay atılabilen bilirubine dönüştürür, buna direkt bilirubin denir.

- **Direkt bilirubin analizinde kullanılan reaktifler**
 - **Reaktif 1**
 - HCl
 - Sulfanilik asit
 - **Reaktif 2**
 - Sodyum nitrit
 - **Reaktifin hazırlanması:** Kitin içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden sodyum nitrit ile direkt bilirubin reaktifi 1: 100 oranında karıştırılır. Örnek:10 ml direkt bilirubine 0.1ml sodyum nitrit ilave edilir (pH 1.15).

Not: Direkt bilirubin analizi, total bilirubin analizi çalışma tekniğinin aynı olup sadece çalışma reaktifinin hazırlanışında farklılık vardır.

1.4.3. Total ve Direkt Bilirubin Analiz Tekniğı

- **Total ve Direkt Bilirubin Analizinin işlem basamakları**
 - Çalışma önlüğü ve eldiven giyerek güvenlik önlemleri alınır.
 - Analize başlamadan önce çalışma ortamı hazırlanır.
 - Analize başlamadan önce analizde kullanılacak cihazların günlük bakımı yapılır.
 - Analiz için yeterli miktarda venöz kan alınır ve hemolizsiz serum elde edilir.
 - Total bilirubin analizinde kullanılacak reaktifler hazırlanır. Reaktifler, total bilirubin çalışma reaktifinin prospektüsündeki hazırlama bilgisi doğrultusunda çalışılacak test sayısına göre hazırlanır.
 - Numune, standart ve kör tüpleri spora numaralandırılarak yerleştirilir.
 - Numune tüpüne serum alırken dibe çöken şekilli elamanların ve fibrinojenin oluşturduğu pıhtıyı karıştırmadan hemolizsiz serum alınmasına dikkat edilir.

	Kör	T.bilirubin numune	D.bilirubin numune	Standart
Serum		50 µI	50 µI	
Standart				50 µI
Total bilirubin çalışma reaktifi	1000µI	1000µI		1000µI
Direkt bilirubin çalışma reaktifi	1000µI		1000µI	1000µI
Numune, standart ve kör tüplerine serum, standart reaktifi, total ve direkt bilirubin çalışma reaktifleri tablodaki miktarlar doğrultusunda pipetlenecek tüpler karıştırılır.				

Tablo 1.1: Total ve direkt bilirubin çalışma tablosu

- Numune ve standart tüpü benmaride 37 °C de 10 dakika inkübe edilir. Tüp sporu, benmari içine yerleştirildikten sonra laboratuvar saati veya benmari saati 10 dakikaya ayarlanır.
- İnkübasyon sonunda benmariden çıkarılan karışımları okumak için spektrofotometre 550 nanometre (nm) dalga boyuna ayarlanır.
- Spektrofotometre tüpüne kör karışımı aktarılarak spektrofotometrenin (0.00) transmittans ayarı yapılır. Transmittans (0.00) ayarından sonra standart ve numune karışımı spektrofotometre tüpüne sırayla aktarılarak okuma yapılır. Okunan standart ve numune absorbans değeri not edilir.
- Okunan değerler: Numune /Standart X StC =.....mg/dl formülüne yerleştirilerek total bilirubin miktarı hesaplanır.

➤ **Total bilirubin hesaplanması**

N. Abs : 0.150
St. Abs : 0.650
StC : 5

$$\frac{\text{Abs. N}}{\text{Abs. St}} \times \text{StC} = \text{mg/dl} \quad \frac{0.150}{0.650} \times 5 = 1.1 \text{ mg/dl}$$

Normal değerleri: 0.2 - 1.5 mg/dl

➤ **Direkt bilirubin hesaplanması**

N. Abs : 0.105
St. Abs : 0.720
Stc : 4

$$\frac{\text{Abs. N}}{\text{Abs. St}} \times \text{StC} = \text{mg/dl} \quad \frac{0.105}{0.720} \times 4 = 0.5 \text{ mg/dl}$$

Normal değerleri: 0.0 - 0.2 mg/dl

➤ **Endirekt bilirubin değerinin hesaplanması**

Total bilirubin değerinden direkt bilirubin değeri çıkarılarak endirekt bilirubin değeri bulunur.

1.5. Endirekt Bilirubin Arttığı Durumlar

Eritrositlerin aşırı hemoliz olmasından ya da konjenital (kazanılmış) bilirubin metabolizması bozukluğu sonucu endirekt bilirubin yükselir.

- **Fizyolojik sarılık:** Yeni doğanda
- **Crigler najjar sendromu:** **Tip I:** Bu hastalarda glukoroniltransferaz enzimi kalıtsal olarak yoktur. **Tip II:** Bu hastalarda monoglukuronid sentezlendiği hâlde diklukuronid bilirubin sentezlenememektedir.
- **Gilbert hastalığı:** Bilirubinün karaciğer tarafından tutulamaması sonucu oluşur
- **Hemolitik sarılık:** Akut ve kronik hemolitik anemiler, eritroblastozis fötalis, konjenital sferositik anemide.

1.6. Direk Bilirubin Arttığı Durumlar

- **Dubin – Johnson sendromu:** Direkt bilirubinün karaciğerden safraya atılmasında kusur vardır.
- **Safra yolu tıkanması:** Hepatik veya koledok kanalının tıkanması sonucu oluşur.
- **Hepatoselüler sarılık:** Endirekt ve direkt bilirubinün yükseldiği görülür, yani total bilirubin yükselir.

UYGULAMA FAALİYETİ

Total ve direkt bilirubin analizlerini tekniğine uygun olarak yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınır.	➤ Çalışma önlüğü ve eldiven giyiniz.
➤ Analiz öncesi araç, gereç ve cihazları hazırlayınız.	➤ Cihazların günlük bakımını yapmayı unutmayınız. ➤ Günlük bakımı yapılan cihazlarla güvenli ve doğru sonuç elde edeceğinizi unutmayınız.
➤ Kanı santrifüj ederek hemolizsiz serum elde ediniz.	➤ Santrifüjde denge unsuruna dikkat ediniz. ➤ Serumun hemolizsiz olduğundan emin olunuz.
➤ Reaktifleri hazırlayınız.	➤ Çalışılacak test sayısına göre reaktif hazırlayınız. ➤ Reaktiflerin son kullanım tarihlerini kontrol ediniz.
➤ Spora; total ve direkt bilirubin analizi için numune, standart ve kör tüplerini numaralandırarak yerleştiriniz.	➤ Tüplerin numaralandırılmasının analizin hata payındaki rolüne dikkat ediniz.
➤ Total bilirubin numune tüpüne 50 µl serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Direkt bilirubin numune tüpüne 50 µl serum koyunuz.	
➤ Total ve direkt bilirubin için standart tüplerine 50 µl standart reaktifini koyunuz.	➤ Otomatik pipet ucunu değiştirmeyi unutmayınız.
➤ Total bilirubin numune, standart ve kör tüplerine 1000 µl total bilirubin çalışma reaktifini koyunuz.	➤ Otomatik pipet ucunu değiştirmeyi unutmayınız.

<p>➤ Direkt bilirubin numune, standart ve kör tüplerine 1000 µI direkt bilirubin çalışma reaktifi koyunuz.</p>	<p>➤ Otomatik pipet ucunu değiştirmeyi unutmayınız.</p>
<p>➤ Tüpleri karıştırıp benmaride 37 °C'de 10 dakika inkübe ediniz.</p>	<p>➤ İnkübasyonda zaman dilimine uyunuz.</p>
<p>➤ Bekletilen karışımları köre karşı, spektrofotometrede 550 nanometre (nm) dalga boyunda numune ve standart absorbanslarını okuyunuz.</p>	<p>➤ Spektrofotometre tüpünün dışını okuma bölümüne yerleştirmeden önce her seferinde gazlı bezle siliniz.</p>
<p>➤ Ölçüm değerlerini; Numune /Standart X StC = mg/dl formülüne göre yerleştiriniz ve hesaplamasını yapınız.</p>	<p>➤ Ölçüm değerlerini dikkatli not ediniz.</p>
<p>➤ Çıkan sonuçları kontrol ederek normal ve anormal çıkan değerleri belirleyiniz.</p>	<p>➤ Anormal çıkan sonuçları tekrar çalışınız.</p>
<p>➤ Raporları uzmana onaylatınız.</p>	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Eritrositlerin kan dolaşımında ortalama yaşam süresi ne kadardır?
A) 140 gün
B) 150 gün
C) 135 gün
D) 120 gün
E) 160 gün
2. Kan dolaşımında yaşlanmış eritrosit hücrelerinin yıkımı aşağıdakilerden hangisinde gerçekleşmez?
A) Kemik iliği
B) Karaciğer
C) Dalak
D) RES
E) Böbrek
3. Aşağıdakilerden hangisi, ürobilinojenlerin % 20'sinin geri Emilimi ile karaciğere gelerek tekrar safra ile bağırsağa atılmasıyla gerçekleşen dolaşımdır?
A) Küçük dolaşım
B) Büyük dolaşım
C) İdrarın dışarı atılımı
D) Enterohepatik dolaşım
E) Gaitanın dışarı atılımı
4. Aşağıdakilerden hangisi, kan dolaşımındaki yaşlanmış eritrositlerin yıkımı ile açığa çıkan maddelerden biri değildir?
A) Porfirin
B) Globulin
C) Plazma
D) Hem
E) Demir
5. Yeni doğan çocuklarda karaciğerde glukuronil transferaz enziminin tam olarak teşekkül etmemesi sonucu indirekt bilirubinün yükselmesi ile ortaya çıkan duruma ne denir?
A) Patolojik sarılık
B) Fizyolojik sarılık
C) Hemolitik sarılık
D) Tıkanma sarılığı
E) Hepatoselüler sarılık

DEĞERLENDİRME

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

ÖĞRENME FAALİYETİ-2

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile transaminaz enzimleri hakkında bilgi edinerek SGOT ve SGPT analizlerinin kantitatif ölçümünü yapabileceksiniz.

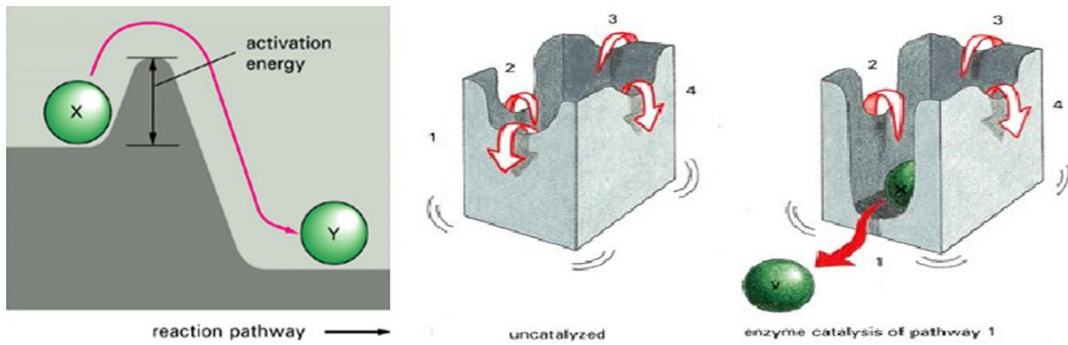
ARAŞTIRMA

- Enzimlerin metabolizmalarını araştırınız.
- Enzim analizleri hakkında araştırma yapınız.
- Biyokimya laboratuvarında enzim analizlerinin yapılışını izleyerek izlenimlerinizi arkadaşlarınızla paylaşınız.

2. TRANSAMİNAZ ANALİZİ

2.1. Enzimler

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



Resim 2.1: Enzim etkisi

2.1.1. Enzimlerin Özellikleri

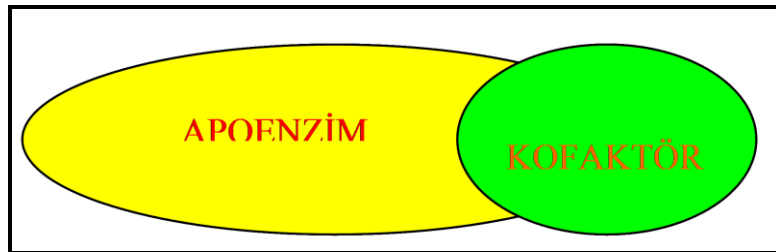
- Kimyasal tepkimelerin hızını artırır.
- Kimyasal tepkime sonunda değişmeden serbest kalır.

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

2.1.2. Enzimlerin Genel Yapısı

Enzimler iki grup olarak incelenir.

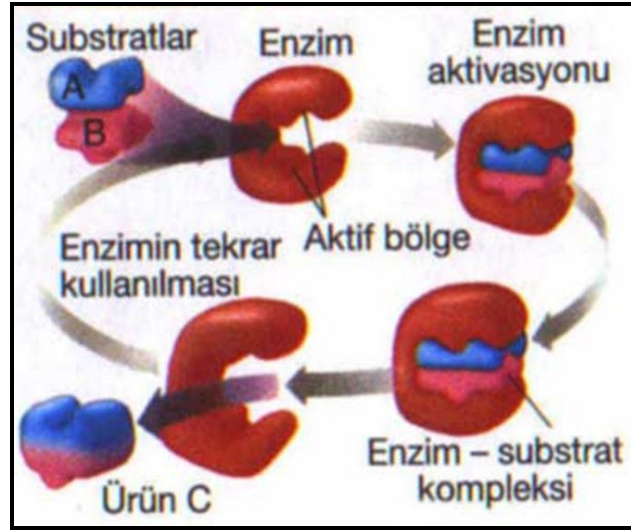
- **Basit enzimler:** Bu tip enzimlerin yapılarında sadece protein vardır.
- **Birleşik enzimler:**
 - Bu tip enzimler proteinlerle birlikte organik ya da inorganik kısımlara sahiptir.
 - Birleşik proteinlerin proteinli kısmına **apoenzim** denir.
 - Apoenzime bağlı olan organik ya da inorganik maddelerin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



Resim 2.2: Haloenzim

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

Apoenzim substrata bir ya da birkaç yerden anahtar – kilit uygunluğu ile yapışır ve bağlanır. Bu bağlanma bölgelerine aktif merkez denir. Ko kısımlar da enzimlere bağlanarak tepkimenin yönünü belirler.



Resim 2.3: Enzim - substrat ilişkisi sonucu oluşan ürün



E = Enzim
S = Substrat
P = Ürün

2.1.3. Enzimlerin İsimlendirilmesi

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

2.1.4. Enzimlerin Sınıflandırılması

Enzimler, başlıca 6 sınıfa ayrılır.

➤ Oksidoredüktazlar

Elektron ve hidrojen atomlarını (proton + elektron) bir substrattan (S) diğer bir substrata (S) taşıyan enzimlerdir. Örnek: Dehidrogenazlar, oksidazlar, peroksidaz gibi enzimlerdir.

➤ Transferazlar

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

➤ **Hidrolazlar**

Yıkılacak bağı su elementlerini ekleyen ya da substratların bir kimyasal grubunu suya aktarabilen enzimlerdir.

➤ **Liyazlar**

Substratlarındaki bir kimyasal grubu hidrolizsiz, indirgemesiz, oksitlemesiz olarak serbest hâle çıkararak ya da serbest hâldeki bir grubu substratlarına sokan enzimlerdir.

➤ **İzomerazlar**

Molekül içi reaksiyonları ve molekül içi yeni düzenlemeleri belirli bir elektron kazancı ve kaybı olmaksızın katalizleyen enzimlerdir. Diğer bir deyimle optik, geometriksel veya izomerlerini kendi aralarında birbirine çeviren enzimlerdir.

➤ **Ligazlar (Sentetazlar)**

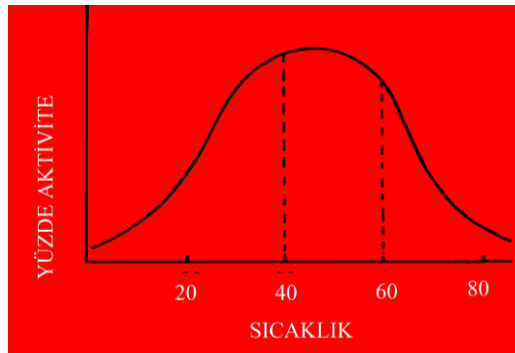
ATP ya da benzeri trifosfatların yıkıldığı sırada iki bileşiğin bağlanmasını yani sentez reaksiyonlarını katalizleyen enzimlerdir. Ligazlardan ATP – bağımlı sentez reaksiyonlarını katalizleyenlere **sentetaz**, ATP'nin kullanılmadığı sentez reaksiyonlarını katalizleyenlere ise **sentaz** adı verilir.

2.2. Enzimlerin Kimyasal Tepkimelerinin Hızını Etkileyen Faktörler

Her enzim ayrı bir gen ya da gen grubu tarafından verilen genetik şifreye göre proteinlerden oluştuğu için kendine özgü bir tepkimeyi düzenler. Bu nedenle proteinlere etki eden her şey enzimlere de etki eder.

➤ **Sıcaklık faktörü**

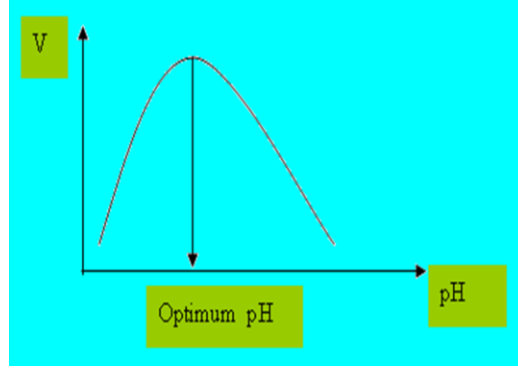
Her enzimin ideal olarak çalışabileceği bir sıcaklık derecesi vardır. Bir enzimin en iyi şekilde çalışabileceği sıcaklığa **optimum sıcaklık** denir. Birçok enzim 55 – 60 °C'nin üzerinde etkisini kaybeder. 0 ve altındaki sıcaklıklarda inaktifleşen enzimler çalışmaz. Düşük sıcaklıklar enzimin yapısını bozmaz, ortam sıcaklığı düşükten normale çıkarıldığında enzim faaliyeti yeniden başlar.



Şekil 2.4: Sıcaklığın enzim üzerine etkisi

➤ **Ortamın pH faktörü**

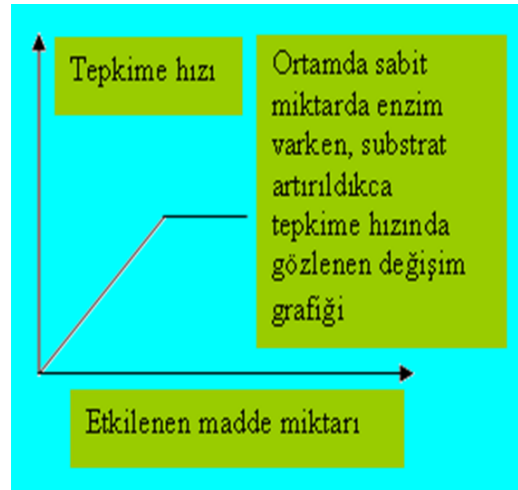
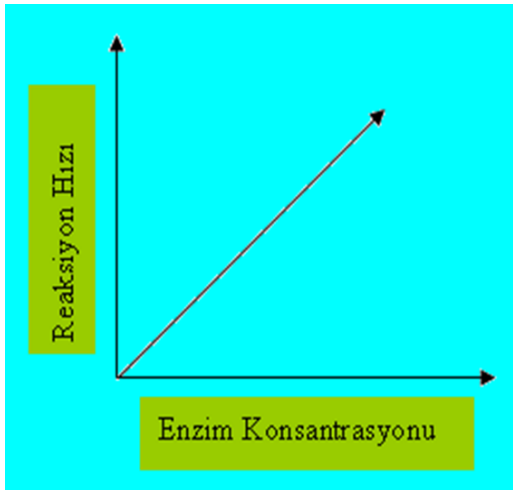
Her enzimin kendine özgü bir optimum pH'ı vardır. Enzimin maksimum aktivite gösterdiği pH'a o **enzimin optimum pH'ı** denir ve bu değer enzimlere göre değişir. İnsan enzimlerinin büyük çoğunluğu nötr ortamda pH= 7 civarında etkilidir. Bu pH'ın dışında aktivite düşer.



Şekil 2.5: Enzimlerin etkin olduğu optimum pH değeri

➤ **Enzim ve substrat miktarı**

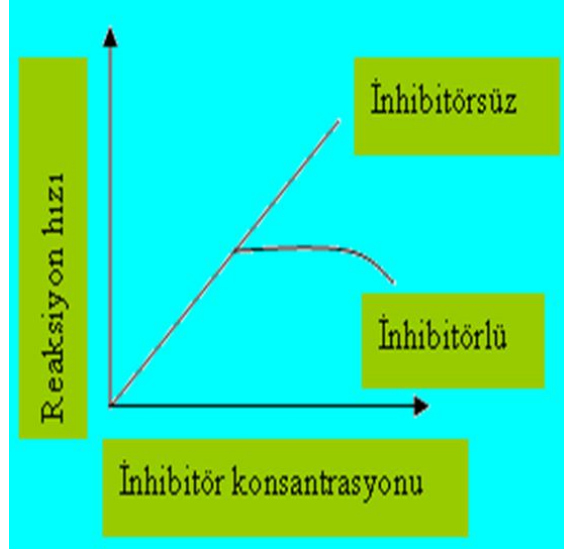
Ortamdaki enzim miktarı ortamdaki substrat miktarına bağlı olarak tepkime hızına etki eder. Ortamda fazla substrat varken enzim miktarı artırıldıkça tepkime hızı da artar. Enzimler substratların dış yüzeylerine bağlanarak etki eder. Bu nedenle substrat yüzeyleri arttıkça tepkime hızları da artar. Örneğin, küçük parçalara bölünmüş bir besin daha kolay ve hızlı sindirilir.



Şekil 2.6: Enzim - substrat miktarı

➤ **İnhibitör konsantrasyonunun etkisi**

Reaksiyon sırasında enzime kolayca bağlanan inhibitörler, protein grubunu tesirsiz bırakır. İhibitörler (toksikler, ilaçlar, sabunlar, metaller) enzimin reaksiyon hızını azaltır.



Şekil 2.7: İnhibitörlerin reaksiyon hızına etkisi

➤ **Tampon konsantrasyonu**

Enzime göre tampon spesifik olmalıdır. Tamponlar inhibitör veya aktivatör etkisi yapabilir.

2.3. Enzim Aktivitelerinin Ölçüm Yöntemleri ve Kullanılan Ölçü Birimleri

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

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

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

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

Ör: $\Delta A1 = A2 - A1 = 0.15$ $\Delta A2 = A3 - A2 = 0.17$ $\Delta A3 = A4 - A3 = 0.14$

$$\Delta A / \text{dakika} = \frac{\Delta A1 + \Delta A2 + \Delta A3}{3} = \frac{0.15 + 0.17 + 0.14}{3} = 0.153$$

- Endpoint ölçüm yöntemleri
- İki nokta ölçüm yöntemleri

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

2.4. Enzimlerin Vücuttaki Dağılımı

Enzimler, hekimlikte şu amaçlarla kullanılır:

- Glikoz, üre, ürik asit gibi bazı maddelerin miktar tayinlerini enzimler yardımıyla yapmak
- Hastalıkların ayırıcı tanısı ve izlenimlerinde yardımcı olmak
- Tedavi amaçlı kullanmak

İnsan vücudunda bulunan yüzlerce farklı enzimlerin hemen hepsi hücre içinde sentez olur. Bu enzimler çoğu fonksiyonlarını oluşturdukları hücrelerin içinde yapar.

Klinik biyokimya prensip olarak bazı enzimler dışında daha çok intrasellülerde bulunan ve normal olarak serumda düşük aktivitede olan enzimlerin serum veya plazmadaki aktivite değişimlerini ölçerek vücut dokularındaki patolojik değişimleri hakkında bilgi verir.

➤ **Hücre içi enzimleri**

Hücre içinde ve hücre metabolizma zinciri içinde etkili olan enzimler, hücre dışında faaliyet göstermez. Hücrenin harabiyete uğraması hâlinde enzim sentezi azalır. Hücre zarının geçirgenliği bozulur ve enzimler plazmada yoğunlaşır. Hücre içinde görünen enzimler **CK, LDH, AST** ve **ALT**'dir.

➤ **Sekrasyon enzimleri**

Bu enzimler görevlerini sentezlendikleri hücrenin dışında yapar. **Amilaz, lipaz, tripsin, kimotripsin** gibi enzimler, sekreasyon enzimleridir.

➤ **Plazma enzimleri**

Bu enzimler, plazmada aktif hâle gelir. En önemlisi, kanın pıhtılaşmasında rol alan **protrombin** enzimidir.

Enzim analizlerinin yapılaş amaçları şunlardır:

- Hastalığın yeri ve lokalizasyonunun belirlenmesi
- Patolojik süreç ve evresinin (akut, kronik) belirlenmesi
- Hücre hasarının genişliğinin derecesinin belirlenmesi
- Doku hasarının genişliği hakkında bilgilendirilmesi
- Hastalığın tanısı
- Bir organın hastalığının ayırıcı tanısı

2.5. Transaminazlar

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

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

SGOT /AST

L – Aspartat + α – ketoglutarat —————> Okzalasetat + Glutamat

SGPT /ALT

L – Alanin + α – ketoglutarat —————> Glutamat + Piruvat

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

2.5.1. Aspartat Aminotransferaz / Serum Glutamat Oksalasetat Transaminazı (SGOT)

AST/SGOT vücutta yaygın olarak bulunur. Kalp, karaciğer, iskelet kasları ve böbrek AST' den zengin dokulardır. Eritrositlerde az miktarda bulunur. Hemolize bağlı hafif artışlar görülür.

Başlıca myokard enfarktüsü, karaciğer ve kemik hastalıklarının tanısında kullanılır. AST enzimi; kalp enfarktüsünden 12 saat sonra serumda artmaya başlar. 48 saatte en yüksek miktara çıkar. Enfarktüsün 5. gün sonunda normal seviyesine düşer. Akut myokard enfarktüsünde serumda AST enzimi ALT enziminden yüksek çıkar.

2.5.2. Alanin Aminotransferaz / Serum Glutamat pirüvat Transaminazı (SGPT)

ALT / SGPT vücutta yaygın olmakla birlikte en çok karaciğerde bulunur. Kalpte daha az miktarlarda bulunan ALT, myokard enfarktüsünü takiben genellikle yükselmez. Ancak konjestif kalp yetmezliği olursa karaciğerde salınır. Bu nedenle ALT, AST'ye kıyasla karaciğer hastalıklarına daha özgün bir enzimdir. Akut karaciğer nekrozlarında ALT enzimi AST enziminden yüksek çıkar.

2.5.3. Gama Glutamil Transaminazı (GGT)

Gama – glutamil transferaz (gama - glutamil transpeptidaz) böbrek başta olmak üzere bazı dokularda bulunur. Karaciğer ve pankreasda da önemli miktarda mevcuttur. GGT ölçümü en çok hepatobiliyer hastalıkların tanısında kullanılır. GGT mikrozomal bir enzimdir. Karaciğer hastalığı olmasa bile çok aşırı alkol kullanan olguların % 70 – 80' inde serum GGT düzeylerinde orta derecede artış görülür. Alkolik karaciğer hastalığında GGT artışı fazladır. Karaciğer hastalığını göstermesi açısından transaminazlara kıyasla GGT daha az duyarlıdır. Kolestazisde GGT artışı hem çok fazla olur, hem de alkalin fosfatazdan önce yükselebilir.

2.6. Transaminazlar ve Analiz Metotları

2.6.1. Rietman-Frankel Metodu

Transaminazlar, hem kolorimetrik hem de enzimatik kinetik metotlarla tayin edilir. Piyasada her iki metoda dayalı ticari kitler bulunmaktadır. Kolorimetrik metodun linearitesi az, deney süresi ise oldukça uzundur. Kinetik metodun linearitesi çok yüksek, deney süresi çok kısadır. Kolorimetrik metoda göre daha hassastır.

➤ AST / SGOT prensibi

Aspartat transaminaz enzimi; L- Aspartik asidin (aminoasit) amin grubunu α – ketoglutarik aside (keto asit) taşıyarak glutamik asit (amino asit) ve oksalasetik asit oluşumunu katalizler. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan oksal asetik asit 2,4-dinitro fenil hidrazin ile renklendirilir. Oluşan renk şiddeti fotometre ile ölçülerek miktarı bulunur.

➤ ALT / SGPT prensibi

Alanin transaminaz enzimi; L- Alanin (amino asit) amin grubunu α – ketoglutarik aside (keto aside) taşıyarak glutamik asit (amino asit) ve pirüvik asit oluşumunu katalizler. Reaksiyon sonunda ortaya çıkan pirüvik asit 2,4 – dinitrofenil hidrazin reaktifile renklendirilir. Oluşan renk şiddeti fotometre ile ölçülerek miktarı bulunur.

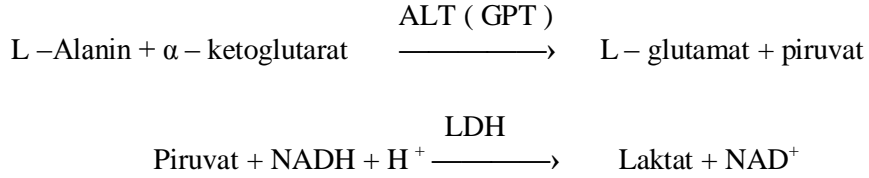
➤ **Kinetik metotla SGOT ve SGPT analizi**

• **SGOT- SGPT prensibi**

SGOT, L – Aspartat'ın amino grubunun α – keto glutarata transferini katalize eder. Meydana gelen oksalasetat malat dehidrogenaz tarafından L – malat'a dönüştürülürken NADH, NAD⁺ye okside olur.



SGPT'nin tayini de aynı prensibe dayanmakta olup aşağıdaki reaksiyona göre dir.



➤ **Kullanılan araç, gereç ve cihazlar**

- Santrifüj cihazı
- Distile su cihazı
- Spektrofotometre cihazı
- Deney tüpü
- Pipet/ otomatik pipet
- Santrifüj tüpü
- Tüp sporu

Not: Transaminaz SGOT-SGPT analizlerini her hangi bir kolorimetrik veya kinetik yöntem ve metodunun ticari kitleri tedarik edilerek okul laboratuvar ortamında analizi yapılması sağlanır.

➤ **SGOT reaktif içeriği (pH 7.85)**

- 2- Oksoglutarat
- L – Aspartat
- Malat dehidrogenaz (MDH)
- LDH
- NADH

- **SGPT reaktif içeriği (pH 7.65)**
 - 2- Oksoglutarat
 - L- Alanin
 - NADH
 - LDH
 - Tristampon
 - **Reaktifin hazırlanması:** Kit içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden prospektüs deki sulandırma oranına göre çalışma reaktifi hazırlanır.
 - **Reaktifin depolanması:** Reaktifler 2- 8 °C'de saklandığında son kullanma tarihine kadar kullanılır.
 - **Reaktiflerin kullanılmaması gereken durumlar:** 340 nm'de suya karşı başlangıç absorbansı SGOT'de 1.000 SGPT'de 1.0 altında kullanılmamalıdır. Reaktif parametreleri performans parametrelerini karşılamadığında kullanılmaz.
 - **Testte çalışılacak kanın özelliği ve depolanması:** Hemolize olmamış serumla çalışılmalıdır. Eritrositler AST ve ALT içerdiğinden eritrositlerin parçalanması analiz sonunda AST ve ALT'nin yüksek çıkmasına neden olur. Serum içinde AST ve ALT buzdolabında yedi gün, donmuş (-20 C) olarak bir ay, oda sıcaklığında üç gün dayanır.

- **SGOT – SGPT analizlerinin tekniği**
 - Analiz için yeterli miktarda venöz kan alınır ve hemolizsiz serum elde edilir.
 - SGOT – SGPT analizinde kullanılacak reaktifler hazırlanır. Çalışılacak test sayısına göre SGOT – SGPT çalışma reaktifinin prospektüsündeki hazırlama bilgisi doğrultusunda hazırlanır.
 - Numune ve kör tüpleri spora numaralandırılarak yerleştirilir.
 - Numune tüpüne serum alırken dibe çöken şekilli elamanların ve fibrinojenin oluşturduğu pıhtıyı karıştırmadan hemolizsiz serum almaya dikkat edilir. Hemolizli kan alındığında parçalanmış eritrosit içerisindeki enzimler çalışılan testte yüksek değer çıkmasına neden olur.

	Kör	SGOT Numune	SGT Numune
Serum		100 µI	100 µI
SGOT çalışma reaktifi	1000µI	1000µI	
SGPT çalışma reaktifi	1000µI		1000µI

Tablo 2.1: SGOT ve SGPT çalışma tablosu

- Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 340 nanometre dalga boyunda sıfırlanarak numune absorbansı dakika arası ölçüm yapılır. Dakika arası (kinetik) ölçümünde ilk okunan karışımın $\Delta A1$ absorbans değeri ölçülür. Bir dakika arayla $\Delta A2$, $\Delta A3$, $\Delta A4$ 3 okuma gerçekleştirilerek absorbansı ölçülür. Okunan değerler test formülüne yerleştirilerek hesaplanır.
- $SGOT (U/L) = \Delta Abs / dak \times F$

F (Faktör) =1768 yerleştiriniz.

Örnek:

$$A1 = 0.280$$

$$A2 = 0.287$$

$$A3 = 0.296$$

$$A4 = 0.305$$

$$\Delta A1 = A2 - A1 = 0.287 - 0.280 = 0.007$$

$$\Delta A2 = A3 - A2 = 0.296 - 0.287 = 0.009$$

$$\Delta A3 = A4 - A3 = 0.305 - 0.296 = 0.009$$

$$\Delta A / dakika = \frac{\Delta A1 + \Delta A2 + \Delta A3}{3} \times 1768 = \frac{0.007 + 0.009 + 0.009}{3} \times 1768$$

$$\Delta A / dakika = \frac{0.025}{3} \times 1768 = 0.008 \times 1768 = 14.144 \text{ U / L}$$

SGOT' nin kandaki normal değeri: 5 -34 U/L'dir.

- $SGPT (U/L) = \Delta Abs / dak \times F$

F (Faktör) =1768 yerleştiriniz.

Örnek:

$$A1 = 0.369$$

$$A2 = 0.361$$

$$A3 = 0.357$$

$$A4 = 0.349$$

$$\Delta A1 = A2 - A1 = 0.361 - 0.369 = -0.008$$

$$\Delta A2 = A3 - A2 = 0.357 - 0.361 = -0.004$$

$$\Delta A3 = A4 - A3 = 0.349 - 0.357 = -0.008$$

$$\Delta A / \text{dakika} = \frac{\Delta A1 + \Delta A2 + \Delta A3}{3} \times 1768 = \frac{(-0.008) + (-0.004) + (-0.008)}{3} \times (-1768)$$

$$\Delta A / \text{dakika} = \frac{-0.020}{3} \times (-1768) = (-0.006) \times (-1768) = 11.78 \text{ U / L}$$

SGPT'nin kandaki normal değeri: 5- 36 U/L'dir.

- Deneyde ölçülen madde miktarı reaksiyon sonunda gittikçe artıyorsa artan absorbans değerlerin bulunur, azalıyorsa azalan absorbans değerleri bulunur. Bu durumda $\Delta A / \text{dakika}$ değerleri negatif çıkar. O zaman $\Delta A / \text{dakika}$ değerlerinin işareti dikkate alınmadan mutlak değerleri alınır veya faktör de negatif olarak alınır. Böylece pozitif sonuçlar elde edilmiş olunur.
- Normal spektrofotometre kullanıldığında yukarıdaki örnek doğrultusunda hesaplanır. Dijital spektrofotometre kullanıldığında cihaz absorbans değerlerini otomatik olarak hesaplayarak sonuçları verir. Dijital spektrofotometre kullanılması, analizin absorbans ölçümlerinde hata payını azaltır.
- Çıkan sonuçlar kontrol edilerek normal ve anormal çıkan değerler belirlenir. Anormal çıkan analizler tekrar çalışılarak sonuçları aynı çıkmışsa raporlandırılır.
- Raporlar uzmana imzalatılır. İmzalanan raporların bilgisayar ve laboratuvar defterine kaydı yapılır.

2.7. SGOT enziminin Arttığı Durumlar

- Karaciğer hastalıklarında
- Karaciğer nekrozunda
- Kolestazisde
- Kalp hastalığında
- Myokard infarktüsü sonrası
- Hepatitte
- Karaciğer sirozunda
- Hücre harabiyetinde

26

2.8. SGPT enziminin Arttığı Durumlar

- Karaciğer fonksiyonlarında bozulma başladığında
- Akut enfeksiyöz hepatitte
- Karaciğer sirozunda
- Karaciğer kanserlerinde

27

UYGULAMA FAALİYETİ

Transaminaz enzimleri olan SGOT VE SGPT analizlerini tekniğine uygun olarak yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınır.	➤ Çalışma önlüğü ve eldiven giyiniz.
➤ Analiz öncesi araç, gereç ve cihazları hazırlayınız.	➤ Cihazların günlük bakımını yapmayı unutmayınız. ➤ Günlük bakımı yapılan cihazlarla güvenli ve doğru sonuç elde edeceğinizi unutmayınız.
➤ Kanı santrifüj ederek hemolizsiz serum elde ediniz.	➤ Santrifüjde denge unsuruna dikkat ediniz. ➤ Serumun hemolizsiz olduğundan emin olunuz.
➤ Reaktifleri hazırlayınız.	➤ Çalışılacak test sayısına göre reaktif hazırlayınız. ➤ Reaktiflerin son kullanım tarihlerini kontrol ediniz.
➤ SGOT ve SGPT analizi için numune ve kör tüplerini numaralandırarak spora yerleştiriniz.	➤ Tüplerin numaralandırılmasının analizin hata payındaki rolüne dikkat ediniz.
➤ SGOT numune tüpüne 0.10 ml (100 µl) serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ SGPT numune tüpüne 0.10 ml (100 µl) serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ SGOT numune tüpüne 1ml (100 µl) SGOT çalışma reaktifi koyunuz.	➤ Otomatik pipet ucunu değiştiriniz. ➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ SGPT numune tüpüne 1ml (100 µl) SGPT çalışma reaktifi koyunuz.	➤ Otomatik pipet ucunu değiştiriniz. ➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.

<p>➤ Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda distile su ile (0) sıfırlanarak kinetik ölçüm tekniğiyle numune absorbanlarını okuyunuz.</p>	<p>➤ Spektrofotometre tüpünün dışını okuma bölümüne yerleştirmeden önce her seferinde gazlı bezle siliniz.</p>
<p>➤ Ölçüm değerlerini $\Delta\text{Abs} / \text{dakika} \times F = U/L$ formülüne göre yerleştiriniz ve hesaplamasını yapınız.</p>	<p>➤ Ölçüm değerlerini dikkatli not ediniz.</p>
<p>➤ Çıkan sonuçları kontrol ederek normal ve anormal çıkan değerleri belirleyiniz.</p>	<p>➤ Anormal çıkan sonuçları tekrar çalışınız.</p>
<p>➤ Raporları uzmana imzalatınız.</p>	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

1. Kimyasal reaksiyonlarda tepkimeye verilen ilk enerji aşağıdakilerden hangisidir?
A) Alternatif akım enerji
B) Kinetik enerji
C) Durağan enerji
D) Aktivasyon enerjisi
E) Doğru akım enerjisi
2. Yapısında sadece protein bulduran enzim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Ko enzim
B) Haloenzim
C) Apo enzim
D) Aktivasyon enerjisi
E) Paralel enerji
3. Nişasta substratını katalizleyen enzim aşağıdakilerden hangisidir?
A) Lipaz
B) Proteinaz
C) Üreaz
D) Amilaz
E) Pepsin
4. Serumda kinetik metotla yapılan SGOT analizinde absorbans değerleri verilen hastanın SGOT miktarı aşağıdakilerden hangisidir?

F (Faktör) = 1768

A1 = 0.320

A2 = 0.295

A3 = 0.280

A4 = 0.255

A) $\Delta A / \text{dakika} = 38 \text{ U/L}$

B) $\Delta A / \text{dakika} = 50 \text{ U/L}$

C) $\Delta A / \text{dakika} = 45 \text{ U/L}$

D) $\Delta A / \text{dakika} = 25 \text{ U/L}$

E) $\Delta A / \text{dakika} = 30 \text{ U/L}$

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

5. Apoenzim ve kofaktör kısımlarının birlikte oluşturdukları yapıyaenzim denir.
6. Delta dakika (ΔA / ***dakika***) arası absorban ölçümüne yöntem denir.
7. Sentezlandıkları hücrenin dışında görev yapan enzimlere.....enzimleri denir.
8. SGPT enziminin vücutta en yoğun olarak bulunduğu organ.....dır.

DEĞERLENDİRME

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

ÖĞRENME FAALİYETİ-3

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile oksidoredüktaz enzimleri hakkında bilgi edinerek laktat dehidrogenaz (**LDH**) analizinin kantitatif ölçümünü yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- LDH enzimi ve izoenziminin insan metabolizmasındaki önemini araştırınız.
- LDH ve izoenzim analizlerinin yapılaş amacını araştırınız.
- Biyokimya laboratuvarında LDH analizinin yapılaşını izleyerek izlenimlerinizi arkadaşlarınızla paylaşınız.

3. OKSİDOREDÜKTAZ ANALİZİ

3.1. Kanda Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH), anaerobik glikolizin son enzimi olup piruvatın laktata dönüşümünü katalize eder. Vücut dokuları ve sıvılarının hepsinde LDH bulunmakla beraber özellikle kalp kası, eritrositler, böbrek, karaciğer ve akciğerde yoğun olarak bulunur. Bu dokulardaki harabiyetler sonucunda kandaki seviyesi artar. Klinik tanı açısından LDH myokard enfarktüsünde kullanılır. LDH enziminin hastalıklara özgünlüğü azdır. LDH izoenzimlerinin miktar belirtileri yapılaşarak özgünlük artırılabilir. Beş tane LDH izoenzimi mevcuttur. Bu izoenzimler değişik dokularda değişik oranlarda bulunur.

3.1.1. LDH İzoenzimleri

Bir enzimin yapılaş olarak benzeyen fakat elektriksel alanda göç, doku dağılımı, ısı, inhibitör ve aktivitelere yanıtları farklı olan formlarına o enzimin izoenzimleri denir. izoenzim aktivitelerinin bilinmesi klinisyenler için tanı koymada yol göstericidir. LDH izoenzimlerinin dokulardaki buldukları yoğunlukların gösteren tablo aşağıya çıkarılmıştır.

LDH izoenzimi	İzoenzimin monomerleri	İzoenzim özellikleri
LDH1	HHHH	Elektroforezde anoda en hızlı göçen izoenzimdir. Kalp kası, eritrositler, blast hücreler ve böbreklerde bulunur, myokard enfarktüsünde serumda düzeyi artar.
LDH2	HHHM	Kalp kasında ve eritrositlerde bulunur.
LDH3	HHMM	Akciğer, endokrin bezler, dalak, lenf bezleri ve trombositlerde bulunur.
LDH4	HMMM	Karaciğer ve iskelet kasında bulunur.
LDH5	MMMM	İskelet kasında ve karaciğerde bulunur. Karaciğer hastalıklarında serumdaki düzeyi artar.

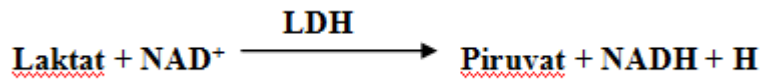
Tablo 3.1: LDH izoenzimlerinin yoğun buldukları dokular

3.2. Laktat Dehidrojenaz Analizi

LDH, endpoint ve kinetik metotla analizi yapılır.

3.2.1. Kinetik Metot

- **Prensip:** Laktat dehidrojenaz laktat – piruvat reaksiyonunu katalize ederken NAD - NADH indirgenmesini sağlar. NADH oluşumunun değeri spektrofotometrede absorbansda bir artış olarak ölçülür.



- **Kullanılan araç, gereç ve cihazlar**

- Santrifüj cihazı
- Distile su cihazı
- Spektrofotometre cihazı
- Deney tüpü
- Pipet/ otomatik pipet
- Santrifüj tüpü
- Tüp sporu

- **LDH reaktifinin içeriği**

- Reaktif- 1
 - L – Laktat
 - Tampon AMP (pH 8.8)
- Reaktif- 2
 - NAD

- **Reaktifin hazırlanması:** Kit içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden prospektüsdeki sulandırma oranına göre çalışma reaktifi hazırlanır.
- **Reaktifin depolanması:** Reaktifler 2- 8 °C'de saklandığında son kullanma tarihine kadar kullanılır.
- **Reaktiflerin kullanılmaması gereken durumlar:** 340 nm'de suya karşı başlangıç absorbansı 0.8'den büyük ise kullanılmamalı. Reaktif parametreleri performans parametrelerini karşılamadığında kullanılmaz.

➤ **Testte çalışılacak kanın özelliği ve depolanması**

Hemoliz olmamış serum tercih edilir. Eritrositler büyük konsantrasyonlar hâlinde LDH içerir. Numuneler alındıktan sonra serum hemen pıhtıdan ayrılmalıdır. Ayrılan serumların hemen analizi çalışılmalıdır. Serum içindeki LDH 2-3 gün stabildir. Serum dondurulmamalı veya yüksek ısıya maruz bırakılmamalıdır.

➤ **Teknik**

- Analiz için yeterli miktarda venöz kan alınır ve hemolizsiz serum elde edilir.
- LDH analizinde kullanılacak reaktifler, çalışılacak test sayısına göre çalışma reaktifinin prospektüsündeki hazırlama bilgisi doğrultusunda hazırlanır.
- Numune ve kör tüpleri numaralandırılarak spora yerleştirilir.
- Numune tüpüne serum alırken dibe çöken şekilli elamanların ve fibrinojenin oluşturduğu pıhtıyı karıştırmadan hemolizsiz serum almaya dikkat edilir.

Numune		Kör
Serum	25 µl	-
LDH çalışma reaktifi	1000µl	-
Distile su	-	1000µl

Tablo 3.2: LDH çalışma tablosu

- Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda distile su ile sıfırlanarak numune absorbansı dakika arası ölçüm yapılır. Dakika arası (Kinetik) ölçümünde ilk okunan karışımın $\Delta A1$ absorbans değeri ölçülür. Bir dakika arayla $\Delta A2$, $\Delta A3$, $\Delta A4$ 3 okuma gerçekleştirilerek absorbansı ölçülür. Okunan değerler test formülüne yerleştirilerek hesaplanır.

- $LDH (U/L) = \Delta Abs / dak \times F$
F (Faktör) = 6592 yerleştiriniz.

Örnek:

$$A1 = 0.482$$

$$A2 = 0.460$$

$$A3 = 0.445$$

$$A4 = 0.433$$

$$\Delta A1 = 0.482 - 0.460 = 0.022$$

$$\Delta A2 = 0.460 - 0.445 = 0.015$$

$$\Delta A3 = 0.445 - 0.433 = 0.012$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.022 + 0.015 + 0.012 = 0.049$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.049 / 3 = 0.016$$

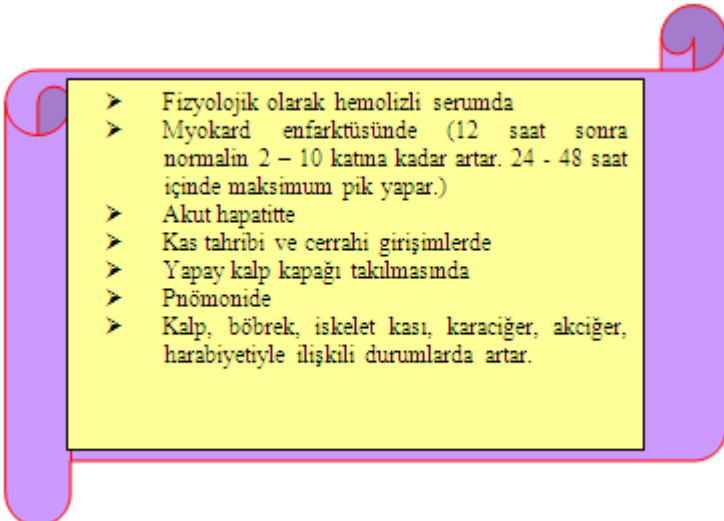
$$\Delta A / \text{dakika} = 0.016 \times 6592 = \Delta A / \text{dakika} = 105 \text{ U/L}$$

Kandaki LDH'nin normal değerleri:

Erkekde: 80 – 285 U/L Kadında: 103-227 U/L (37 °C)

- Çıkan sonuçlar kontrol edilerek normal ve anormal çıkan değerler belirlenir. Anormal çıkan analizler, tekrar çalışılarak sonuçları aynı çıkmışsa raporlandırılır.
- Raporlar uzmana imzalatılır. İmzalanan raporların bilgisayar ve laboratuvar defterine kaydı yapılır.

3.3. LDH Enziminin Arttığı Durumlar

- 
- Fizyolojik olarak hemolizli serumda
 - Myokard enfarktüsünde (12 saat sonra normalin 2 – 10 katına kadar artar. 24 - 48 saat içinde maksimum pik yapar.)
 - Akut hepatitte
 - Kas tahribi ve cerrahi girişimlerde
 - Yapay kalp kapağı takılmasında
 - Pnömonide
 - Kalp, böbrek, iskelet kası, karaciğer, akciğer, yarabiyetiyle ilişkili durumlarda artar.

UYGULAMA FAALİYETİ

LDH analizini tekniğine uygun olarak yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınız.	➤ Çalışma önlüğü ve eldiven giyiniz.
➤ Analiz öncesi araç, gereç ve cihazları hazırlayınız.	➤ Cihazların günlük bakımını yapmayı unutmayınız. ➤ Günlük bakımı yapılan cihazlarla güvenli ve doğru sonuç elde ettiğinizi unutmayınız.
➤ Kanı santrifüj ederek hemolizsiz serum elde ediniz.	➤ Santrifüjde denge unsuruna dikkat ediniz. ➤ Serumun hemolizsiz olduğundan emin olunuz.
➤ Reaktifleri hazırlayınız.	➤ Çalışılacak test sayısına göre reaktif hazırlayınız. ➤ Reaktiflerin son kullanım tarihlerini kontrol ediniz.
➤ Spora numune ve kör tüplerini numaralandırarak yerleştiriniz.	➤ Tüplerin numaralandırılmasının analizin hata payındaki rolüne dikkat ediniz.
➤ LDH numune tüpüne 0.025 ml (25 µl) serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Numune üzerine 1.0 ml LDH çalışma reaktifi koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda distile su ile (0) sıfırlanarak kinetik ölçüm tekniğiyle numune absorbanlarını okuyunuz.	➤ Spektrofotometre tüpünün dışını okuma bölümüne yerleştirmeden önce her seferinde gazlı bezle siliniz.
➤ Ölçüm değerlerini $\Delta Abs / dakika \times F = U/L$ formülüne göre yerleştiriniz ve hesaplamasını yapınız.	➤ Ölçüm değerlerini dikkatli not ediniz.
➤ Çıkan sonuçları kontrol ederek normal ve anormal çıkan değerleri belirleyiniz.	➤ Anormal çıkan sonuçları tekrar çalışınız.
➤ Raporları uzmana imzalatınız.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Piruvatın laktata dönüşümünü katalizleyenenzimidir.
2. Enzimlerin yapısal olarak benzeyen fakat elektriksel alanda göç, doku dağılımı, ısı, inhibitör ve aktivatörlere yanıtları farklı olan formlarınadenir
3. Elektroforezde anoda en hızlı göçen LDH izoenzimi dır.
4. Serum içerisindeki LDH 2-8 °C'de.....gün stabildir.

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

5. Karaciğer hastalıklarının teşhisinde yardımcı olan izo enzim aşağıdakilerden hangisidir.
A) LDH1
B) LDH3
C) LDH2
D) LDH4
E) LDH5
6. Serumda kinetik metotla yapılan LDH analizinde absorban değerleri verilen hastanın LDH miktarı aşağıdakilerden hangisidir?
F (Faktör) = 6592
A1 = 0.540
A2 = 0.498
A3 = 0.470
A4 = 0.425
A) $\Delta A / \text{dakika} = 105 \text{ U/L}$
B) $\Delta A / \text{dakika} = 252 \text{ U/L}$
C) $\Delta A / \text{dakika} = 300 \text{ U/L}$
D) $\Delta A / \text{dakika} = 290 \text{ U/L}$
E) $\Delta A / \text{dakika} = 190 \text{ U/L}$

DEĞERLENDİRME

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

ÖĞRENME FAALİYETİ – 4

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile kreatin enzimleri hakkında bilgi edinerek kreatin kinaz/ kreatin fosfokinaz analizinin kantitatif ölçümünü yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

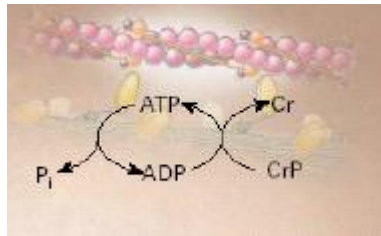
- Kreatin kinaz enzimi ve analiz tekniği hakkında bilgi edinerek arkadaşlarınızla paylaşınız.
- Troponin T enzimi ve analiz tekniği hakkında bilgi edinerek arkadaşlarınızla paylaşınız.

4. KREATİN KİNAZ ANALİZİ

Kreatin kinaz (CK) enzimine kreatin fosfokinaz (CPK) da denir. Genellikle CPK yerine CK kullanılır.

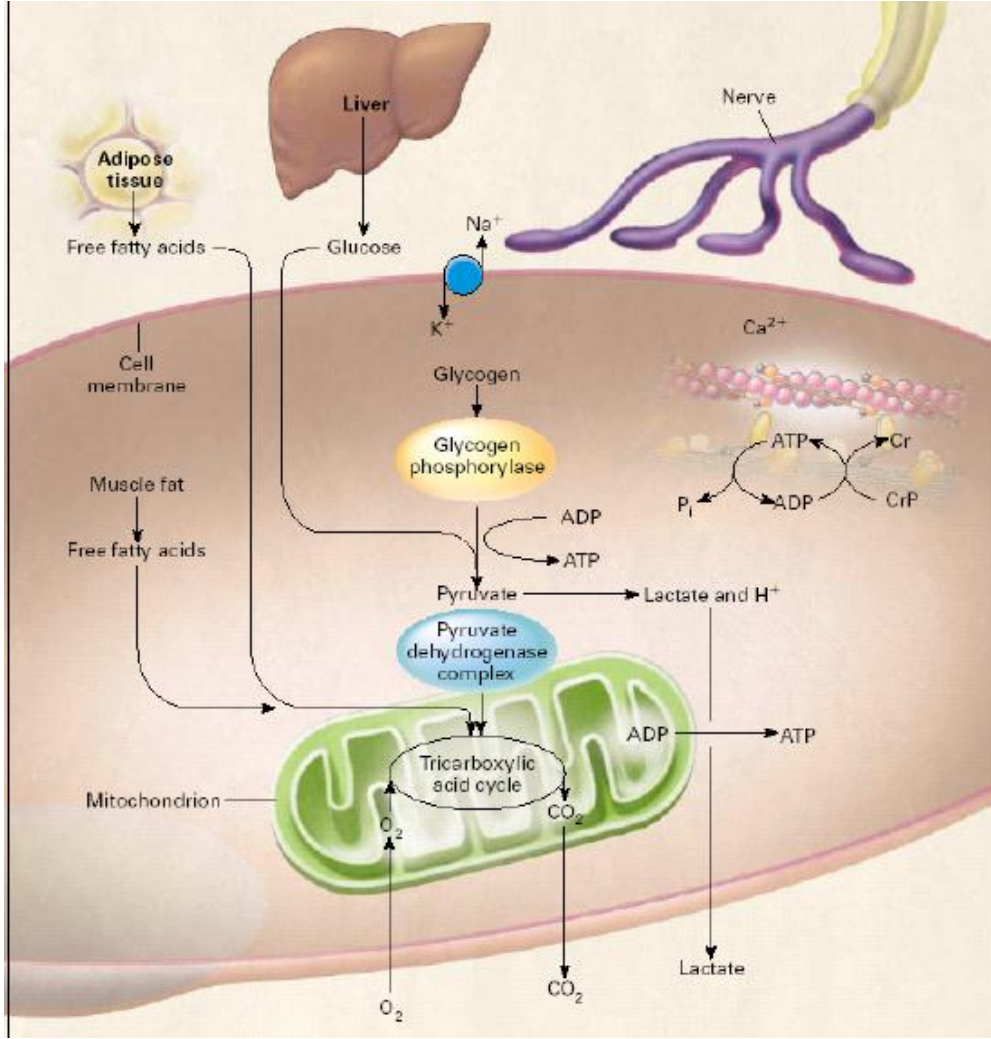
4.1. Kreatin Kinaz

Kinaz enzimleri, bir substrat ile ATP arasında fosfat transferi yapan enzimlerdir. Kreatin kinaz, dokunun kasılması için gerekli olan ATP oluşumunun reaksiyonunu katalizler. Kreatin ile ATP arasında geri dönüşümlü bir reaksiyonla fosfat transferi yapar.



Şekil 4.1: Kreatin fosfattan ADP'ye fosfat (P) aktarımı ve ATP oluşumu

Bu reaksiyon, kas kasılması için gerekli olan enerjiyi sağlar. İstirahat hâlindeyken çeşitli gıda maddelerinin oksidasyonu ile oluşan ATP'den de kreatin fosfat sentezlenerek depolanır. Kasılma sırasında ise kreatin fosfattan ATP sentezlenerek kullanılır. Reaksiyonlar özellikle çizgili kasta olduğu için enzim en çok bu dokuda bulunur. Kas hücrelerinin stoplazmalarında, myofibrillerde ve mitokondriyumun iç membranında özellikle kalp ve beyinde yoğun olarak bulunur.



Şekil 4.2: CK enziminin etkisiyle ATP oluşumu

- CK izoenzimleri: CK'nin üç izoenzimi bulunur. Moleküller M ve B (subünitelerinin) ortak yapısında bulunan protein veya monomerlerinin kombinasyonu ile oluşmuştur.

	CK 1 (CK – BB)	CK2 (CK- MB)	CK 3 (CK – MM)
İskelet kası	—	% 1-3	% 97-99
Kalp kası	—	% 15-20	% 75-80
Beyin	% 100	—	—
Serum CK	—	—	% 100

Tablo 4.1: CK izoenzimlerinin buldukları dokular ve miktarları

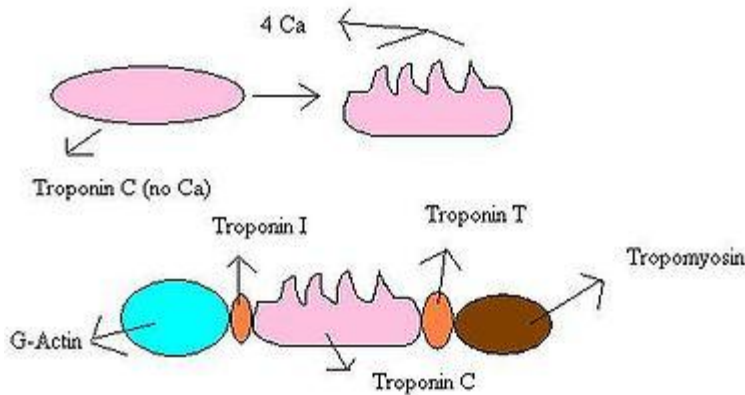
CK İzoenzimleri	İzoenzimin Özellikleri
CK 1 (CK – BB)	Beyin, prostat, akciğer, bağırsak, mesane, plesanta ve tiroide bulunur. Serumda her zaman aktivitesini göstermez.
CK2 (CK- MB)	Kalp kasında bulunur, plazma düzeyi normalde total CK düzeyininin % 2 sinden daha azdır. Myokard enfarktüsünden sonra plazma düzeyi artar.
CK 3 (CK – MM)	İskelet kasında bulunur, normalde plazma total CK aktivitesininin %98' ini oluşturur.

Tablo 4.2: CK izoenzimlerinin özellikleri

CK enzimi, myokard enfarktüslerinde erken teşhis için aranan bir enzimdir. Bu test için alınan serumlarda bulunan CK enzimleri dış şartlara dayanaksız olduğundan laboratuvarında bekletilmeden çalışılmalıdır.

Son zamanlarda akut myokard enfaktüsünde spesifik protein yapılı bir enzim olan **Troponin T** analizi daha spesifiktir. Üç farklı yapı ve fonksiyona sahip olan enzim 3 (subünitten) yani alt gruptan oluşmaktadır.

- **Troponin T (TnT):** Troponin kompleksini tropmiyozine ve komşu moleküllere bağlar.
- **Troponin I (TnI):** Aktin miyozin etkileşmesini inhibe eder.
- **Troponin C (TnC):** Kalsiyum bağlayıcı proteindir. Her TnC molekülüne 4 kalsiyum bağlanır.



Şekil 4.3: Troponin C molokülünün Ca'a bağlaması

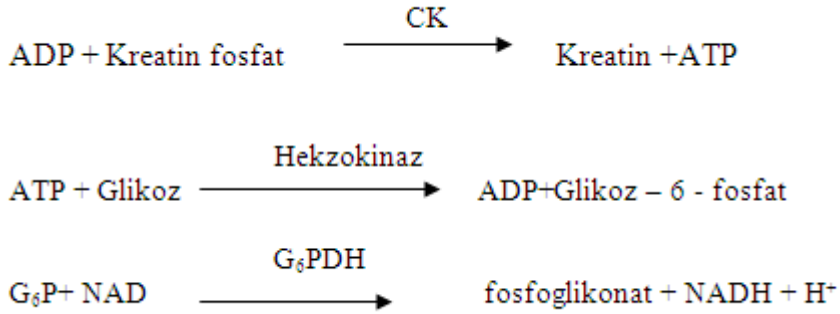
TnT myokardial hasarın duyarlı bir saptayıcısıdır. CK / CK –MB den daha erken artan ve spesifik olan bir testtir.

4.2. Kreatin Kinaz Analizi

CK İzoenzimi, otoanalizörde ultraviole-kinetik metotlarla analizleri yapılabildiği gibi elektroforez tekniği ile izoenzimlerin elektroferatik yoğunlukları test edilir.

4.2.1. Kinetik Metot

- **Prensip:** CK enzimi, kreatin fosfat varlığında ADP'nin fosforilasyonunu ATP ve kreatin oluşturacak şekilde katalize eder. Yardımcı enzim hegzokinaz ADP ve glikoz – 6 -fosfat (G₆-P) üretmek üzere glikozun fosforilasyonunu oluşturan ATP yoluyla katalize eder G₆-P, NADH'ın oluşumu ile birlikte 6-fosfoglikonata okside edilir.



- **CK reaktifi**

İmidazol (pH 6.7)
Kreatin fosfat
ADP
AMP
NADP
N-Asetilsistein (NAC)
Hekzokinaz
G₆PDH
Glikoz
Magnezyum asetat
EDTA-Na₂
Diadenozin pentafosfat

- **Reaktifin hazırlanması:** Kit içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden prospektüsdeki sulandırma oranına göre çalışma reaktifi hazırlanır. Örnek: Çalışma reaktifi 4 kısım reaktif 1 ile 1 kısım reaktif 2 (20 ml reaktif 1 ile 5ml reaktif 2) karışımı ile hazırlanır.
- **Reaktifin depolanması:** Reaktifler 2 - 8 °C'de saklandığında son kullanma tarihine kadar kullanılır.

- **Reaktiflerin kullanılmaması gereken durumlar:** 340 nm’de suya karşı başlangıç absorbansı 0.8’den büyük olduğunda ve reaktif parametreleri performans parametrelerini karşılamadığında kullanılmaz.
- **Testte kanın özelliği ve depolanması:** Hemolize olmamış serumla çalışılmalıdır. Ayrılan serumdan hemen analize alınmalıdır. Çünkü serum içindeki CK 2-8 °C’de yedi gün stabildir. Serum buharlaşmaya karşı korunduğu takdirde bir aya kadar donmuş olarak saklanır. Zorlu egzersiz veya fiziksel aktivite, serum CK seviyesini yükseltebilir. Bir dizi ilaç ve reaktifler CK aktivitesini etkileyebilir.

➤ **Teknik**

- Analiz için yeterli miktarda venöz kan alınır ve hemolizsiz serum elde edilir.
- CK analizinde kullanılacak reaktifler hazırlanır. Çalışılacak test sayısına göre CK çalışma reaktifinin prospektüsündeki hazırlama bilgisi doğrultusunda hazırlanır.
- Numune ve kör tüpleri spora numaralandırılarak yerleştirilir.

	Numune	Kör
Serum	20 µl	-
CK çalışma- reaktif	1000 µl	-
Distile Su	-	1000 µl

Tablo 4.3: CK analizi çalışma tablosu

- Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda distile su ile sıfırlanarak numune absorbansı dakika arası ölçüm yapılır. Dakika arası (Kinetik) ölçümünde ilk okunan karışımın $\Delta A1$ absorbans değeri ölçülür. Bir dakika arayla $\Delta A2$, $\Delta A3$, $\Delta A4$ 3 okuma gerçekleştirilerek absorbansı ölçülür. Okunan değerler test formülüne yerleştirilerek hesaplanır.
- $CK (U/L) = \Delta Abs / dak \times F$

F(Faktör) = 3376 yerleştiriniz.

Örnek:

$$A1 = 0.459$$

$$A2 = 0.443$$

$$A3 = 0.421$$

$$A4 = 0.413$$

$$\Delta A1 = 0.459 - 0.443 = 0.016$$

$$\Delta A2 = 0.443 - 0.421 = 0.022$$

$$\Delta A3 = 0.421 - 0.413 = 0.008$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.016 + 0.022 + 0.008 = 0.046$$

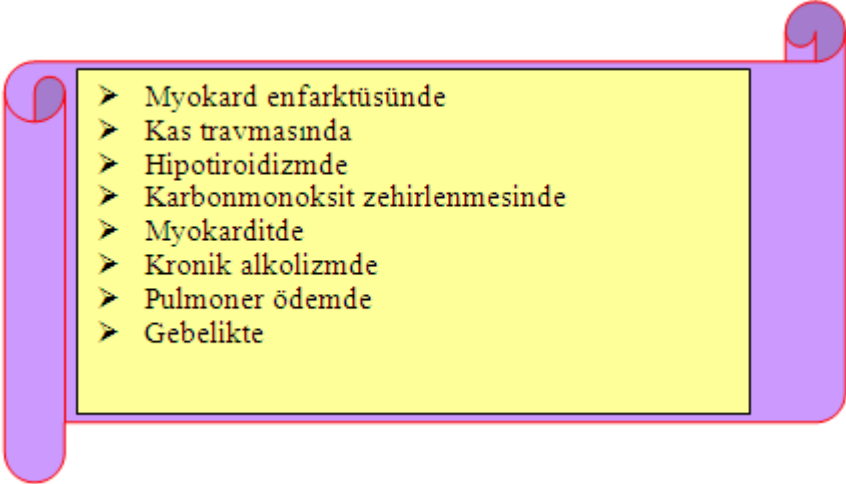
$$\Delta A / \text{dakika} = 0.046 / 3 = 0.015$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.015 \times 3376 = \Delta A / \text{dakika} = 50.6 \text{ U/L}$$

CK normal değeri: 0 - 24 U/L

- Çıkan sonuçlar kontrol edilerek normal ve anormal çıkan değerler belirlenir. Anormal çıkan analizler tekrar çalışılarak sonuçları aynı çıkmışsa raporlandırılır.
- Raporlar uzmana imzalatılır. İmzalanan raporların bilgisayar ve laboratuvar defterine kaydı yapılır.

4.3. CK Enziminin Arttığı Durumlar

- 
- Myokard enfarktüsünde
 - Kas travmasında
 - Hipotiroidizmde
 - Karbonmonoksit zehirlenmesinde
 - Myokarditte
 - Kronik alkolizmde
 - Pulmoner ödemde
 - Gebelikte

UYGULAMA FAALİYETİ

CK analizini tekniğine uygun olarak yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınır.	➤ Çalışma önlüğü ve eldiven giyiniz.
➤ Analiz öncesi araç, gereç ve cihazları hazırlayınız.	➤ Cihazların günlük bakımını yapmayı unutmayınız. ➤ Günlük bakımı yapılan cihazlarla güvenli ve doğru sonuç elde edeceğinizi unutmayınız.
➤ Kanı santrifüj ederek hemolizsiz serum elde ediniz.	➤ Santrifüjde denge unsuruna dikkat ediniz. ➤ Serumun hemolizsiz olduğundan emin olunuz.
➤ Reaktifleri hazırlayınız.	➤ Çalışılacak test sayısına göre reaktif hazırlayınız. ➤ Reaktiflerin son kullanım tarihlerini kontrol ediniz.
➤ Spora numune ve kör tüplerini numaralandırarak yerleştiriniz.	➤ Tüplerin numaralandırılmasının analizin hata payındaki rolüne dikkat ediniz.
➤ CK numune tüpüne 0.05 ml (50 µl) serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Numune üzerine 1.0 ml CK çalışma reaktif koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda distile su ile (0) sıfırlanarak kinetik ölçüm tekniğiyle numune absorbanlarını okuyunuz.	➤ Spektrofotometre tüpünün dışını okuma bölümüne yerleştirmeden önce her seferinde gazlı bezle siliniz.
➤ Ölçüm değerlerini $\Delta\text{Abs} / \text{dakika} \times F = U/L$ formülüne göre yerleştiriniz ve hesaplamasını yapınız.	➤ Ölçüm değerlerini dikkatli not ediniz.
➤ Çıkan sonuçları kontrol ederek normal ve anormal çıkan değerleri belirleyiniz.	➤ Anormal çıkan sonuçları tekrar çalışınız.
➤ Raporları uzmana imzalatınız.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Dokunun kasılması için gerekli olan ATP oluşumunu katalizleyen, kreatin ile ATP arasında geri dönüşümlü fosfat transferi yapan enzimidir.
2. Beyinde yoğun olarak bulunan CK izoenzimi.....dir.
3. CK enzimini yoğun olarak, ve de bulunur.
4. Myokard enfarktüslerinde erken teşhis için aranan..... enzimidir.
5. Kalp kasında bulunan CK izoenzimi.....dir.

DEĞERLENDİRME

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

ÖĞRENME FAALİYETİ – 5

AMAÇ

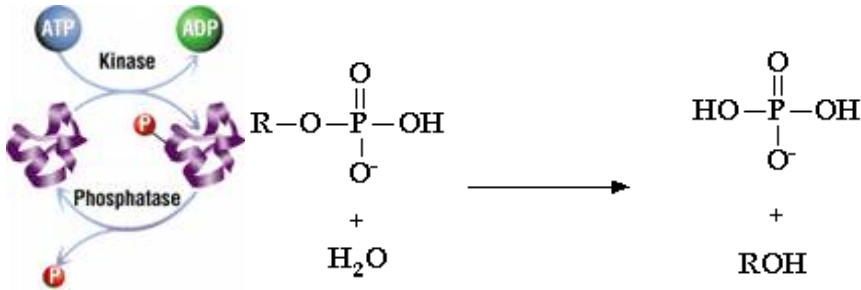
Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile fosfataz enimlerinden alkalen fosfataz ve asit fosfataz analizini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Alkale fosfataz ve asit fosfataz enziminin hangi dokularla ilgisi olduğunu araştırınız.
- Asit fosfataz enziminin prostat ile olan önemini araştırınız.
- Fosfat enzim analizlerinin biyokimya laboratuvarında çalışma tekniğini araştırınız.

5. FOSFATAZ ANALİZİ

Fosfatazlar, fosfat esterlerini yıkan hidroliz enzimleridir. Klinik önemi olan fosfatazlar, alkale fosfataz (ALP) ve asit fosfataz (ACP)dır. ALP pH=9 ve ACP pH=5'te optimum aktivite göstermektedir.



Şekil 5.1: Fosfataz enzimi

5.1. Alkale Fosfataz (ALP)

Alkale fosfataz; karaciğer, kemik, barsak, plasenta ve akciğerde sentezlenmektedir. Hücre zarında bulunmaktadır. En fazla kemiklerde bulunur. Osteoblastik aktivite (kemik yapımı) sırasında kandaki seviyesi çok fazladır. Alkale fosfatazın serumda yükselişi, kemik ya da karaciğer safra yolları sistemik hastalığını gösterir.

5.2. Asit Fosfataz (ACP)

Asit fosfataz en fazla prostatta bulunur. Prostat dışında kemik, eritrosit, dalak, granülosit ve pankreasta bulunur. Asit fosfataz analizinde tampon reaktifi dışında alkale fosfataz analiz reaktifleri kullanılır. Teknik aynıdır.

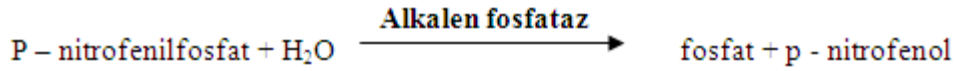
5.3. Alkale Fosfataz Analizi

5.3.1. Kolorimetrik, Endpoint Metot

Prensip: Alkale fosfataz enzimi, tampon / substrat reaktifi içinde bulunan thymol ftalein monofosfatı hidrolize eder. Reaksiyon sonunda ortaya çıkan yeni ürün thymo ftalein renk reaktifi ile renklendirilir. Renk şiddeti 590 nm dalga boyunda fotometrede okunarak miktar belirlenir.

5.3.2. Kinetik metot

Prensip: Serumdaki alkale fosfataz belirli koşullarda muhtelif fosfat esterlerinin hidroliz değerlerinin ölçümüyle belirlenir.



➤ Kullanılan araç, gereç ve cihazlar

- Deney tüpü
- Pipet/ otomatik pipet
- Santrifüj tüpü
- Tüp sporu
- Santrifüj
- Distile su cihazı
- Benmari
- Spektrofotometre

➤ Alkale fosfataz reaktifi

Reaktif – 1

2 – amino – 2 – metil – I – propanol
Magnezyum sülfat
Çinko sülfat
HEDTA

Reaktif – 2

P – nitrofenilfosfat (pH 10,4)

- Reaktifin hazırlanması ve depolanması

Kit içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden prospektüsdeki sulandırma oranına göre çalışma reaktifi hazırlanır. Örnek: Çalışma reaktifi 4 kısım reaktif 1 ile 1 kısım reaktif 2 (20 ml reaktif 1 ile 5ml reaktif 2) karıştırılarak hazırlanır.

Reaktifler 2- 8 °C’de saklanır. Reaktifler 2- 8 °C’ de saklandığında son kullanma tarihine kadar kullanılır. Reaktif 2 ışıktan uzak tutulmalıdır.

Reaktif tortulaşmışsa ve 405 nm’de 1.0 dan büyük absorbands ölçülürse reaktif kullanılmamalıdır.

Hemoliz olmamış serum veya heparinli plazma kullanılır. Ayrılan serumların hemen analizi çalışmalıdır. Serum örnekleri 2-8 °C’de yedi gün stabildir.

➤ **Tekniği**

- Analiz için yeterli miktarda venöz kan alınır ve hemolizsiz serum elde edilir.
- CK analizinde kullanılacak reaktifler hazırlanır. Çalışılacak test sayısına göre CK çalışma reaktifinin prospektüsündeki hazırlama bilgisi doğrultusunda hazırlanır.
- Numune ve kör tüpleri spora numaralandırılarak yerleştirilir.

	Numune	Kör
Serum	20 µI	
ALP çalışma- reaktifi - 1	1000 µI	-
ALP çalışma reaktifi - 2	250 µI	-
Distile su	-	1000µI

Tablo 5.1: ALP analiz çalışma tekniği

- Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda distile su ile sıfırlanarak numune absorbandsı dakika arası ölçüm yapılır. Dakika arası (kinetik) ölçümünde ilk okunan karışımın $\Delta A1$ absorbands değeri ölçülür. Bir dakika arayla $\Delta A2$, $\Delta A3$, $\Delta A4$ 3 okuma gerçekleştirilerek absorbandsı ölçülür. Okunan değerler test formülüne yerleştirilerek hesaplanır.

$$ALP (U/L) = \Delta Abs / dak \times F$$

$$F(\text{Faktör}) = 3387 \text{ yerleştiriniz}$$

Örnek:

$$A1=0.361$$

$$A2=0.346$$

$$A3=0.333$$

$$A4=0.321$$

$$\Delta A1 = 0.361 - 0.346 = 0.015$$

$$\Delta A2 = 0.346 - 0.333 = 0.013$$

$$\Delta A3 = 0.333 - 0.321 = 0.012$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.015 + 0.013 + 0.012 = 0.040$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.040 / 3 = 0.013$$

$$\Delta A / \text{dakika} = 0.013 \times 3387 = \Delta A / \text{dakika} = 44 \text{ U/L}$$

Kandaki ALP' nin normal değerleri:

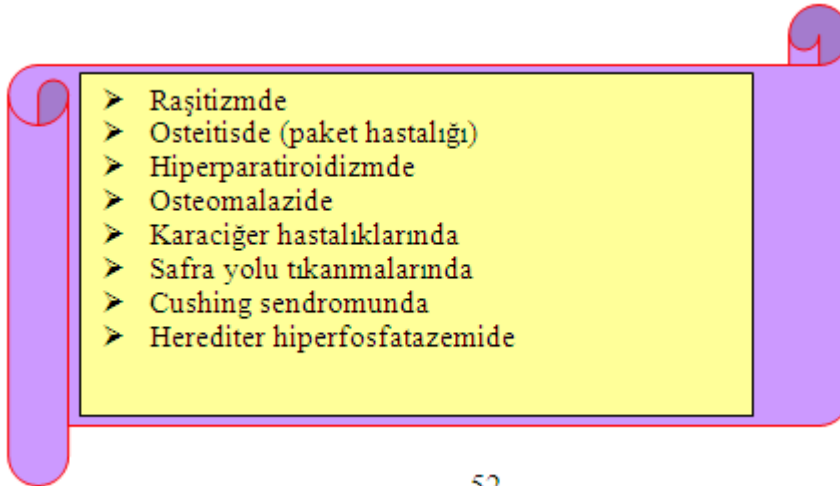
Erkeklerde : 20- 50 yaş 53 – 128 U /L

Bayanlarda : 20- 50 yaş 42 – 98 U /L

- Çıkan sonuçlar kontrol edilerek normal ve anormal çıkan değerler belirlenir. Anormal çıkan analizler tekrar çalışılarak sonuçları aynı çıkmışsa raporlandırılır.
- Raporlar uzmana imzalatılır. İmzalanan raporların bilgisayar ve laboratuvar defterine kaydı yapılır.

5.4. Alkalen Fosfatazın Arttığı ve Azaldığı Durumlar

5.4.1. Alkalen Fosfatazın Arttığı Durumlar



5.4.2. Alkalen Fosfatazın Azaldığı Durumlar

- Hipofosfazemide
- Hipotiroidizmde
- Ağır anemilerde

UYGULAMA FAALİYETİ

ALP analizini tekniğine uygun olarak yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınır.	➤ Çalışma önlüğü ve eldiven giyiniz.
➤ Analiz öncesi araç, gereç ve cihazları hazırlayınız.	➤ Cihazların günlük bakımını yapmayı unutmayınız. ➤ Günlük bakımı yapılan cihazlarla güvenli ve doğru sonuç elde edeceğinizi unutmayınız.
➤ Kanı santrifüj ederek hemolizsiz serum elde ediniz.	➤ Santrifüjde denge unsuruna dikkat ediniz. ➤ Serumun hemolizsiz olduğundan emin olunuz.
➤ Reaktifleri hazırlayınız.	➤ Çalışılacak test sayısına göre reaktif hazırlayınız. ➤ Reaktiflerin son kullanım tarihlerini kontrol ediniz.
➤ Spora numune ve kör tüplerini numaralandırarak yerleştiriniz.	➤ Tüplerin numaralandırılmasının analizin hata payındaki rolüne dikkat ediniz.
➤ Kör tüpüne 1ml distile su koyunuz.	➤ 1000' µl lik otomatik pipet seçiniz.
➤ ALP numune tüpüne 0.020 ml (20 µl) serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Numune üzerine 1.0 ml reaktif 1 koyunuz.	➤ 1000' µl lik otomatik pipet seçiniz. ➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Numune üzerine 0.250 ml (250 µl) reaktif 2 koyunuz.	➤ 250' µl lik otomatik pipet seçiniz. ➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda distile su ile (0) sıfırlanarak kinetik ölçüm tekniğiyle numune absorbanlarını okuyunuz.	➤ Spektrofotometre tüpünün dışını okuma bölümüne yerleştirmeden önce her seferinde gazlı bezle siliniz.
➤ Ölçüm değerlerini $\Delta Abs / dakika \times F = U/L$ formülüne göre yerleştiriniz ve hesaplamasını yapınız.	➤ Ölçüm değerlerini dikkatli not ediniz.
➤ Çıkan sonuçları kontrol ederek normal ve anormal çıkan değerleri belirleyiniz.	➤ Anormal çıkan sonuçları tekrar çalışınız.
➤ Raporları uzmana imzalatınız.	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Fosfatazlar, fosfat esterlerini yıkan enzimleridir. Klinik önemi olan fosfatazlar alkalen fosfataz ve asit fosfatazdır.
2. Alkalen fosfatazın serumda yükselişiya da karaciğer safra yolları sistemik hastalığını gösterir.
3. Asit fosfataz en fazla..... da bulunur.
4. Raşitizm hastalığında kanda alkalen fosfataz miktarı
5. Hipotiroidizm hastalığı, kanda alkalen fosfataz miktarı

DEĞERLENDİRME

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

ÖĞRENME FAALİYETİ - 6

AMAÇ

Bu faaliyette kazandığınız bilgiler ile sindirim enzimlerinden amilaz enzimi analizini yapabileceksiniz.

ARAŞTIRMA

- Sindirim metabolizması açısından amilaz ve lipaz enziminin önemini araştırınız.
- Biyokimya laboratuvarında amilaz enzim analizinin çalışma tekniklerini araştırınız.

6. AMİLAZ ANALİZİ

Pankreas hastalıklarının tanısında yararlı enzimler, amilaz ve lipaz enzimidir.

6.1. Kanda Amilaz

Amilaz enzimi; pankreas ve tükürük bezlerinde sentezlenen, nişastayı disakkarit olan maltoza hidroliz eden enzimdir. α -amilaz insanda pankreas ve tükürük bezlerinde salgılanır ve bir kısmı kana geçer ve idrarla atılır.

Normal kişilerde bulunan serum amilazının başlıca kaynağı, tükürük bezidir. Artmış serum amilaz aktivitesinin başlıca kaynağı ise pankreastır. Serum amilaz aktivitesi, normal üst değer 10 katından fazla artmışsa bu akut pankreatit için **diagnostiktir** (ileriye yönelik araştırma). Akut pankreatitte serum amilaz aktivitesi, 2-12 saatte artar. 12-72 saatte normalin 5-10 katına ulaşarak maksimum olur. 3-4 günde normal değerlere iner.

Akut pankreatit tanısında **idrara amilazı** daha değerlidir. Çünkü böbrek fonksiyonlarının sağlam olması koşuluyla daha yüksek değerlere ulaşır ve 7-10 gün gibi daha uzun süre yüksek kalır.

Kan veya idrara amilazı, hem kolorimetrik hem de kinetik enzimatik olarak tayin edilebilir. Piyasada her iki metoda dayalı ticari kitler bulunmaktadır. Caraway metodu, amilaz aktivitesi tayininde kullanılan kolorimetrik metottur. Bu metot, otoanalizörlere uyarlanamaz.

6.2. Lipaz

Lipaz, trigliseridleri hidrolizleyen enzimdir. Kandaki lipazın çoğu pankreas kaynaklıdır. Akut pankreatitten sonra serum lipaz seviyesi 2-12 saat içinde normalin dört katından fazla artar ve 48-72 saat içinde normale döner.

Bazen serum amilaz seviyesine göre çok daha uzun süre yüksek kalabilir. Lipaz seviyesindeki yükselme amilaz ile paralellik gösterir. Pankreas hastalıklarında her ikisinin birlikte tayini tavsiye edilir.

Serum lipaz analiz seviyesi amilaza göre pankreas hastalıkları için daha spesifiktir. Amilaz analiz seviyesi tükürük bezi hastalıklarından etkilenebilir. Örneğin; kabakulak hastalığında serum amilazı yükselirken lipaz yükselmez. Kronik pankreatitte ve pankreas kanallarının taş veya tümörle tıkanması durumunda da serum amilaz seviyesi yükselir.

Serum lipaz aktivitesi, titrimetrik veya turbidimetrik metotlarla tayin edilebilir. Günümüzde en çok kullanılanı turbidimetrik metotlara dayalı ticari kitlerdir.

6.3. Kanda Amilaz Analizi

Kanda amilaz analizi yapılırken kullanılan metotlar aşağıda verilmiştir.

6.3.1. Kolorimetrik Metot

İki çeşidi vardır.

➤ Caraway metodu

Prensip: Serumda mevcut amilazın belli miktardaki nişastayı hidrolize etmesi esasına dayanır.

➤ Wohlgemeth metodu

Prensip: Serum içinde bulunan amilaz enzimi, belirli miktarda nişasta bulunan tüplerde inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüplerdeki nişastayı parçalayacak kadar enzim ihtiva edecek serum hacmi belirlenir.

6.3.2. Kinetik Metot

Prensip: Bu metod, kromojenik (grup) substrat olan maltotriose (üç parçalı şeker) ile bağlanmış 2- kloro-p-nitrofenol kullanımına dayanmaktadır. Bu substrat ile amilaz reaksiyonu 405 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilen 2-kloro-p-nitrofenol oluşumu olarak sonuçlanmaktadır.

➤ Kullanılan araç gereçler ve cihazlar

- Santrifüj
- Distile su cihazı
- Benmari
- Spektrofotometre
- Deney tüpü
- Pipet/ otomatik pipet
- Santrifüj tüpü
- Tüp sporu

Not: Amilaz analizi, her hangi bir kolorimetrik veya kinetik yöntem ve metodunun ticari kitleri tedarik edilerek okul laboratuvar ortamında analizi yapılması sağlanır.

➤ **Amilaz reaktifi**

Mes tampon (pH 6.0)
2-kloro-p-nitrofenil-a-D-maltotriozid
Sodyum klorid
Kalsiyum asetat
Potasyum tiosiyanat
Sodyum azid

- Reaktifin hazırlanması ve depolanması

Kit içinde hazır olarak bulunan reaktiflerden prospektüsdeki sulandırma oranına göre çalışma reaktifi hazırlanır.

Reaktifler, 2- 8 °C’de saklanır. Reaktifler, 2- 8 °C’de saklandığında son kullanma tarihine kadar kullanılır.

Reaktif parametreleri performans parametrelerini karşılamıyorsa ve reaktif bulanıksa kullanılmaz.

Hemoliz olmamış serum kullanılır. Ayrılan serumların hemen analizi çalışılmalıdır. Sitrat, EDTA gibi antikoagülanlar amilaz aktivitesi için gereken kalsiyumu bağlar. Bu sebeple antikoagulan kullanılmamalıdır. Serum içindeki amilaz; oda ısısında 16-20 C’de bir hafta, 2-8 °C’de buzdolabında 2 ay dayanıklıdır.

➤ **Tekniği**

- Analiz için yeterli miktarda venöz kan alınır ve hemolizsiz serum elde edilir.
- Amilaz analizinde kullanılacak reaktifler hazırlanır. Çalışılacak test sayısına göre amilaz çalışma reaktifinin prospektüsündeki hazırlama bilgisi doğrultusunda hazırlanır.
- Numune ve kör tüpleri spora numaralandırılarak yerleştirilir.

	Numune	Kör
Çalışma reaktifi	1000 µl 37 °C de en az 5 dakika bekletilir	-
Serum	25 µl Serum ilave edildikten sonra 60 saniye beklenir	-
Distile Su	-	1000 µl

Tablo 6.1: Amilaz analiz çalışma tekniği

- Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda distile su ile sıfırlanarak numune absorbansı dakika arası ölçüm yapılır. Dakika arası (kinetik) ölçümünde ilk okunan karışımın $\Delta A1$ absorbans değeri ölçülür. Bir dakika arayla $\Delta A2$, $\Delta A3$, $\Delta A4$ 3 okuma gerçekleştirilerek absorbansı ölçülür. Okunan değerler test formülüne yerleştirilerek hesaplanır.
- Amilaz (U/L) = $\Delta Abs / dak \times F$

F(Faktör) = 3178 yerleştiriniz.

Örnek:

$$\Delta A1 = 0.376$$

$$A 2 = 0.354$$

$$A3 = 0.342$$

$$A4 = 0.329$$

$$\Delta A1 = 0.376 - 0.354 = 0.022$$

$$\Delta A2 = 0.354 - 0.342 = 0.012$$

$$\Delta A3 = 0.342 - 0.329 = 0.013$$

$$\Delta A / dakika = 0.022 + 0.012 + 0.013 = 0.047$$

$$\Delta A / dakika = 0.047 / 3 = 0.015$$

$$\Delta A / dakika = 0.015 \times 3178 = \Delta A / dakika = 47 U / L$$

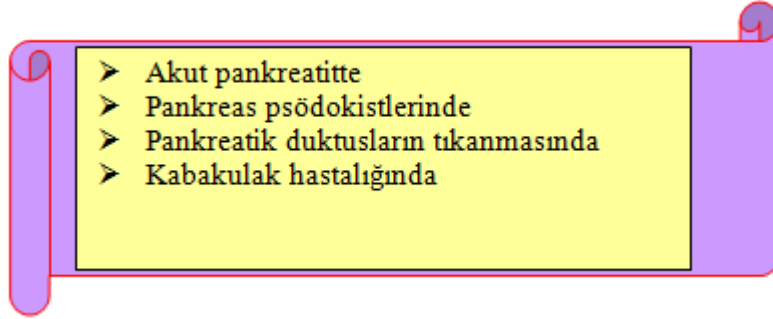
Amilaz normal değeri: 25 – 125 U / L .

Bu değerler yaş, cinsiyet, diyet, coęrafik yer gibi faktörlerden etkilenebilir.

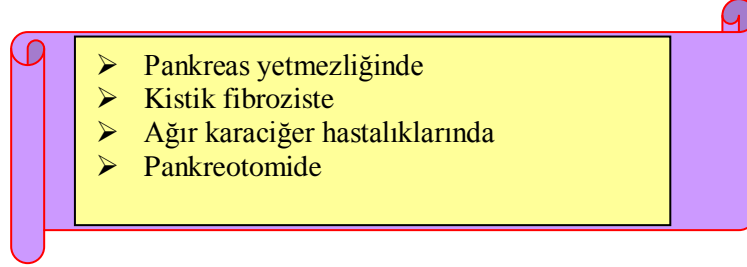
- Çıkan sonuçlar kontrol edilerek normal ve anormal çıkan değerler belirlenir. Anormal çıkan analizler tekrar çalışılarak sonuçları aynı çıkmışsa raporlandırılır.
- Raporlar uzmana imzalatılır. İmzalanan raporların bilgisayar ve laboratuvar defterine kaydı yapılır.

6.4. Amilaz Enziminin Arttığı ve Azaldığı Durumlar

6.4.1. Amilaz Enziminin Arttığı Durumlar



6.4.1. Amilaz Enziminin Azaldığı Durumlar



UYGULAMA FAALİYETİ

Amilaz analizini tekniğine uygun olarak yapınız.

İşlem Basamakları	Öneriler
➤ Kişisel güvenlik önlemleri alınız.	➤ Çalışma önlüğü ve eldiven giyiniz.
➤ Analiz öncesi araç, gereç ve cihazları hazırlayınız.	➤ Cihazların günlük bakımını yapmayı unutmayınız. ➤ Günlük bakımı yapılan cihazlarla güvenli ve doğru sonuç elde edeceğinizi unutmayınız.
➤ Kanı santrifüj ederek hemolizsiz serum elde ediniz.	➤ Santrifüjde denge unsuruna dikkat ediniz. ➤ Serumun hemolizsiz olduğundan emin olunuz.
➤ Reaktifleri hazırlayınız.	➤ Çalışılacak test sayısına göre reaktif hazırlayınız. ➤ Reaktiflerin son kullanım tarihlerini kontrol ediniz.
➤ Spora numune ve kör tüplerini numaralandırarak yerleştiriniz.	➤ Tüplerin numaralandırılmasının analizin hata payındaki rolüne dikkat ediniz.
➤ Kör tüpüne 1ml distile su koyunuz.	➤ 1000' µl'lik otomatik pipet seçiniz.
➤ Numune tüpüne 1000'µl amilaz reaktifi koyunuz.	➤ 1000 ' µl'lik otomatik pipet seçiniz. ➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Numune tüpünü 37°C de 5 dakika benmaride bekletiniz.	
➤ Benmaride bekleyen numune tüpüne 25 µl serum koyunuz.	➤ Otomatik pipet taksimatını kontrol ediniz.
➤ Bir dakika bekleyiniz.	

<ul style="list-style-type: none"> ➤ Hazırlanan karışımlar bekletilmeden spektrofotometrede 405 nm dalga boyunda distile su ile (0) sıfırlanarak kinetik ölçüm tekniğiyle numune absorbanlarını okuyunuz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Spektrofotometre tüpünün dışını okuma bölümüne yerleştirmeden önce her seferinde gazlı bezle siliniz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bir dakika sonra okumaya $\Delta A1$ absorbanı okuyarak birer dakika arayla üç okuma gerçekleştiriniz. 	
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ölçüm değerlerini $\Delta Abs / dakika \times F = U/L$ formülüne göre yerleştiriniz ve hesaplamasını yapınız. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Ölçüm değerlerini dikkatli not ediniz.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Çıkan sonuçları kontrol ederek normal ve anormal çıkan değerleri belirleyiniz. 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Anormal çıkan sonuçları tekrar çalışınız.
<ul style="list-style-type: none"> ➤ Raporları uzmana imzalatınız. 	

ÖLÇME VE DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Amilaz enzimi ve den sentezlenir.
2. Normal kişilerde bulunan serum amilazının başlıca kaynağıdir
3. Artmış serum amilaz aktivitesinin başlıca kaynağı dir.
4. Akut pankreatit tanısındaanalizi spesifiktir.
5. Lipaz, hidrolizleyen enzimdir.

DEĞERLENDİRME

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

MODÜL DEĞERLENDİRME

Aşağıdaki cümleleri dikkatlice okuyarak boş bırakılan yerlere doğru sözcüğü yazınız.

1. Eritrositlerin karaciğer ve dalakta bulunan retikulo endotelyal sistem (RES) hücreleri tarafından yıkılması sonucu hemoglobin,ve 'e ayrılır.
2. İndirekt bilirubin karaciğerde glukoronik transferaz enzim aracılığı ile glukoronik asitle birleşmesi sonucu 'e dönüşür.
3. Serbest bilirubin bağırsak floraları tarafından ürobilinojenler dediğimiz bir grup renksiz, ve 'e dönüştürülür.
4. Yeni doğanda indirekt hiperbilirubinemi sonucu, sarılık görülür.
5. Proteinlerle birlikte organik ya da inorganik kısımlarına sahip olan enzimlere.....denir.
6. Bir enzimin biyolojik katalizör olarak aktif olabilmesi içinve ko kısmı ile birlikte olması gerekir.
7. Bir enzimin en iyi şekilde çalışabileceği sıcaklıklara..... denir.
8. AST enzimi; kalp enfarktüsündensaat sonra serumda artmaya başlar. saatte en yüksek miktara çıkar. Enfarktüsün.....günü sonunda normal seviyesine düşer.
9. Son zamanlarda akut myokard enfarktüsünde spesifik protein yapılı bir enzim olan....., üç farklı yapı ve fonksiyona sahip olan enzim 3 (subünitten) yani alt gruptan oluşmaktadır.

Aşağıdaki soruları dikkatlice okuyarak doğru seçeneği işaretleyiniz.

10. Aşağıdakilerden hangisi, sekrasyon enzimidir?
A) LDH
B) CK
C) Protrombin
D) Amilaz
E) GGT

11. Elektroforezde anoda en hızlı göç eden LDH izoenzimi aşağıdakilerden hangisidir?
A) LDH 2
B) LDH 3
C) LDH 4
D) LDH 1
E) LDH 5
12. Aşağıdaki hastalıklardan hangisinde alkalen fosfataz enzimi artar?
A) Hipofosfatazemi
B) Osteomalazi
C) Ağır anemiler
D) Hipotiroidizm
E) Kanamalarda

DEĞERLENDİRME

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

CEVAP ANAHTARLARI

ÖĞRENME FAALİYETİ 1'İN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	E
3	D
4	C
5	B

ÖĞRENME FAALİYETİ 2'NİN CEVAP ANAHTARI

1	D
2	C
3	D
4	A
5	haloenzim
6	kinetik
7	sekrasyon enzimi
8	karaciğer

ÖĞRENME FAALİYETİ 3'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	LDH
2	İzoenzim
3	LDH 1
4	2 - 3
5	E
6	B

ÖĞRENME FAALİYETİ 4'ÜN CEVAP ANAHTARI

1	Kreatin kinaz (CK)
2	CK 1 (CK – BB)
3	Çizgili kas , kalp ve beyin
4	CK
5	CK 3 (CK -MM)

ÖĞRENME FAALİYETİ 5'İN CEVAP ANAHTARI

1	Hidroliz
2	Kemik
3	Prostat
4	Artar
5	Azalıır

ÖĞRENME FAALİYETİ 6'NIN CEVAP ANAHTARI

1	Pankreas ve tükrük bezlerinde
2	Tükrük bezi
3	Pankreas salgı bezi
4	İdrar amilaz
5	trigliseritleri

MODÜL DEĞERLENDİRME CEVAP ANAHTARI

1	hem ve globulin
2	direkt-konjuge, bilirubin
3	ürobilinojen,sterkobilinojen,mezobilinojen
4	fizyolojik
5	birleşik enzim
6	apo enzim
7	optimum sıcaklık
8	12, 48, 5.
9	troponin -t
10	C
11	D
12	B

ÖNERİLEN KAYNAKLAR

- DEMİR Muammer, **Klinik Biyokimya**, XII sınıf Çare Tek Bilim Eğitim LTD. ŞTİ. Ankara, 2001.
- MEHMETOĞLU İdris, **Klinik Biyokimya**, XI Türk Sağlık Eğitim Vakfı Ankara, 2002.

KAYNAKÇA

- AY AKÇA Fatma, **Temel Hemşirelik Kavramlar İlkeler Uygulamalar**, 2. Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul, 2008.
- BİLGEL Nazan, **Aile Hekimliği**, Medikal Tıp Kitabevi, Bursa, 2005.
- DEMİR Muammer, **Klinik Biyokimya**, XII sınıf Çare Tek Bilim Eğitim LTD. ŞTİ. Ankara, 2001.
- DİLEK Osman Nuri, **Afyon Kocatepe Üniversitesi İlk Yardım Ders Kitabı**, 47 yayın, Afyonkarahisar, 2003.
- IŞIK Erdal, **Birinci Basamak Sağlık Hizmetlerinde Ruhsal Hastalıklar**, Güneş Kitabevi Yayınları, Ankara, 2001.
- KUT Altuğ, İbrahim TOKALAK, M. Gökhan EMİNSOY, **Aile Hekimliği Tanı Ve Tedavi**, Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara, 2007.
- MEHMETOĞLU İdris, **Klinik Biyokimya**, XI Türk Sağlık Eğitim Vakfı Ankara, 2002.
- SOMYÜREK H. İbrahim, **İlk Yardım Ders Kitabı**, Palme Yayıncılık, Ankara, 1989.
- ŞELİMEN Deniz (Editör), Sema KUĞUOĞLU, Fatma ETİ ASLAN, Nermin OLGUN, **Acil Bakım**, 3. Baskı, Yüce Yayın, İstanbul, 2004.