

TOTAL LİPİT ve KOLESTEROL MİKTAR TAYİNLERİ

Lipitler; benzen, aseton, eter, kloroform gibi organik çözücülerde çözünebilen, ancak suda çözülemeyen heterojen yapıya biyomoleküllerdir. Organizmanın önemli yapı maddelerinden biri olan lipitler C, H ve O atomlarından oluşmuşlardır. Bazı lipitlerde P, N ve S atomları da bulunmaktadır.

Lipitlerin biyolojik önemi:

- (1) Enerji eldesinde kullanılırlar.
- (2) Yağda çözünen vitaminlerin (A,D,E,K) barsaklarda emilmesini kolaylaştırırlar.
- (3) Hücre zarının yapısına katılırlar.
- (4) Isı kaybını önlerler.
- (5) İç organları çevreleyerek, onları basınç ve darbe gibi dış etkenlerden korurlar.

1. Lipoproteinler

Lipitler kısmen polar olan fosfolipitler hariç, hidrofobik karakterli bileşikler olduğundan, sulu fazda (kan plazması) çözünebilmeleri, proteinlerle birleşerek hidrofilik lipoprotein komplekslerini oluşturmaları ile sağlanmıştır. Lipoproteinler, fosfolipitler, kolesterol, kolesterol esterleri ve trigliseritlerin çeşitli kombinasyonları ile apoproteinler (apolipoproteinler) olarak adlandırılan spesifik taşıyıcı protein moleküllerinin bir araya gelmesinden oluşmaktadır.

Lipoproteinler küresel şekillidirler. Merkezde nötral lipitler olarak bilinen trigliseritlerin ve kolesterol esterlerinin hidrofobik lifleri, dış yüzde ise proteinlerin, fosfolipitlerin ve kolesterolün hidrofilik kısımları yer alır. Bu yapıdaki bileşenler çok sık ve hızlı değiştiği için lipoproteinlerin yapısı statik olmaktan çok dinamiktir. Lipoprotein molekülünün çekirdeğinde bulunan lipitler apoproteine hidrojen bağları ve van der Waals bağları gibi kovalent olmayan bağlarla bağlanırlar. Bu sayede serum ve doku lipoproteinleri arasında lipit alışverişi mümkün olmaktadır (www.istanbulsaglik.gov.tr).

Lipitler proteinlerden daha hafiftirler. Bu sebeple lipoproteinlerde lipit/protein oranı artarsa yoğunluk azalmaktadır. Lipoproteinler yoğunluk farklarına göre şilomikronlar (ŞM), çok düşük yoğunluklu lipoproteinler (VLDL), orta yoğunluklu lipoproteinler (IDL), düşük yoğunluklu lipoproteinler (LDL) ve yüksek yoğunluklu lipoproteinler (HDL) olmak üzere 5 sınıf altında

incelenmektedir. Her biri yapısındaki lipit/protein bileşimleri ve büyüklükleri açısından farklılık göstermektedir.

2. Kolesterol

Kolesterol, hayvanların vücut dokularındaki hücre zarlarında bulunan ve kan plazmasında taşınan bir sterol, yani bir steroid ve alkol birleşimidir. Beyin, sinirler, kalp, barsaklar, kaslar, karaciğer başta olmak üzere tüm vücutta yaygın olarak bulunur.

Kolesterolün işlevleri;

- (1) Hücre zarlarının yapımı ve bakımı için gereklidir. Kolesterol içeren hücre zarları daha geniş sıcaklık aralığında akışkanlıklarını korurlar.
- (2) D vitamini ve yağların sindirimine yarayan safra asitleri sentezinde kullanılır.
- (3) Yağda çözünen vitaminlerin (A,D, E ve K vitaminleri gibi) metabolizmasında görev alır.
- (4) Aldosteron, testosteron, östrojen ve progesteron gibi steroid hormonlarının ve kortizolün sentezlerinde yer alır.
- (5) Hücre sinyal iletiminde görev alır.

3. Deneysel Çalışmalar

Deney 1. Modifiye Fosfovanilin Metodu İle Kanda Total Lipit Tayini

Deneyin prensibi: Serumun derişik sülfürik asit ile ısıtılıp, üzerine fosfovanilin çözeltisi ilave edilmesi sonucu serum lipitlerinin miktarı ile orantılı olarak gül kırmızısı rengi oluşturması esasına dayanmaktadır.

Deneyin yapılışı:

- (1) Üç tane deney tüpü alınır ve aşağıdaki tabloya göre ilaveler yapılır.

Çözeltiler (µL)	Kör	Standart	Örnek
Distile su	20	-	-
Std. Kolesterol	-	20	-
Serum	-	-	20
dH ₂ SO ₄	200	200	200

Ağız kapatılan tüpler kaynar su banyosunda 10 dk bekletilir.			
Tüpler 5 dk akar su altında soğutulur.			
Fosfovanilin (mL)	10	10	10
Tüpler 37°C su banyosunda 15 dk bekletilir.			
540 nm'de absorbans değerleri ölçülür.			

(2) Elde edilen sonuçların aşağıdaki formülde yerine yazılması ile serumda bulunan % mg total miktarı hesaplanır.

$$\% \text{ mg total lipit} = (\text{Örnek OD} / \text{Standart OD}) \times 800$$

Çözeltiler

Vanilin çözeltisi: 0.6 g vanilin 100 mL distile suda su banyosunda ısıtılması ile hazırlanır.

Fosfovanilin çözeltisi: 25 mL vanilin çözeltisi, 5 mL distile su ve 60 mL ortofosforik asitin karıştırılması ile hazırlanır.

Standart kolesterol: 0.08 g kolesterol 10 mL etil alkolde su banyosunda hafifçe ısıtılarak çözülür.

Deney 2. Lipit Ekstraksiyonu ve Kolesterol Tayini

Deneyin prensibi: Yumurta sarısı, süt, tereyağı ve cevizden ekstrakte edilen lipitlerdeki kolesterol miktarının Liebermann yöntemi ile belirlenmesidir.

Deneyin yapılışı:

I. aşama:

a) Yumurta sarısı, süt ve tereyağından lipit ekstraksiyonu

- (1) Üç tane deney tüpü alınır ve her birine ilgili örneklerden 0.8 g ilave edilir.
- (2) 8 mL kloroform/ metanol (2:1) (v/v) karışımı eklenir ve vorteks ile kuvvetle karıştırılırlar.
- (3) 15 dakika 4000 rpm'de santrifüjlenir.
- (4) Sıvı kısımların her biri yeni deney tüplerine alınır.
- (5) Deney tüpündeki kloroform/ metanol ekstraktına çözelti hacminin yaklaşık 1/5'i kadar %0.02'lik CaCl_2 çözeltisi ilave edilir.

(6) Tüp vortekslenir ve fazların ayrılması için beklendikten sonra üst faz pastör pipeti yardımıyla dikkatle uzaklaştırılır.

(7) Alt faza çözelti ile aynı hacimde kloroform/ metanol/ su (2:50:50) eklenir.

(8) Tüpler vortekslenir ve fazların ayrılması için beklendikten sonra üst faz pastör pipeti yardımıyla dikkatle uzaklaştırılır.

(9) Alt fazın hacmi tayin edilir ve deneyin ikinci aşamasına geçilir.

b) Cevizden lipit ekstraksiyonu

(1) 0.8 g ceviz küçük küçük doğranıp 4 mL kloroform / metanol (2:1) (v/v) karışımı içeren havana konular ve iyi bir şekilde öğütme işlemi yapılır.

(2) Havanın içeriği bir test tüpüne aktarılır. Havadaki kalıntılar 4 mL daha kloroform / metanol (2:1) (v/v) karışımı ile alınıp, deney tüpüne aktarılır.

(3) Tüpün ağzı kapatılır ve 50°C sıcaklıktaki su banyosunda 10 dk beklenir.

(3) 15 dakika 4000 rpm'de santrifüjlenir.

(4) Sıvı kısım yeni deney tüpüne alınır.

(5) Deney tüpündeki çözeltiye hacminin 1/5'i kadar %0,02'lik CaCl₂ çözeltisi ilave edilir.

(6) Tüp vortekslenir ve fazların ayrılması için beklendikten sonra üst faz pastör pipeti yardımıyla dikkatle uzaklaştırılır.

(7) Alt faza çözelti ile aynı hacimde kloroform/ metanol/ su (2:50:50) eklenir.

(8) Tüp vortekslenir ve fazların ayrılması için beklendikten sonra üst faz pastör pipeti yardımıyla dikkatle uzaklaştırılır.

(9) Alt fazın hacmi tayin edilir ve deneyin ikinci aşamasına geçilir.

II. aşama: I.aşamada elde edilen örnek çözeltilerindeki kolesterol miktarını belirlemek için aşağıdaki tabloya göre ilaveler yapıldıktan sonra 550 nm'de absorbans ölçümü yapılır.

Çözeltiler (mL)	1	2	3	4	5
Kloroform/metanol (2/1)	0.5	-	-	-	-

2.5 mM Kolesterol standardı	-	0.5	-	-	-
5 mM Kolesterol standardı	-	-	0.5	-	-
10 mM Kolesterol standardı	-	-	-	0.5	-
Örnek	-	-	-	-	0.5
Liebermann reaktifi	5	5	5	5	5
Tüplerin ağzı kapatılır ve 35°C sıcaklıktaki etüvde 10 dk bekletilir. 550 nm'de absorbans ölçülür.					

Çözeltiler

Liebermann reaktifi: Buz banyosu içindeki bir beherdeki 60 mL asetik anhidrit üzerine sürekli karıştırılarak yavaş yavaş 10 mL derişik sülfürik asit ilave edilir. Daha sonra 30 mL asetik asit ve 0.6 g susuz sodyum sülfat eklenir. Reaktif 1-2 hafta saklanabilir.

%0.02 CaCl₂ : 0.02 g CaCl₂ / 100 mL su

10 mM kolesterol standardı: 0.191 g kolesterol 50 mL kloroform / metanol (1:1)

5 mM kolesterol standardı: 10 mM kolesterol standardından 10 mL alınır üzerine 10 mL kloroform / metanol (1:1) ilave edilir.

2.5 mM kolesterol standardı: 5 mM kolesterol standardından 10 mL alınır üzerine 10 mL kloroform / metanol (1:1) ilave edilir.

KAYNAKLAR

- (1) www.mustafaaltinisik.org.uk
- (2) www.firat.edu.tr
- (3) www.saglikpark.com
- (4) www.patienthealth.com
- (5) <http://chienlab.wikispaces.com>
- (6) Prof. Dr. Fahrünnisa Pamuk, Biyokimya Kitabı
- (7) Marmara Üniversitesi Biyokimya II Laboratuar Föyü