

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

İDRARDA N-ASETİL-β-D-GLUKOZAMİNİDAZ ENZİMİNİN ÖLÇÜMÜ VE KLİNİK UYGULAMASI

UZMANLIK TEZİ

**Ömer KAYA
Hv.Tbp.Kd.Ütğm.**

ANKARA-2004

ÖNSÖZ

Bu tez konusu, Gülhane Askeri Tıp Akademisi ve Askeri Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 29 ARALIK 2003 gün ve 0530-80-03/796 sayılı yazısı ile verilmiştir.

Bu çalışmada , idrarda N-asetil beta glukoaminidaz enziminin ölçümü ve klinik uygulamaları araştırılmıştır.

Değerli hocalarım, bölüm başkanımız Prof. Dr. Ecz. Kd. Alb. M. Kemal ERBİL'e ve Prof. Dr. Dz. Ecz. Kd. Alb. Türker KUTLUAY'a, uzmanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük katkıları bulunan, ayrıca tez danışmanlığımı yaparak benden yardımlarını hiç eksik etmeyen, beni yönlendiren ve destek olan değerli hocam Prof. Ecz. Kd. Alb. İsmail KURT'a ve diğer hocalarım, Doç. Ecz. Kd. Alb. Şerif AKMAN'a ve Doç. Dz. Tbp. Kd. Bnb. Muhittin A. SERDAR'a minnet ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Tbp. Y b. Adnan HAŞİMLİ'ye, Yrd. Doç. Tbp. Kd. Bnb. Taner ÖZGÜRTAŞ'a, Yrd. Doç. Tbp. Bnb. Abdullah OLGUN'a, Yrd. Doç. Dz. Tbp. Kd. Yzb. Halil YAMAN'a, Uzm. Tbp. Yzb. Nurbahar YILMAZ'a, Uzm. Tbp. Yzb. Şuayp TEZCAN'a, Uzm. Tbp. Yzb. Gürkan METİNYURT'a, Uzm. Dz. Tbp. Yzb. E. Özgür AKGÜL'e, çalışma arkadaşlarım Tbp. Kd. Ütğm. E. Banu AKAY'a, Tbp. Kd. Ütğm. Tuncer ÇAYCI'ya, Tbp. Bnb. Muhammed YUSİFOV'a, Hv. Tbp. Kd. Ütğm. Dilek ABASLI'ya, Tbp. Ütğm. Murat CİHAN'a, Dz. Tbp. Ütğm. Ercan SARUHAN'a, Tbp. Ütğm. Yasemin KURT'a, Uzm. Ecz. Filiz OZAN'a, Uzm. Bio. Ömer GENİŞ'e, Bio. Benen GENİŞ'e, Bio. Selma BARIŞ'a, Laborant Pınar KAYA'ya, uzmanlık eğitimim boyunca göstermiş olduğu sabır, anlayış ve desteklerinden dolayı ev arkadaşım Hv. Tbp. Kd. Ütğm. Mutluay ARSLAN'a ve Biyokimya ve Klinik Biyokimya A.D. Başkanlığında birlikte görev yaptığım tüm bölüm personeline desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Dr. Ömer KAYA
ANKARA-2004

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	
A. N-ASETİL-β-D-GLUKOZAMİNİDAZ ENZİMİNİN YAPISI VE FONKSİYONU	2
B. NEFROTOKSİSİTE	3
C. BÖBREK HASTALIKLARINDA İDRAR N-ASETİL-β-D GLUKOZAMİNİDAZ ÖLÇÜMÜNÜN YERİ	7
D. N-ASETİL-β-D GLUKOZAMİNİDAZ ÖLÇÜM METOTLARI	13
III. GEREÇ VE YÖNTEM	20
IV. BULGULAR	25
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
VI. ÖZET	38
VII. SUMMARY	39
VIII. KAYNAKLAR	40

I- GİRİŞ

Böbrek hastalıklarının tanısında ve takibinde rutin biyokimyasal göstergeler kullanılmaktadır. Bunlar, genellikle glomerüler fonksiyonu ve hasarı değerlendirmeye yönelik parametrelerdir.

Bununla birlikte, böbreklerde geri emilimin ve sekresyonun yapıldığı tubül fonksiyonlarına yönelik rutin biyokimyasal test bulunmamaktadır.

Yaklaşık elli kadar enzim idrarla birlikte fizyolojik olarak atılmaktadır. Bu enzimlerin çoğu tubüler fonksiyonun değerlendirilmesinde kullanılabilmektedir. Ancak, çoğunun dayanıklı olmaması, ölçümlerinin pratikteki kullanımını kısıtlamaktadır. Bununla birlikte, idrardaki N-asetil- β -D-glukozaminidaz enzimi (NAG), tubüler hücre kaynaklıdır ve aktivitesini daha uzun süre korumaktadır.

NAG enziminin, enzimin molekül ağırlığının büyük olması (130 000 dalton) nedeniyle glomerülden filtre olmadığından, idrardaki seviyesinin yükselmesi tubüllerden aşırı salınmasından kaynaklanmaktadır. Bu da tubüler hasarı ve hasarın derecesini gösterebilmektedir.

Bu çalışmada idrarda NAG enziminin, reaktifleri laboratuvarımızda hazırlanan, spektrofotometrik bir ölçüm metodu irdelenmiş ve rutin klinik laboratuvarında kullanılması için değerlendirmeler yapılmıştır.

II- GENEL BİLGİLER

II.A. N-ASETİL-β-D GLUKOZAMİNİDAZ ENZİMİNİN YAPISI VE FONKSİYONU

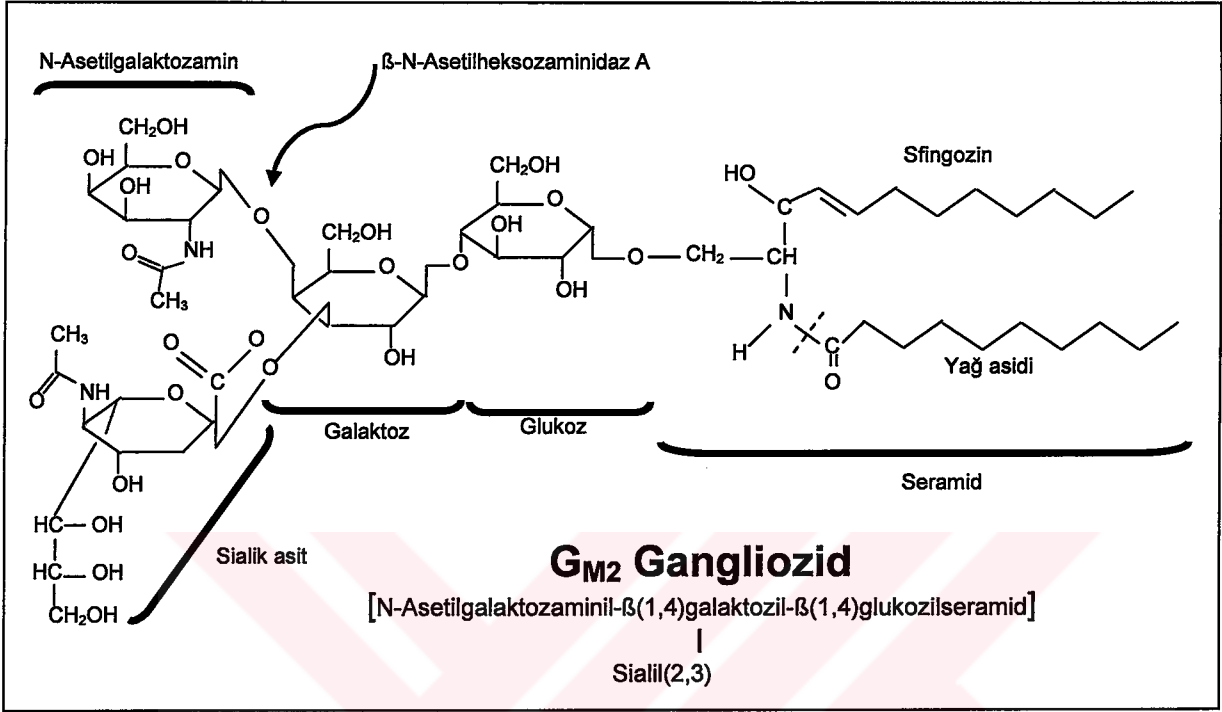
N-Asetil-β-D-glukozaminidaz (Beta-N-asetilheksozaminidaz; β-NAG; NAG; 2-acetamidodeoxy-β-glucoside a cetamidodeoxyglucohydrolase; EC 3.2.1.52) yaklaşık 40 kadar olan lizozomal hidrolitik enzimden birisidir (Tablo-1). NAG normalde dokularda, net yükleri ve ısıya dayanıklılıklarına göre farklılık gösteren, A ve B olmak üzere iki ana formda bulunur. A izoenziminin izoelektrik noktası (pI) 5.4 iken B izoenzimininki 7.9'dur. Bu özellik, izoenzimlerin iyon değiştirici kromatografi ve elektroforezde farklı noktalara göç etmelerine neden olur. Bu iki izoenzim, subünit yapılarına göre farklılık gösterirler. A formu birer adet α ve β subünitlerinden oluşurken B formu iki β subünitinden oluşur. Bu subünitler farklı genler tarafından kodlanırlar. Ana izoenzimler, substrat özgüllüğüne göre de farklılık gösterirler; A formu (β-NAG-A, hex A) gangliozit GM₂'deki galaktoz ve N-asetil galaktozamin arasındaki β(1-4)-glikozit bağıı hidrolize etmektedir. (Şekil-1) (1,2,3,4).

Asıl adı	Beta-N-asetilheksozaminidaz
Alternatif isimler	Beta-heksozaminidaz, Heksozaminidaz, N-asetil-beta-glukozaminidaz
Katalizlediği reaksiyon	N-asetil-beta-D-heksozaminde indirgen olmayan uçtaki N-asetil-D-heksozamin kalıntılarının hidrolizi
Diğer bilgiler	N-asetil-glukozidler ve N-asetil-galaktozidler üzerine etki eder, EC numarası 3.2.1.52, eski EC numaraları 3.2.1.29 ve 3.2.1.30, Molekül ağırlığı 130 000 daltondur, Sandhoff hastalığı (GM2 gangliozidozis, varyant 0) ve Tay-Sachs hastalığında (erişkin tip GM2 gangliozidozis) eksikliği söz konusudur.

Tablo 1. N-asetil-β-D-glukozaminidaz ile ilgili bazı bilgiler (2,4)

Bu izoenzimlere asıl klinik ilgi otozomal resesif geçişli lizozomal depo hastalıklarının tespitinde kullanılmaları ile olmuştur. Tay-Sachs hastalığında α subüniti kodlayan gende defekt söz konusu olup A izoenzimi yoktur. Enzimin yokluğu GM₂ gangliozidin nöronlarda birikmesiyle ve buna bağlı klinik tabloyla sonuçlanır. Sandhoff hastalığında ise β subünitini kodlayan gende defekt vardır ve bunun sonucunda hem A hem de B (β-NAG-B) yoktur. Serum A ve B izoenzim aktiviteleri, A formunun ısıya duyarlı olmasından dolayı, kolayca ayrılarak saptanabilmektedir.

Serumda bulunan A formu böbrek ve dalakta bulunan A formundan farklıdır ve A^s olarak isimlendirilir. Çok az bulunan diğer bazı formlar C ve S ile gebelerde bulunan P formudur. Gebelerde idrarla atılan NAG'ın artmasına rağmen P formu idrarla atılmamaktadır(1,2,3,5).



Şekil-1. G_{M2} gangliozidin yapısı. Terminal monosakkaritleri N-asetilgalaktozamin ve sialik asittir. Her iki monosakkarit galaktoza, o da glukozla seramide bağlıdır. Seramid sfingozin ve amid bağlı yağ asidinden oluşur. (3)

II.B. NEFROTOKSİSİTE

Böbrek birçok hücre tipi içerir. Bu hücrelerin öncelikli fonksiyonları glomerüler filtrasyon, tubüler absorpsiyon ve sekresyon ile metabolitlerin konsantre edilmesidir. Böbrek karmaşık bir yapıya sahip olmasına rağmen, hastalık ve toksik hasara hücresel seviyede sınırlı sayıda yolla cevap verebilir(1,2).

Nefrotoksinler çevremizde oldukça yaygın bulunmaktadır ve bunların da çoğu belli bazı mesleklerle ilişkilidir. Kadmiyum ve kurşun gibi çeşitli ağır metallerin sıklıkla, proksimal tubüler disfonksiyona ve glomerüler hasara neden olmak suretiyle böbrek hastalığıyla ilişkili olduğu eskiden beri bilinmektedir (6).

Tablo 2’de nefropatiyle ilişkisi olan bazı ilaçlar ve çevresel toksinlerle bunların etkileri verilmiştir. Tablo 3’de de akut ve kronik böbrek yetmezliğiyle ilişkisi olan ve sık kullanılan ilaçlar ile klinik bulguları verilmiştir.

İster glomerüler nefrit isterse tubülointerstisyel hasar olsun, her ikisi de bu toksinlerle oluşur ve glomerüler filtrasyon hızının ve hem glomerüler hem de tubüler proteinürinin tespitini gerektirirler. Hasar göstergeleri (*markerlar*) (α_1 -mikroglobülin, retinol bağlayıcı protein, β_2 -mikroglobülin gibi düşük molekül ağırlıklı proteinler) yaygın olarak bu toksinlere maruziyetin yasal sınırlarını koymak için kullanılmaktadır. Tubüler proteinüri göstergelerinin ortaya konmuş tek klinik kullanımı ilaçların yol açtığı hasardır (7).

Etken	Toksik etki
İlaçlar	
ACE inhibitörleri	Bilateral renal arter stenozlu hastalarda GFR'de şiddetli düşüş. Yüksek doz kaptopril proteinüriye neden olabilir.
Nonsteroid antiinflatuar ilaçlar	Dolaşım yetmezliği (kalp yetmezliği gibi) olanlarda GFR'de şiddetli düşüş. Hipovolemi ayrıca akut ve kronik interstisyel nefrite neden olabilir.
Antıromatizmal ilaçlar (Altın tuzları, cıvalı bileşikler, D-penisilamin)	Nefrotik sendromla birlikte membranöz tip görünüm (mekanizma bilinmiyor)
Antikanser ilaçlar	
Mitomisin	Hemolitik-üremik sendrom
Sisplatin	Akut tubüler nekroz (ATN)
Metotreksat	Lümen içi presipitasyon ve ATN
Antibiyotikler, antifungaller	
Aminoglikozitler	ATN ve interstisyel nefrit
Sefalosporinler, penisilin-G, ampisilin, amoksisilin, amfoterisin-B	İnterstisyel nefrit
Lityum	Nefrojenik dizbetes insipidusla beraber distal tubüler hasar
Allopurinol	İnterstisyel nefrit
Çevresel toksinler	
Ağır metaller	
Cıva	Glomerülo nefrit
Kadmiyum	Kronik İnterstisyel nefrit
Kurşun	Hipertansiyon ve tubülointerstisyel nefrit
Krom	Artmış tubüler proteinler ve enzimüri
Vanadyum	Artmış tubüler proteinler ve enzimüri
Nikel	Artmış tubüler proteinler ve enzimüri
Solventler: Kuru temizleme, boyalar	Glomerülo nefrit

Tablo 2. Nefropati gelişimiyle ilişkisi olan ilaçlar ve çevresel toksinler (7). ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim; GFR: Glomerüler filtrasyon hızı; ATN: Akut tubüler nekroz

Patofizyoloji	İlaç	Önemli Klinik Bulgular
Akut Böbrek Yetmezliği		
Azalmış renal perfüzyona ikincil prerenal yetmezlik	Diüretikler, NSAİİ, ACE inhibitörleri, siklosporin, radyokontrast ajanlar, interlökin-2, takrolimus	FENA <%1, İosm >500, idrar sedimenti normal görünümü
Renal hasar		
Direkt toksik etkiye bağlı akut tübülüler hasar	Aminoglikozitler, radyokontrast, sisplatin, metoksisfluran, tetrasiklin, amfoterisin-B, sefaloridin, streptozosin, takrolimus, karbamezepin, mitramisin, kinolonlar, foskarnet, pentamidine, intravenöz gammaglobulin, ifosfamid,	FENA >%2, İosm <350, idrar sedimentinde granüller silindirler ve tübülüler epitel hücreleri
-Rabdomiyolizle -Ciddi hemolizle	Lovastatin, etanol, kodein, barbitüratlar, diazepam, kinin, kinidin, sülfonamidler, hidralazin, triamteran, nitrofurantoin, mafenitoin	Artmış CPK düzeyi, idrar sedimenti ATN ile uyumlu
İnterstisyumun immün aracı inflamasyonuna bağlı akut interstisyel nefrit	Penisilinler, rifampisin, sülfonamidler, tiazid, simetidin, fenitoin, allopurinol, sefalosporinler, c-arabinozid, furosemid, interferon, NSAİİ, siprofloksasin	Ateş, döküntü, eozinofili, idrar sedimentinde püürü, lökosit kümeleri, eozinofili, NSAİİ ile nefrotik düzeyde proteinüri
Hemolitik Üremik Sendrom olarak ortaya çıkan vasküler endotelial hasar	Siklosporin, mitomisin C, kokain, takrolimus, konjuge östrojenler, kinin, 5-fluorurasil	Ateş, mikroanjiyopatik hemolitik anemi, trombositopeni
İmmün aracı hasara bağlı glomerülopati	Altın, penisilamin, kaptopril, NSAİİ, civa	Ödem, orta veya ciddi düzeyde proteinüri, idrar sedimentinde bazı durumlarda eritrositler ve eritrosit kümeleri
Postrenal		
İlaçların birikmesine bağlı intratübüler obstrüksiyon	Asiklovir, metotreksat, sülfonamidler	İdrar sedimenti normal olabilir veya ATN benzeri sediment görülebilir.
Retropéritoneal fibrozise bağlı üreteral obstrüksiyon	Metiserjid, hidralazin, metildopa, pindolol, atenolol, ergotamin, dihidroergotamin	Genellikle normal idrar paterni, ultrason hidronefrozu ortaya koyar.
Kronik Böbrek Yetmezliği		
Papiller nekroz ile veya olmaksızın kronik interstisyel fibrozis	Fenasetin, NSAİİ, asetaminofen, aspirin, siklosporin, takrolimus, lityum	Uzun süreli ilaç kullanımı hikayesi

Tablo 3. Akut ve kronik böbrek yetmezliğiyle ilişkisi olan sık kullanılan ilaçlar (8)

NSAİİ: Nonsteroid antiinflamatuar ilaçlar; ACE: Anjiyotensin dönüştürücü enzim; FENA: Fraksiyone sodyum ekskresyonu; İosm: İdrar osmolalitesi; CPK: Kreatin fosfokinaz; ATN: Akut tübülüler nekroz

Nefrotoksisite, günümüzde, bir çok ilaç kullanımıyla birlikte görülmektedir. İstirahat halindeki kardiyak debinin %25'inin böbreğe gittiği hesaba katıldığında, bu hiç de sürpriz değildir. Birçok enzimi ve transtubüler hücre transport sürecini içeren yüksek metabolik hız sayesinde, böbrekteki glomerüler, tubüler ve interstisyel hücreler ilaçlarla ve metabolitleriyle beklenenden daha fazla temas edecektir. Nefropati sıklıkla, ancak filtrasyon etkilendiğinde serum üre ve kreatininin artışıyla tanınmaktadır. Yapılan bir araştırmada, akut böbrek yetmezliği (ABY) vakalarının %18.3'ü 'ilaçla ilişkili' olarak tanımlanmıştır. İlaçlar ABY'ne, aralarında azalmış renal perfüzyon, vasküler veya direkt tubüler hasar, alerjik interstisyel inflamasyon ve glomerüler bazal membran hasarının (GBM) bulunduğu çeşitli yollarla neden olabilirler (8).

İlaçlar, ayrıca, kronik interstisyel hasar ve papiller nekroz ile kronik böbrek yetmezliğine (KBY) neden olabilir (8).

İdrar sedimentinde tubüler hücre dejenerasyonu ve silikleşmesi olan, koyu kahverengi görünümde ve anlamlı sayıda düzgün veya granüler silendir ile giden direkt tubüler toksisite akut tubüler nekrozun (ATN) karakteristiğidir. ATN aminoglikozitlerden, radyoiyot kontrast maddelerden, amfoterisin-B'den, cisplatin ve diğerlerinin kullanımından kaynaklanabilir (8).

Gentamisin gibi aminoglikozitler esas olarak renal kortikal tubüler hücrelerin proksimal fırçamsı kenarını etkiler. Toksisite, kümülatif renal kortikal birikimden kaynaklanmaktadır. Çünkü bu katyonik amino grulu organik bazlar, glomerülden serbestçe süzülmemekte ve pinositozla geri emilmektedir, ki bu da normalde 3 saat olan plazma yarılanma ömürlerini burada 100 saatin üzerine çıkarmaktadır. Serum seviyesinin kontrolüne ve hatta ilacın kesilmesine rağmen bu uzamış doku yarı ömründen dolayı nonoligürik bir böbrek yetmezliği oluşabilir. Bu konuda Fanconi sendromu karakteristiktir. Fanconi sendromu, normoglisemi, bikarbonatüri, fosfatüri, aminoasidüri, natriürez, kaliürez ve azalmış amonyum atılımına rağmen tubüler proteinüri ve glikozüriyle seyreder. İdrarla magnezyum atılımıyla giden hipomagnezemi ve nonoligürik ATN'ye katılan antidiüretik hormon (ADH) direnci, aminoglikozitlerin kollektör tubüller üzerine olan etkilerinin sonucudur. Aminoglikozit grubu maddelerin içerdiği katyonik amino grubu sayısı, nefrotoksisiteyle korele görülmektedir (8).

Hastaneye yatırılan hastalarda aminoglikozit kullanımının ana komplikasyonu ABY'dir. Aminoglikozit nefrotoksisitesinin sıklığı, çeşitli çalışmalarda %2-10 arasında

değişmekle birlikte bir çalışmada %32.4 bulunmuştur. Nefrotoksisitenin mekanizması tam olarak açık değildir. Hayvan deneyleri, ilaçların böbrek tubül hücrelerini direkt olarak zedelediğini ve bunun da NAG gibi enzimlerin hasarlı hücrelerden salınmasına neden olduğunu göstermiştir. İdrar NAG atılımı, aminoglikozit tedavisinin başlamasından 24 saat sonra yükselmektedir, ancak sadece iki kattan fazla artışlar klinik nefrotoksisiteyle ilişkilidir (9).

Gentamisin tek başına ve çeşitli β -laktam antibiyotiklerle birlikte uygulamalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, rölatif enzimüriye dayanarak yapılan değerlendirmelerde tikarsilin veya klavulanat ile kombinasyon tedavisinde tek başına gentamisin tedavisine göre daha az nefrotoksisite tespit edilmiştir. Piperasilin kombinasyonunun ise nefrotoksisiteyi değiştirmedeği, seftazidimin ise aminoglikozitlerin uyardığı böbrek hasarını artırdığı gözlenmiştir. Tek başlarına kullanıldıklarında bazı sefalosporinlerin renal tubüler toksisite ve belirgin enzimüriye neden oldukları gösterilmiştir (10).

Düşük doz metotreksat (MTX) tedavisi, romatoid artritte etkin bir ilaç tedavisidir. MTX esas olarak böbreklerden, glomerüler filtrasyon ve tubüler sekresyonla atıldığından, böbrek yetmezlikli hastalarda ilacın atılımı gecikmekte ve MTX toksisitesi artmaktadır(11).

İlaçlardan başka kurşun (Pb), cıva (Hg) ve kadmiyum (Cd) gibi bazı ağır metaller de ciddi renal hasara neden olmaktadır. Transforme insan renal hücre kültürlerinde düşük dozda Cd ile indüklenen hücre ölümü, apoptozise bağlı tipik değişiklikleri göstermekte iken yüksek doz Cd apoptozisi indüklemekte oldukça zayıf etki göstermiştir. İnsan lenfosit kültürlerindeki in vitro deneyimler de düşük doz Cd'un apoptozisle hücre ölümünü uyarırken, yüksek doz Cd'un nekroz gibi muhtemel başka bir mekanizma ile hücre ölümünü uyardığını göstermektedir (6).

Yeni anlayışa göre tubüler interstisyel nefrit, tubüler hücreler üzerindeki erken ve baskın zedelenme ile karakterize renal hastalıkların heterojen bir grubudur. Olguların belirli bir kısmında tubüler interstisyel nefritin ana nedeni ilaçlardır. Diğer nedenler ise virüsler, ağır metaller ve metabolik disfonksiyondur (12).

II.C. BÖBREK HASTALIKLARINDA İDRAR N-ASETİL- β -D GLUKOZAMİNİDAZ ÖLÇÜMÜNÜN YERİ

Sağlıklı insanlarda idrar NAG aktivitesinin kaynağı yenilenen böbrek proksimal tubül hücreleri iken artmış idrar NAG aktivitesi tubüler lezyon olgularında görülmektedir. Proteinüri bir glomerüler hasar göstergesi olarak kullanılırken, idrar

NAG aktivitesi, böbrek tubül fonksiyonu için bir gösterge olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Artmış idrar NAG seviyesi, diabetes mellitus (DM) da dahil olmak üzere birçok hastalıkta tanımlanmıştır (2,13).

İdrar NAG aktivitesini etkileyen bazı durumlar tablo 4'te belirtilmiştir.

Fizyolojik faktörler	Yaş, ağırlık, boy, idrar akım hızı
Çocukluk çağı hastalıkları	Glomerüler proteinüri İnsülin-bağımlı DM Büyüme hormonu tedavisi Demir yüklenmesi (β -talasemi majör) Nefrolitiazis, nefrokalsinozis, hiperkalsiüri Üst idrar yolu enfeksiyonu, reflü nefropati Renal transplantasyon (akut rejeksiyon, siklosporin toksisitesi) Siyanotik konjenital kalp hastalığı
Nefrotoksisite	İlaçlar (antibiyotikler, immünosupresifler, antikanser ilaçlar...) Radyokontrast ajanlar
Diğer	Tek taraflı nefrektomi, tek taraflı renal agenezi İnflamatuvar barsak hastalığı Glukoz-6-fosfataz eksikliği Artmış plazma endotelin-1 seviyesi

Tablo 4. Artmış idrar N-Asetil- β -D glukozaminidaz aktivitesiyle ilişkili durumlar (14)

Böbrek hastalıklarının teşhisi ve böbrek hasarının ortaya konulması amacıyla idrar enzimlerinin ölçümü, klinikte geniş kullanım alanına sahiptir. Alkalen fosfataz (ALP), gama-glutamil transferaz (GGT), lösin aminopeptidaz (LAP), alanin aminopeptidaz (AAP), beta-galaktozidaz (GAL), nötral endopeptidaz (NEP), alfa glukozidaz ve N-Asetil- β -D glukozaminidaz (NAG) bu amaçla kullanılmaktadır (1,2,10,12,15,16,17,18,19,20,21,22).

Böbrekler tarafından idrara birçok enzim salınmasına rağmen, bu enzimlerin birçoğu dayanıklı değildir ve bu nedenle kullanım alanları kısıtlıdır. Bu enzimler arasında yer alan NAG böbrek hastalıklarının ve hasarının ortaya konulması amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. NAG yaklaşık olarak 130 000 dalton molekül ağırlığında olup idrara çıkan dayanıklı bir enzimdir. Özellikle böbrek proksimal tubül hücrelerindeki lizozomlarda yüksek miktarda bulunur. Yüksek molekül ağırlığı nedeniyle glomerülden filtre edilememektedir. Bu yüzden, idrar konsantrasyonunun artması, proksimal tubüler hasarı veya lizozomların

bütünlüğünün kaybolduğunu gösterir. Proksimal tubüllerde bulunan endositoz/ekzositoz transport sistemi normal bireylerde lizozomal enzimlerin çok düşük miktarlarının atılmasına neden olur. Endositoz/ekzositoz transport sistemi birbirine eşit ve zıt yönde meydana gelen enerji bağımlı bir mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir. Bu sistemin çeşitli nedenlerle tahrip olması lizozomal bir enzim olan NAG'ın idrarla fazla miktarda atılmasına neden olur (1,2).

NAG izoenzimlerinin idrar paterninde ilk değişiklik, *Price* ve *ark* tarafından elektroforetik teknikle, cerrahi travmayı takiben B formundaki artışın ortaya konmasıyla gözlenmiştir. Çalışılan hasta grubunda, total NAG aktivitesinde artışla birlikte B formunun kısmi miktarı da artmıştır. A formunun idrarla atılımında artış olmasına rağmen A formunun B formuna oranı, normal grupla karşılaştırıldığında azalmış olarak bulundu. Bir hastada ise serumda bulunan A^s formu idrarda görülmüştür ki bu form normalde böbrekte bulunmadığından glomerüler hasarın oluştuğuna işaret eder. Benzer bir tespit, daha sonra patolojik değişikliklerin glomerüle sınırlı olduğu biyopsiyle gösterilen Goodpasture hastalığı olan bir hastada da yapılmıştır (2).

Tablo 5'te bazı durumlarda ve böbreği ilgilendiren bazı hastalıklarda NAG ve izoenzimlerinin kullanımı verilmiştir.

İdrar dondurularak saklandığında alanin aminopeptidaz aktivitesi kaybolmakta iken NAG aktivitesi stabil kalmaktadır. Çocukluk çağında idrar NAG seviyesi için normal aralıkların tespitindeki zorluklar klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Aynı hastada birden fazla idrar NAG aktivitesi ölçümü yapılması klinik değerlendirmede daha yararlı olabilecektir. İdrar NAG düzeyi yaş, boy ve ağırlıktan etkilenmektedir ancak cinsiyetle bir değişiklik olmamaktadır. Hayatın ilk üç yılında düşmektedir ama en yüksek seviyesine erkeklerde 14 yaşında, bayanlarda 13 yaşında ulaşmaktadır (14).

Diğer yandan, yeni doğanlarda değişik tedavi yaklaşımları esnasındaki renal tubüler hasarın tespitinde de kullanılabilir (14).

Vankomisin idrar NAG seviyesini değiştirmemekte ve bu yüzden düşük doğum ağırlıklı infantlarda ciddi enfeksiyonlarda kullanılabilir (14).

Vigano ve *ark*, B izoenziminin, çocuklarda üst üriner sistem enfeksiyonlarında artıp alt üriner sistem enfeksiyonlarında artmadığını ortaya koyarak, B izoenziminin enfeksiyondan kaynaklanan renal tubüler hasarın göstergesi olduğuna işaret etmişlerdir (2,19).

Durum veya hastalık	Gösterge	Diğer göstergeler ve bilgiler	Kaynak
Gebelik <i>Normal</i> <i>Komplike</i>	B formu ↑ ↑↑	İdrarda β_2 -mikroglobulin (B2M) artışı anlamsızdır. Gebelerde serumda P formu bulunur, ancak idrara çıkmaz (2).	5
Yeni doğan <i>Miadında doğum</i> <i>Prematür doğum</i>	NAG ↑ ↑	Renal fonksiyon tam gelişmediğinden enzimüri yüksek olup hızla düzelir. Hasta ve prematürlerde düzelleme zor olup tam olmayabilmektedir.	16
Üst idrar yolu enfeksiyonu (çocuklarda)	B formu ↑	–	2,19
Cerrahi travma	B formu ↑	Hem A hem de B formunun artmasına rağmen B'deki artış daha fazla olduğundan A/B oranı düşer	2
Goodpasture sendromu	A ^s formu	A ^s formu normalde serumda bulunur, idrara çıkmaz	2
Nefrotik sendromlu hastalar	NAG ↑	B2M'de bir değişiklik yoktur.	23,24
Nefrolitiazis	NAG ↑	İdrarda alkalen fosfataz (ALP), gamaglutamil transferaz (GGT) ve β -galaktozidaz da yükselir; nötral endopeptidaz değişmez.	12,15
Toksik nefropati	NAG ↑	İdrarda ALP ve GGT de artar.	12
Kontrast madde nefropatisi	NAG ↑	GFR düşer, serum kreatinin artar, idrarda α_1 -mikroglobulin de artar.	25
24 saat sonra ikinci ESWL uygulaması	NAG ↔	Anlamlı bir değişiklik olmamaktadır.	26
Kadmiyuma maruz kalan endüstri işçileri	B formu ↑	B2M'de bir değişiklik yoktur.	6
Romatoid artritte düşük doz metotreksat tedavisi	NAG ↔	Tedavi öncesi idrarda yüksek NAG ve albumin değerleri metotreksatın bozuk renal klirensine bağlı toksisitesi için yol gösterici olabilir.	11
Aminoglikozit nefrotoksitesisi	NAG ↑	–	9
Gentamisin tedavisi Gentamisin (G) (tek başına) G+ tikarsilin/klavulanat G+ piperasilin	NAG ↑↑ ↑ ↑↑	G+tikarsilin/klavulanat protokolünde yalnız G tedavisine göre azalma gözlenmiştir. G+piperasilin tedavisinde ise tek başına G tedavisine göre bir farklılık görülmemiştir.	10
Renal transplantasyon	B formu ↑	İdrarda alanin aminopeptidaz (AAP) da artar.	18
Diabetes mellitus	B formu ↑	Proteinürü de gözlenir.	13
Hipertansiyon	NAG ↑	Enzimürideki artış tedaviyle düzelmektedir.	20
Obstrüktif nefropatinin iyileşme dönemi	NAG ↓↓	İdrarda alfa-glukozidaz, GGT ve B2M düşerken serumda da kreatinin düşer ki iyileşmenin en iyi göstergesi olarak değerlendirilmektedir.	21

Tablo 5. İdrarda NAG ve izoenzimlerinin seviyesini etkileyebilen bazı durum ve hastalıklar. ↑: Artış; ↔: Değişiklik yok; ↓:Azalma. GFR: Glomerüler filtrasyon hızı

Üst üriner sistem enfeksiyonlarında artmış idrar NAG seviyesi pyelonefritin tanısına yardımcı olabilir. Ancak üst üriner sistem enfeksiyonu olan ateşli çocuklarda

artmasına rağmen sintigrafik renal parankimal tutulumla her zaman uyumlu (korele) değildir (14).

Diğer taraftan reflü nefropatide de idrar NAG seviyesi artmaktadır. İki taraflı reflü nefropatisine bağlı yaygın skar olgularında glomerüler proteinüri ortaya çıkmadan önce bir tubüler harabiyet göstergesi olarak idrar NAG düzeyi artmaktadır. Bu durum renal skarlaşmaya sekonder rezidüel nefronların hiperfiltrasyonuna bağlıdır. Akut piyelonefritte, idrarda IL-6, IL-8 ve NAG seviyelerinin artmasına rağmen idrar NAG düzeyi ile vezikoüreteral reflü veya renal sintigrafik bulgular arasında bir ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır (14).

Yeni doğanlarda yüksek indirekt hiperbilirubineminin, idrar NAG seviyesini artırdığı bildirilmiştir. Ancak miadında doğmuş yeni doğanlarda 18.4 mg/dL seviyesinden düşük değerlerde idrar NAG seviyesi etkilenmemektedir (14).

İnsüline bağımlı diabetes mellitusta ciddi proteinürinin görülmesinden önce idrar NAG seviyesi artmaktadır. İdrar NAG seviyesi kan glukoz seviyesi ile ilişkilidir ve kan glukoz seviyesi iyi kontrol edildiğinde normale inmektedir (14).

Kısa boylu çocuklarda rekombinant insan büyüme hormonu ile yapılan tedavilerde bazı çalışmalar, idrar NAG seviyesinde artış bildirirken bazıları da değişiklik olmadığını bildirmiştir (14).

β-talasemi majör hastalarında, idrar NAG seviyesinin arttığı ve bunun da idrar çinko seviyesi ile paralel olduğu saptanmıştır. Bazı çalışmalar da bu artışın demir yüklenmesiyle ilişkili olduğunu ve demir yükünün tedaviyle azaltılmasıyla birlikte idrar NAG seviyesinin de azaldığını bildirmişlerdir (14).

Renal transplantasyon ve cerrahi girişimleri takiben yapılan bir çalışma, büyük cerrahi girişim sonrasında ara formların oranının arttığını bildirmiştir (2).

Krishna ve ark, renal transplantasyon sonrası graft rejeksiyonunun tanı ve takibinde NAG ve alanin amino peptidaz (AAP) enzimlerinin idrarla atılımını takip etmişler ve transplantasyon sonrası erken dönemde görülen tüm rejeksiyon epizotlarının yüksek enzimüri ile karakterize olduğunu gözlemişlerdir. Bazal seviyeden artışı daha fazla olduğundan AAP daha sensitif (duyarlı) bulunmuşken; NAG da daha az yanlış pozitif artışlarıyla daha spesifik (özgül) bulunmuştur. Sonuç olarak her iki enzim de graft kaybının ve kronik graft harabiyetinin eşit düzeyde iyi prognostik indeksleri olarak değerlendirilmiştir(18).

Hultberg ve ark normal ve komplike gebeliklerde idrar NAG atılımını değerlendirmişlerdir. Normal bir gebelikte, özellikle üçüncü trimesterde, enzimüri

normalin 3-4 katına çıkmaktadır. Diabetik gebelerde, benzer bir patern gözlenmekle beraber komplike olmayan gebeliklerden daha yüksek değerler gözlenmiştir. Ayrıca preeklampside de enzimüri normal gebeliklerden yüksek seyretmiştir. Enzimüri, normal gebeliklerde doğumdan bir yıl kadar sonra normale dönerken, diabetik ve preeklampitik gruplarda yüksek seyretmeye devam etmiştir (5).

Çalışkan ve ark tarafından yapılan bir çalışmada primer nefrotik sendromlu çocuklarda idrar NAG ve β_2 -Mikroglobulin düzeyleri ölçülmüştür. Steroide dirençli ve duyarlı nefrotik sendromlu gruplar arasında idrar NAG ve β_2 -Mikroglobulin seviyeleri arasında bir fark görülmemişken her iki grupta da NAG düzeylerinde normal bireylere göre belirgin artış gözlenmiştir (23).

Costigan ve ark proteinürlü renal hastalarda NAG'ın kaynağını ve anlamlılığını incelemişlerdir. Proteinürik hastalardaki üriner NAG'ın böbrekten kaynaklandığı; NAG ile izoenzimlerinin idrar ölçümlerinin, renal tubüler hasarın erken bir belirteci olarak kullanılabileceği ve hastalığın takibinde kullanışlı bir non-invazif gösterge olabileceği sonucuna varmışlardır (24).

Tassi ve ark kadmiyuma maruz kalan işçilerde yaptıkları çalışmada, idrar kadmiyum seviyesi $<2\mu\text{g/g}$ -kreatinin olanlarda idrar NAG seviyelerinde anlamlı bir artış gözlemlenmemişken, idrar kadmiyum seviyesi $2-10\mu\text{g/g}$ -kreatinin olanlarda daha yüksek idrar NAG seviyeleri ve NAG B izoenzim oranında artış tespit etmişlerdir (6).

Intraarteryel DSA (Digital Subtraction Angiography) ile intravenöz bilgisayarlı tomografi anjiyografilerini kontrast madde nefropatisi yönünden irdeleyen bir çalışmada renal fonksiyonun evaluasyonu için idrarda α_1 -mikroglobulin ve NAG takibi yapılmıştır ve her iki yöntem arasında kontrast madde nefropatisi yönünden anlamlı bir fark bulunamamıştır (25).

Köpek böbreğinde, tekrarlanan şok dalgalarının (ESWL; Extracorporeal Shock Wave Lithotripsy) idrar NAG seviyesine etkisi üzerine yapılan bir çalışmada, 24 saat arayla yapılan ikinci ESWL uygulamasının üriner NAG atılımında anlamlı bir değişiklik yapmadığı ortaya konmuştur (26).

Neimark ve ark (12) tarafından yayınlanan bir çalışmada nefrolitiazis ve toksik nefropatili olgularda erken tanı için, aralarında NAG da olmak üzere, enzimürinin değerlendirilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır.

Tip-2 DM hastalarında, idrar NAG atılımının yüksek seyredip nefropati ilerledikçe de arttığı; pentoksifilin (PTF) uygulamasıyla proteinüri ve idrar NAG

atılımının azaldığı saptanarak PTF'nin diabetik böbrek hastalığında tubülointerstisyel hasar üzerinde olumlu etkileri olabileceği bildirilmiştir (13).

Nix ve ark gentamisin tek başına veya çeşitli ilaçlarla kombine kullanımının sonucunda yaptıkları enzimüri üzerine etkisini incelemişlerdir. Gentamisin, tikarsilin veya klavulanat kombinasyonlarında NAG ve AAP'nin idrarla atılımlarının, gentamisin ve plasebo verilen gruba göre azaldığı; seftazidimle kombinasyonunda enzimürinin arttığı; piperasilinle kombinasyonda ise gentamisin ve plasebo tedavisine göre anlamlı bir değişiklik gözlenmediğini bildirmişlerdir (10).

Kasara ve ark 15 gün-15 yaş arasındaki çocuk hastalarda yaptıkları ve çeşitli sistem enfeksiyonlarını aminoglikozitlerle tedavi ettikleri çalışmada başlangıçtaki idrar NAG seviyelerinin ve ilaç kombinasyonlarının nefrotoksisite gelişmesiyle ilgili olmadığını, nefrotoksisite gelişenlerde enzimürinin en az iki katına çıktığını gözlemlemişlerdir. İdrar NAG ölçümünün pediatrik hastalarda aminoglikozit nefrotoksisitesinin taramasında kullanışlı bir test olduğu ve idrarla atılımının iki katından fazla olduğunda ilacın kesilmesi gerektiği sonucuna varmışlardır (9).

Wiland ve ark düşük doz metotreksat (MTX) alan romatoid artritli hastalarda glomerüler ve tubüler fonksiyonları değerlendirmişlerdir. Proksimal tubüler hasar göstergesi olarak idrar NAG atılımını değerlendirmişlerdir ve MTX'in belirgin bir hasar yapmadığı, aksine 24. haftada gözlenen idrar NAG atılımındaki belirgin azalmanın MTX'in böbrek fonksiyonu üzerine olan olumlu bir etkisi olarak yorumlanabileceği sonucuna varmışlardır (11).

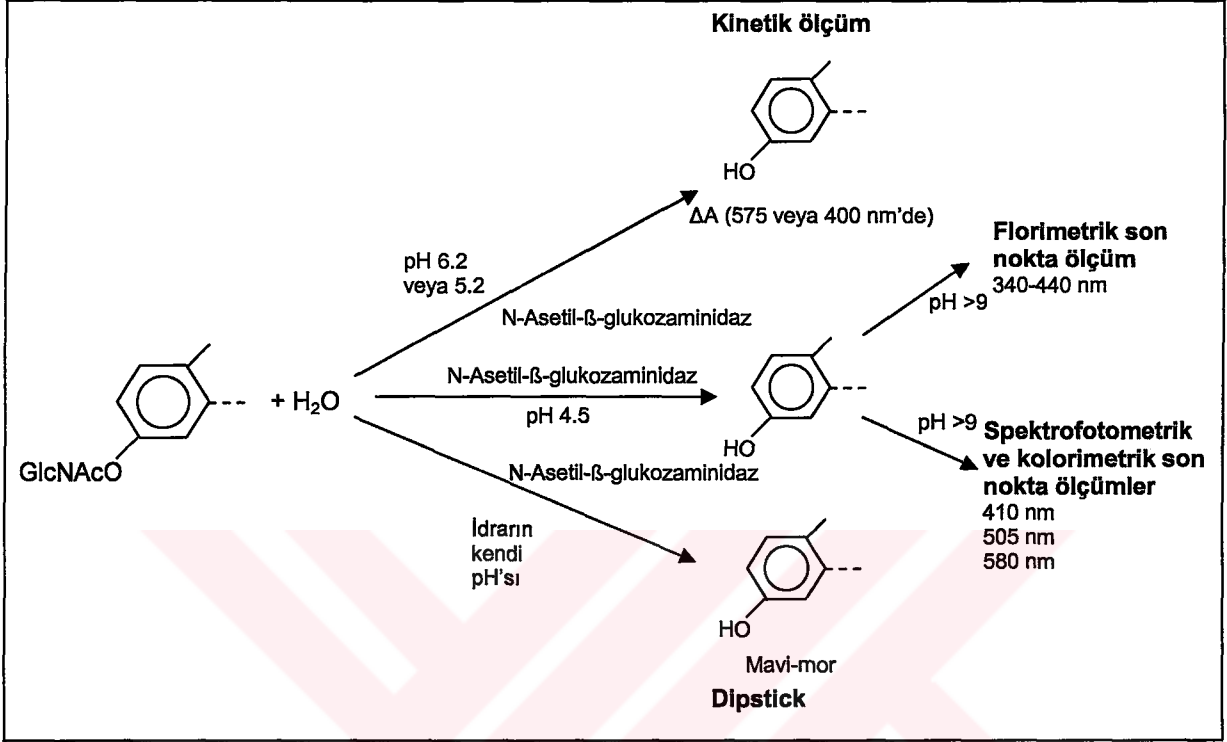
Siklosporin nefrotoksisitesi, bir çalışmada NAG, gama-glutamil transferaz (GGT) ve β_2 -mikroglobülin ile takip edilmiştir (22). Renal transplantlı grup ile böbrek fonksiyonları sağlam olan üveitli grup üzerindeki çalışmanın sonuçlarına göre; enzimüri, nefropatisi olmayan grupta nefrotoksisite için erken bir göstergedir.

Hipertansiyon hastalarında, böbrek hasarı için başka bir veri yok iken dahi sıklıkla idrarda NAG'ın yükseldiği ve başarılı bir antihipertansif tedaviyle gerilediği bildirilmiştir (20).

Yeni doğanlarda, glomerül ve tubüllerin fonksiyonel ve yapısal bütünlüğünün değerlendirildiği bir makalede, proksimal tubüllerin bütünlüğü NAG ve LAP enzimlerinin idrarda ölçümüyle değerlendirilerek, glomerüler ve tubüler fonksiyon ve yapının tüm yeni doğanlarda göreceli olarak henüz tam gelişmemiş olduğu ve zamanla geliştiği bildirilmiştir. Ancak düzelmenin, prematür doğanlarda ve çeşitli hastalıkları olanlarda daha zor olduğu veya tam olmadığı da belirtilmiştir(16).

II.D. N-ASETİL-β-D GLUKOZAMİNİDAZ ÖLÇÜM METOTLARI (Tablo 6)

İdrar NAG ölçümü için florimetrik, kolorimetrik, spektrofotometrik ve bir çubuk (dipstick) testini içeren çeşitli analitik metotlar mevcuttur (Şekil 14).



Şekil 2. N-Asetil-β-D Glukozaminidaz'ın florimetrik, spektrofotometrik, kolorimetrik ve dipstick ölçümlerinin prensipleri (2)

a- Florimetrik Metot:

4-metil umbelliferil-N-asetil- β-D-glukozaminid (4-MU) kullanan florimetrik metotun geliştirilmesiyle NAG ölçümü rutin bir prosedür olmuştur, çünkü metot normal idrarda bulunan düşük miktardaki aktiviteleri tespit edecek kadar sensitiftir. Üre inhibisyonundan kaçınmak için örneğin yeterince (15 kat) dilüe edilmesine imkan veren yüksek sensitivitesinden dolayı florimetrik metot çok verimlidir. Metodun bir avantajı da dilüsyonun idrar komponentlerince interferasyonu önlemesidir ki böylece kör ölçümleri gerekmemektedir. Metodun otomatize edilmesiyle de çok sayıda örnekle çalışmak mümkün olmuştur. Genellikle, dilüe sülfrik asit içinde kinin sülfat gibi, internal bir standart kullanılır ve örnekteki endojen floresans ölçülür (2).

Florimetrik teknikler rutin laboratuvarlarda çok az bir kullanım alanına sahip olduklarından ve uygun ekipmanı bulmak kolay olmayabileceğinden florimetrik metodun uygulaması sınırlıdır (2).

Substrat	Reaksiyon sonucu oluşturulan renkli ürün	Dalga boyu λ_{max} (nm)	Molar absorptivite ϵ (m^2/mol)
Floresan			
4-Metil umbelliferil-N-asetil- β -D-glukozaminid	4-Metilumbelliferol	340-360	—*
4-Metil umbelliferil-N-asetil- β -D-glukozaminid-6-sülfat			
Kolorimetrik			
4-Nitrofenil-N-asetil- β -D-glukozaminid	4-nitrofenol	405	17500
2-Metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenil-N-asetil- β -D-glukozaminid	2-Metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenol	505	27800
m-Krezolsulfonfitaleninil-N-asetil- β -D-glukozaminid	m-Krezolsulfonfitalenin	580	40670
Amonyum 5-[4-R-3-metoksifenilmetilen]-2-tiyoksotiyazolidin-4-bir-3-etanoat- N-asetil- β -D-glukozaminid	Amonyum 5-[4-R-3-metoksifenilmetilen]-2-tiyoksotiyazolidin-4-bir-3-etanoat	492	37000
Fenolindofenil-N-asetil- β -D-glukozaminid	Fenolindofenol	630	21106
Spektrofotometrik			
3,3'-Diklorofenilsülfonfitaleninil-N-asetil- β -D-glukozaminid	3,3'-Diklorofenilsülfonfitalenin	575	—**
2-Kloro-4-nitrofenil-N-asetil- β -D-glukozaminid	2-Kloro-4-nitrofenol	400	35800
3,4-Dinitrofenil-N-asetil- β -D-glukozaminid	3,4-Dinitrofenol	400	—**
Dipstick			
(4-[(2-Metil-pirazolo-(1,5-a)-piridin-3-yl)-amino]-fenil-N-asetil- β -D-glukozaminid	(4-[(2-Metil-pirazolo-(1,5-a)-piridin-3-yl)-amino]-fenol	570	—**

Tablo 6. Idrar β -NAG ölçümü için kullanılan substratlar. *: Floresans değerleri rölatif aktivite olarak ifade edilir. **: Belirtilmemiştir. (2)

Ayrıca, substrat 4-MU'nun düşük çözünürlüğü ve solüsyondaki instabilitesinden dolayı başka problemler de ortaya çıkmaktadır. Florimetrik metotlar, özellikle izoenzimleriyle ilgilenildiği, bazı laboratuvarlarda kullanılmaktadır ve genetik depo hastalıkları olan Tay-Sachs ve Sandhoff hastalıklarının tanısında NAG izoenzimlerinin saptanması için seçkin metottur (2).

b- Kemilüminesans Metot:

NAG için yeni bir kemilüminojenik substrat geliştirilmişse de idrar ölçümlerinde kullanımı için daha da geliştirilmesi gereklidir (2).

c- Kolorimetrik Metot:

Maruhn ve ark idrar NAG ölçümü için 4-nitrofenil-N-asetil-β-D-glukozaminidi kullanan ve çok iyi bilinen kolorimetrik metodu idrara adapte etmişlerdir. Metottaki önemli kısım, düşük molekül ağırlıklı inhibitörleri ekarte etmek için bir jel filtrasyon basamağının ya da alternatif olarak ultrafiltrasyonun kullanılmasıdır. Açığa çıkan kromoforun (renkli ürün) rengi, idrarinkine benzediğinden yüksek kör değerleri olabilmektedir. *Maruhn*'un metodu yaygın olarak kullanılmaktadır. Sensitivitesi, örnek hacmini artırarak ve reaksiyonu sonlandırmak için çok az miktarda durdurma reaktifi eklenerek yükseltilmiştir. Metot optimum pH ve substrat şartlarında çalışır ve reaktifler -25 °C'de altı ay dayanıklıdır(2).

Hem nefrotoksisitenin hem de renal hastalığın değerlendirilmesi için idrar NAG'a artan ilgi nedeniyle florimetrik (4-MU) ve kolorimetrik (4-nitrofenol) yöntemlerin dezavantajlarının üstesinden gelen yeni bir kolorimetrik substrat geliştirilmiştir. Yeni substrat kromofor olarak, molar absorbansı 4-nitrofenolden daha yüksek olan, 2-metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenol içerir. Artmış sensitivitesinden dolayı örnekler, endojen inhibitörlerin etkisini ve kör ölçümü gerekliliğini ortadan kaldıracak şekilde, 15 kat dilüe edilir. Salınan kromoforun alkalileşmesi, ana substratın renginden iyi ayırt edilen ($\lambda_{\max}$ 382 nm) yoğun bir kırmızı renk ($\lambda_{\max}$ 382 nm) ile sonuçlanmaktadır ki böylece salınan kromoforun rengiyle etkileşim olmamaktadır. 4-nitrofenol ve 4-MU metotlarıyla mükemmel korelasyon göstermiştir. Substratın çözülmesinde karşılaşılan güçlükler, substratın kit prosedüründe asit çözelti halinde sunulmasıyla aşılmıştır. Metot yaygın olarak kullanılan tüm spektrofotometrelere uygulanabilecek şekilde modifiye edilmiştir(2).

2-metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenolden hemen sonra m-krezolsulfonfitalayn derivativesi başka bir substrat geliştirilmiştir. Bu substrat NAG ile iyi reaksiyon verir ve K_m değeri 0.41 mmol/L olup suda kolayca çözünür. Bu prosedürün sonuçları da 4-MU, 4-

nitrofenol ve 2-metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenol ile korele bulunmuştur. Bu metodun, substratın higroskopik ve renkli olması gibi birkaç dezavantajı vardır. Ayrıca hidroliz reaksiyonu sonucu oluşan spektral değişim görünür ışıktadır ki bu da, çok yüksek enzim aktivitesi ölçülmüyorsa, oluşan mavi rengi maskeleyebilmektedir (2). Açığa çıkan renk sabittir ve bilirubin ve hemoglobin gibi renkli maddelerin etkisinden kaçınmak için 550 nm'den daha büyük dalga boylarına ihtiyaç vardır. m-krezolsulfonfitalayn kullanılan bir çalışmada bilirubin ve hemoglobin interferasyonuna dair çok az kanıt bulunmuştur, bu yüzden, oluşan renkli ürün 505 nm'de ölçüldüğünde anlamlı bir etkileşimleri yoktur (2). Bu kitle beraber düşük aktiviteli bir standart da kullanılmalıdır. Optimal çalışma şartları tanımlanmıştır ve farklı otomatize prosedürlere adapte edilmiştir. Ancak, *Makise* ve *ark* bu metodun alkali solüsyonda belirgin renk veren fenolbromosülfonfitalayn gibi ilaçlarla etkileşmeye açık olduğu yorumunu yapmışlardır (2).

Fenolindofenol kullanan bir başka metot geliştirilmiştir. Açığa çıkan kromoforun $\lambda_{\max}$ 'ı 600 nm'dir ve molar absorbtivitesi 4-nitrofenolünkinden yüksektir. Açığa çıkan kromofor 630 nm'de ölçüldüğünden idrar körüne gerek yoktur (2).

Amonyum 5-[4-R-3-metoksifenilmetilen]-2-tiyoksotiyazolidin-4-bir-3-etanoat derivativesi sentezi ve hızlı ve sensitif bir metot *Pocsi* ve *ark* tarafından bildirildi. Substrat çözeltisi 4-7°C'de bir hafta saklanabilmektedir ve NAG'ın minör izoenzimlerini ölçme konusunda önemli yere sahip olan 2-metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenolden iki kat daha sensitiftir (2).

Yukarıda tartışılan metotların hepsi de, birincisi idrar ve substratın inkübasyonu takiben eklenmesi ve ikincisi de alkali durdurucu ajanın ortama eklenmesi olmak üzere iki basamak içermektedir. Yakın geçmişte kinetik birkaç metot bildirilmiştir (2).

c- Spektrofotometrik Metot:

Makise ve *ark* kinetik bir çalışma için 2-kloro-4-nitrofenolden yeni bir substrat geliştirdiler. İyi bir çalışma için gerekli substrat, ortaya çıkan kromoforu NAG'ın optimal pH'sına yakın asidik bir pK_a 'ya sahip olacak şekilde olmalıdır. 2-kloro-4-nitrofenol derivativesi suda ancak hafifçe çözündüğünden Triton X-100 gibi bir sürfaktant gerekmektedir. Çalışma pH 4.8'de olmaktadır ve 2-kloro-4-nitrofenol ürünü 400 nm'de okunmaktadır. 2-kloro-4-nitrofenolün pK_2 'si 5.5 olup bu değer NAG'ın optimum pH'sına, yaklaşık 7.00 pH'ya sahip, 4-nitrofenolünkinden daha yakındır. Molar absorbtivite yüksek olup metot 4-nitrofenolden 15 kat daha sensitiftir. Çalışma 3

dakika sürmekte ve kör ölçümü gerektirmemektedir. Substratın düşük çözünürlüğü ve instabilitesinin crown eter ve etilen glikol ekleyerek ve çalışma pH'sını 4.7'den 5.7'ye değiştirerek kısmen üstesinden gelinebildi (2).

Kinetik NAG ölçümü için suda çözünür bir derive (3,4-dinitrofenol) geliştirildi. Çalışma 400 nm'de ve pH 5.4'te yapılmaktadır ve aglikonun nonenzimatik hidrolizi için ufak bir düzeltme gerekmektedir (2).

Noto ve ark 3,3'-dikloro-fenil-sülfon-fitaleinil derivesi bir başka substrat tanımladılar. Metot m-krezolsulfonfitaleyn ve 2-kloro-4-nitrofenol ile iyi korelasyon gösterdi. 3,3'-dikloro-fenilsülfonfitaleinin standart da içeren modifiye bir versiyon kiti Boehringer-Mannheim tarafından piyasaya sürülmüştür. Hitachi oto analizörde bu prosedürü kullanarak elde edilmiş iyi sonuçlar yayınlanmıştır ancak, metot 4-nitrofenilden daha az sensitiftir(2).

Birçok durumda artmış N-Asetil- β -D Glukozaminidaz aktivitesi hastalıklarının erken evresi için gösterge olduğundan bir dipstick testinin varlığı heyecanlandıran bir gelişmedir (RENAG Boehringer-Mannheim). Bu metot, endüstri çalışanları gibi, risk altındaki kişilerde renal hasardan şüphelenildiğinde, enfeksiyon olasılığında, hipertansiyon veya renal hastalık şüphesinde birinci basamak tarama testi olarak veya nefrotoksik ilaçların takibinde kullanılabilir. RENAG sribinde, hidrolizi takiben mavi-mor renk veren aminofenil derivesi vardır. Test on dakika sürmektedir ve başka bir reaktif eklemeye ihtiyaç duymaz. Eğer örnek kan veya bilirübin ile kontamine olursa veya üre içeriği çok olacak şekilde konsantre ise bu testte problem olabilir. Stribin raf ömrü kısadır ancak ürün belirgin bir teknolojik ilerleme sunmaktadır. Ayrıca *Price ve ark* tarafından 2-metoksi-4-(2'-nitrovinil)-fenil derivesi içeren bir strip geliştirilmiştir ve rengi RENAG'inkinden daha belirgindir, ancak ortama alkali eklemeyi gerektirmektedir. İdrarda NAG çalışması için en önemli gereksinimler tablo 7'de verilmiştir (2).

1. Hastalığın veya hasarın sürecinin başında düşük enzim aktivitesi bulunduğundan sensitif bir metot gerekir.
2. Endojen inhibitörler uzaklaştırılmalı veya etkileri dilüsyonla en aza indirilmelidir.
3. Çalışma şartları renkli bileşiklerin veya ilaçların olası etkileşimlerinden kaçınılacak şekilde düzenlenmelidir.
4. Her örnek için kör ölçümü olmamalıdır.
5. Her laboratuvar normal bireylerde NAG için kendi referans değerlerini ve üst sınırını ortaya koymalıdır; çocuklarda, yaşlı veya gebe kadınlarda enzim aktivitesi yükselmektedir.
6. Çalışma basit ve uygulaması kolay olmalı; kolayca otomatize edilebilmelidir.
7. Yüksek, orta ve düşük N-asetil- β -glukozaminidaz standartları rutin çalışmaya eklenmelidir.
8. İdrardaki değişikliklerden etkilenmemek için aktivite kreatinine göre hesaplanmalıdır, ayrıca ciddi hasardan şüphelenildiğinde kreatinin klirensine göre hesaplamak daha uygun olabilecektir.
9. Çalışma tamponunun konsantrasyonu idrar örneğindeki pH değişikliklerinin üstesinden gelebilecek şekilde ayarlanmalıdır.

Tablo 7. İdrarda iyi bir N-asetil- β -glukozaminidaz ölçümü için gerekli şartlar (2)

III- GEREÇ VE YÖNTEM

III.A.GEREÇLER

III.A.1. Kullanılan kimyasal maddeler:

1. 4-Nitrofenil N-asetil beta-D-glukozaminid (Sigma diagnostics, St. Louis, ABD)
2. Sitrik asit (Merck KGaA., Darmstadt, Almanya)
3. Sodyum sitrat (Chas. Pfizer & Co.,inc. New York, ABD)
4. Disodyum tetraborat.10su (Merck KGaA., Darmstadt, Almanya)
5. Sodyum hidroksit (Merck KGaA., Darmstadt, Almanya)

III.A.2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler:

1. Ultrasonik karıştırıcı (Degasser) (Bandelin Sonorex, Berlin, Almanya)
2. Olympus AU 2700 analizör (Olympus Optical Co. Ltd., Shizuoka-ken, Japonya)
3. pH-metre (MP 220 pH Meter, Mettler-Toledo GmbH, İsviçre)
4. Bidistile su cihazı (Nanopure UV, Barnstead-Thermolyne, Dubuque, Iowa, ABD)
5. Spektrofotometre (Shimadzu UV-240, Japonya)
6. Soğutmalı santrifüj (Eppendorf 5403, Almanya)
7. Normal santrifüj (Nüve NF 1215, Türkiye)
8. Muhtelif otomatik pipet (Eppendorf Research Almanya)
9. Muhtelif cam pipet (Witeg, Almanya)
10. Vorteks (Maximix Thermolyne, Dubuque, IOWA, ABD)
11. Hassas terazi (AX 120, Shimadzu Corp., Japonya)
12. Terazi (Mark 420 EİB, İtalya)

III.B. YÖNTEMLER

III.B.1. İdrarda N-asetil-β-D-glukozaminid ölçüm yöntemi:

İdrarda N-asetil-β-D-glukozaminidaz (NAG) aktivitesi ölçüm yöntemi, Xu ve ark 'nın (27) spektrofotometrik yönteminden modifiye edildi. Yöntem, detaylarıyla aşağıda anlatılmıştır.

III.B.1.a. Örneklerin Hazırlanması:

Spot idrarlar alındıktan sonra bekletilmeden 3000rpm'de 5 dakika santrifüje edildi. Süpernatandan kreatinin ve total protein ölçümü için bir miktar örnek ayrıldı. Kalan süpernatant NAG için ayrıldı. Aynı gün çalışılmayan örneklerin süpernatantı - 30°C'de en fazla 7 gün saklandı.

III.B.1.b. Reaktiflerin Hazırlanması:

a) 50mM sitrat tampon: 2.1 g sitrik asit.1su 100 mL deiyonize su ile temiz bir kap içinde çözdürüldü. İkinci bir temiz kapta 2.9 g sodyum sitrat.2su 100 mL deiyonize suda çözdürüldü. 30 mL sitrik asit çözeltisine yaklaşık 20 mL sodyum sitrat eklenerek pH 4.25'e ayarlandı. Son hacim deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

b) Substrat (reaktif): 4-Nitrofenil N-asetil beta-D-glukozaminid (Sigma diagnostics, St. Louis, ABD) sitrat tampon içinde, 10 mM olacak şekilde (34.2 mg/10mL-tampon) hafifçe ısıtarak ve ultrasonik su banyosu yardımıyla çözdürülerek substrat (reaktif) hazırlandı.

c) Renk reaktifi: 7.6 g disodyum tetrahidroborat.10su 70-80 mL deiyonize su içinde çözdürüldü. Sodyum hidroksit eklenerek pH'sı 12.0'ye ayarlandı. Son hacim, deiyonize su ile 100 mL'ye tamamlandı. +4°C'de saklandı.

III.B.1.c. Ölçüm(Tablo-8):

Temiz cam tüplere 750µL substrat konarak 5 dakika 37°C su banyosunda ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine, kör tüpüne 50µL deiyonize su, örnek tüplerine 50µL idrar örneği eklenerek karıştırıldı ve 10 dakika 37°C'de enkübe edildi. Bu süre sonunda 405nm'de köre karşı örneklerin absorbansları tespit edildi ve A₁ olarak kaydedildi. Ardından, karışıma borat tampon eklenerek karıştırıldı ve reaksiyon sonlandırıldı. Tekrar köre karşı absorbansları tespit edildi ve A₂ olarak kaydedildi. Açığa çıkan 4-nitrofenolün miktarı fotometrik olarak 405nm'de A₂ ve A₁ değerlerinin farkı olarak elde edildi.

	TEST TÜPÜ	KÖR TÜPÜ
Substrat	750µL	750µL
37°C'de 5 dk ön inkübasyon		
Örnek	50µL idrar (karıştır)	50µL su (karıştır)
37°C'de 10 dk inkübasyon		
Testi 405nm'de köre karşı oku (A ₁)		
Borat	200µL (karıştır)	200µL (karıştır)
Testi 405nm'de köre karşı oku (A ₂)		

Tablo-8. İdrar NAG ölçümü için kullanılan uygulama tablosu

III.B.1.d. Hesaplama:

Enzim aktivitesi 4-nitrofenolün alkali solüsyonda (pH 10), 405 nm'deki molar absorbtivite katsayısı ($18,5\text{mmol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) yardımıyla hesaplandı ve IU/L olarak ifade edildi. Enternasyonal Ünite (IU), birim hacimde, birim zamanda ürüne dönüşen substrat miktarıdır. Birimi mikromol/dakika/litre'dir.

$$\text{IU/L (veya U/L)} = \mu\text{mol/dk/L}$$

Hesaplama kullanılan formül şöyledir:

$$\text{U/L} = (A_2 - A_1 \times 0,8) \times 108$$

Sonuçlar kreatininle düzeltilerek, milimol kreatinin başına ünite aktivite (U/mmol-kreatinin) olarak ifade edildi.

III.B.1.e. Metodun İrdelenmesi:

Tekrarlanabilirlik: Tekrarlanabilirlik, biri normal değeri yüksek seviyede örnek kullanılarak iki farklı konsantrasyonda çalışıldı.. Gün içi değişim çalışmasında, her iki örnek onar kez çalışıldı. Günler arası değişim çalışması içinse, örnekler ardı ardına on gün çalışıldı. Çalışma sırasında örnekler porsiyonlar halinde -30°C 'de saklandı. Değişim katsayısı (% CV); standart sapmanın, ortalama değere bölünüp, 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı.

Doğrusallık: Yüksek NAG aktiviteli örnek serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile dilüe edilerek 0.5-200 U/L olacak şekilde seri sulandırılmış örnekler hazırlandı. Elde edilen değerler beklenen değerlerle karşılaştırıldı. Doğrusallık, direkt olarak enzim aktivitesiyle paralel olduğundan, doğrusallığın değerlendirilmesinde aktivite değeri (U/L) kullanıldı.

Substrat ve örnek dayanıklılığı: Yöntemin manuel olması ve sık yapılan bir test olmaması nedeniyle reaktifin ve örneğin depolanmasında problemler olması beklenebilir. Bunu tespit etmek için, farklı konsantrasyonlardaki iki örnek porsiyonlara ayrılarak -30°C 'de donduruldu. Substrat hazırlanarak porsiyonlar halinde buzdolabında ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de) ve dondurucuda (-30°C 'de) saklandı. Saklanacak reaktif ve örneklerin hazırlandığı gün '0. gün' olarak kabul edildi ve 1., 4., 7., 15. ve 30. günlerde ölçümler yapıldı. Her çalışma gününde taze reaktif hazırlandı. Taze reaktifle, buzdolabında ve dondurucuda saklanan reaktiflerin her biriyle her iki örnek de çalışıldı. Önceden hazırlanıp saklanan reaktif porsiyonlarıyla reaktifin dayanıklılığının, taze hazırlanan reaktiflerle ise örneğin dayanıklılığının tespiti

amaçlandı. Taze reaktifle elde edilen sonuçlar örnek dayanıklılığının performansını gösterdi. Her çalışma gününde hem taze hem de önceden hazırlanmış reaktiflerle elde edilen sonuçlar da saklanan reaktiflerin taze reaktife karşı önceden hazırlanıp +4°C'de ve -30°C'de saklanmış reaktiflerin dayanıklılık performansını gösterdi.

Metodun Duyarlılığı: Deteksiyon (saptama) sınırının tespiti için düşük konsantrasyonlu örnekler çalışıldı. Deteksiyon sınır değeri de direkt olarak enzim aktivitesiyle paralel olduğu için sonuçlar (U/L) olarak ifade edildi.

III.B.2. İdrarda kreatinin ölçüm yöntemi:

İdrarda kreatinin ölçümü Olympus AU 2700 analizörü (Olympus Optical Co. Ltd., Shizuoka-ken, Japonya) ile orijinal kitleri kullanılarak yapıldı. İdrar kreatinin ölçümü modifiye Jaffé metodu ile yapılmaktadır. Alkali solüsyonda kreatinin, pikrik asitle sarı-turuncu bir renk oluşturur. Bu bileşiğin konsantrasyonu örnekteki kreatinin konsantrasyonunu yansıtır. Test, idrarda 0.4-600 mg/dL (35-52800 µmol/L) kreatinin konsantrasyonları için doğrusaldır.

III.B.3. İdrarda total protein ölçüm yöntemi:

İdrarda total protein ölçümü Olympus AU 2700 analizörü (Olympus Optical Co. Ltd., Shizuoka-ken, Japonya) ile orijinal kitleri kullanılarak yapıldı. Pyrogallol kırmızısı, maksimum absorbanası 470nm'de olan kırmızı bir kompleks oluşturacak şekilde, molibdat ile birleştirilir. Protein varlığında, maksimum absorbanası 600 nm'de olacak şekilde, mavi-mor renkli bir kompleks oluşur. Oluşan kompleksin absorbanası, örneğin protein konsantrasyonuyla orantılıdır. Test 150 mg/dL konsantrasyonuna kadar doğrusaldır.

III.B.4. Kan kurşun düzeylerinin ölçüm yöntemi:

Kan kurşun seviyelerinin ölçümü Spectra Atomik Absorbsiyon Spektrofotometre (Varian, Avustralya) ile yapıldı. Nötral hale çevrilen atomlar çok dar bantlı ışımayı absorbe etme kapasitesine sahiptirler. Atomlar, katot lambasından çıkan ışığı absorbe edebilir hale çevrilirler ve daha sonra atomun absorbe ettiği ışın miktarı ölçülür.

III.C. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler için SPSS 10.0(SPSSFW, SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler için ortalama ve standart sapma değerleri hesaplandı. Gruplar arası farklılık "İki ortalama arası farkın önemlilik testi

(Student t test)” ile araştırıldı. Parametreler arası ilişkilerin belirlenmesi için Pearson korelasyon katsayısı kullanıldı. Bu ilişkilerin boyutlarının incelenmesi için lineer regresyon analizi uygulandı. Yanılma düzeyi olarak $\alpha=0.05$ seçildi. Bu değere eşit ya da küçük p değerleri için “istatistiksel olarak önemli (anlamlı)” yorumu yapıldı.



IV- BULGULAR

IV.A. METOT İRDELEME ÇALIŞMALARI:

IV.A.1. TEKRARLANABİLİRLİK:

İdrarda N-Asetil-β-D-glukozaminidaz (NAG) ölçüm metoduna ait gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları tablo-9'da verildi.

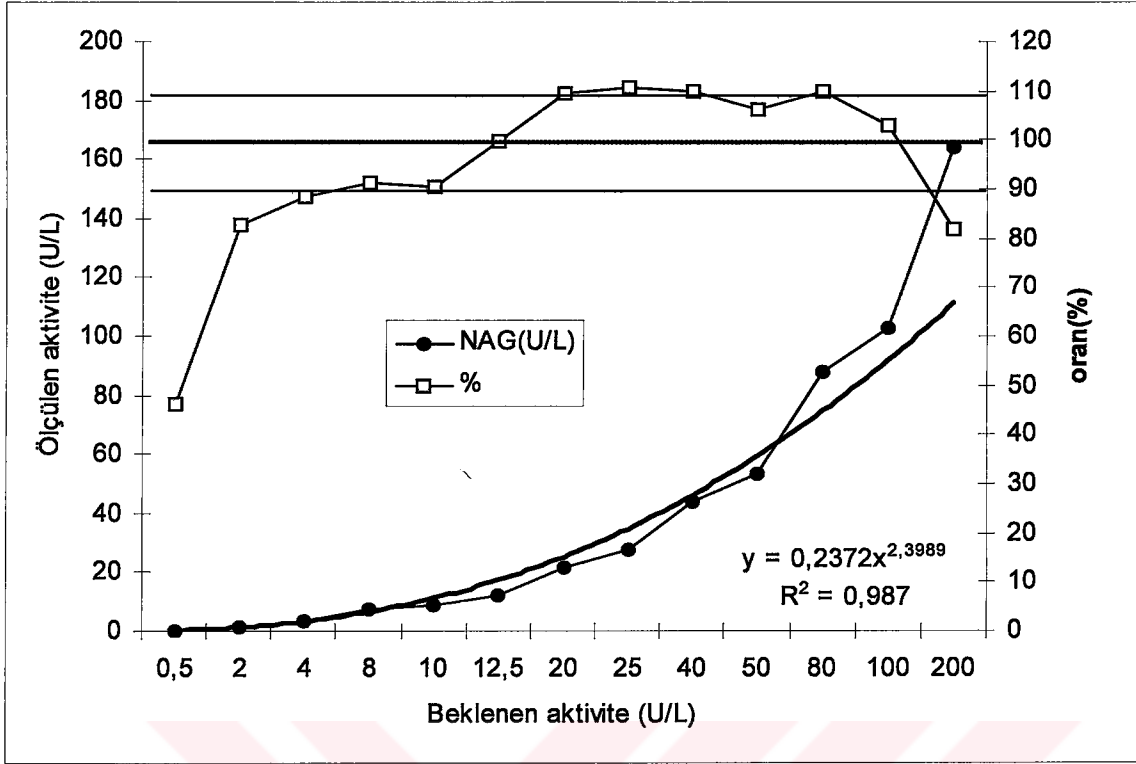
Çalışma	Gün içi NAG U/mmol-Kr	Günler arası NAG U/mmol-Kr	Çalışma	Gün içi NAG U/mmol-Kr	Günler arası NAG U/mmol-Kr
1	2.26	2.26	1	58.17	53.97
2	2.33	2.32	2	60.84	52
3	2.26	2.26	3	56.26	54.74
4	2.38	2.11	4	57.02	58.35
5	2.32	2.25	5	60.07	56.59
6	2.32	2.24	6	55.04	57.27
7	2.31	2.34	7	58.24	56.98
8	2.26	2.44	8	59.23	60.3
9	2.32	2.07	9	54.43	63.2
10	2.16	2	10	57.02	59.42
Ort	2.29	2.23	Ort	57.63	57.28
SD	0.06	0.13	SD	2.08	3.26
%CV	2.62	5.97	%CV	3.61	5.7

Tablo-9. Sol sütunda normal aktiviteli, sağ sütunda yüksek aktiviteli örneklerde idrarda NAG ölçüm metodunun gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları (ort: ortalama, SD: standart sapma, %CV: değişim katsayısı)

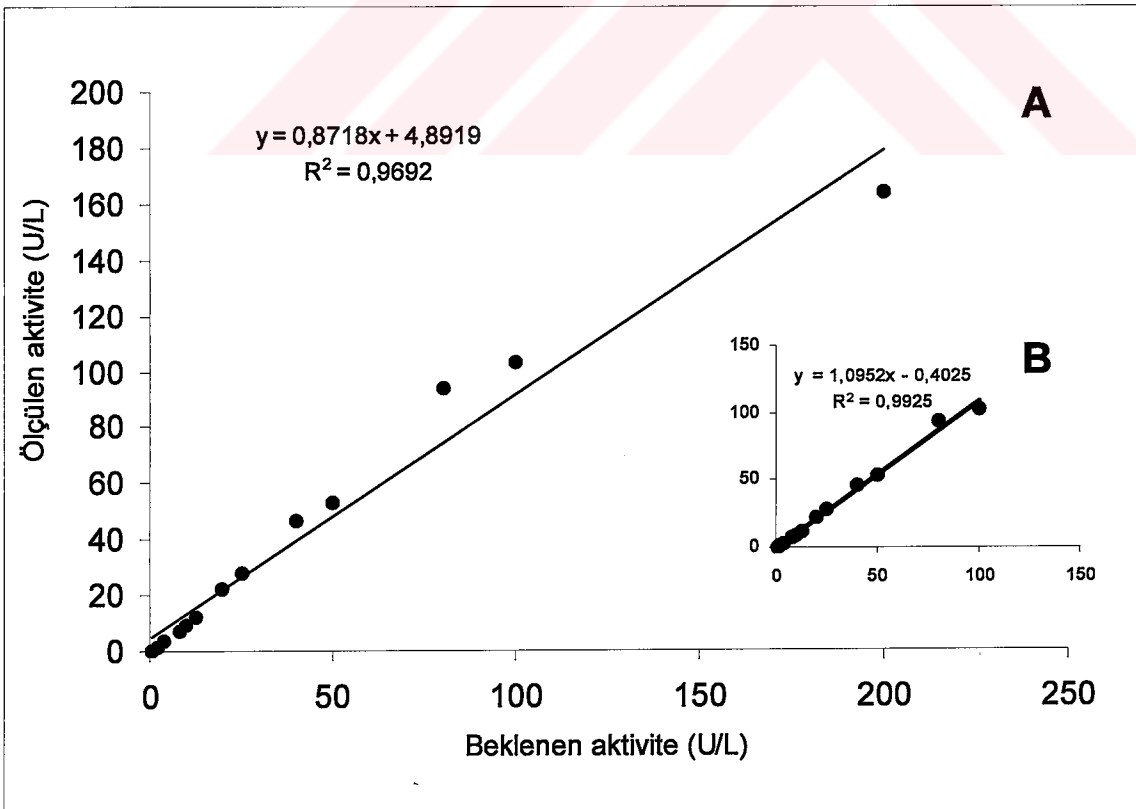
Bu sonuçlara göre değişim katsayısı sonuçları, gün içi tekrarlanabilirlik için normal ve yüksek seviyedeki örneklerde sırasıyla, %2.62 ve %3.61; günler arası tekrarlanabilirlikte ise %5.97 ve %5.7 olarak saptandı.

IV.A.2. DOĞRUSALLIK ÇALIŞMASI:

Doğrusallık çalışması için, 0.5-200 U/L arasında hazırlanan örneklerde, idrar NAG ölçümleri yapıldı ve elde edilen değerler beklenen değerlerle karşılaştırıldı (Şekil-3 ve -4). Şekil-3'te üst kısımda elde edilen değerlerin beklenen değere oranı görülmektedir. Yine şekil-3'te alt kısımda ise ilişki üssel olarak ifade edildi ve R^2 0.987 olarak bulundu. Şekil-4 A'da 0.5-200 U/L değerleriyle yapılan regresyon analizi görülmektedir. Şekil-4 B'de (küçük grafik) ise 200 U/L değeri dışlandıktan sonraki (0.5-100 U/L arası) regresyon analizi görülmektedir.



Şekil-3. İdrar NAG düzeyinin ölçümünde doğrusallığın oransal gösterimi ve ilişkisinin üssel ifadesi



Şekil-4. İdrar NAG aktivitesinin ölçümünde doğrusallık grafiği. A: 0.5-200 U/L değerleriyle, B: 0.5-100 U/L değerleriyle yapılan regresyon analizleri

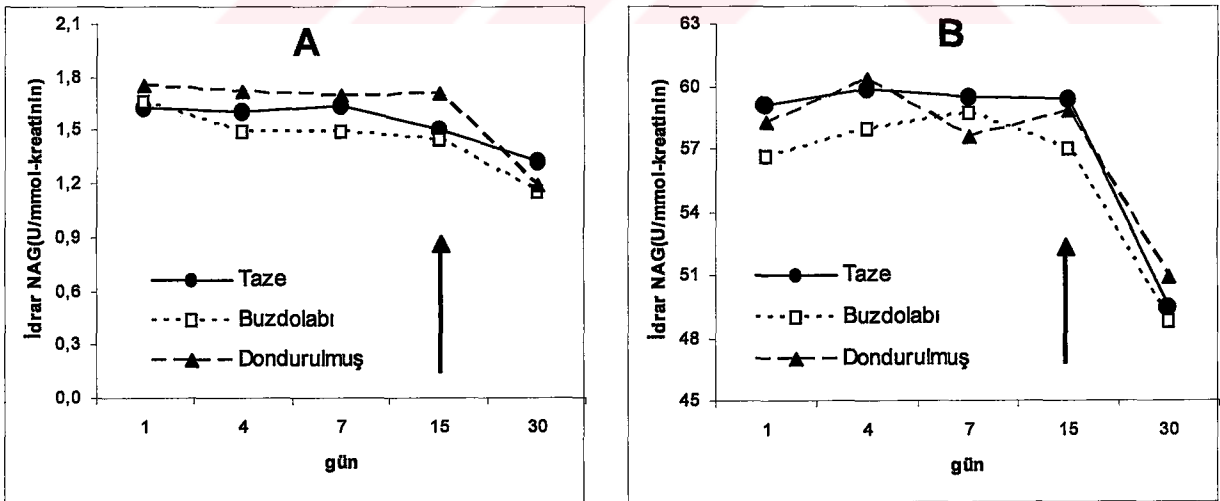
Buna göre 4 U/L altındaki ve 100 U/L üzerindeki idrar NAG seviyelerinde doğrusallığın kaybolduğu (beklenen değerin %90'ından düşük ölçüm değeri alındığı) gözlemlendi.

0.5-200 U/L aktivite aralığında yapılan regresyon analizi sonucunda eğim (slope) değerinin 0.8718, kesim noktası (intercept) değerininse 4.8919 olduğu saptandı; regresyon katsayısı (R^2) 0.9692 olarak tespit edildi (Şekil-4A). 200 U/L değeri dışlanarak yapılan regresyon analizinde (Şekil-4 B), eğim için 1.0952, kesim noktası için 0.4025, regresyon katsayısı (R^2) içinse 0.9925 gibi daha uygun sonuçlar elde edilmiştir.

Bu sonuçlara göre yöntemin 4-100 U/L arasında doğrusal olduğu, analitik duyarlılığın ise 4 U/L olduğu saptandı (Şekil-3 ve -4).

IV.A.3. SUBSTRAT ve ÖRNEK DAYANIKLILIĞI:

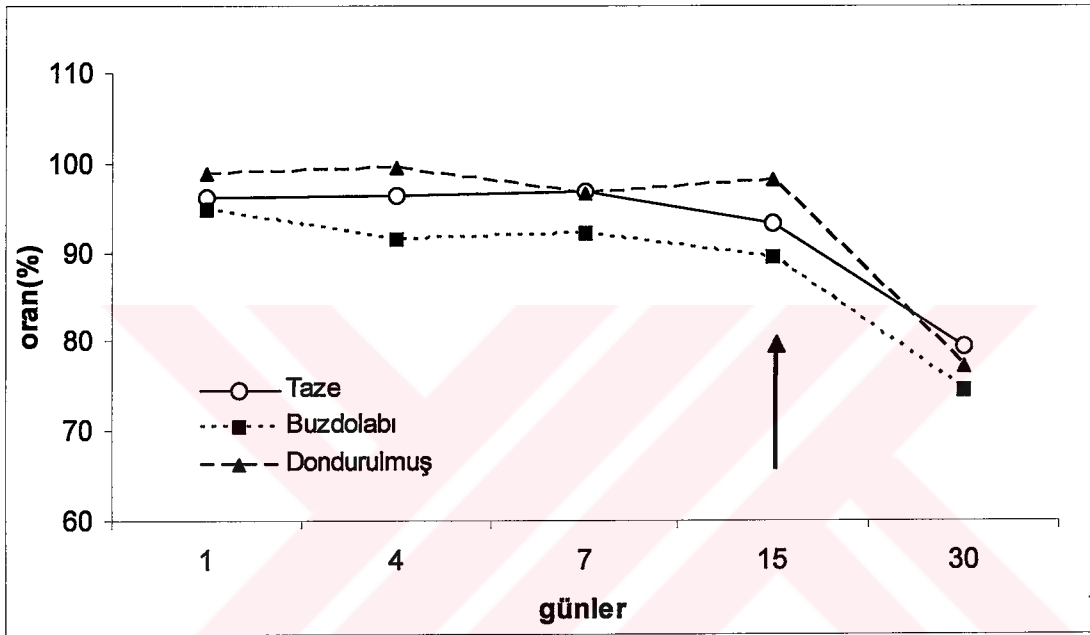
Substrat (reaktif) ve örnek dayanıklılığını değerlendirmek için, saklanacak reaktif ve örneklerin hazırlandığı gün '0. (sıfırıncı) gün' olarak kabul edildi ve 1., 4., 7., 15. ve 30. günlerde ölçümler yapıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil-5 ve 6'da verildi. Şekil-5 A ve B'de farklı iki konsantrasyondaki ölçüm değerleri günlere göre verilmiştir. Şekil-6'da her çalışma gününde elde edilen değerlerin 0. gün değerine oranlarının ortalaması görülmektedir.



Şekil-5: Dondurucudan çıkarılan düşük (A) ve yüksek (B) NAG aktiviteli iki örneğin taze hazırlanmış, buzdolabında saklanmış ve dondurucuda saklanmış reaktiflerle ölçümlerinin sonuçları

Sonuçlar;

- Reaktifin $+4^{\circ}\text{C}$ ve -30°C 'de 30 gün boyunca bozulmadığını, her iki ortamda muhafaza edilen reaktiflerin taze hazırlanan reaktifle benzer sonuçlar verdiğini (şekil-5 ve 6),
- Örneklerin aktivitelerini -30°C 'de 15 gün koruduğu, daha sonra ise aktivitelerini yitirdiğini (30. günde yaklaşık %20 düşüş) gösterdi (şekil-5 ve 6).



Şekil-6. Günler boyunca ölçülen NAG enzim aktivitelerinin 0. gün enzim aktivitelerine oranı

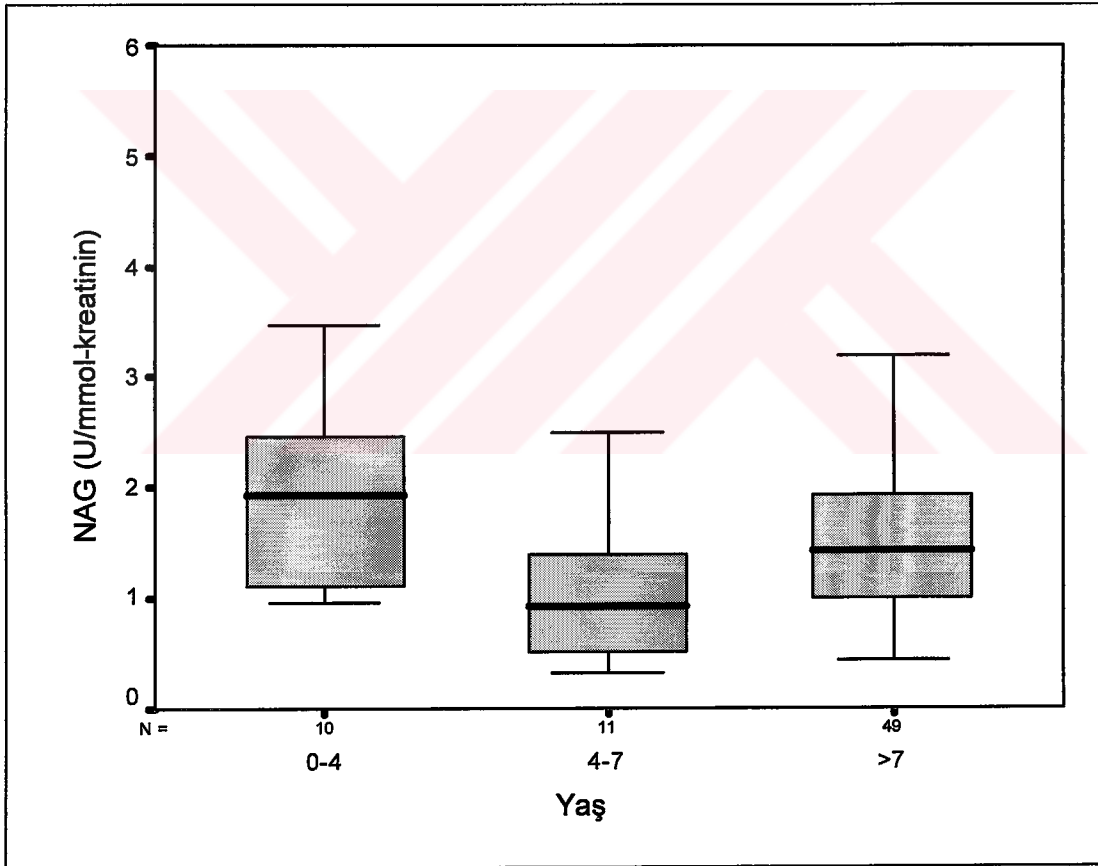
IV.A.4. REFERANS DEĞER ÇALIŞMASI:

Çeşitli nedenlerle hastahanemize başvurmuş, sağlıklı olduğu bilinen 4ay-85 yaş arasındaki bireylerden elde ettiğimiz idrar NAG normal değerleri ve bunların yaşlara göre dağılımı aşağıda verilmiştir (Tablo-10, Şekil-7 ve -8). Tablo-10'da üst kısımda bulunan 1 ay-3 yaş; 3-7 yaş ve >7 yaş aralıkları Xu ve ark (27) tarafından yapılan yayındaki yaş aralıkları ve bunlarda elde edilen referans değerlerdir. Orta ve alt kısımdaki 1 ay-14 yaş ve >14 yaş aralıkları ile alt kısımdaki 0-85 yaş aralıkları ise bizim değerlendirmemizdir. Şekil-7'de verilen değerler, Xu ve ark tarafından belirlenen yaş gruplarında elde ettiğimiz idrar NAG seviyelerini göstermektedir. Şekil-8'de ise elde ettiğimiz idrar NAG değerleri yaşa göre verilmiştir.

1 ay-14 yaş arası grupta idrar NAG düzeyleri için referans değerleri 0-3.05 U/mmol-kreatinin olarak saptarken, >14 yaş grubu içinse 0-4.02 olarak bulduk. Tüm bireyleri tek grup olarak ele aldığımızda ise 0-3.72 U/mmol-kreatinin değerlerini elde ettik (Tablo-10).

Sonuçlara göre, yaş ile idrar NAG konsantrasyonları arasında çok düşük anlamlı bir korelasyon görüldü ($r=0.286$; $p=0.016$).

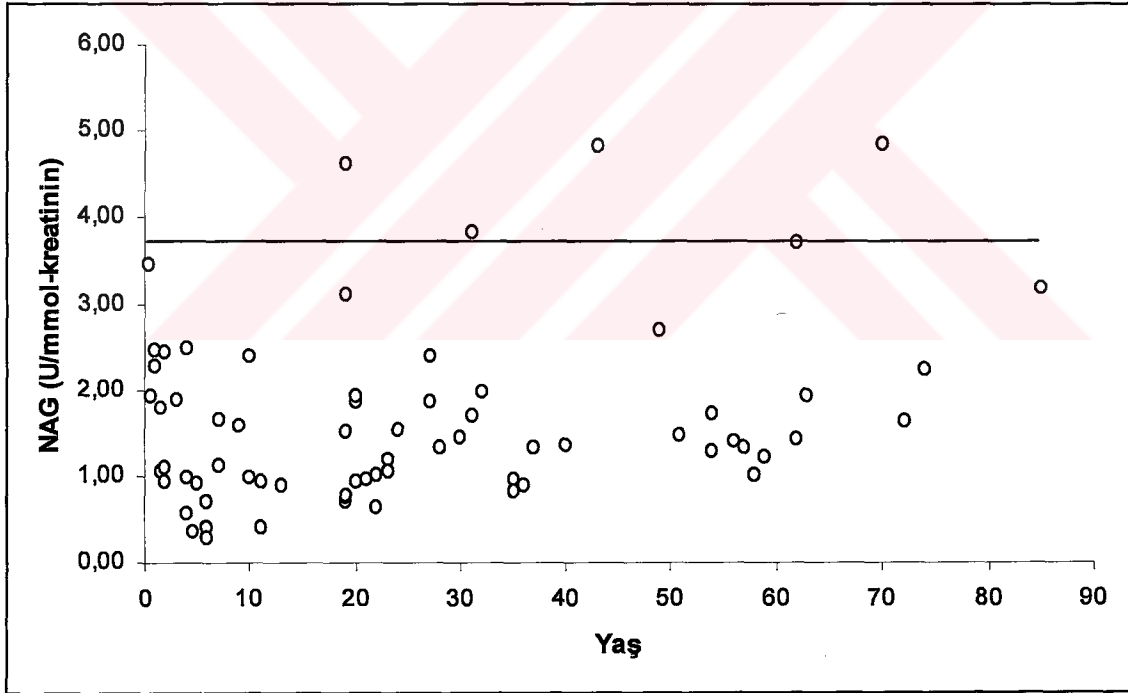
Ayrıca çocukluk yaşı üst sınırı 14 yaş kabul edildiğinde, idrar NAG düzeylerini çocuk ve erişkinler arasında değerlendirdiğimiz zaman, istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptamadık ($p=0,069$) (Tablo-10, Şekil-7).



Şekil-7. Çeşitli yaş gruplarına göre referans aralıkları

Yaş grubu (27)	Bizim çalışma sonuçlarımız		Kaynak (27) değerleri
	Ort. $\pm$ SD	Referans değer	Referans değer
1 ay-3 yaş	1.85 $\pm$ 0.82	0.21-3.49	0.56-4.5
4-7 yaş	0.8 $\pm$ 0.79	0-2.38	0.57-3.12
>7 yaş	1.75 $\pm$ 1.08	0-3.91	0.21-2.48
1 ay-14 yaş	1.39 $\pm$ 0.83	0-3.05	-
>14 yaş	1.82 $\pm$ 1.1	0-4.02	-
0-85 yaş	1.66 $\pm$ 1.03	0-3.72	-

Tablo-10. Referans kaynakta verilen yaş gruplarında ve tüm yaşlarda idrar NAG seviyesi için referans değerleri (NAG değerleri U/mmol-kreatinin cinsindendir, ort.: Ortalama, SD: Standart sapma)



Şekil-8 İdrar NAG düzeylerinin yaşa göre dağılımı, çizgi, 0-85 yaş grubu için elde ettiğimiz üst sınırı (3.72 U/mmol-kreatinin) göstermektedir.

IV.B. KLİNİK ÇALIŞMA

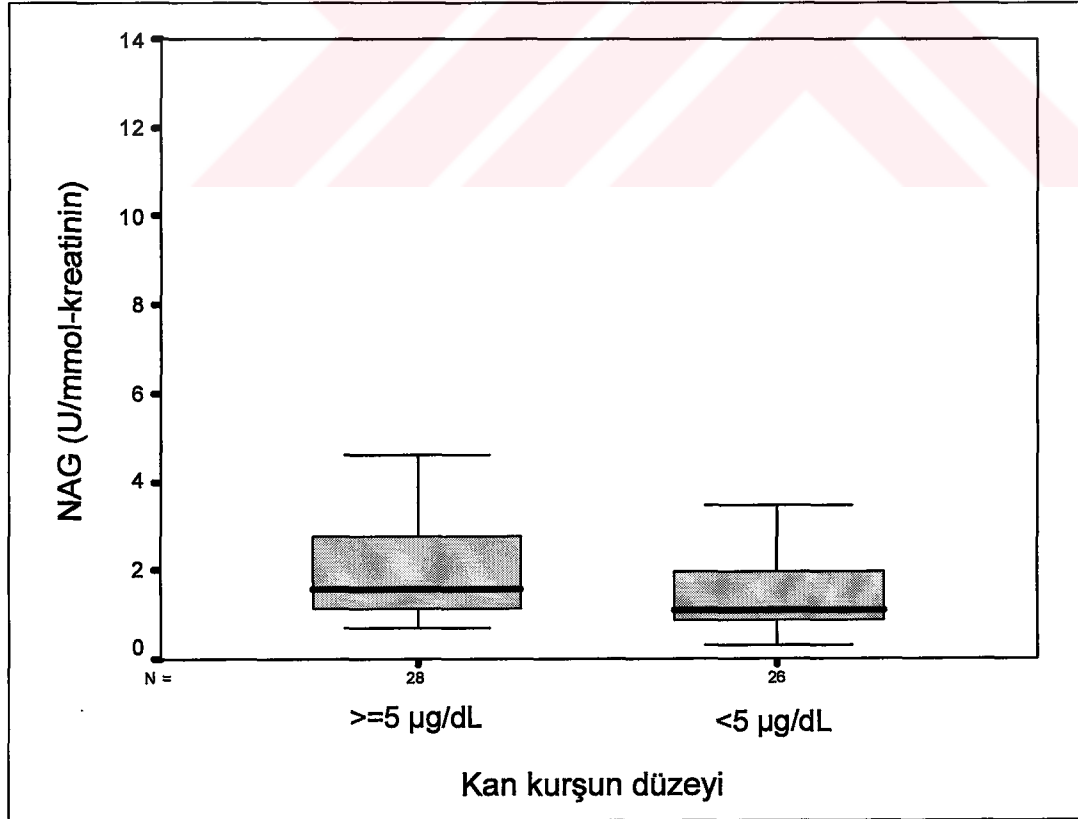
IV.B.1. KAN KURŞUN DÜZEYLERİ İLE İDRAR NAG DÜZEYLERİ

ARASINDAKİ İLİŞKİ:

Çeşitli nedenlerle hastahanemize başvurmuş, sağlıklı olarak bilinen 0-14 yaş arasında toplam 54 çocukta kan kurşun düzeyleri ile idrar NAG aktiviteleri ölçüldü. Kan kurşun düzeyleri ≥ 5 ve < 5 $\mu\text{g/dL}$ olmak üzere iki grup oluşturuldu (Tablo 11). İki grupta yapılan değerlendirme sonucunda kan kurşun seviyesi ≥ 5 $\mu\text{g/dL}$ olan grupta idrar NAG düzeylerinin istatistiksel olarak yüksek olduğunu saptadık ($p=0.031$) (Şekil-9).

	Kurşun ≥ 5 $\mu\text{g/dL}$	Kurşun < 5 $\mu\text{g/dL}$	p
Kurşun ($\mu\text{g/dL}$)	9.50 ± 3.2	2.9 ± 0.9	<0.001
İdrar NAG (U/mmol-kreatinin)	2.57 ± 2.63	1.39 ± 0.83	0.031

Tablo-11. Kan kurşun seviyesi ≥ 5 ve < 5 $\mu\text{g/dL}$ olan gruplarda kan kurşun ve idrar NAG seviyelerinin ortalama $\pm$ standart sapma ve p değerlerinin gösterilmesi

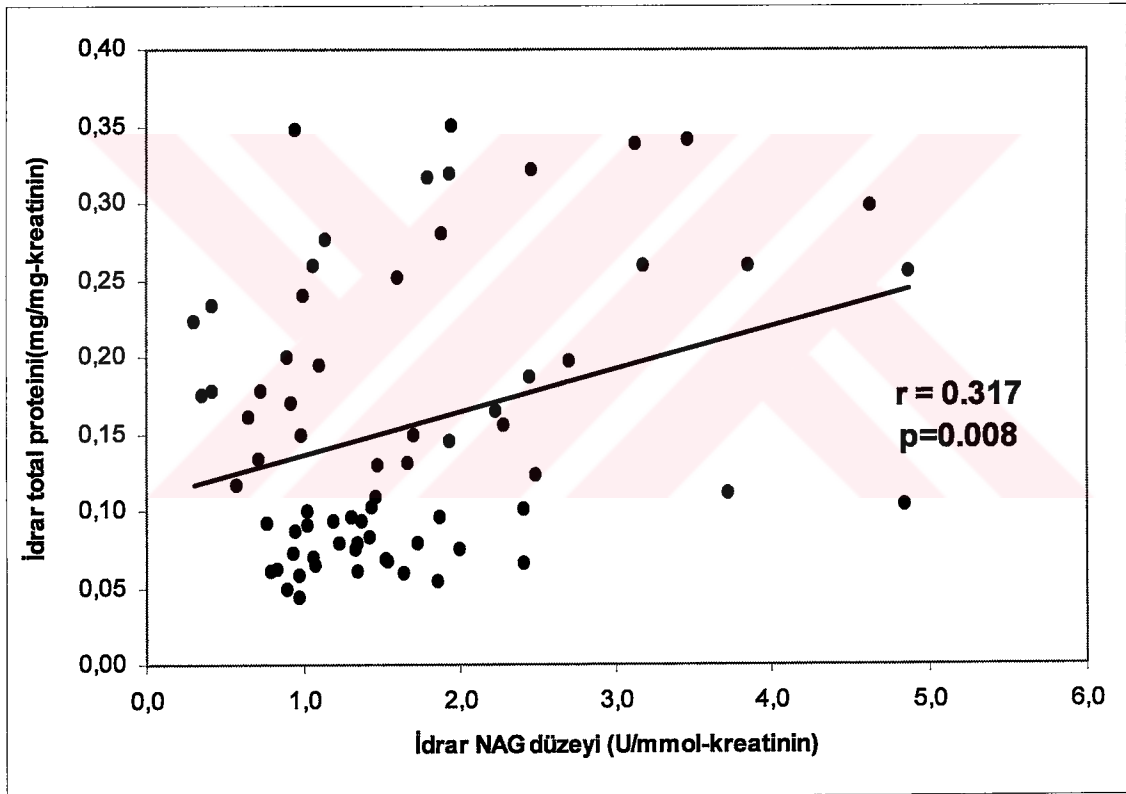


Şekil-9. 0-14 yaş arasındaki bireylerin kan kurşun seviyelerine göre idrar NAG seviyelerinin gösterilmesi

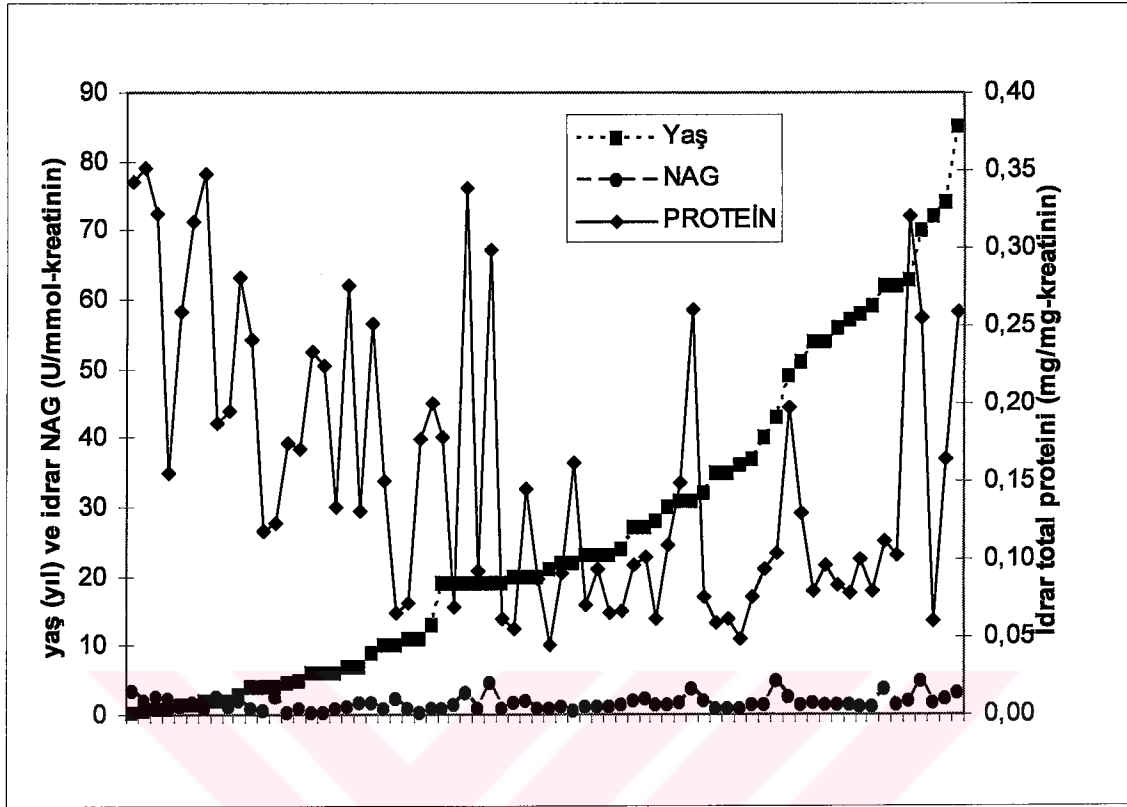
IV.B.2. SAĞLIKLI BİREYLERDE İDRAR NAG ve İDRAR TOTAL PROTEİN ATILIMININ KARŞILAŞTIRILMASI:

Çeşitli nedenlerle hastahanemize başvurmuş, sağlıklı olduğu bilinen 4ay-85 yaş arasındaki 70 bireyde idrar NAG aktivitesi ile idrar total protein atılımını arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Çalışma sonucunda, iki parametre arasında pozitif korelasyon gözlemlendi ($r=0.317$, $p=0.008$) (Şekil-10). Bu ilişki yaştan bağımsızdı (Şekil-11).



Şekil-10. Sağlıklı bireylerde idrar NAG düzeyleri ile idrar protein atılımlarının karşılaştırılması



Şekil-11. Yaşa bağımlı idrar NAG aktivitesi ve idrar total protein atılımı arasındaki ilişki

V- TARTIŞMA VE SONUÇ

Böbreklerde meydana gelen glomerüler hasarın değerlendirilmesinde çeşitli göstergeler (serum kreatinin ve üre, kreatinin klirensi vb.) rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılırken, tubüler hasarın değerlendirilmesinde biyokimyasal göstergeler sınırlıdır. Bu amaçla, idrarda alkalin fosfataz (ALP), gama-glutamil transferaz (GGT), lösin aminopeptidaz (LAP), alanin aminopeptidaz (AAP), beta-galaktozidaz (GAL), nötral endopeptidaz (NEP), alfa glukozidaz ve N-Asetil-β-D glukozaminidaz (NAG) ölçümü kullanılmaktadır. Ne var ki, değerlendirilecek molekülün dayanıklılığı ve 24 saat idrar toplamının zorluğu bu göstergelerin çoğunun kullanılmasını kısıtlamaktadır. Bu göstergelerin arasından NAG öne çıkmaktadır (1,2,10,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22,28).

Tubüler hasarın değerlendirilmesinde en çok kullanılan enzim NAG'dır. Kaynaklarda idrarla atılan N-Asetil-β-D-glukozaminidaz (NAG) enziminin stabilitesinin (dayanıklılığı) yüksek olduğu ve dondurularak aktivitesini uzun süre koruduğu ileri sürülmektedir. Ayrıca, idrar NAG aktivitesinin kreatinine oranlanması ile spot idrarla çalışmak suretiyle bu enzimin rutin klinik laboratuvarlarda kullanılabileceği bildirilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, idrarla atılan NAG aktivitesinin ölçümünün böbrekteki tubüler hasarının değerlendirilmesinde en uygun test olduğu belirtilmektedir (1,2,14,28).

Biz de bu doğrultuda, böbrek tubül hasarının değerlendirilmesine olanak sağlayan, rutinde kullanılabilecek idrar NAG yöntemi üzerinde çalıştık. Xu ve arkadaşlarının metodunu (27) modifiye ederek irdledik ve klinik kullanımını değerlendirdik.

Metot irdemesi çalışmasında metodun tekrarlanabilirliğini saptamak için normal ve yüksek seviyelerde NAG aktivitesine sahip iki örnekle çalıştık. Değişim katsayısı sonuçları, gün içi tekrarlanabilirlik için normal ve yüksek seviyedeki örneklerde sırasıyla, %2.62 ve %3.61; günler arası tekrarlanabilirlikte ise %5.97 ve %5.7 olarak saptandı.

Sonuçta, idrarda NAG ölçümleri değişim katsayısı değerleri, rutin çalışma için uygun bulundu.

Xu ve ark (27) tarafından ortaya konan değişim katsayısı değerleriyle karşılaştırıldığında gün içi değerlerimiz benzer, günler arası değerlerimiz ise hafif yüksek olarak saptandı. *Nix ve ark* (10) tarafından saptanan CV değerlerinden ise hafif yüksekti.

Tubüler hasarda idrar NAG seviyesi arttığından, belli aralıklarla test tekrarlanarak hasarın seyri de değerlendirilebilir. Bu noktada, kantitatif ölçüm değer kazanmaktadır. Bu durumda doğrusallığın tespiti laboratuvar kaynaklı hataları en aza indirecektir.

Metodun doğrusallığının tespiti için 0-200 U/L arasında hazırlanan örneklerde idrar NAG ölçümleri yapıldı ve bunlar gerçek değerleriyle karşılaştırıldı. Yöntemin 4-100 U/L arasında doğrusal olduğu, analitik duyarlılığın ise 4 U/L olduğu saptandı. 100 U/L değerlerini aşan konsantrasyonlarda uygun dilüsyonların yapılması daha iyi sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır. Şimdiye kadar laboratuvarımıza >100 U/L olan sadece bir idrar örneği gönderildi.

Yöntemin manuel olması ve sık yapılan bir test olmaması nedeniyle reaktifin ve örneğin depolanmasında problemler olması beklenebilir. Bu olası problemleri aşabilmek için, reaktiflerin ve örneklerin dayanıklılıklarını belirlemek gerekir.

Reaktif ve örnek dayanıklılıklarını değerlendirdiğimiz çalışmada buzdolabında +4°C ve -30°C'de muhafaza edilen reaktiflerin 30 gün boyunca dayanıklılıklarını koruduğunu gözledik. Bununla birlikte -30°C'de saklanan idrar örneklerinde NAG aktivitesinin 15. günden sonra %20-25 düştüğü gözlemlendi.

Sonuç olarak reaktifin hazırlandıktan sonra uygun porsiyonlar halinde ister buzdolabında ister -30°C derin dondurucuda en azından 30 gün saklanabileceği sonucuna varıldı.

Sitrat tampon ile hazırlanan 4-Nitrofenil N-asetil beta-D-glukozaminid substratının dayanıklılığı konusunda kısıtlı bilgiye ulaşılmıştır. -25°C'de altı ay dayandığı bir kaynakta belirtilmiştir (2).

Örnek aktivitesinin 30. günde %20-25 azalması ise, daha kesin sonuçlar elde etmek için, -30°C'de en fazla 15 gün saklanmalarının uygun olacağına işaret etmektedir.

Bizim yaptığımız referans değeri çalışmalarında sağlıklı oldukları bilinen, çeşitli yaş gruplarındaki 70 bireyin idrar NAG düzeyleri ölçüldü. Sonuçlar çocuk yaş gruplarına ayrılarak değerlendirildi. Elde edilen sonuçlara göre, yaş ile idrar NAG konsantrasyonları arasında çok düşük anlamlı bir korelasyon görüldü ($r=0.286$; $p=0.016$). Bizim sonuçlarımıza göre, yaşlara göre referans aralığı belirlenmesi yerine toplumun tümüne bir tek referans aralığı belirlenmesinin daha uygun olacağı belirlendi.

Xu ve arkadaşlarınca yapılan çalışmada referans değerlerine değinilmiştir. Değerler çeşitli yaş gruplarına ayrılmıştır. Referans değerler, 7 yaşına kadar düşmekte, bu yaştan sonra değişmemektedir (27).

Yaptığımız klinik çalışmalarda sağlıklı bireylerde idrar NAG düzeyi ile idrar total protein düzeyleri arasında korelasyon saptadık ($r=0.317$, $p=0.008$). Sağlıklı bireylerde idrar NAG düzeyi ile proteinüri arasındaki ilişkiyi değerlendiren yeterli bilgiye ulaşılamadı.

Sonuç olarak, sağlıklı bireylerdeki proteinüri ile idrar NAG seviyeleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için, daha ileri çalışmaların yapılması uygun olacaktır.

Düşük molekül ağırlıklı proteinler glomerüler bazal membrandan kolayca filtre olurlar ve tamamına yakını proksimal tubül epitel hücrelerince geri emilir. Proksimal tubül disfonksiyonunda idrarda düşük molekül ağırlıklı protein artar. İdrar protein ve NAG düzeyleri arasındaki ilişkiye daha önceden nefropatili veya nefrolitiazisli hastalarda ve proteinürlü çocuklarda değinilmiştir. Proteinüri ile idrar NAG düzeyleri arasında ilişkinin varlığı toksik nefropatide gösterilmiş, nefrolitiaziste gösterilememiştir. Ayrıca, *Çalışkan ve ark* da proteinürlü çocuklarda proteinüri ile idrarla NAG atılımı arasında güçlü bir ilişki göstermişlerdir (12,23).

Kadmiyum ve kurşun gibi çeşitli ağır metallerin sıklıkla, proksimal tübüler disfonksiyona ve glomerüler hasara neden olmak suretiyle böbrek hastalığıyla ilişkili olduğu eskiden beri bilinmektedir. Ayrıca kurşun, hipertansiyon ve tübülointerstisyel nefrite de neden olmaktadır(6,7).

Sağlıklı oldukları bilinen çocuk yaş grubu 54 bireyde yapılan ölçümlerde, kan kurşun seviyesi ≥ 5 $\mu\text{g/dL}$ olan gruptaki idrar NAG düzeyleri, <5 $\mu\text{g/dL}$ olan gruptan istatistiksel olarak yüksek ($p=0.031$) çıkmıştır.

Sonuç olarak, kurşun zehirlenmesinde olduğu gibi, böbreğin etkilendiği çoğu durumda idrar NAG düzeyleri artmaktadır.

Ayrıca, gentamisin, siklosporin, asiklovir (intravenöz), penisilin ve türevleri gibi ilaçlarla tedavi edilen hastalardan, idrar NAG seviyesi ölçümü için laboratuvarımıza idrar örnekleri gönderilmektedir. Sonuçlar ilaç rejiminin yeniden düzenlenmesinde kullanılmaktadır.

Sonuç olarak, irdelemiş olduğumuz spektrofotometrik idrar NAG ölçüm metodunun tekrarlanabilirliğinin, $<10\%$ değişim katsayısı değerleriyle, uygun olduğu; 4-100 U/L değerleri arasında doğrusal olduğu ve bunun klinik kullanım için uygun

olduğu; substratın +4°C ve -30°C’de 30 gün dayandığı gözlenmiştir. Bu  alışma ile, reaktifleri laboratuvarımızda hazırlanan, basit spektrofotometrik idrar NAG  l  m , laboratuvarımıza kurulmuş ve böbrek tubüler hasar göstergesi olarak rutin klinik kullanımına kazandırılmıştır.



VI- ÖZET

Bu çalışmada, idrarda N-asetil- β -D-glukozaminidaz (NAG) enziminin spektrofotometrik bir ölçüm metodu irdelendi ve rutin klinik laboratuvarlarda kullanılması için değerlendirmeler yapıldı.

İdrarla birlikte yaklaşık elli kadar enzim fizyolojik olarak atılmaktadır. Bunların çoğunun dayanıklı olmaması, ölçümlerinin klinik kullanımını kısıtlamaktadır. Ancak idrardaki NAG, tubüler hücre kaynaklıdır ve aktivitesini uzun süre korumaktadır. Molekül ağırlığının büyük olması nedeniyle NAG, glomerüllerden filtre edilmediğinden, tubüler fonksiyonun bir göstergesidir. İdrardaki artışı tubüllerden aşırı serbestleşmesini ve böylece tubüler hasarı göstermektedir.

Bizim yaptığımız çalışmada metodun 4-100 U/L aktivite değerleri arasında doğrusal olduğu bulundu. Analitik sensitivitesi 4 U/L olarak saptandı. Normal ve yüksek aktivitelere yapılan gün içi ve günler arası çalışmalarda değişim katsayısı değerleri sırasıyla %2.62 ve %3.61 ile %5.97 ve %5.7 olarak tespit edildi ve bu değerler klinik kullanım için uygun bulundu. Referans aralık çalışmasında 70 sağlıklı bireyden elde edilen sonuçlara göre tüm yaş grupları için 0-3.72 U/mmol-kreatinin aralığı saptandı. Sonuçlar genel olarak yayınlanmış referanslarla uyumlu bulundu.

Substratın (4-Nitrofenil N-asetil beta-D-glukozaminid) en az 30 gün boyunca, +4°C'de buzdolabında ve -30°C'de derin dondurucuda dayanıklılığını koruduğu gözlemlendi. Örneklerin ise -30°C'de derin dondurucuda 15 gün boyunca dayandığı, 30. günde ise idrar NAG aktivitesinde %20-25 civarında kayıp olduğu gözlemlendi.

Metodun klinik uygulama çalışmalarında, sağlıklı bireylerde idrar NAG düzeyleri ile idrar total protein atılımı arasındaki ilişkiyi inceledik ve iki parametre arasında pozitif korelasyon bulduk ($p=0.008$). Kan kurşun seviyeleri ile idrar NAG düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılmasında ise, kan kurşun seviyesi $>5 \mu\text{g/dL}$ olan grupta idrar NAG seviyeleri, kan kurşun seviyesi $<5 \mu\text{g/dL}$ olan gruba göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ($p=0.031$).

Sonuç olarak, reaktifleri laboratuvarımızda hazırlanan, basit spektrofotometrik idrar NAG ölçüm metodu, laboratuvarımıza kurulmuş ve böbrek tubüler hasar göstergesi olarak rutin klinik kullanıma kazandırılmıştır.

VII- SUMMARY

In this study, a spectrophotometric method for measurement of urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG) was used and the value of the use of this test in clinical laboratory was evaluated.

About fifty enzymes are excreted into urine physiologically. The practical use of the measurement of these enzymes is limited because of their instability in urine. However, urinary NAG, which originates from renal tubular cells, is stable in urine. Since it is not filtered from glomeruli because of its high molecular weight, NAG is a marker of tubular function. Elevated levels of this enzyme indicate renal tubular damage regarding to oversecretion from tubular cells.

In our study, we found that the method was linear between 4-100 U/L, analytical sensitivity was 4 U/L, intraassay and interassay precisions for normal and higher enzyme activities were 2.62%, 3.61%, and 5.97% and 5.7%, respectively, and these results were found to be suitable for clinical use. In the reference range study, according to the results of 70 healthy subjects, a range of 0-3.72 U/mmol-creatinine was obtained. The results were found compatible with published references.

The substrate (4-Nitrophenyl N-acetyl beta-D-glucosaminide) was stable either at +4°C or -30°C for at least 30 days. Samples were observed to be stable for 15 days at -30°C and to lose about 20-25% of their activity at the 30th day.

In the clinical application of this method, we investigated the relationship between urinary NAG levels and urinary total protein excretion and found a positive correlation between these two parameters ($p=0.008$). In subjects screened for blood lead levels, urinary NAG levels were found statistically higher in the group with blood lead levels $>5 \mu\text{g/dL}$ than the group having $<5 \mu\text{g/dL}$ ($p=0.031$).

As a result, a spectrophotometric method for measurement of urinary NAG using home made reagents was started in our laboratory for the purpose of routine clinical use as a marker of renal tubular injury.

VIII- KAYNAKLAR

1. Noyan T., Şekeroğlu M.R., Dülger H.: N-Asetil- β -D Glukozaminidaz ve Böbrek Hastalıklarında Kullanımı, Van Tıp Dergisi, 7(2): 80-83,2000
2. Price R.G.: Measurement of N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase and its Isoenzymes in Urine Methods and Clinical Applications, Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 30: 693-705, 1992
3. O'Brien J.F.: Lysosomal Storage Disease, In "Tietz Textbook of Clinical Chemistry" Ed. Burtis C.A. and Ashwood E.R., 1776-1787, W.B.Saunders, third ed., Philadelphia, 1999
4. IUBMB Enzyme Nomenclature EC 3.2.1.52,
<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/2/1/52.html>
5. Hultberg B., Isaksson A., Krutzen E., Nilsson-Ehle P.: Urinary Excretion of N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Normal and Complicated Pregnancy, J.Clin. Chem. Clin. Biochem 27: 487-489,1989
6. Tassi C., Abbritti G., Mancuso F., Morucci P., Feligioni L., Muzi G.: Activity and Isoenzyme Profile of N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Urine from Workers Exposed to Cadmium, Clinica Chimica Acta, 299: 55-64, 200
7. Newman D.J. and Price C.P.: Renal Function and Nitrogen Metabolites, In "Tietz Textbook of Clinical Chemistry" Ed. Burtis C.A. and Ashwood E.R., 1204-1270, W.B.Saunders, third ed., Philadelphia, 1999
8. Choudhury D., Ahmed Z.: Drug-Induced Nephrotoxicity, Medical Clinics of North America, 81(3): 705-717,1997
9. Assadamongkol K., Tapaneya-Olarn W., Chatasing S.: Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) in Aminoglycoside Nephrotoxicity, J Med Assoc Thai, 72(1): 42-46, 1989
10. Nix D.E. , Thomas J.K., Symonds W.T., Spivey J.M., Wilton J.H., Gagliardi N.C., Schentag J.J.: Assessment of the Enzymuria Resulting from Gentamisin Alone and Combinations of Gentamisin with Various β -Lactam antibiotics, Ann Pharmacother, 31: 696-703, 1997
11. Wiland P., Swierkot J., Szechinski J.: N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Urinary Excretion as an Early Indicator of Kidney Dysfunction in Rheumatoid Arthritis Patients on Low-Dose Methotrexate Treatment, British Journal of Rheumatology,

36: 59-63, 1997

12. Neimark A., Fidirkin A., Celovalnikova I.: Enzymuria as Early Marker of Interstitial Nephritis, *International Urology and Nephrology*, 29(2): 137-140, 1997
13. Navarro J.F., Mora C., Muros M., Macia M., Garcia J.: Effects of Pentoxifylline Administration on Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Excretion in Type 2 Diabetic Patients: A Short-Term, Prospective, Randomized Study, *American Journal of Kidney Diseases*, 42(2): 264-270, 2003
14. Kavukçu S., Soylu A., Türkmen M.: The Clinical Value of Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Levels in Childhood Age Group, *Acta Med. Okayama*, 56(1): 7-11, 2002
15. Huang H.S., Chen C.F., Chien C.T., Chen J.: Possible Biphasic Changes of Free Radicals in Ethylene Glycol-induced Nephrolithiasis in Rats, *BJU International*, 85: 1143-1149, 2000
16. Awad H., El-Safty I., El-Barbary M., Imam S.: Evaluation of Renal Glomerular and Tubular Functional and Structural Integrity in Neonates, *The American Journal of the Medical Sciences*, 324(5): 261-266, 2002
17. Houser M.T.: The Effect of hydropenia and Oral Water Loading on Renal Lysozyme Handling and N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase Excretion in Man, *Ann Clin Biochem*, 23: 453-457, 1986
18. Krishna K.s., Kirubakaran M.G., Pandey A.P., Kanagasabapathy A.S.: Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase and Aminopeptidase N in the Diagnosis of Graft Rejection After Live Donor Renal Transplantation, *Clinica Chimica Acta*, 150: 69-85, 1985
19. Vigano A., Assael B.M., Villa A.D., Gagliardi L., Principi N., Ghezzi P., Salmona M.: N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) and (NAG) Isoenzymes in Children with Upper and Lower Urinary Tract Infections, *Clinica Chimica Acta*, 130: 297-304, 1983
20. Alderman M.H., Melcher L., Drayer D.E., Reidenberg M.M.: Increased Excretion of Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Essential Hypertension and its Decline with an antihypertensive Therapy, *The New England Journal of Medicine*, 309(20): 1213-1217, 1983
21. Tataranni G., Farinelli R., Zavagli G., Logallo G., Farinelli A.: Tubule Recovery After

- Obstructive Nephropathy Relief: The Value of Enzymuria and Microproteinuria, The Journal of Urology, 138: 24-27, 1987
22. Tataranni G., Zavagli G., Farinelli R., Malacarne F., Fiocchi O., Nunzi L., Scaramuzzo P., Scorrano R.: Usefulness of the Assessment of Urinary Enzymes and Microproteins in Monitoring Cyclosporin Nephrotoxicity, 60: 314-318, 1992
 23. Çalışkan S., Hacıbekiroğlu M., Sever L., Özbay G., Arısoy N.: Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase and β_2 -Microglobulin Excretion in Primary Nephrotic Children, Nephron, 74: 401-404, 1996
 24. Costigan M.G., Rustom R., Bone M.J., Shenkin A.: Origin and Significance of Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase (NAG) in Renal Patients with Proteinuria, Clinica Chimica Acta, 255: 133-144, 1996
 25. Lufft V., Hoogestraat-Lufft L., Fels L.M., Egbeyong-Baiyee D., Tusch G., Galanski M., Olbricht C.J.: Contrast Media Nephropathy: Intravenous CT Angiography Versus Intraarterial Digital Subtraction Angiography in Renal Artery Stenosis: A Prospective Randomized Trial, American Journal of Kidney Diseases, 40(2): 236-242, 2002
 26. Fortes M.A., Andriolo A., Ortiz V., Srougi M.: Effect of Shock Wave Reapplication on Urinary N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase in Canine Kidney, Int Braz J Urol., 30: 148-154, 2004
 27. Xu G., Zhu L., Hong J., Cao Y., Xia T.: Rapid Colorimetric Assay of Urinary β -Galactosidase and N-Acetyl- β -D-Glucosaminidase With Cobas Mire Auto-Analyzer, Journal of Clinical Laboratory Analysis, 13: 95-98, 1999
 28. Noyan T., Şekeroğlu M.R., Dülger H.: Böbrek Hasarı Markerlerinin değerlendirilmesinde 24 saatlik ve spot idrar kullanımı arasında fark var mıdır?, Klinik Laboratuar Araştırma Dergisi, 5(2): 53-57, 2001