

N-Asetil-β-D Glukozaminidaz ve Böbrek Hastalıklarında Kullanımı

Tevfik Noyan, M. Ramazan Şekeroğlu, Haluk Dülger

Özet: N-asetil-β-D glukozaminidaz (NAG), böbrek hastalıklarının ve hasarının taranması amacıyla çok geniş kullanım alanına sahip bir idrar enzimidir. Bu enzim proksimal tubül lizozomlarında bulunan glikozidazların en aktifidir. Yüksek moleküler ağırlığına bağlı olarak (M.A. ≥ 1300000 dalton) glomerüllerden filtrasyona uğramaz, bu nedenle idrarda miktarının artması tubüler hasarın duyarlı bir göstergesidir. Böbrek hastalığının ve hasarının farklı evrelerinde idrar NAG izoenzim profili değişmektedir. Bu makalede, NAG ve böbrek hastalıklarındaki kullanımı ile ilgili literatür bilgileri özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: NAG, İzoenzim, Renal hastalık

Böbrek hastalıklarının teşhisi ve böbrek hasarının ortaya çıkarılması amacıyla idrar enzimlerinin ölçümü klinikte geniş kullanım alanına sahiptir. Böbrekler tarafından idrara birçok enzim salınmasına rağmen, bu enzimlerin bir çoğu stabil değildir ve bu nedenle sınırlı kullanım alanına sahiptir. Bu enzimler arasında yer alan N-asetil-β-D glukozaminidaz (NAG; 2-acetamidodeoxy-β-glucoside acetamidodeoxyglucohydrolase, EC 3.2.1.30) böbrek hastalıklarının ve hasarının ortaya çıkarılması amacıyla çok geniş kullanım alanına sahiptir. NAG yaklaşık olarak 130.000 dalton molekül ağırlığına sahip olup, idrara çıkan stabil bir glikolitik enzimdir. Özellikle böbrek proksimal tubül hücrelerindeki lizozomlarda yüksek miktarda bulunur (1). Yüksek molekül ağırlığı nedeniyle glomerülden filtre edilmez ve bu nedenle idrar konsantrasyonlarının artması proksimal tubüler hasarı veya lizozomların bütünlüğünün kaybolduğunu gösterir. Proksimal tubüllerde bulunan eksozitoz/ endositoz transport sistemi, normal bireylerde lizozomal enzimlerin çok düşük miktarlarının atılımına neden olur. Endositoz/eksozitoz transport sistemi birbirine eşit ve zıt yönde gerçekleşen enerji bağımlı bir mekanizma aracılığıyla gerçekleşmektedir. Çeşitli nedenlere bağlı olarak bu sistem kolaylıkla tahrip olabilir ve sonuç olarak lizozomal enzim olan NAG fazla miktarda idrarla dışarı atılır. Doku ve vücut sıvılarına özgü NAG izoenzimlerinin bulunması değişik hastalıklarda bu enzimin klinik kullanımının önemini daha da artırmıştır (1,2).

NAG İzoenzimleri

NAG; lizozomal hidrolazlar arasında en çok aktif olanıdır. Isıya dayanıklılığı ve net

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, Van
Yazışma adresi: Dr. Tevfik NOYAN
Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD, VAN

yüklerinin farklılıklarına göre dokularda esas olarak NAG-A ve NAG-B formunda bulunur. A izoenziminin izoelektrik noktası 5.4 iken B izoenziminin izoelektrik noktası 7.9'dur. Bu özellik izoenzimlerin iyon değiştirici kromatografi ve elektroforezde farklı noktalara göç etmelerine neden olur. NAG izoenzimlerinin yapısındaki farklılıklar iki izoenzimin farklı fiziksel özelliklere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (3). A ve B şeklinin yapısal bileşimi farklıdır. A izoenzimi α ve β subünitelerinin birleşiminden oluşmuştur. B izoenzimi 2 ya da 4 β subünitinin birleşiminden oluşmuştur. Bu yapısal özelliğinden dolayı α zincirinde oluşan mutasyonlar yalnızca A izoenziminde yetmezliğe yol açarken, β subünitindeki mutasyonlar hem A hem de B izoenzimindeki yetersizliğe yol açmaktadır. İzoenzimlerin substrat özgünlüğü farklıdır. A formu yalnızca G_{M2} gangliozidlere karşı yüksek aktiviteye sahiptir ve substrat olarak N-acetylhexosaminide β bağıyla bağlı aglikon ya da şeker üzerindeki asidik grupları ortadan kaldırmaktadır (2).

Bu izoenzimlerin klinikte en çok ilgi çeken kullanım alanı otozomal resesif genetik geçişe sahip Tay-Sachs hastalığı ve Sanndhoff's hastalığıdır. Lizozomal depo hastalıkları arasında yer alan Tay-Sachs hastalığında A izoenziminde (β-NAG-A; Hex A) yetmezlik vardır. Hex A G_{M2} gangliozidlerdeki galaktoz ve N-acetyl-galaktozamin arasındaki β(1-4)-glikozid bağına hidroliz etmektedir. Bu enzimin yokluğu G_{M2} gangliozidlerin nöronlarda depolanması ile sonuçlanmaktadır. Sanndhoff's hastalığı daha nadir olarak gözükmemektedir Bu hastalıkta enzimin A ve B (β-NAG-B; Hex B) formunda yetmezlik vardır (3).

Serumda bulunan A ve B'nin miktarını ölçmek için enzim 60 °C de 10 dakika ısıtılır. Hex A ısıya

karşı dayanıksızdır. Bu yüzden enzimin yapısında çözünme meydana gelecektir. Daha sonra 4-methylumbelliferyl 1-N-acetyl-β-D-glucosaminide-6-sulfat substratıyla işleme tabi tutulur. DEAE-selülozla yapılan iyon değiştirici kolon kromatografisinde A ve B izoenzimleri arasında yer alan I₁ ve I₂ olarak isimlendirilen bantlar yer almaktadır. Serumda bulunan A izoenzimi böbrek ve dalakta bulunandan farklıdır ve As olarak isimlendirilmektedir. Diğer çok az bulunan formlar C, S ve gebe kadınlarda bulunan P formudur (2).

Price ve ark. (4) elektroforez tekniği kullanarak NAG izoenzimlerinin idrardaki değişimlerini incelemişler ve ilk olarak elektroforez tekniği kullanarak B formunun idrarla atılımının arttığını göstermişlerdir. Elektroforezde uygulama noktasında B formu, bunu takiben arada yer alan izoenzimler ve son olarak A formu yer alır (1).

Sağlıklı kişilerin idrarında A izoenzimi baskın olan formdur. Toplam NAG aktivitesinin arttığı hastalarda B izoenzimi baskın hale gelmektedir. As izoenzimi normalde böbrekte bulunmamasına rağmen glomerüler hasar oluşan bir hastanın idrarında As izoenzimi tesbit edilmiştir (2) Vigano ve ark. (5) üst idrar yolu enfeksiyonuna sahip çocuklarda B izoenzimlerinin idrarda arttığını tesbit etmişlerdir. Kind (6) renal transplantasyon ve büyük cerrahi operasyonlar sonrasında hastaların takibinde; büyük cerrahi operasyonlar sonrasında ara formların yüzdesi artarken, renal transplantasyon reddinde daha düşük artmalar meydana geldiğini tesbit etmiştir. Whiting ve ark. (7) renal rejeksiyonda A/B oranının azaldığını ve ara formlarda çok az değişme olduğunu tesbit etmişlerdir. Gibey ve ark. (8) bazı aminoglikozidlerin alımının B ve ara formlarda artışa neden olduğunu göstermişlerdir. Yine Mozer ve ark. (9) tarafından lizozomal enzimler üzerine aminoglikozidlerin direkt etkileri gösterilmiştir. Bu araştırmacılar antibiotik ve enzim arasındaki direkt etkileşime bağlı olarak aminoglikozidlerin terapötik dozlarının NAG ve izoenzimlerinin aktivitesinin % 60' dan daha fazlasını inhibe ettiklerini rapor etmişlerdir. İdrar ve serum NAG aktivitesi diabetik hastalarda yükselmektedir. Jung ve ark. (10) 36 insüline bağımlı diabetik hasta ve 30 sağlıklı kontrol grubunda yaptığı çalışmada klinik olarak proteinürisi bulunan bütün diabetik hastalarda NAG enziminin idrardaki düzeyinin arttığını bulmuşlardır. Bizim yaptığımız bir çalışmada, normal böbrek fonksiyonuna sahip tip 2 diabetes mellituslu hastalarda, sağlıklı kontrollere göre idrar NAG aktivitesinde önemli oranda artış olduğu tesbit edilmiştir (11). Normal bireylerle karşılaştırıldığında diabetik hastalarda B izoenzimlerinin serumdaki miktarı düşerken,

idrardaki miktarında bununla doğru orantılı olarak artmaktadır. NAG izoenzimlerinin diabetik hastaların kontrolünde duyarlı bir gösterge olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (2).

Renal Hastalık ve Hasarda NAG'ın Önemi

Böbrek farklı hücre tipleri içermektedir. Bu hücrelerin öncelikli görevi glomerüler filtrasyon, tübüler reabsorbsiyon, sekresyon ve metabolitlerin konsantre edilmesidir. Böbrek kompleks bir yapıya sahip olmasına rağmen, toksik hasar ve hastalıklara karşı sınırlı sayıda yollarla cevap vermektedir. Noninvaziv testler morfolojik, fonksiyonel ve biyokimyasal düzeydeki değişimleri yansıtmaktadır. Bununla birlikte, böbrekte oluşan hücre yaralanmasına cevap olarak oluşacak erken dönemdeki enzim salınımı hakkında çok az şey bilinmektedir. İdrar enzimleri hücre hasarı ya da özellikle etkilenen bölgenin yeri hakkında bilgi sahibi olmamıza yardımcı olurken, hastalığın tipi hakkında bize bilgi vermezler. Böbrek hastalıklarında kullanılan fonksiyonel testlerin birçoğunun duyarlılığını kaybetmesinden dolayı sorunlar artarak çoğalmaktadır. Böbrek hastalığının erken döneminde teşhis konularak hastalığın ilerlemesi önlenmelidir. Toksinlere ya da hastalıklara bağlı olarak oluşan böbrek hasarının erken dönemde taranması ve hastalığın ilerlemesinin takibinde non invaziv bir test olan NAG'ın önemli bir rolü vardır. NAG'ın otomatik ya da manuel yolla ölçümü klinik biyokimya laboratuvarlarında mümkün olup halk sağlığı çalışmalarında popülasyondaki risk oranının ortaya çıkarılması amacıyla kullanılmaktadır. NAG renal fonksiyonlarda gerileme oluşmadan önceki dönemde böbrek hasarının şiddetini ölçmek için kullanılan duyarlı bir test yöntemidir. Proksimal tübüllere lokalizedir ve bu bölgenin fonksiyonlarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (2).

Sağlıklı bireylerde bu enzimin idrardaki miktarı çok düşüktür. Doğru ve duyarlı bir ölçüm yapmak için idrarda bulunan ürenin inhibitör etkisini ortadan kaldırmak gerekir, bu amaçla idrar numuneleri dilüe edilmelidir. Ölçüm esnasında oluşacak bir diğer hata idrar volümüne bağlı olarak oluşacak değişimlerdir. NAG ölçümü için 24 saatlik idrar toplamak zordur ve nadiren bu yöntem kullanılmaktadır. Ölçüm yapılan idrarda bulunan NAG düzeyini idrar kreatinin düzeyine oranlayarak idrar volümüne bağlı olarak oluşan değişimlerin bir kısmı ortadan kaldırılmış olunur. Diürez, bu enzimin idrarla atılımı üzerine çok az etkiye sahiptir. İdrarda bakterilerin bulunması

Tablo 1. Böbrek hastalıkları ve toksikolojide N- Acetyl- β - D- glukozaminidazın kullanımı

1. Kadmiyum ve civa gibi ağır metallerle oluşan zehirlenmeler, idrar yolu enfeksiyonları, aminoglikozid, cis-platinum ve siklosporin A gibi nefrotoksik ilaçların kullanımına bağlı olarak oluşan nefrotoksitenin erken dönemde gösterilmesi amacıyla,
2. Operasyonlar esnasında böbrekte oluşan anoksik epizodların iyileşme döneminin takibi amacıyla,
3. Diabet, hipertansiyon, romatoid artrit bağli oluşan sekonder böbrek hasarının izlenmesi amacıyla,
4. Nefrotoksik ilaçların kullanılmasına bağli olarak gelişen böbrek hasarı, transplantasyon yapılmış hastalarda oluşabilecek organ reddinin ve böbrek hastalıklarının izlenmesi ve takibi amacıyla, idrar NAG ölçümü yapılmaktadır.

ölçüm sonuçlarını etkilemez. İdrar NAG aktivitesinin ana inhibitörü üre olup, idrarda albumininde yüksek konsantrasyonlarda bulunmasının NAG aktivitesini etkileyebileceği bildirilmiştir (2,3).

NAG'ın böbrek hasarının göstergesinde kullanımını sağlayan faktörler şöyle sıralanabilir (12);

a) Böbrek tübüler hasarının çok yüksek oranda duyarlı bir göstergesidir.

b) Kullanılmakta olan böbrek fonksiyon testlerine göre daha erken dönemde idrardaki miktarı yükselmektedir.

c) Oluşan patolojik değişimlere paralel olarak idradaki miktarında artma meydana gelmektedir.

Bu özelliklerinden dolayı NAG böbreği ilgilendiren çeşitli durumlarda kullanım alanı bulmuştur. Pratikte NAG'ın kullanım alanları ile ilgili özet bilgi Tablo 1'de verilmiştir (2,1 2).

Tablo 1'den de görüldüğü gibi NAG giderek daha yaygın bir kullanım alanına sahip olmaktadır. NAG'ın noninvaziv ve kolayca uygulanabilir bir test olmasından dolayı gelecek yıllarda renal hastalıkların ve nefrotoksitenin taranması amacıyla rutin klinik pratikte kullanılabilecek önemli testler arasında yer alacağı görüşünü taşımaktayız.

N-Acetyl - β -D Glucosaminidase and Its Use in Renal Diseases

Abstract: *N-acetyl - β -D glucosaminidase (NAG) is the most widely used urinary enzyme assay for the assessment of renal disease and the detection of nephrotoxicity. It is the most active of glycosidases found in the lysosomes in the proximal tubule. An increase in NAG activity in urine is a sensitive test for renal tubular damage, since its relative molecular mass ($M.W. \geq 130000$) precludes its filtration by the glomerulus. The isoenzyme profile of NAG in urine varies at different stages of renal disease and damage. In this paper, NAG and knowledges which are its use in renal diseases are summarized.*

Key words: NAG, isoenzyme, renal disease.

Kaynaklar

1. Furuhashi N., Shiba K., and Naro N.: N acetyl β -D- glucosaminidase, Nippon Rinsho; 53(5): 1267-76, 1995.
2. Price R.G.: Measurement of N acetyl β -D- glucosaminidase and its isoenzymes in urine methods and clinical applications, Eur. J. Clin. Biochem.; 30: 693-705, 1992.
3. Brien J.F.O.: The lysosomal enzymes, In "Tietz Textbook of Clinical Chemistry" Ed. Burtis C.A. and Ashwood E.R., 2149-2159, W.B. Saunders, second ed., London, 1994.
4. Price R.G., Dance N., and Edwards B.: The excretion of N acetyl β -D- glucosaminidase and β -D- galactosidase following surgery to the kidney, Clin. Chim. Acta.; 27: 65-72, 1972.
5. Vigano A., and Assoel B.M.: N acetyl β -D- glucosaminidase(NAG) and NAG isoenzymes in children with upper and lower urinary tract infections, Clin. Chim. Acta.; 130: 297-304, 1983.
6. Kind P.R.N.: N acetyl β -D- glucosaminidase in urine of patients with renal disease and after renal transplants and surgery, Clin. Acta.; 119: 89-97, 1982.
7. Whiting P.H., and Peterson J.: Diagnostic value of urinary N acetyl β -D- glucosaminidase, its isoenzymes and the fractional excretion of sodium following renal transplantation, Clin. Chim. Acta.; 130: 369-376, 1983.
8. Gibey R., Dupond J.R., and Henry J.D.: Urinary N acetyl β -D- glucosaminidase(NAG) isoenzyme profiles: a tool for evaluating nephrotoxicity of aminoglycosides and cephalosporins, Clin. Chim. Acta.; 137: 1-11, 1984.
9. Mozer J.L., Gibey R., Dupond J.L., and Henry J.C.: Influences des aminoglycosides sur l'active de la N acetyl β -D- glucosaminidase(NAG) urinaire et de ses isoenzymes, Pathol. Biol.; 327: 230-234, 1988.
10. Jung K., Pergande M., and Schimke R.: Urinary enzymes and low molecular-mass proteins as indicators of diabetic nephropathy, Clin. Chim.; 34: 544-547, 1988.

11. Noyan T.: Tip 2 diabetik hastalarda N acetyl β -D-glucosaminidase, beta-2 mikroglobulin ve retinol bağlayıcı globulinin idrar atılımı, Uzmanlık tezi, Van, 2000
12. Flynn F.V.: Assesment of renal function: Selected developments, Clin. Biochemistry; 23: 49-54, 1990.