

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MAKROENZİM TESPİTİNDE KULLANILAN POLİETİLENGLİKOL
ÇÖKTÜRME VE ULTRAFİLTRASYON YÖNTEMLERİYLE CK, LDH,
AST, AMİLAZ İÇİN LABORATUVARIMIZDAKİ % RECOVERY
REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ VE
KARŞILAŞTIĞIMIZ MAKROENZİMLERİN TANISININ FARKLI
YÖNTEMLERLE DESTEKLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.MEHMET ÇİNGİRT

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ÖZLEM GÜLBAHAR

ANKARA

ARALIK 2016

T.C.

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**MAKROENZİM TESPİTİNDE KULLANILAN POLİETİLENGLİKOL
ÇÖKTÜRME VE ULTRAFİLTRASYON YÖNTEMLERİYLE CK, LDH,
AST, AMİLAZ İÇİN LABORATUVARIMIZDAKİ % RECOVERY
REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ VE
KARŞILAŞTIĞIMIZ MAKROENZİMLERİN TANISININ FARKLI
YÖNTEMLERLE DESTEKLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr.MEHMET ÇİNGİRT

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ÖZLEM GÜLBAHAR

ANKARA

ARALIK 2016

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	
KISALTMALAR.....	
ŞEKİL, TABLO VE RESİM LİSTELERİ.....	
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enzimler	
2.1.1. Aspartat Transaminaz Enziminin Genel Özellikleri.....	3
2.1.2. Aspartat Transaminaz Enziminin Tanısal Önemi.....	4
2.1.3. Aspartat Transaminaz Enziminin Ölçüm Yöntemleri.....	6
2.2.1. Amilaz Enziminin Genel Özellikleri.....	8
2.2.2. Amilaz Enziminin Tanısal Önemi.....	9
2.2.3. Amilaz Enziminin Ölçüm Yöntemleri.....	11
2.3.1. Kreatin Kinaz Enziminin Genel Özellikleri.....	14
2.3.2. Kreatin Kinaz Enziminin Tanısal önemi.....	16
2.3.3. Kreatinin Kinaz Enziminin Ölçüm Yöntemleri.....	18
2.4.1. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Genel Özellikleri.....	21

2.4.2. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Tanısal Önemi.....	23
2.4.3. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Ölçüm Yöntemleri.....	25
2.2. Makroenzimler.....	27
2.2.1. Tanım ve Genel Özellikler.....	27
2.2.2. Tarihçe.....	30
2.2.3. Makroenzim Tipleri.....	31
2.2.3.1. Tip 1 Makroenzimlerin Yapısı.....	31
2.2.3.2. Anti Enzim Antikorlarının Oluşum Mekanizmaları.....	32
2.2.3.3. Tip 1 Makroenzimlerin Klinik Önemi.....	34
2.2.3.4. Bazı Makroenzimlerin Karakteristik Özellikleri.....	35
2.2.3.4.1. Makroamilaz.....	35
2.2.3.4.2. MakroAST.....	36
2.2.3.4.3. MakroCK.....	37
2.2.3.4.4. MakroLDH.....	38
2.2.3.2. Tip 2 Makroenzimlerin Yapısı.....	39
2.2.3.4. Tip 2 Makroenzimlerin Klinik Önemi.....	42
2.2.3.5. Makroenzim Saptama Yöntemleri.....	43

2.2.3.4.1. Polietilenglikol Çöktürme Yöntemi.....	43
2.2.3.4.2. Ultrafiltrasyon Yöntemi.....	44
2.2.3.4.3. Makroenzim Saptamada Kullanılan Diğer yöntemler.....	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
3.1.Referans Aralık Çalışması İçin Bireylerin Seçimi.....	46
3.2. İmpresizyon Çalışması.....	47
3.3. Yöntemlerin Uygulanması.....	47
3.3.1. Polietilenglikol Çöktürme Yöntemi.....	47
3.3.2. Ultrafiltrasyon Yöntemi.....	47
3.4. Enzimlerin çalışılması.....	48
3.5. Polietilenglikol Çöktürme ve Ultrafiltrasyon Yöntemleriyle Saptanan Makroenzimlerin Tanısının Farklı Yöntemlerle Desteklenmesi.....	48
3.5.1. Kreatin Kinaz İzoenzim Elektroforezi.....	48
3.5.2. Laktat Dehidrogenaz İzoenzim Elektroforezi.....	49
3.5.3. Amilaz/kreatinin Klirensi Oranının Hesaplanması.....	50
3.6. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR	
4.1. İmpresizyon Çalışması Bulguları.....	51

4.2. Referans Çalışması Bulguları.....	52
4.3. Ultrafiltrasyon ve Polietilenglikol Çöktürme Yöntemleriyle Saptadığımız Makroenzim Vakalarının Tanısının Farklı Yöntemlerle Desteklenmesi.....	56
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ.....	76
7. KAYNAKLAR.....	77
8. ÖZET.....	90
9. SUMMARY.....	92
10. ÖZGEÇMİŞ.....	94

KISALTMALAR

ADP: Adenozin difosfat

ALP: Alkelen fosfataz

ALT: Alanin transaminaz

AST: Aspartat transaminaz

ATP: Adenozin trifosfat

CK: Kreatin kinaz

CNP: 2-kloro-p-nitrofenole

CNP-G3: 2-kloro-p-nitrofenil α -D-maltotriozidin

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

G7PNP: p-nitrofenil-maltoheptaozid

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry

Ig: İmmünglobulin

LDH: Laktat dehidrogenaz

NAD: Nikotinamid adenin dinükleotit

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

PEG: Polietilenglikol

ŞEKİL, TABLO VE RESİM LİSTELERİ

Şekil 1. AST Tepkime eşitliği

Şekil 2. AST Tepkime eşitliği

Şekil.3. Amilaz enziminin ölçüm yöntemi

Şekil 4. Kreatin kinaz enzimi reaksiyon denklemi

Şekil 5. Kreatin kinaz enziminin ölçüm yöntemi

Şekil 6. CK izoenzim elektroforezi örneklerinin şematik çizimi

Şekil 7. Laktat dehidrogenaz enzimi reaksiyon eşitliği

Şekil 8. Kolorimetrik LDH ölçüm yöntemi

Şekil 9. CK izoenzim bantlarını görünür hale getiren reaksiyon şeması

Şekil 10. LDH izoenzim bantlarını görünür hale getiren reaksiyon şeması

Tablo 1. Hiperamilazemi sebepleri

Tablo 2. Laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin doku yerleşimleri ve artış nedenleri

Tablo 3. Laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin referans aralıkları

Tablo 4. Mayo Klinikte makroenzim tanısı konmuş 42 vakanın hastalıkları

Tablo 5. Hasta serumlarından izole edilen tip 1 makroenzimler

Tablo 6. İmmünglobüline bağlı olmayan makroenzimler

Tablo 7. Polietilenglikol çöktürme yönteminin proteinlere etkisi

Tablo 8. Kalite kontrol materyali 1.seviye impresizyon sonuçları

Tablo 9. Kalite kontrol materyali 2.seviye impresizyon sonuçları

Tablo 10. 1. ve 2. grup referans bireylerin demografik verileri

Tablo 11. 1.gruptaki referans aralık sonuçları

Tablo 12. 2.gruptaki referans aralık sonuçları

Tablo 13. 1. ve 2.grup arasında PEG çöktürme yöntemiyle saptanan % recovery değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 14. 1. ve 2. grup arasında ultrafiltrasyon yöntemiyle saptanan % recovery değerlerinin karşılaştırılması

Tablo 15. Saptadığımız 3 makro CK vakasının verileri

Tablo 16. Saptadığımız 3 makro LDH vakasının verileri

Tablo 17. Saptadığımız 2 makro amilaz vakasının verileri

Resim 1. CK izoenzimlerinin jel görüntüsü

Resim 2. LDH izoenzimlerinin jel görüntüsü-1

Resim 3: LDH izoenzimlerinin jel görüntüsü-2

1. GİRİŞ

Makroenzimler, normal yapıdaki enzimlere göre daha yüksek molekül ağırlığına sahiptirler. Büyük oranda, enzimlerle immünglobülinlerin birleşmesi sonucu oluşurlar. Makroenzimler, tamamen sağlıklı insanlarda oluşabileceği gibi, otoimmün hastalıklar, maligniteler gibi bazı hastalıklarda da kandaki düzeyleri artabilir(1).

Makroenzimlerin yıkımı, normal yapıdaki enzimlere göre uzadığı için, makroenzime sahip kişilerde, ölçülen enzim değerleri yüksek bulunabilmektedir. Bu durum, klinisyenlerce, makroenzime sahip kişilerde enzim sonuçlarının yorumlanmasında zorluklara, bu kişilerden ek tahlillerin istenmesine, hatta invazif girişimlerin yapılmasına neden olabilmektedir(2). Bu bakımdan, makroenzimden şüphelenildiğinde tanısı konabilmelidir.

Makroenzimleri saptamada, Jel filtrasyon kromatografisi, ultrasantrifüj, elektroforez gibi komplike, külfetli metodlar vardır, ancak birçok laboratuvarında bu ekipmanlar mevcut değildir(3)

Makroenzimleri saptamada, polietilenglikol çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleri çalışması kolay ve çok sayıda hasta çalışmak için uygundur(4).

Literatürde, polietilen glikol çöktürme yöntemiyle makroenzimleri saptayabilmek için alınması önerilen % recovery değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda bu değer, enzim düzeyleri referans aralıklarının içinde olan bireylerde belirlenmişken, bazı çalışmalarda enzim düzeyleri referans aralığının üst limitinden yüksek bireylerde belirlenmiştir. Ayrıca, PEG çöktürme

işleminde kullanılan PEG konsantrasyonları ve santrifüj süreleri de farklılık göstermektedir(3,4) Ultrafiltrasyon yönteminde ise makroenzimler için yapılmış çalışma çok kısıtlıdır(4).

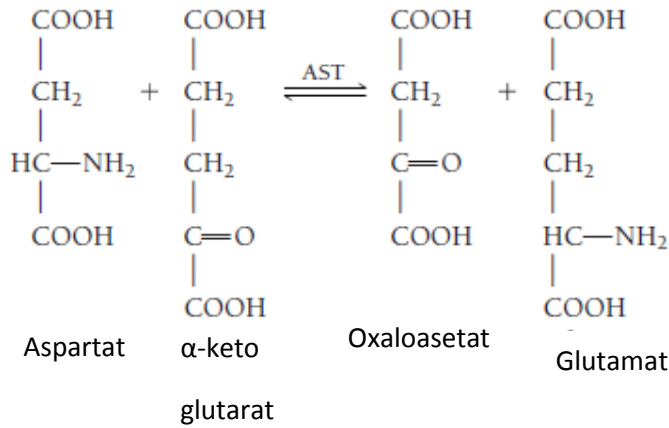
Bu çalışmada, yanlış tanı konulmasına yol açarak, gereksiz tetkikler, hatta invazif girişimler yapılmasına neden olabilecek makroenzimleri tespit edebilmek amacıyla, PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle CK, LDH, AST ve amilaz enzimleri için, laboratuvarımızda % recovery referans aralıklarını belirlemeyi amaçladık. Polietilenglikol çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle, CK, LDH, AST ve amilaz enzimleri için laboratuvarımızda % recovery referans aralıklarını, enzim düzeyleri referans aralıkları içinde görece sağlıklı bireylerde ve enzim düzeyi yüksek serumlarda ayrı ayrı belirledik. Ayrıca, kliniklerden makroenzim şüphesiyle danışılan veya Laboratuvar Bilgi Yönetim Sisteminde karşılaştığımız uygunsuz sonuçları bulunan hastalara ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme yöntemlerini uyguladık. Bu yöntemlerle karşılaştığımız makroenzim vakalarını, CK ve LDH enzimleri için elektroforez yöntemini, amilaz için ise amilaz/kreatinin klirensi oranını kullanarak konfirme ettik.

GENEL BİLGİLER

2.1. Enzimler

2.1.1. Aspartat Transaminaz Enziminin Genel Özellikleri

AST (Aspartat Aminotransferaz) transferaz ailesine ait bir enzimdir. Aspartat ve α -keto asitler arasında amino grup transferine katılmaktadır. Reaksiyon tersinirdir. Pridoksal 5 fosfat ve amino analogu pridoksamin 5 fosfat koenzim olarak görev yapmaktadır (5). Tepkime eşitliği Şekil 1’ de gösterilmiştir.



Şekil 1. AST Tepkime eşitliği

AST, insan dokusunda geniş dağılıma sahiptir. Kardiyak doku, karaciğer ve iskelet kasında yüksek konsantrasyonda, böbrek, pankreas ve eritrositlerde ise daha az miktarda bulunmaktadır (6). Hücrelerde, AST’nin sitoplazmik ve mitokondrial izoenzim formları bulunmaktadır. Bu formlar iki eş subunitten oluşmaktadır. AST izoenzimlerinin amino asit dizeleri yaklaşık %50 oranında benzerdir. Mitokondriyal formun molekül ağırlığı 90 400 Da, sitoplazmik formun

molekül ağırlığı ise 93 000 Da'dır. Sitoplazmik form, serumda en sık bulunan formdur. Mitokondriyal form ise özellikle karaciğerde fazladır ve karaciğer hücrelerinin aşırı dejenerasyonlarında ve nekrozunda serum düzeyleri artmaktadır(7).

2.1.2. Aspartat Transaminaz Enziminin Tanısal Önemi

Karaciğer hastalıkları, serumdaki artmış transaminaz aktivitesinin en önemli nedenidir. Alkolik hepatit, hepatik siroz, karaciğer malignitesi dışında birçok karaciğer hastalığında ALT'nin AST'den daha fazla arttığı görülür.

Viral hepatitler gibi akut hepatik nekroza neden olan karaciğer hastalıklarında, serum AST, ALT değerleri, üst referans değerinin 100 katına varan yükselmeler gösterse de 10-40 kat arasındaki yükselmelere daha sık rastlanır. Akut hepatitlerde, pik transaminaz aktiviteleri 7. ve 12. günler arasında görülür, daha sonra düşerek 3-5 haftalarda normal düzeylerine dönebilir. Pik transaminaz aktiviteleriyle hastaların prognozu arasında ilişki yoktur(5).

Toksik hepatitler, infeksiyöz hepatitlerden farklı seyir izler. Asetaminofen kaynaklı karaciğer hasarlarında, vakaların % 90' ında, pik transaminaz aktivitesi, üst referans limitin 85 katından yüksek görülür. Akut viral hepatitlerde bu değerlerdeki yüksekliklere daha az rastlanır. Ayrıca toksik hepatitlerde tipik olarak, AST, ALT aktivitesi daha erken pik yapar ve daha hızlı düşer(5).

Nonalkolik yağlı karaciğer hastalığı, alkol gibi sekonder yağlanmaya neden olabilecek durumların yokluğunda, yağlı karaciğer hastalığının histolojik bulgularının olduğu bir karaciğer hastalığıdır. Aminotransferaz artışının sık

görülen nedenlerinden biridir. Basit yağlanmadan, steatohepatit, ilerlemiş fibrozis ve siroza kadar geniş spektrumlu bir karaciğer hasarını tanımlar. Etyolojide obezite, diyabet, hipertansiyon ve dislipidemi önemli yer tutar. (8)

Sirozda aminotransferaz aktiviteleri, hastalığın dönemine göre değişkenlik gösterir. Transferaz aktiviteleri, referans aralığın üst sınırıyla, 4 – 5 kata varan değerler arasında görülür.

Karaciğerin primer veya metastatik karsinomlarında, AST de daha yüksek olmak üzere, aminotransferaz aktivitelerinde 2 den 5 kata varan yükseklikler görülebilir. Ancak karaciğerin malign infiltrasyonunun erken evrelerinde, aminotransferaz aktiviteleri sıklıkla normal olarak bulunur. Nonsteroidal anti inflamatuvarlar, antibiyotikler, antiepileptikler, statinler, opiyadlar gibi çeşitli ilaçların veya bitkisel preparatların kullanımı da hafif veya orta derecede AST, ALT yükselmelerine neden olabilir. Hemokromatozis, Wilson Hastalığı, otoimmün hepatitler, primer bilier siroz, sklerozan kolanjit, Çöliak hastalığı, α 1-antitripsin eksikliği gibi hastalıklarda artmış transaminaz aktivitelerinin daha nadir görülen sebepleridir.(5)

Akut miyokard infarktüsünde AST düzeyi 6-8 saat içerisinde yükselmeye başlayarak 24 saatte en yüksek değerine ulaşmakta ve 5 gün içinde normale dönmektedir. Ancak geniş doku dağılımı nedeniyle AST düzeyi AMI' nün tanısı için kullanışlı değildir(6). Progresif musküler distrofi ve dermatomyozitte de AST aktivitesi normalin sekiz katı kadar artabilmektedir. Ayrıca pulmoner emboli, akut pankreatit ve hemolitik hastalıklarda da AST düzeyleri artabilmektedir(5).

2.1.3 Aspartat Transaminaz Ölçüm Yöntemleri

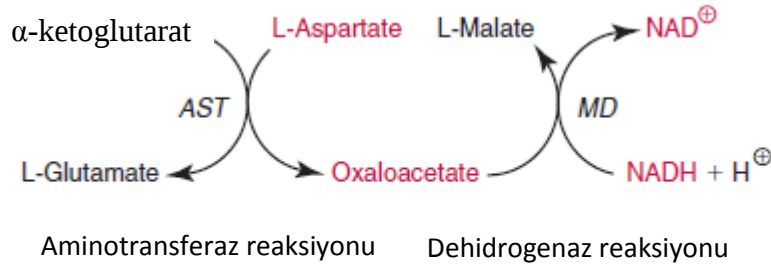
Aspartat transaminaz enzimi, spesifik aminoasitlerden (L-glutamat veya L-aspartat) amino gruplarının spesifik ketoasitlere (α -ketoglutarat veya oksaloasetat) transferini katalize eder. İn vivo ortamda, üre siklusuna nitrojen kaynağı sağlamak için, reaksiyon, glutamat ve oksaloasetat yönüne çalışır. Oluşan glutamat, glutamat dehidrogenaz enzimiyle amonyak ve α -ketoglutarata dönüşür(9)

AST ölçümünde, Reitman, Frankel yöntemi ve Karmen yöntemi, en geniş popülariteye sahip iki yöntemdir. Karmen yöntemini, laboratuvarların %80' den fazlası kullanmaktadır(9).

Reitman ve Frankel yöntemi, 1957 yılında tanıtılmıştır.(10). Oksaloasetat ile 2,4-dinitrofenilhidrazinin (DNPH) bağlanması ile mavi hidrazon oluşması prensibine dayanır. Reaksiyon ortamına, fazladan L-aspartat ve α -ketoglutarat eklenir ve inkübe edilir. İnkübasyondan sonra, DNPH eklenir ve reaksiyon durdurulur. pH alkali hale getirilir ve 505 nm'de absorbans ölçülür. DNPH, hem α -ketoglutarat, hem de oksaloasetat ile reaksiyona girmesine rağmen, elde edilen absorbansın çok büyük kısmı oksaloasetat hidrazonuna aittir. Düşük AST aktivitelerinde, fazla olacak α -ketoglutarat hidrazonundan dolayı, yöntemde küçük bir hata tanımlanmıştır(9).

Karmen yöntemi de, ölçülen ürün olarak, oksaloasetatı kullanmaktadır. Oluşan oksaloasetat, malat dehidrogenaz enzimiyle malata, NADH da okside olarak

NAD⁺ a çevrilir. 340 nm’ de, NADH azalmasından kaynaklanan absorbanstaki düşme kullanılarak AST aktivitesi ölçülür. Reaksiyon şekil 2’ de gösterilmiştir.



Şekil 2. AST Tepkime eşitliği

International Federation of Clinical Chemistry(IFCC), Karmen yönteminde yaptığı modifikasyonlarla referans metodun özelliklerini yayınlamıştır. En son 2002 yılında yaptığı modifikasyonda reaksiyon koşullarının 37 °C’ olması gerektiği belirtilmiş, α -ketoglutarat haricindeki reaktanlarla 5 dakika ön inkübasyon önerilmiştir(11). Ön inkübasyon aşamasında, reaktanlara, serumdaki pirüvatı laktata çevirmek için laktat dehidrogenaz enzimi ve AST enziminin kofaktörü olarak piridoksal fosfat eklenmesi önerilmektedir.

Numune tipi olarak serum veya plazma kullanılabilir. Heparin, oksalat, EDTA ve sitrat enzim inhibisyonuna yol açmaz. Hemolizli numuneler uygun değildir(12).

IFCC yöntemine göre önerilen referans aralık, erkekler için 14-45 U/L, kadınlar için 13-37 U/L’dir(13).

2.2.1. Amilaz Enziminin Genel Özellikleri

α -Amilaz, hidrolaz sınıfından bir enzim olup, polisakkaridlerdeki 1,4- α -glukozidik bağıyı hidroliz etmektedir. Amiloz gibi düz zincirli poliglukanları veya amilopektin, glikojen gibi dallı yapıdaki poliglukanları, farklı oranlarda hidroliz etmektedir. Amilaz, amilozu maltoz ve glukoz, dallı poliglukanları ise maltoz, glukoz ve limit dekstrinlere parçalamaktadır. Amilaz, α -1,6 glikozidik bağıyı ise parçalayamamaktadır. Amilaz, kalsiyum metalloenzimdir ve aktivitesi için kalsiyum esansiyeldir(5).

Plazmada bulunan normal yapıdaki amilaz enziminin molekül ağırlığı 54000-62000 Da'dır. Bu küçük yapısından dolayı glomerüllerden filtre olabilmektedir ve normalde idrarda bulunan tek plazma enzimidir.

Pankreasın asinar hücreleri ve tükrük bezleri amilazın en önemli doku kaynağıdır. Tükrük bezlerinde S tipi amilaz sentezlenmektedir. Tükrük amilazı, diğer adıyla pityalin, ağız ve özefagusta nişastanın hidrolizini başlatmaktadır. Ancak aktivitesi mide asidiyle sonlanır. Pankreas amilazı ise asinar hücrelerde sentezlenir ve P tipi amilaz olarak adlandırılır. Enzim, pankreatik kanalla duodenuma ulaştırılır. Duodenumdaki alkali ortam amilaz aktivitesi için uygundur(5).

Amilaz enzimi, semen, testis, overler, fallop tüpleri, çizgili kas, akciğerler ve yağ dokusu ekstratlarında bulunur. Ayrıca anne sütü ve gözyaşında da bulunur. Akciğer ve overin epitelyal tümörleri de amilaz üretebilir.

P ve S tipi amilaz izoenzimleri, 1. kromozomda birbirine yakın 2 lokusta kodlanmaktadır. Amilaz izoenzimlerinden, deamidasyon, glikozilasyon ve deglikozilasyon gibi posttranslasyonel modifikasyonlarla izoformları (S1-S2-S3- ve P1-P2-P3) oluşmaktadır. S tipi amilaz, serumdaki amilaz aktivitesinin 2/3 ünü oluşturmaktadır. P tipi amilaz ise idrarda baskındır(6).

2.2.2 Amilaz Enziminin Tanısal Önemi

Plazmada amilaz enzimi, fizyolojik olarak düşük konsantrasyonda sürekli bulunmaktadır. Akut pankreatit ve tükürük bezi inflamasyonlarında ise amilaz düzeyi büyük ölçüde artar.

Akut pankreatitte, semptomların başlangıcından, 5-8 saat sonra serum amilaz düzeyleri artmaya başlar ve tipik olarak 3-4. günde normale iner. Akut pankreatitte, amilaz düzeyleri, üst referans limitin 4-6 katına sıklıkla ulaşır. Maksimum konsantrasyonlar, 12-72. saatlerde görülür. Serum amilaz düzeylerinin artmasıyla, idrar amilaz düzeyleri de artar ve serum amilazına göre daha uzun süre yüksek kalır. Amilaz düzeyleri, akut pankreatit haricinde, bazı intraabdominal ve ekstra abdominal hastalıklarda da arttığı için, akut pankreatit tanısında spesifitesi %20-60 arasında bulunmuştur. Tablo 1’de hiperamilazemi sebepleri gösterilmektedir(5).

Tablo 1. Hiperamilazemi sebepleri

Pankreas hastalıkları	Pankreatitler (P-amilaz) Pankreatik travma (P-amilaz)
Pankreas dışı intraabdominal hastalıklar	Safra yolu hastalıkları (P-amilaz) İntestinal obstrüksiyon (P-amilaz) Mezenter infarktüsü (P-amilaz) Perfore peptik ülser (P-amilaz) Gastrit, duodenit (P-amilaz) Rüptüre aort anevrizması Peritonit Akut apandisit (perfore) Travma
Genitoüriner hastalıklar	Ektopik, rüptüre tubal gebelik Salpenjit (S-amilaz) Over malignitesi (S-amilaz) Renal yetmezlik (P-S amilaz)
Diğer sebepler	Tükürük bezi lezyonları (S-amilaz) Akut alkol tüketimi (S-amilaz) Diabetik ketoasidoz (S-amilaz) Makroamilazemi (S veya P amilaz) Septik şok (S-amilaz) Kardiyak cerrahi (S-amilaz) Tümörler (genellikle S-amilaz) İlaçlar (genellikle S-amilaz)

Akut abdominal ağrılarda, total amilaz ölçümünün düşük spesifitesinden dolayı, P amilaz ölçümü yardımcı olabilir. P amilaz ölçümü, karar limit olarak üst referans limitin üç katı alındığında, akut pankreatit tanısında, spesifiteyi %90 dan yukarı taşıyabilir.(14)

Kolesistit gibi safra yolu hastalıkları, primer veya sekonder pankreas hasarına sebep olarak, P amilaz aktivitesinde 4 kata varan yüksekliklere sebep olabilir.

Ayrıca çeşitli intra abdominal hastalıklarda, P amilazın önce peritoneal kaviteye sızmasına, daha sonra da dolaşıma geçerek, serumda 4 kat ve üstü yüksekliklere neden olmaktadır. P amilaz düzeyindeki düşüklükler ise ekzokrin pankreas yetmezliği için büyük ölçüde spesifiktir. Akciğer ve over kanserleri gibi neoplastik hastalıklarda, özellikle S tipi olmak üzere, serum amilaz düzeyleri 50 kata varan yükselmeler gösterebilir(5).

Hiperamilazeminin bir nedeni olan makroamilaz ileriki bölümlerde anlatılacaktır.

2.2.3 Amilaz Enziminin Ölçüm Yöntemleri

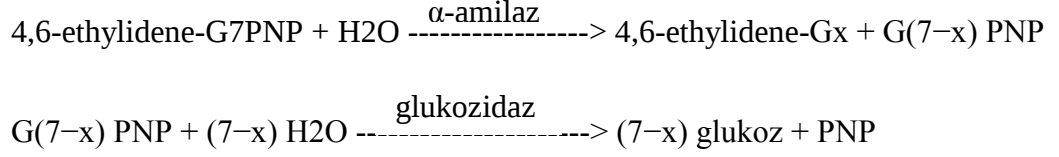
Amilaz ölçümü için, farklı prensip ve substratlarla geliştirilmiş 200' den fazla method vardır. Amilaz ölçümü için uygun bir pH (6,9-7) ve kofaktör olarak kalsiyum, klor iyonu kullanımı temel gereksinimlerdir. Amilaz ölçüm yöntemleri, amiloklastik, sakkorojenik ve kromolitik olmak üzere başlıca 3 kategoride gruplandırılmıştır(9).

Amiloklastik yöntemlerde, nişastanın amilaz ile hidrolizi kullanılmaktadır. Türbidimetrik, nefelometrik ve iodometrik tekniklerle, nişastanın daha küçük yapılara hidroliz oranı saptanmaktadır. Türbidimetrik yöntemde, azalan nişasta oranıyla türbiditenin azalması, nefelometrik yöntemde de azalan nişasta oranıyla ışık saçılımının artması kullanılmaktadır. İodometrik yöntemde ise, öncelikle nişasta iyot ile mavi renge boyanır. Daha sonra amilaz katalizörlüğünde parçalanan boyalı nişasta oranı fotometrik olarak ölçülür. Amiloklastik yöntemler,

substrat değişkenliklerini standardize etmedeki zorluklar nedeniyle günümüzde kullanılmamaktadır(9).

Sakkarojenik tekniklerde, kullanılan substrat, amilaz katalizörlüğünde, monosakkarit veya disakkaritlere parçalanır ve oluşan ürünler ölçülerek amilaz aktivitesi tayin edilir. Klasik bir yöntem olan Somogyi yöntemi de, sakkarojenik bir tekniktir(15). Bu yöntemde, analizi yapılacak numune substrat ile 30 dakika inkübe edilir. Daha sonra oluşan ürünlerin indirgen özelliği kullanılarak analiz yapılır. Son zamanlarda, otomatize kinetik analizler için sakkarojenik yöntemler modifiye edilmiştir. Bu yöntemlerde, substrat olarak maltopentoz veya maltotetroz kullanılır ve amilaz katalizörlüğünde ürün olarak maltoz elde edilir. Oluşan maltoz, reaktanların içine eklenen enzimlerle glukoza çevrilir. Oluşan glukoz ise farklı enzimatik yöntemlerle ölçülür(9).

Son yıllarda, üretici firmalar tarafından, ilgi çekici ve kullanışlı kromolitik teknikler geliştirilmiştir. Bu tekniklerden biri olan, IFCC'nin de amilaz ölçümünde referans method olarak gösterdiği yöntemde, substrat olarak bir p-nitrofenol glukozid olan p-nitrofenil-maltoheptaozid (G7PNP) kullanılmaktadır(16). Reaktan olarak α -glukosidazın da kullanıldığı reaksiyonlar sonucu oluşan p-nitrofenolün renk yoğunluğu, α -amilaz aktivitesi ile doğru orantılıdır. 405 nm'de absorbansın monitörizasyonu ile α -amilaz aktivitesi hesaplanır. Reaksiyon denklemi şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil.3. Amilaz enziminin ölçüm yöntemi

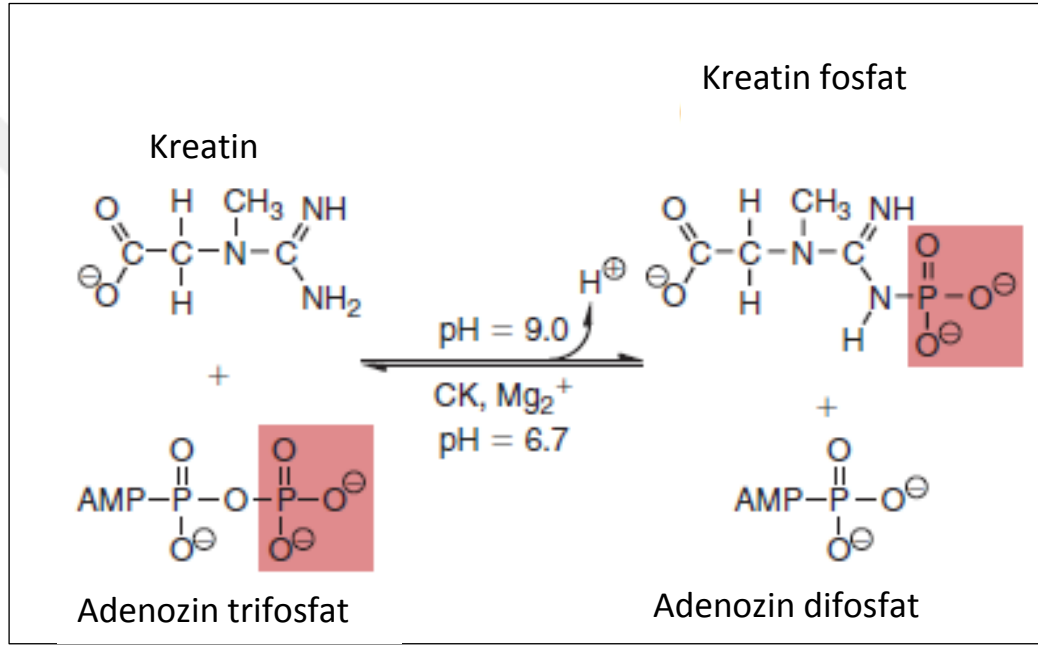
Substrat olarak, 2-kloro-p-nitrofenil α -D-maltotriozidin (CNP-G₃) kullanıldığı diğer bir kromolitik yöntemde ise, substrat amilazın katalizörlüğünde, 2-kloro-p-nitrofenole (CNP) hidrolize olmaktadır. Oluşan ürün spektrofotometrik olarak, amilaz aktivitesiyle orantılıdır. Bu yöntem, glukozidaz enzimi gerektirmemesi nedeniyle direkt assay olarak ta değerlendirilir.

Amilaz ölçümü için, numune olarak serum veya heparinize plazma kullanılmalıdır. Amilaz enzimi için kofaktör olan kalsiyumla şelat oluşturan, sitrat, oksalat ve EDTA'lı tüpler kullanılmamalıdır(17).

Amilaz için referans aralık IFCC' nin önerdiği metoda göre 31-107 U/L dir. Yenidoğanlarda amilaz düzeyleri, yetişkinlerin yaklaşık %18 kadardır. 3-4 yaşlarda yetişkin düzeylere ulaşır(17).

2.3.1. Kreatin Kinaz Enziminin Genel Özellikleri

Kreatin kinaz enzimi, 82000 Da ağırlığında dimerik bir enzimdir ve reversibl olarak, kreatinin adenosin trifosfat ile fosforilasyonunu katalize eder. Reaksiyon eşitliği şekil 4’de gösterilmiştir(5).



Şekil 4. Kreatin kinaz enzimi reaksiyon denklemi

Fizyolojik olarak kas kasıldığında adenosin trifosfat (ATP), adenosin difosfata (ADP) çevrilir ve CK, kreatin fosfatı kullanarak, ADP’ yi tekrar ATP’ ye çevirir. ADP, kreatin fosfat yönündeki reaksiyon için optimal pH 9, ATP kreatin yönündeki reaksiyon için optimal pH 6,7 dir. Mg^{+2} , reaksiyon için gerekli, ATP ve ADP ile kompleks yapan iyonudur. Ancak, optimal konsantrasyon aralığı dardır ve aşırı Mg^{+2} da inhibitör etki gösterir. Mn^{+2} , Ca^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} gibi birçok metal iyonu, iodoasetat ve diğer sülfidril bağlayıcı maddeler, enzim aktivitesini inhibe

eder. Ayrıca fazla ADP ve sitrat, florid, nitrat, asetat, iyodür, bromid, malonat, L-tiroksin de, enzim aktivitesini inhibe eder(5).

Çizgili kas ve kalp kası, sırasıyla 2500 ve 550 U/g protein olmak üzere, yüksek miktarlarda CK aktivitesine sahiptir. Beyin, gastrointestinal sistem ve mesane gibi diğer dokularda daha az miktarda bulunmaktadır. Karaciğer ve eritrositlerde ise enzim aktivitesi bulunmamaktadır(5).

CK, herbiri yaklaşık 40000 Da ağırlığında iki subünitten oluşmaktadır. Bu subünitler, B ve M olarak adlandırılır, sırasıyla 14. ve 19. kromozom lokuslarında kodlanır. Bu subünitlerin birleşimiyle enzimin BB (CK-1), MB (CK-2) ve MM (CK-3) izoenzim formları oluşmaktadır. Farklı insan dokularındaki CK aktiviteleri ve izoenzimlerin oranları tablo 2’de gösterilmiştir(5).

Tablo 2. Farklı insan dokularındaki CK aktiviteleri ve izoenzim oranları

Doku	CK aktivitesi	CK-BB	CK-MB	CK-MM
İskelet kası (tip 1, kırmızı fibril)	50.000	<%1	%3	%97
İskelet kası (tip2, beyaz fibril)	50.000	<%1	%1	%99
Kalp	10.000	<%1	%22	%78
Beyin	5000	%100	%0	%0
Gastrointestinal sistem	5000	%96	%1	%3
Mesane	4000	%92	%6	%2

Üç izoenzim formu da, miyofibriler yapılarla ilişkili olarak hücrelerin stoplazmasında bulunur. Başka bir CK izoenzim formu ise mitokondrial (CK-Mt)

formdur ve mitokondrinin iç ve dış membranları arasında bulunur. 15. kromozom lokusunda kodlanan bu izoenzim formu, diğer formlardan immünolojik ve elektroforetik mobilitesi bakımından farklıdır. Mitokondrial formun, kalpteki total CK aktivitesine oranı %15'e kadar çıkabilmektedir(5).

Sağlıklı insan serumlarında, esas izoenzim MM formudur. MB izoenzimi için değerler, tespit edilemeyen düzeyler ile eser miktarlar (total CK'nın %6'sından az) arasında değişmektedir. BB izoenziminin serumdaki varlığı tayin yöntemine bağlı olsa da, sağlıklı bireylerde oldukça az olduğu bilinmektedir(6).

MakroCK olarak adlandırılan makromoleküler formlar, makroenzimler bölümünde anlatılacaktır.

2.3.2. Kreatin Kinaz Enziminin Tanısal Önemi

Serum CK düzeyleri, iskelet veya kalp kasında yaralanma, inflamasyon veya nekroz olan hastaların neredeyse tamamında artmış bulunur. Yüksek serum CK düzeyleri, subklinik nöromusküler hastalıkların tek belirtisi olabilir. Musküler distrofilerin tüm tiplerinde, serum CK aktiviteleri çok yükselmiştir. Progresif musküler distrofilerde, özellikle Duchenne musküler distrofisinde, daha bebeklik ve çocukluk dönemlerinde, hastalık klinik olarak oluşmadan, serum CK düzeyleri çok yüksektir. Hastaların yaşları ilerledikçe, fonksiyonel kas kitlesindeki azalmadan dolayı, serum CK aktiviteleri karakteristik olarak azalır. Viral miyozitler, polimiyozitler ve benzer kas hastalıklarında da yüksek CK değerleri görülür. Ancak, myastenia gravis, multiple skleroz, poliomiyelit, ve parkinsonizm

gibi nörojenik kas hastalıklarında serum CK aktiviteleri artmaz. Ayrıca malign hipertermide de çok yüksek CK düzeyleri ölçülür(5).

Kas hastalıklarında veya aşırı egzersiz gibi kas hasarına neden olan durumlarda, serum CK-MB izoenzim formunun oranı anlamlı şekilde artmış bulunabilir. Bu fenomene fetal geri dönüş denir ve fetal paternde protein sentezinin tekrar ortaya çıkmasından kaynaklanır. Ayrıca kronik böbrek hastalıklarında, üremik miyopatiye bağlı artmış CK-MB oranları görülebilir(5).

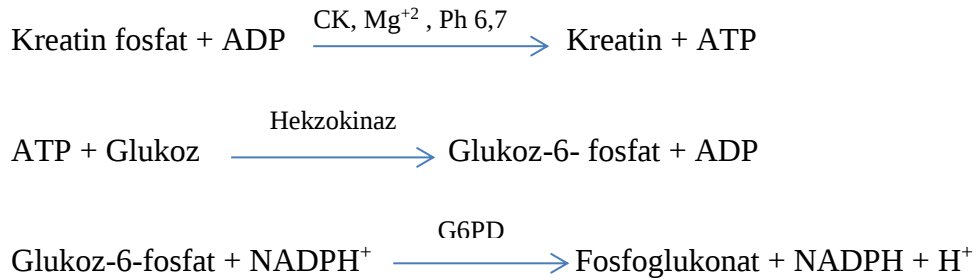
Crush sendromuna bağlı akut rabdomiyolizde, büyük miktarda kas destrüksiyonuna bağlı olarak, CK seviyelerinde, üst referans limitin 200 katına varan yükselmeler görülebilir. İlk 3 günde CK düzeyleri 5000 U/L nin altında kalırsa, akut böbrek yetmezliği gelişme ihtimali düşüktür. İntramusküler enjeksiyon, cerrahi girişim gibi direkt kas travmaları da serum CK düzeylerini artırabilir. Statinler, fibratlar, antiretroviraller, anjiyotensin II reseptör antagonisti gibi ilaçlar, farmakolojik dozlarda dahi, serum CK düzeylerini arttırabilirler(5).

Akut miyokard infarktüsünün tanısında, serum CK düzeyleri ve MB izoenzimi yıllardır kullanılmaktadır. Ancak günümüzde, troponin T ve I gibi, kardiyak dokuya daha spesifik, non-enzimatik markerlar mevcuttur. Ancak, CK-MB ölçümleri, miyokardiyal nekrozun büyüklüğünü tahmin etmede ve infarkt prognozunu değerlendirmede yardımcı olabilir. Pik CK-MB düzeyleri, infarkt büyüklüğüyle daha kolere olduğu için, seri ölçümlerle pik değer yakalanmalıdır(5).

Hipotiroidizm, yaygın görülen bir endokrin miyopati nedenidir. Üst referans aralığın 5 katına varan yükseklikler görülebilir ve kas kaynaklı olduğunu destekleyen, CK-MM izoenzimi major olarak artmış bulunur(5).

2.3.3. Kreatin Kinaz Enziminin Ölçüm Yöntemleri

CK ölçümü için, birçok fotometrik, fluorometrik ve enzim eşlenik metod geliştirilmiştir. Bu yöntemler, reaksiyonu ileri (kreatin → kreatinfosfat) veya ters (kreatinfosfat → kreatin) yönde kullanabilmektedirler. Günümüzde, total CK analizinde, tüm ticari kitler, 6 kat daha hızlı ilerleyen ters yöndeki reaksiyonu kullanmaktadır(9). İlk kez Oliver tarafından tanımlanan(18) ve daha sonra Rosalki(19) ve Szasz tarafında modifiye edilen yöntem(20) şekil 5’de gösterilmiştir.



Şekil 5. Kreatin kinaz enziminin ölçüm yöntemi

Reaksiyonlar sonucu NADPH’ın 340 nm’deki absorbansının artış oranı monitörize edilerek, CK aktivitesi ölçülür. Bu yöntem temel alınarak, bazı geliştirmelerle, IFCC tarafından referans method olarak önerilmiştir(21).

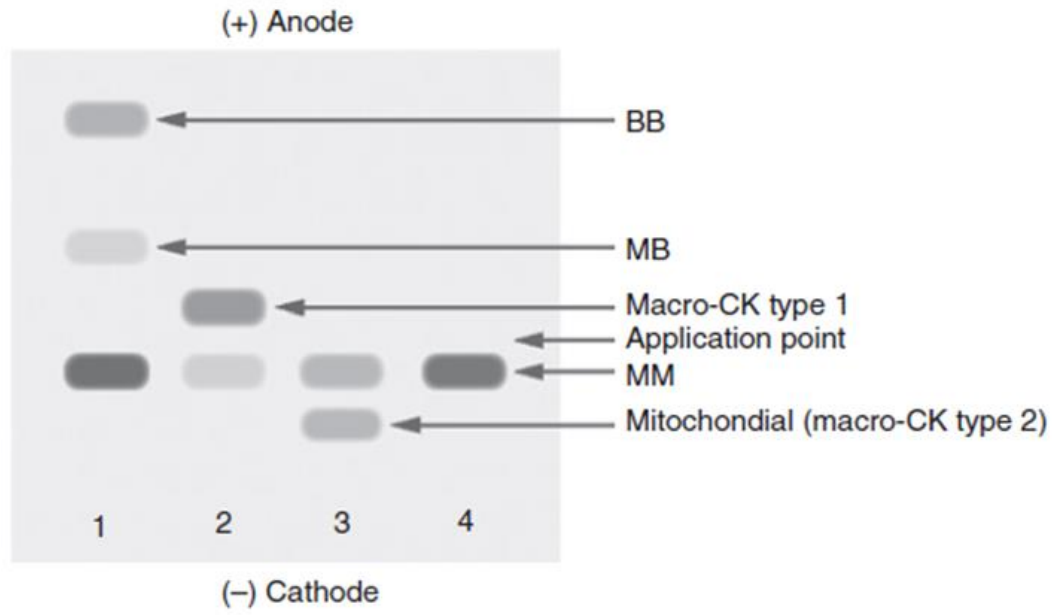
Kreatin kinaz enzimi analizinde, numune tipi olarak, serum veya heparinize plazma gerekir. Heparin haricindeki antikoagülanlar, CK aktivitesini inhibe edebileceği için kullanılmamalıdır. Serumdaki CK aktivitesi, nispeten unstabil olduğu için, saklama sırasında, hızlıca aktivite kaybına uğrayabilir. Ortalama olarak, oda sıcaklığında 8 saat, 4 °C’da 48 saat, -20 °C ‘da 1 ay stabildir. Daha uzun süre saklanacaksa, -80 °C’da saklanmalıdır(9).

Eritrositlerde CK aktivitesi bulunmadığı için, numunelerdeki orta dereceye kadar hemoliz (0,32 g/dL), CK aktivitesi ölçümlerinde anlamlı değişikliğe neden olmaz. Ancak aşırı hemoliz durumlarında, adenilat kinaz, ATP ve glukoz 6 fosfat gibi maddeler eritrositlerden salınarak, ölçümde kullanılan reaktanlarla interferansa neden olabilir(22).

Serum CK aktiviteleri, ırk, yaş, cinsiyet, kas kütlesi, fiziksel aktivite gibi fizyolojik değişkenlere bağlıdır. Erkeklerde kas kütlesi daha fazla olduğu için, serum CK aktiviteleri de kadınlara göre yüksek bulunur. Ayrıca beyaz ırktaki ortalama CK aktivitesi, siyah ırkın ortalama CK aktivitesinin %66’sı olarak bulunmuştur. 37 °C’da, IFCC referans metoda göre, beyaz ırkta, CK referans aralıkları kadınlar için 34-145 U/L, erkekler için 46-171 U/L bulunmuştur(23). Yenidoğanlarda, doğum sırasında iskelet kası travmasına bağlı olarak, serum CK aktiviteleri genellikle yüksektir. 6-10 hafta civarında yetişkinlerdeki seviyelere düşer(9).

CK izoenzim paternleri, elektroforez yöntemi kullanılarak ayrılabilir. Ayrım sonrası, destek ortamının üzerine (agaroz, selluloz asetat v.s), konsantre CK

reaktif karışımı uygulanır ve inkübe edilir. Reaksiyon sonucu oluşan NADPH, uzun dalga boylu (360 nm) ultraviyole ışığın uyarılmasıyla oluşan, mavimsi beyaz floresanla saptanabilir ve floresan dansitometrisiyle miktarı belirlenebilir. CK izoenzimleri, katotdan anoda doğru MM, MB ve BB şeklinde bantlara ayrılırlar. CK MM izoenzimi, katotda aplikasyon noktasında kalır. CK elektroforezi, makro CK gibi anormal bantların tespit edilmesinide sağlar(5). Şekil 6'daki şematik çizimde normal ve anormal CK elektroforez paternleri gösterilmiştir(24).



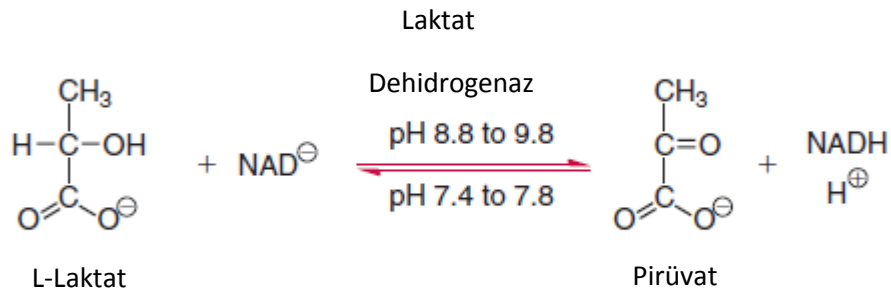
Şekil 6 . CK izoenzim elektroforezi örneklerinin şematik çizimi

1. sırada MM, MB ve BB izoenzimlerini içeren kontrol serumu çalışması.
2. sırada MM ve Makro CK tip 1 içeren serum çalışması
3. sırada MM ve Makro CK tip 2 içeren serum çalışması
4. sırada sadece MM bandı içeren, tipik normal serum çalışması

CK MB izoenzimi, direkt immünoinhibisyon yöntemiyle de ölçülmektedir. Bu yöntemde anti-CK M subunite antiserumu kullanılarak, CK MM izoenzimi ve CK MB izoenziminin M subunitesi inhibe edilmektedir. Daha sonra CK B subunitesi ölçülüp 2 ile çarpılarak CK MB izoenzim aktivesi hesaplanmış olmaktadır. Ancak, bu yöntemde, CK BB izoenziminin ve yöntemi interfere eden makro CK gibi faktörlerin olmadığı varsayılmaktadır. CK MB izoenzim aktivite ölçümünün bu nonspesifitesinden dolayı, direkt CK MB kütlesini ölçen immünassay yöntemler geliştirilmiştir(5).

2.4.1. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Genel Özellikleri

Laktat dehidrogenaz, L-laktatın pirüvata oksidasyonunu, bir hidrojen alıcısı olan NAD^+ 'ın aracılığıyla katalize eden bir hidrojen transfer enzimidir. Reaksiyon eşitliği şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 7. Laktat dehidrogenaz enzimi reaksiyon eşitliği

Şekilde görüldüğü gibi reaksiyon reversibldır ve reaksiyon eşitliği güçlü olarak, pirüvatın laktata redüksiyonuna meyillidir. Laktat dehidrogenaz enzimi, D-laktata etki etmez ve koenzim olarak sadece NAD^+ kullanır(5).

LDH enziminin molekül ağırlığı 134 000 Da'dır. İzoenzimler, herbirinin molekül ağırlığı yaklaşık 32 000 Da olan 4 polipeptid zinciri içermektedir. M (muscle) ve H (heart) olarak isimlendirilen iki farklı polipeptid zinciri, beş farklı şekilde düzenlenerek, 5 ana izoenzim fraksiyonunun oluşmasını sağlamaktadır. LDH-M ve LDH-H peptid zincirleri sırasıyla 11. ve 12. Kromozom loküslerinde kodlanmaktadır. LDH'nin 5 izoenzimi, elektroforezde katottan anoda doğru, LDH-1(HHHH), LDH-2(HHHM), LDH-3(HHMM), LDH-4(HMMM) ve LDH-5(MMMM) olarak ayrılmaktadır. Sağlıklı insanların serumlarında, ana izoenzim fraksiyonu LDH-2'dir. Altıncı bir LDH izoenzimi olan LDH-X (LDHc olarakta isimlendirilir) 4 adet X subunitesinden oluşur ve puberte sonrası insan testisinde bulunur(5).

Laktat Dehidrogenaz enzim aktivitesi, vücuttaki çoğu hücrede ve hücrelerin stoplazmasında bulunur. Farklı dokulardaki enzim konsantrasyonları, fizyolojik olarak serumda bulunan miktarın 1500-5000 katı kadar fazladır. Bu yüzden küçük kütledeki doku hasarlarında bile, serum LDH aktivitesi anlamlı olarak artar(5). Kalp, karaciğer, iskelet kası, böbrek ve eritrosilerde LDH aktivitesi yüksektir. Akciğer, düz kas ve beyinde daha az konsantrasyonlarda bulunmaktadır(6).

Farklı dokular, farklı LDH izoenzimlerini içermektedir. Tablo 2'de, LDH izoenzimlerinin doku yerleşimleri ve artış nedenleri özetlenmiştir(6).

Tablo 2. Laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin doku yerleşimleri ve artış nedenleri

İZOENZİM	DOKU	HASTALIK
LDH-1 (HHHH)	Kalp Kırmızı kan hücresi	Miyokard İnfarktüsü Hemolitik anemi
LDH-2 (HHHM)	Kalp Kırmızı Kan hücresi	Megaloblastik anemi Akut renal infarkt Hemolizli numune
LDH-3 (HHMM)	Akciğer Lenfosit Dalak Pankreas	Pulmoner Emboli Yaygın Pnömoni Lenfositoz Akut Pankreatit Karsinoma
LDH-4(HMMM)	Karaciğer	Karaciğer hasarı veya inflamasyonu
LDH-5 (MMMM)	İskelet kası	İskelet kası hasarı

2.4.2. Laktat Dehidrogenaz Enziminin Tanısal Önemi

Laktat dehidrogenaz enziminin, geniş doku dağılımından dolayı, miyokard infarktüsü, hepatitler, hemoliz ve böbrek, akciğer, kas hastalıkları gibi çok farklı klinik durumlarda serum düzeyleri artar. Ancak, LDH izoenzim fraksiyonlarına ayrıldığı zaman, klinik önemi artmaktadır(5).

Hemolitik anemiler ve megaloblastik anemi, total LDH konsantrasyonlarının en yüksek düzeyinin görüldüğü hastalıklardır. Megaloblastik anemide, serum LDH konsantrasyonlarında, üst referans aralığın 50 katına varan yükselmeler görülebilir. Megaloblastik anemi, sıklıkla folat veya B12 vitamini eksikliğine bağlı oluşur. Eritrosit prekürsör hücrelerinde inefektif eritropoeze neden olarak,

büyük miktarlarda LDH-1 ve LDH-2'nin dolaşıma salınmasına neden olur. Uygun tedaviden sonra, LDH düzeyleri hızla normal seviyeye döner(5).

Malign hastalığı olan kişilerde, serum LDH aktiviteleri sıklıkla artmış bulunur. Karaciğer metastazı olan hastalarda %70'e varan oranlarda, diğer non-hepatik metastazı olanların ise %20-60'ında serum LDH aktiviteleri yüksek bulunur. Testisin seminom, teratom; overin disgerminomu gibi germ hücreli tümörü olan hastaların %60'ında özellikle LDH-1 izoenzimi artar. Ayrıca bazı lösemi türlerinde, özellikle akut lenfoblastik lösemide, belirgin LDH artışları gözlenmektedir(5,6).

LDH-4 ve LDH-5 izoenzimlerindeki yükseklikler, özellikle karaciğer hastalıklarında görülür. Viral hepatit, siroz gibi karaciğer hastalıklarında, üst referans aralığının, 2-3 katı olacak şekilde hafif bir LDH artışı gözlenmektedir. Ancak rutinde bu amaçla kullanımı sınırlıdır ve tanı, takipte aminotransferaz enzimlerine göre, anlamlı olarak ek katkı sağlamaz(5,6).

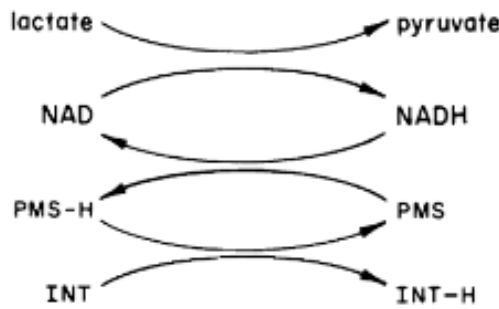
Akut miyokard enfarktüsünde (AMI), serum LDH düzeyleri, 12-24 saat içinde artmaya başlamakta ve en yüksek düzeylere 48-72 saatte ulaşmaktadır. LDH konsantrasyonları 10 gün boyunca yüksek kalmaktadır. Kardiyak doku ve kırmızı kan hücreleri, yüksek konsantrasyonda, LDH-1 izoenzimini içermektedir. Bu nedenle, AMI ve intravasküler hemoliz gibi durumlarda, serum LDH-1 düzeyi, LDH-2'nin konsantrasyonunu aşacak şekilde yükselmektedir. Bu durum kaymış LDH oranı olarak adlandırılmaktadır(LDH-1>LDH-2). Hemolizli serum

örneklerinde de bu kaymış oran gözlenmektedir. LDH, kardiyak doku için özgül olmadığından, AMI'nın tanısında tercih edilen bir belirteç değildir(6).

Tablo 2'de de görüldüğü gibi, LDH-3'deki artış genellikle pulmoner tutulum ile olmaktadır ve ayrıca karsinomali hastalarda da gözlenmektedir. LDH-4 ve LDH-5 izoenzimleri yoğunlukla karaciğer ve kas dokusunda bulunmaktadır ve bu dokuların hasar ve inflamasyonlarında düzeyleri artmaktadır(6).

2.4.3. Laktat Dehidrogenaz Enzimi Ölçüm Yöntemleri

Laktat dehidrogenaz enziminin ölçümünde kullanılan eski yöntemlerde, oluşan veya kullanılan reaktan miktarını tayin edebilmek için, indikatör boyalar kullanılmaktaydı(9). Bu kolorimetrik yöntemlerden biri şekil 8'de gösterilmiştir(25). Reaksiyonlar sonucu oluşan tetrazolium boyası vasıtasıyla LDH ölçümü yapılabilmektedir.



Şekil 8. Kolorimetrik LDH ölçüm yöntemi

PMS-H: Redükte phenazin methosulfate, PMS: Okside phenazin methosulfate

INT-H: Redükte tetrazolium boyası, INT: Okside tetrazolium boyası

Günümüzde, total LDH aktivitesi ölçümünde kinetik spektrofotometrik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerde, LDH enziminin katalizlediği reaksiyonda oluşan veya kullanılan NAD⁺ veya NADH'nın 340 nm'deki absorbtivite özellikleri kullanılmaktadır(9).

IFCC tarafından, laktat → pirüvat yönündeki 37 °C'daki reaksiyon referans metod olarak gösterilmiştir(26).

LDH aktivitesi ölçümünde, serum örnekleri önerilmektedir. Plazma örnekleri, yüksek LDH içeriği olan trombositlerle kontamine olabileceği için önerilmemektedir. Eritrositlerdeki LDH içeriği seruma göre 4000 kat fazla olduğu için, hemolizli numuneler kullanılmamalıdır. LDH izoenzimlerinin soğukta beklemeye dayanıklılıkları farklıdır. LDH-4 ve LDH-5 izoenzimleri, -20 °C'da saklamayla aktivite kaybına uğrarlar. Bu yüzden LDH aktivitesi ölçülecek serumlar, 3 gün stabil olduğu oda sıcaklığında saklanabilir(9).

LDH enzimi için IFCC prosedürüne göre referans aralık, yetişkinlerde 125-220 U/L bulunmuştur(27).

Laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin, agaroz jel veya selüloz asetat membranlardaki elektroforetik ayrımı yaygın kullanılan bir yöntemdir. Elektroforez ile ayırım sonrası, reaktanları içeren karışım, elektroforez destek ortamının üzerine uygulanır. Ayrılan LDH bantlarında oluşan NADH, 365 nm'de ultraviyole ışığın uyarımıyla floresans verir ve LDH bantları bu şekilde saptanır. Oluşan LDH bantları tetrazolium tuzlarının redüksiyonuyla da renkli şekilde

görülebılır. Agaroj jel yöntemi ve florometrik kantitasyonla saptanan LDH izoenzim referans aralıkları tablo 3’de gösterilmiştir(5).

Tablo 3. Laktat dehidrogenaz izoenzimlerinin referans aralıkları

LDH fraksiyonu	Aktivite (U/L)	Yüzde
Total LDH	120-250	100
LDH-1	17-65	14-26
LDH-2	35-98	29-39
LDH-3	24-65	20-26
LDH-4	10-40	8-16
LDH-5	7-40	6-16

2.2. MAKROENZİMLER

2.2.1.Tanım ve Genel Özellikler

Makroenzimler, normal serum enzimlerinin veya izoenzimlerinin, çoğunlukla immünglobülinler olmak üzere, bazı lipoproteinler, proteinler, hücre membran fragmanları veya ilaçlarla polimerizasyonu sonucu oluşan, normal yapıdaki enzimlere göre daha yüksek molekül ağırlığına sahip komplekslerdir(28). Günümüzde, makroAST, makroamilaz, makroLDH ve makroCK gibi pekçok enzimin makro formu bilinmektedir(29).

Makroenzimler, serumda, normal fizyolojik şartlarda bulunabileceği gibi, hipotiroidizm, maligniteler, otoimmün hastalıklar gibi patofizyolojik şartlarda da bulunabilirler(30).

Makroenzimler, büyük molekül ağırlıklarından dolayı, normal yapıdaki enzimlere göre kandan çok daha yavaş uzaklaştırılırlar ve plazmada birikirler. Kanda, enzim aktivitelerinin yüksek ölçülmesine neden olurlar(1). Bu artmış aktivitenin mekanizması en iyi makroamilazda anlaşılmıştır. Amilaz, 50000 Da ağırlığında küçük molekül ağırlığına sahip bir enzimdir ve kolaylıkla böbreklerden filtre olup, atılabilmektedir. Ancak, makroamilazın molekül ağırlığı yaklaşık 210 000 Da ağırlığındadır ve böbreklerden filtre olamaz. Makroamilazın renal klirensinin düşük olması da dolaşımda birikimine neden olur(31,32). Amilazın aksine, diğer birçok enzim daha yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve anlamlı düzeyde böbreklerden filtre olmazlar. Retiküloendotelial sistem tarafından uzaklaştırılırlar(33). Antikor bağlı enzimlerin, retiküloendotelial sistem klerans mekanizmasını interfere ettiği düşünülmektedir(31).

Literatürde, enzim düzeyleri yüksek bulunup, makroenzim tanısı almış birçok vaka bulunmaktadır. Ancak, makroenzimler, serum enzim aktivitesi yüksek olmayan, referans aralığı içinde bulunan kişilerde de bulunabilir. Yapılan bir çalışmada rastgele seçilerek saptanmış 16 makroamilaz hastasından, sadece 2 tanesinin serum amilaz aktivitesi yüksek bulunmuştur(31). Ayrıca makroLDH tanısı olup, bu durumun serumda LDH ın düşük ölçülmesine neden olmuş vakalar da mevcuttur(34,35).

Makroenzimler, uzun yıllardır bilinmektedir ancak enzim ölçümlerinin otoanalizörlerde en çok istenen testler arasına girmesiyle, son zamanlarda klinik uygulamalarda problem haline gelmiştir(29).

Makroenzimler, genellikle açıklanamayan, uzun süreli enzim yüksekliği bulunan kişilerde tanı alırlar(1). Açıklanamayan enzim yüksekliğinin bir nedeni olan makroenzimlerin, düşünülmemesi veya tanısının konulmasındaki eksiklikler, pahalı, gereksiz ve invazif girişimlerin yapılmasına neden olabilir(2). Weidner ve arkadaşlarının sunduğu bir vakada, 54 yaşında bayan hasta izole AST yüksekliği bulgusuyla hastaneye yatırılmış ve tekrarlayan karaciğer biyopsileri yapılmış. Nöroloji, endokrin ve gastroenteroloji konsültasyonları istenmiş. Daha sonra bu yüksekliğin makroenzim kaynaklı olduğu bulunmuş(36).

Makroenzimden şüphelenilmesi gereken durumlar aşağıda belirtilmiştir(2):

- 1) Semptomların yokluğu
- 2) Yüksekliği bulunan enzim için atipik semptomların olması
- 3) Enzim anormalliğinin izole ve uzun süreli olması

Mayo klinik tarafından, 1986-1990 yılları arasında elektroforez ve moleküler ekslüzyon likit kromatografisiyle 21 adet makroCK, 10 makroLDH, 6 makroAST ve 5 makroamilaz olmak üzere 42 makroenzim tanısı konulmuş. Bu vakalardan, makroAST olanlar hariç, diğerleri 60 yaş üzeri bulunmuş. MakroAST hastaları ise daha genç yaşta olmuş. MakroAST tanılı olanlar hariç, cinsiyet bakımından kadın

erkek arasında fark bulunmamış. Makro AST tanılı 6 hastanın 5'i ise kadınmış. Bu vakaların mevcut hastalıklarının tanıları aşağıdaki tablo 4'de gösterilmiştir(2).

Tablo 4.Mayo Klinikte makroenzim tanısı konmuş 42 vakanın hastalıkları

HASTALIK TİPİ	HASTALIKLAR
Otoimmün	Tiroiditler, Romatoid Artrit, Sjögren Sendromu
Kardiyovasküler	Miyokard infarktüsü, hipertansiyon, kardiyak arrest, konjestif kalp yetmezliği vb.
Endokrin	Diabetes mellitus, hipotiroidizm, tiroiditler, multinodüler guatr
Gastrointestinal	Kronik pankreatit, hepatit, Crohn hastalığı, pankreas kanseri
Hematolojik	Anemi, Lenfoma
Enfeksiyon H.	Pyelonefrit, mastit, bakteriyemi, pnömoni
Malignensi	Karaciğer, pankreas, uterus, meme, akciğer, mesane, prostat kanserleri
Akciğer	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı, bronşektazi, pnömoni
Renal	Akut ve kronik böbrek yetmezliği, piyelonefrit
Romatolojik	Gut, psodogut, osteoartrit

2.2.2. Tarihçe

Makroamilaz, ilk kez 1964 yılında Wilding ve ark. tarafından tanıtılmıştır(37). Müphem karın ağrısı olan, yaklaşık 10 yıldır sürekli 3-8 kat amilaz yüksekliği bulunan ve idrarda amilaz atılımının 100 kat azaldığı bir vakada, bunun bir gama globüline bağlı amilazdan kaynaklandığını göstermişlerdir. Daha sonra Berk ve ark. 1967 yılında 3 vaka daha tanımlamışlar ve ilk kez makroenzim terimini kullanmışlardır(38). 1968 yılında da Levitt ve Cooperband, makroamilaza bağlı globülinin immünglobülin A (Ig A) olduğunu konfirme etmişlerdir(39).

1965 yılında Kreutzer ve ark., LDH izoenzim elektroforezinde 5 vakada anormallik tespit etmiştir(40). 1967 yılında Ganrot, lupoid sirozlu bir vakada, LDH elektroforezindeki izoenzim paterninde anormallik saptamışlar ve bunun Ig A ya bağlı makromoleküler LDH'dan kaynaklandığını göstermiştir(41).

1970'li yıllarda ise, Negamine ve ark tarafından makro alkalen fosfataz (42), Konttinen ve ark. tarafından makroAST (43), Kajita ve ark. tarafından makro alanin aminotransferaz (44), Urdal ve ark. tarafından ise makroCK (45) tanımlanmıştır.

1980'li yıllarda ise Virji tarafından makro asit fosfataz (46), Stein ve ark. tarafından makrolipaz (47), Maekawa ve ark. tarafından ise makro lösin aminopeptidaz tanımlanmıştır(48).

2.2.3.Makroenzim Tipleri

Makroenzimler, yapısal olarak 2 tipe ayrılmaktadır. Tip 1, enzimlerin immunglobulinlerle bağlanması sonucu oluşurken, Tip 2, enzimlerin immunglobulin harici yapılara bağlanması ile oluşurlar(31).

2.2.3.1.Tip 1 Makroenzimlerin Yapısı

Tip 1 makroenzimler, enzimlerin veya daha sıklıkla izoenzimlerin, Ig A, Ig G ve daha az oranda Ig M ile bağlanması sonucu oluşurlar(32). Yapılan çalışmaların büyük çoğunluğunda, enzimlerle dolaşımdaki immunglobulinlerin spesifik olarak, antijen antikor ilişkisiyle bağlandığı gösterilmiştir. Enzim-immünglobulin komplekslerinin molekül ağırlığı jel filtrasyon gibi yöntemlerle bakıldığında,

spesifik immün etkileşimde görülen 2/1 enzim immünglobülin bağlanma oranı görülmüştür(31)

Enzimin, immünglobülinin Fab fragmentine bağlanması, enzim aktivitesini daha yüksek sıcaklıklara karşı stabilize eder, eliminasyonunu azaltır ve enzimin kinetik parametrelerini etkiler(1).

Aşağıdaki tablo 5’de, hastalardan saptanmış makroenzimlerin bazı özellikleri verilmiştir(49).

Tablo 5:Hasta serumlarından izole edilen tip 1 makroenzimler

Makroenzim	Teşhis	Ig Tipi	Ig'nin Spesifliği
ALT	Kronik hepatit	IgG	Veri yok
ALP	Çeşitli tanılar	IgG, IgA	İzoenzim spesifik
Amilaz	Çeşitli tanılar	IgA, IgG	Nadiren izoenzim spesifik
AST	Sağlıklı kişiler, çeşitli tanılar	IgG, IgA	Kısmen spesifik
GGT	Hepato-biliyer hastalıklar	IgA	Veri yok
CK	Sağlıklı kişiler, çeşitli tanılar	IgG, IgA	BB-spesifik
LDH	Sağlıklı kişiler, çeşitli tanılar	IgA, IgG	Çoğu H veya M spesifik
Lipaz	Hodgkin lenfoma	IgG	Lipaz-spesifik
AP	Çeşitli tanılar	IgG	Veri yok

ALT: Alanin amino-transferaz, ALP: Alkalen fosfataz, AST: Aspartat amino-transferaz, GGT: Gama glutamül transferaz, CK: Kreatin fosfokinaz, LDH: Laktat dehidrogenaz, AP: Asit fosfataz

2.2.3.2. Antienzim Antikorlarının Oluşum Mekanizmaları

Enzimlere karşı antikorların hangi mekanizmayla oluştuğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak antijen uyarımı teorisi ve immün toleransın bozulma teorisi, anti-enzim antikorlarının oluşma mekanizmasını kısmen açıklamaktadırlar(31).

Vücutta antijen uyarımı 3 şekilde olabilmektedir.

- Çevreden bazı antijenlere maruz kalmak, bu antijenlere karşı vücutta antikor gelişmesine neden olabilmektedir(31). Bu teoriyi destekler nitelikte, Urdal ve ark. yaptığı bir çalışmada, domuz pankreas amilazıyla, insan P ve S amilazının benzer kısımları olduğu, insanlarda oluşan anti amilaz antikorlarının da, domuz amilazına yüksek afiniteyle bağlandığını göstermişler. Alınan gıdaların, anti enzim antikorlarını geliştirebileceğini belirtmişlerdir(50). Buradaki immunglobulin tipinin Ig A, yani gastrointestinal sistem gibi mukozal yüzeylerden antijenlere karşı oluşan antikor tipinde olması bu görüşe destek olarak gösterilmektedir(51).

- Vücuttaki LDH, CK gibi antijenlerin, miyokard enfarktüsü gibi doku zedenlemesine neden olan durumlarda açığa çıkması, bu antijenlerin proteazlarla veya farklı hidrolitik enzimlerle immünolojik özellik kazanmasına ve bunlara karşı otoantikor oluşumuna neden olabilir(31).

- Vücutta bazı dokularda sekestre olmuş antijenlere karşı otoantikorlar oluşabilir. Örnek olarak, santral sinir sistemi hasarı olmuş bebeklerde beyinde sekestre olmuş CK-BB'nin salınmasıyla buna karşı otoantikor oluşabilir(31,52).

Anti-enzim antikorlarının oluşum mekanizmasını açıklayan diğer teori ise, otoimmün hastalıkların da mekanizmasında rol alan, immün toleransın disregülasyonu teorisidir. Makroenzim saptanan bazı vakalarda, sistemik lupus eritematozus, ankilozan spondilit, kriyoglobulinemi, inflamatuvar barsak hastalığı, çölyak, AIDS gibi otoimmün hastalıkların olması, immünitinin bozulduğuna

işaret eden yardımcı T hücresi / baskılayıcı T hücresi oranının artışı, immünoglobülin düzeyinin artışı, pozitif anti nükleer antikorlar (ANA) gibi bulguların varlığı bu teoriyi desteklemektedir(31-53). Makroamilazemi bulunan bir çölyak hastasında, glutensiz diyetle tedavi sonrası makroamilazeminin kaybolduğu görölmüştür(54).

Enzim-immün kompleks oluşumunda öne sürölen teoriler patogenezi açıklamaktan çok, mevcut vakalar üzerine görüş bildirmektedir. Birçok makro-enzim vakasında, jeneralize bir immün hastalığın klinik ve laboratuvar bulgusu mevcut değildir(55).

2.2.3.3. Tip 1 Makroenzimlerin Klinik Önemi

Anti-enzim antikorlarının, herhangi bir hastalığa neden olup olmadığı veya hastalıkların bir göstergesi olup olmadığı tam çözülememiştir. Diğer otoimmün hastalıklarda olduğu gibi, anti-enzim antikorları 3 mekanizmayla hastalık oluşturabilirler. Bu mekanizmalar;

- immün kompleks depolanması,
- antijenin fonksiyonunu interfere etmesi,
- antijenin eksprese edildiği hücrelere sitotoksik etkidir.

Bu mekanizmalar sırasıyla incelendiğinde, makroenzime sahip kişilerin altta yatan lupus eritromatozis gibi bir otomimün hastalığı yoksa, anti-enzim antikorlarının immün kompleks hastalığına neden olmadığı görölmüş. Enzimlerin hücre dışında katalitik rolü bulunmadığı için, oluşan makroenzimler antijen

fonksiyonunu da interfere edemez. Bazı makroamilaz hastalarında karın ağrısı, malabsorbsiyon gibi belirti ve bulgular olsa da, anti-enzim antikorlarının sitotoksik etkisinden kaynaklanabileceği açık değildir ve hasta seçiminden kaynaklanan hataya bağlanabilir. Bu bulgular ışığında ve makroenzime sahip birçok kişinin görünürde sağlıklı olmasından dolayı, anti-enzim antikorlarıyla hastalık ilişkisi çok zayıf görünmektedir. Bu bakımdan, immünglobülin bağlı makroenzimler benign bir fenomen olarak düşünülmelidir(31).

Hastalık ile anti-enzim antikorları arasında bir ilişkilendirme yapılacaksa, hastalığın bir sonucu olarak anti-enzim antikorlarının geliştiği düşünülebilir, tersi yani kendilerinin tek başına bir hastalığa neden oldukları açıkça gösterilememiştir(49).

2.2.3.4. Bazı Makroenzimlerin Karakteristik Özellikleri

2.2.3.4.1. Makroamilaz:

Makroamilaz, ilk keşfedilen makro enzim türüdür. Levit ve ark., amilaz ile Ig A'nın kompleks oluşturduğunu immün absorpsiyon tekniğiyle göstermişlerdir(39).

Amilaz, yaklaşık 50000 Da ağırlığında, albüminden küçük bir enzimdir ve böbreklerden filtre olarak atılır. Levit ve arkadaşlarının, 1969'da yaptığı başka bir çalışmada, serum amilaz düzeyi yüksek ölçülen makroamilaz hastalarında, amilaz klirensinin, kreatinin klirensine oranını çok düşük bulmuşlar. Oysa bu oran akut pankreatitlerde artmaktadır(56). Farklı olarak, Berk ve arkadaşları, tükürük

bezinden kaynaklı amilaz yüksekliklerinde de amilaz klirensinin, kreatin klirensine oranını belirgin şekilde düşük bulmuşlardır(57).

Literatür taramalarında, amilaz ile kompleks yapan antikorlar, IgA kappa, IgA lambda, IgG kappa ve IgG lambda türlerinden bulunmuştur(58). P ve S tipi amilazların benzer yapısal özelliklerinden dolayı çoğu anti-amilaz antikorlar, her iki tip amilazla da kompleks oluşturabilmektedir. Ancak bazı vakalarda sadece S tipine spesifik antikorlar da gösterilmiştir(59,60).

Klonof ve ark. yaptığı çalışmada, normal amilazemik hastalardaki makroenzim prevalansını %1, hiperamilazemik hastalardaki prevalansı ise %2.5 bulmuşlardır ve herhangi bir spesifik hastalıkla ilişkisini bulamamışlardır. Yine aynı çalışmada, saptanan 63 makroamilaz hastasının erkek ve 53,3 yaş ortalamasında, 35 makroamilaz hastasını kadın ve 49,6 yaş ortalamasında bulunduğunu bildirmişlerdir. Erkeklerde, prevalansı anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır(32).

2.2.3.4.2. MakroAST

1978 yılında Konttinen ve ark. tarafından, iki sağlıklı bayanda, açıklanamayan ısrarlı AST yüksekliğinin sebebinin makroAST olduğunu bildirmişlerdir. Serum AST izoenzim elektroforezinde, sitoplazmik ve mitokondriyal bandlar arasında göç eden anormal bir band tespit etmişler. Ayrıca bu hastalardan birinde, AST ile kompleks yapan Ig-G'yi göstermişlerdir(43).

Nakajima ve ark, Ig G'nin, sitoplazmik AST ile oluşturduğu makro-AST bildirmişlerdir(61). Nagamine ve ark. karaciğer metastazı da olan bir akciğer

kanserli hastada Ig G ve IgA- κ , λ 'nın oluşturduğu makro-AST bildirmişlerdir. Bu vakada, Ig G'nin sitoplazmik AST ile, Ig A'nın ise hem stoplazmik hem de mitokondriyal AST ile kompleks yaptığını göstermişlerdir(62).

Moriyama ve ark. 2015 yılında yayınladıkları çalışmada, laboratuvarlarında tespit ettikleri toplam 54 makro-AST vakası olduğunu bildirmişler, bunun 32 tanesinin Ig A ile, 14 tanesinin Ig G ile, 7 tanesinin hem Ig G hem de Ig A ile kompleks oluşturduğunu belirtmişlerdir. Saptadıkları makroAST vakalarının yaş ortalamasını 44, vakalardan 30'unun erkek, 24'ünün kadın olduğunu bildirmişlerdir(29).

Literatürde makroAST genel popülasyondaki prevalansı ile ilgili yayın bulunmamaktadır. Ancak, AST/ALT>2 ve AST>45 U/L olacak şekilde seçilen 260 hastada yapılan bir çalışmada, bu hastalardan 34'tanesinde (%13) makroAST saptanmış(63). Başka bir pediatrik popülasyonda yapılan çalışmada ise, 6 aydan uzun süreli izole AST yüksekliği bulunan 44 çocuk incelenmiş ve bunların 17 tanesinde (%38,6) makroAST saptanmış(64).

2.2.3.4.3. MakroCK

1979 yılında, Urdal ve ark. ilk kez bir hastada CK-BB izoenzimiyle kompleks oluşturmuş, Ig G'yi bildirmişlerdir(45). Aynı yıl farklı yayınlarda da makroCK'nın özellikleri tariflenmiştir(65,66). Bu yayınlarda elektroforezde CK 2 ve CK 3 izoenzim bantları arasında göç eden anormal makroCK bantları tariflenmiş ve bu hastalarda total CK aktivitesi çoğunlukla yüksek bulunduğu belirtilmiştir. Ayrıca makroCK'nın CK 1 ile oluştuğu gösterilmiştir. Yuu ve ark.

CK-Ig A kompleksi bulunan hastada, CK aktivitesinin anti CK-M antikorlarıyla inhibe edilemediğini göstermişlerdir(67). Bu bulgular, makro CK varlığında, immün-inhibisyon testleriyle yanlış pozitif CK-MB aktivitesi ölçüldüğünü göstermiştir.

Moriyama ve ark. yayınladıkları çalışmada, kendi laboratuvarlarında yaptıkları çalışmalarda toplam 32 makroCK tip 1 hastası saptadıklarını bildirmişler. Bu vakalardan 7 tanesinde enzime bağlı Ig türünün Ig G, 18 tanesinde Ig A, 5 tanesinde ise hem Ig G hem de Ig A olduğunu bildirmişler. İki vakada ise Ig türünü saptayamamışlar. Vakaların yaş ortalaması tanı anında 56,4 bulunmuş. Saptanan vakalardan 17 tanesi erkek, 15'i ise erkek olarak bildirilmiş(29).

MakroCK tip 1 prevalansı bir çalışmada, %0,8-2,3 arasında bulunmuştur(58). Diğer yapılan bir çalışmada ise referans aralığından yüksek total CK aktivitesi bulunan bireylerde ise prevalansı %2 olarak bulmuşlardır(68).

2.2.3.4.4 MakroLDH

MakroLDH hastaları, elektroforez çalışmalarında farklı paternlerde, genişlemiş ve yayılmış anormal bandlara sahip bulunmuşlardır(69). 1965 yılında eş zamanlı olarak Ganrot ve Lund tarafından, sırasıyla lupoid sirozlu ve lösemili hastalarda makroLDH bildirmişlerdir(41-70). Daha sonra yayınlanan vakaların, altta yatan bir hastalıkları olmasına rağmen, 1972'de Nagamine, LDH yüksekliğinden başka bulgusu olmayan 2 makroLDH vakası bildirmiştir(71).

Biewenga ve ark. yayınladığı bir seri çalışmada, LDH bağlı Ig'nin çoğunun Ig A kappa tipinde olduğunu, diğer bağlı Ig G'lerin Ig G3 alt sınıfında olduğunu bildirmişlerdir(72,73). Fujita ise, LDH enziminin koenzim bölgesine bağlanan Ig G'nin koenzime benzer şekilde 3 boyutlu bir yapı oluşturduğunu bildirmiştir(74). Bu çalışmalar Ig'lerin, LDH enzimine çok farklı paternlerde bağlandığını göstermektedir.

Moriyama ve ark. yayınladıkları çalışmada, kendi laboratuvarlarında yaptıkları çalışmalarda toplam 37 makro-LDH vakası saptadıklarını bildirmişler. Bu vakalarda enzime bağlı Ig türünün, 19 vakada Ig G, 16 vakada Ig A, iki vakada da hem Ig G, hem de Ig A olduğunu bildirmişlerdir. Vakaların yaş ortalaması tanısında 58,4 bulunmuş. Saptanan vakalardan 23 tanesi erkek, 14'ü ise erkek olarak bildirilmiştir(29).

Tozawa, makro-LDH insidansını hastalarda %0,32; kan vericilerinde ise %0,36 olarak bildirmiştir(75). Ayrıca 1666 kişilik kasabada yapılan bir çalışmada, 6 adet (%0,6) makro- LDH saptanmış(29).

2.2.3.2 Tip 2 makroenzimlerin yapısı

İmmünglobüline bağlı olmayan makroenzimlerdir. Bazı tip 2 makroenzimlerin oluş mekanizması tablo 6'da gösterilmiştir(53).

Tablo 6. İmmünglobüline bağlı olmayan makroenzimler

Enzim	Mekanizma
Amilaz	Substrat ile kompleks
Tripsin	Proteaz-inhibitör kompleksi
Mitokondriyal CK	Polimerazisyon
ALP	Lipit agregatı
GGT	Lipit agregatı
Lösin aminopeptidaz	Lipit agregatı
5'-Nükleatidaz	Lipit agregatı

Amilazın immünglobüline bağlı olmayan enzim makro enzim formu, volüm replasmanı amacıyla kullanılan karbonhidratlı sıvılarla (hidroksietil nişasta veya polisakkarit içeren volüm genişleticiler) kompleks yapması sonucu oluşurlar(76,77). Amilaz dolaşımında, kendi substratına benzediği için bu polisakkaritlere bağlanır. Hidroksietil nişasta ve amilaz kompleksi, büyük moleküler kitlesinden dolayı böbreklerden filtre olamaz ve dolaşımında birikir. Bu tip makroamilaz formuyla sık karşılaşılmasına rağmen, kullanılmakta olan birçok yeni ilacın buna benzer bir mekanizmayla makroenzim oluşumuna katkıda bulunabileceği göz önünde bulundurulmalıdır(31).

Tripsin gibi proteazlar, serumda, α -2 makroglobülinle yüksek molekül ağırlıklı kompleksler oluşturabilmektedir. α -2 makroglobulinler bu proteazların aktivitesini inhibe etmektedir. Bu mekanizma proteazların zararını engelleyici bir

mekanizma olabilir; ancak, tripsin laboratuvarlarda yaygın çalışılan bir parametre olmadığı için sık saptanmamakta ve klinik ilişkisi bilinmemektedir(31).

MakroCK immünglobüline bağlı formda oluşabileceği gibi, makroCK tip 2'deki gibi immün olmayan mekanizmalarla da oluşabilmektedir. MakroCK tip 2 hastanede yatan hastaların %3,6'sında bulunmaktadır(78). MakroCK tip 2, mitokondriyal CK'nın polimerizasyonuyla oluşur ve molekül ağırlığı 300 000 Da'dan büyüktür(79). Mitokondriyal CK, yapısal olarak M ve B alt ünitelerinden farklıdır ve ayrı bir gen tarafından kodlanır. Karaciğer miyokondriyal CK bakımından zengindir ve hastalıklarında plazmada makroCK tip 2 oluşabilir(80). Ayrıca metastatik karsinomlar gibi ciddi sistemik hastalıklarda da hücrelerden mitokondriyal CK salınımı artmaktadır. MakroCK tip 2 hastalarında, serum total CK aktiviteleri normal veya hafif yüksektir(80).

Alkalen fosfataz (ALP), gama glutamil transferaz (GGT), lösin aminopeptidaz (LAP) ve 5'nükleotidazın makroenzim formları biyokimyasal olarak benzerlik gösterirler, partikülat enzimler veya koinozimler olarak da adlandırılırlar. Laboratuvarlarda poliakrilamid jel elektroforezi yöntemiyle saptanan bu enzimler, amfilik karakterde olup, hepatobiliyer sistem hücrelerinin plazma membranlarında bulunurlar. Bu makroenzimler, genellikle karaciğer hastalıklarında artar, fakat sağlıklı bireylerde de bulunabilirler(31,81,82). Bunlardan en çok çalışılan makroenzimler GGT ve ALP'dir. Elektroforezde GGT 3 ayrı band halinde yüksek (MA>1.000.000), orta (MA:250 000-500 000) ve düşük (MA:120 000) olarak ayrılır. Bunlardan düşük molekül ağırlıklı olanın, proteazlar tarafından hidrofobik kısmı uzaklaştırılan, serbest hidrofilik kısmının

olduğu düşünülür. Alkalen fosfataz ise, poliakrilamid jel elektroforezinde yüksek molekül ağırlıklı form (MA>1.000.000) ve düşük molekül ağırlıklı hidrofilik form (MA:220 000) olarak 2 ayrı banda ayrılır(31,53).

Partikülat enzimlerin oluşmasına ait, iki görüş öne sürülmektedir. İlki, safra akımının engellendiği durumlarda, safranin deterjan etkisiyle bu enzimler ayrılmakta ve dolaşımda hidrofobik lipoprotein taşıyıcılarına bağlanarak oluşmaktadır. İkinci görüş ise, safra akımının engellendiği durumlarda, hepatobiliyer sistem hücrelerinin plazma membranlarının zedelenmesi sonucunda membran parçacıklarının dolaşıma katılmasıyla makroenzimlerin oluştuğu düşünülmektedir(83,84).

2.2.3.4. Tip 2 Makroenzimlerin Klinik Önemi

Makro CK tip 2'nin, AMI tanısında yanlış pozitif tanıya neden olması hariç, bu tip makroenzimler, hasta sonuçlarını yorumlarken çok az olarak zorluğa neden olmaktadır(31).

MakroCK tip 2, genellikle ciddi karaciğer hastalıkları ve yaygın kanserlerle ilişkilidir. Mercer ve ark. yaptığı çalışmada, 33 gastro intestinal sistem adenokarsinomlu hastada, makroCK tip 2 araştırmışlar ve makroCK tip 2 varlığının tümörü saptamadaki sensitivitesini %56 bulunmuşlardır. Bunun karsinoembriyonik antijenden daha iyi bir tümör belirteci olabileceğini belirtmişlerdir(85).

Hepatobiliyer sistem makroenzimlerinin de, karaciğer metastazlarını saptamada faydalı bir tümör belirteci olabileceği belirtilmiştir(86,87)

2.2.4. Makroenzim Saptama Yöntemleri

2.2.4.1. Polietilenglikol (PEG) Çöktürme Yöntemi

Makroenzimleri saptamada, PEG çöktürme yöntemi, Jel filtrasyon kromatografisi, elektroforez gibi yöntemlere göre uygulanması basit, numunenin PEG’li solüsyon ile ön işlemine dayanan bir yöntemdir.

Polietilen glikol, etilen oksit polimerlerinden oluşur.

Yapısı : $H-(O-CH_2-CH_2)_n-OH$

Makro enzimleri saptamak için genellikle 6000 veya 8000 moleküllü ağırlıklı PEG’ler kullanılır.

Yapılan bir çalışmada, PEG 6000 ile çöktürme uygulanan plazmadaki proteinler ve lipidler, çöktürme öncesi değerleriyle karşılaştırılmış(84). Elde edilen bulgular tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Polietilenglikol çöktürme yönteminin proteinlere etkisi

	PEG öncesi	PEG sonrası
Total protein(g/L)	86	44
Albumin (g/L)	38	34
Globulin (g/L)	48	10
Kolesterol(mmol/L)	5,4	0,8
Trigliserid(mmol/L)	1,94	0,4
IgG(g/L)	15,86	<0,33
IgA(g/L)	11,6	1,9
IgM(g/L)	2,46	<0.04

PEG çöktürme yönteminde, numune ve uygun konsantrasyondaki PEG solüsyonu eşit hacimlerde karıştırılır, inkübasyona bırakılır ve santrifüjlenir. Santrifüj sonrası supernatanda ilgili enzim çalışılır. % recovery değerleri aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{PEG sonrası enzim aktivitesi}}{\text{işlem yapılmamış serumdaki enzim aktivitesi}} \times 2 \times 100$$

2.2.4.2. Ultrafiltrasyon Yöntemi

Bu yöntemde, analizini yapacağımız enzime uygun cut-off'lu filtreler seçilir. Filtre işlemine tabi tutacağımız numune filtre kısmını konur, daha sonra filtre haznesine yerleştirilir ve santrifüj edilir. Santrifüj sonrası haznede biriken ultrafiltrattan enzim analizi yapılır.

Ultrafiltrattan enzim analizi sonrası % recovery değeri aşağıdaki formülden hesaplanır.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Ultrafiltrattaki enzim aktivitesi}}{\text{işlem yapılmamış serumdaki enzim aktivitesi}} \times 100$$

2.2.4.3. Makroenzim Saptamada Kullanılan Diğer Yöntemler

Makroenzimlerin saptanmasında kullanılan yöntemler(88):

- Sükroz dansite gradient santrifügasyon
- Jel filtrasyon kromatografisi
- Agaroz veya diğer tip elektroforez yöntemleri
- Gradient poliakrilamid jel elektroforezi

- Ekslüzyon kromotografisi

Enzime spesifik otoantikörlerin saptanmasında kullanılan yöntemler:

- Enzim-linked immunosorbent assay
- immünpresipitasyon
- radioimmünassay
- western blot
- enzim aktivitesi inhibisyonu

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için, Keçiören Eğitim ve Araştırma Hastanesi Etik Kurulundan, 11/11/2015 tarihinde, B.10.4.İSM.4.06.68.49/ sayı numarasıyla onay alınmıştır. Çalışmanın tüm aşamaları, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.1. Referans Aralık Çalışması İçin Bireylerin Seçimi

Çalışma için iki ayrı grup oluşturulmuştur.

1. grup için, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi incelenerek, 19-65 yaş arası, amilaz, AST, CK ve LDH değerleri referans aralıklar içinde olan, istenmiş diğer biyokimya parametrelerinin de normal referans aralıkta olan, laboratuvarında fazla serumları bulunan, görece sağlıklı 60 birey seçilmiştir.

2. grup için, Gazi Üniversitesi Hastanesi Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi incelenerek, 19-65 yaş arası, amilaz, AST, CK ve LDH değerleri referans aralığının üstünde olan bireyler seçilmeye çalışılmıştır. Ancak, dört enzim düzeyi de aynı anda referans aralığı üstünde olan yeterli sayıda hasta bulunamadığı için, farklı hastalardan, yüksek olan enzim değerleri seçilerek, toplamda, 60'ar adet olacak şekilde, referans aralığından yüksek olan amilaz, AST, CK ve LDH serumları çalışmaya alındı.

Seçilen numuneler, çalışılncaya kadar -80 C'de saklanmıştır.

3.2. İmpresizyon Çalışması

İmpresizyon çalışması için, Roche PreciControl ClinChem(PCC) Multi 1 ve 2 iç kalite kontrol serumları kullanılmıştır. PCC 1 kontrol serumunun lot numarası 186373, PCC2 kontrol serumunun lot numarası 186387'dir. 1. ve 2. seviye kontrol serumlarına direkt, PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon işlemleri uygulandıktan sonra, amilaz, AST, CK ve LDH aktiviteleri çalışıldı ve CV% değerleri hesaplandı. Çalışma günde 1 defa, çift ve 10 gün boyunca yapıldı.

3.3. Yöntemlerin Uygulanması

3.3.1. Polietilenglikol Çöktürme Yöntemi

İşlem için, Merck Polietilen 6000 kullanıldı. %25 lik PEG 6000, 0.01 M PBS de hazırlandı. 300 µL PEG çözeltisi ve 300 µL serum ependorf tüplerinde karıştırılıp, 1 dakika vortekslendi. 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonu takiben 3000 rpm'de masaüstü ependorf santrifüjünde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan, enzim aktiviteleri ölçüldü(28). Eş zamanlı olarak, işlem yapılmamış serumlarda da enzim aktiviteleri ölçüldü. % recovery değerleri her enzim için aşağıdaki formülle hesaplandı.

$$\% \text{ Recovery: } \frac{\text{PEG sonrası enzim aktivitesi}}{\text{işlem yapılmamış serumdaki enzim aktivitesi}} \times 2 \times 100$$

3.3.2. Ultrafiltrasyon Yöntemi

Ultrafiltrasyon yöntemi için, Millipore Amicon Ultra-0,5 ml, 100000 Da molekül ağırlığı cut-off değerli filtreler kullanıldı. 500 µL serum, dilüe edilmeden,

filtrenin rezervuarına pipetlendi. Filtre, kendi ependorflarının içine yerleştirildikten sonra, 150 g'de, 18 saat, soğutmalı ependorf santrifüjünde, 15 C' da santrifüj edildi. Santrifüj sonrası filtre uzaklaştırıldı ve ependorf tüpü içinde kalan ultrafiltrattan enzim aktiviteleri ölçüldü. % recovery değerleri her test için aşağıdaki formülden hesaplandı(4).

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Ultrafiltrattaki enzim aktivitesi}}{\text{İşlem yapılmamış serumdaki enzim aktivitesi}} \times 100$$

3.4. Enzimlerin Çalışılması

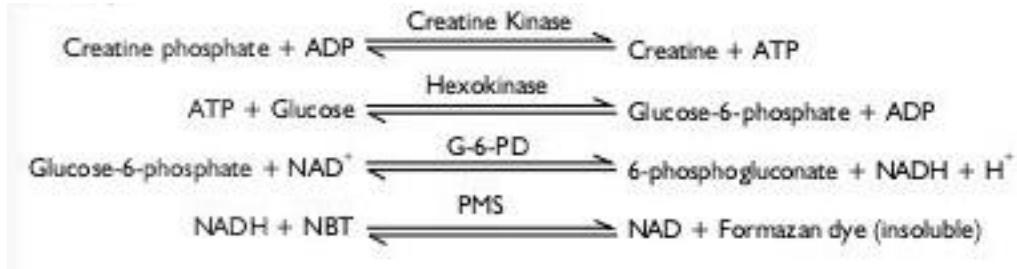
Çalışmadaki tüm enzim ölçümleri, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarındaki Roche Cobas 8000 otoanalizöründe yapılmıştır. Kasım 2016'da, 20 günlük iç kalite kontrol sonuçlarımızdan hesapladığımız 6 sigma değerleri, amilaz ve LDH için level 1 düzeyde >6 sigma, level 2 düzeyde ise iyi 3-6 sigma arasında tespit edilmiş olup, AST testinin her iki seviyesi 3-6 sigma arasında, CK'nın her iki seviyeside >6 sigma olarak bulundu.

3.5. Polietilenglikol Çöktürme ve Ultrafiltrasyon Yöntemleriyle Saptanan Makroenzimlerin Tanısının Konfirmasyonunda Kullanılan Yöntemler

3.5.1. Kreatin Kinaz İzoenzim Elektroforezi

CK izoenzim elektroforezi, Helena SAS-1 plus cihazında, hazır kit kullanılarak çalışılmıştır. CK izoenzimleri, agaroz jelde, 80 V, 20 dakika, 15 °C'de elektroforetik mobilitelerine göre ayrıldıktan sonra, jel reaktif karışımıyla 30 dakika, 37 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, jel %10'luk glacial asetik asitte yıkandıktan sonra kurutulmuştur. İşlemler sonrası

CK izoenzim bantları görünür hale gelmiştir. Reaksiyon şeması şekil 9’da gösterilmiştir.



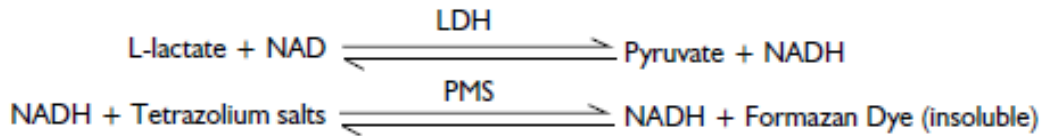
Şekil 9. CK izoenzim bantlarını görünür hale getiren reaksiyon şeması

NBT: Nitroblue tetrazolium PMS: Fenazin metasülfat

Yöntem, band başına 1300 U/L’ye kadar lineerdir. Yöntemin sensitivitesi band başına 4 U/L’dir.

3.5.2. Laktat Dehidrogenaz İzoenzim Elektrofrez

LDH izoenzim elektrofrez, Helena SAS-1 plus cihazında, hazır kit kullanılarak çalışılmıştır. LDH izoenzimleri, agaroz jelde, 80 V, 20 dakika, 15 °C’de elektroforetik mobilitelerine göre ayrıldıktan sonra, jel reaktif karışımıyla 25 dakika, 45 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, jel %10’luk glacial asetik asitte yıkandıktan sonra kurutulmuştur. İşlemler sonrası LDH izoenzim bantları görünür hale gelmiştir. Reaksiyon şeması şekil 10 ‘da gösterilmiştir.



Şekil 10. LDH izoenzim bantlarını görünür hale getiren reaksiyon şeması

PMS: Fenazin metasülfat

Sistem band başına 650 U/L'ye veya total LDH aktivitesi 1300 U/L'ye kadar lineerdir.

3.5.3. Amilaz/kreatinin klirensi oranının hesaplanması

Amilaz/kreatinin klirensi aşağıdaki fomüle göre hesaplanmıştır.

$$ACCR = \frac{\text{İdrar amilazı(U/L)}}{\text{Serum amilazı(U/L)}} \times \frac{\text{Serum kreatinini(mg/dL)}}{\text{İdrar kreatinini(mg/dl)}} \times 100$$

Amilaz/kreatinin klirensinin <%1 olması makroamilaz için destekleyici bulgu olarak kabul edilmiştir(32).

3.6. İstatistiksel Analiz

İmpresizyon çalışmasında varyasyon katsayıları (CV%), EP Evaluator 11 Release programı kullanılarak hesaplanmıştır.

PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon işlemleri sonrası % recovery değerleri için referans aralık hesaplaması için Analyse-it 2.2 programı kullanılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogrov Smirnov testiyle kontrol edildikten sonra, referans aralıklar, %90 güven aralığında parametrik yöntemle hesaplanmıştır.

1. ve 2. grup referans bireyler arasındaki % recovery verileri Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. İmpresizyon Çalışması Bulguları

İç kalite kontrol materyalleri olan Roche PreciControl ClinChem(PCC) Multi 1 ve 2 serumlarının direkt ölçüm, PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon işlemleri sonrası impresizyon sonuçları tablo 8 ve 9’da gösterilmiştir. Ek olarak tablolarda, PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon işlemlerinden sonra elde edilen ortalama % recovery değerleri de hesaplanmıştır.

Tablo 8. Kalite kontrol materyali 1.seviye impresizyon sonuçları

Enzim	Numune	Mean Aktivite U/L	Çalışma içi CV %	Çalışmalar arası CV %	Total CV %	Ortalama Recovery %
Amilaz	Direkt ölç.	80,1	0,9	1,0	1,4	-
	PEG supernat	31,2	2,9	4,1	5	77,9
	Ultrafiltrat	85,1	4,3	7,8	8,9	106,2
AST	Direkt ölç.	47,5	1,1	1,2	1,6	-
	PEG supernat	12,8	5,1	3,9	6,4	53,8
	Ultrafiltrat	40	5,4	5,8	7,9	84,2
CK	Direkt ölç.	149,1	1,0	1,3	1,6	-
	PEG supernat	52,2	1,5	2,3	2,8	70,0
	Ultrafiltrat	133,2	3,6	3,7	5,1	89,3
LDH	Direkt ölç.	164	0,8	1,4	1,6	-
	PEG supernat	39	2,4	2,0	3,1	47,4
	Ultrafiltrat	64,4	5,0	5,4	7,4	39,2

Tablo 9. Kalite kontrol materyali 2.seviye impresizyon sonuçları

Enzim	Numune	Mean Aktivite U/L	Çalışma içi CV %	Çalışmalar arası CV %	Total CV %	Ortalama Recovery %
Amilaz	Direkt ölç.	186,3	0,5	0,7	0,9	-
	PEG supernat	64,1	1,7	2,1	2,7	68,8
	Ultrafiltrat	204,1	2,8	6,3	6,9	109,5
AST	Direkt ölç.	145,8	0,5	1	1,1	-
	PEG supernat	32,2	1,6	3	3,4	44,1
	Ultrafiltrat	118,9	5,1	5,4	7,4	81,5
CK	Direkt ölç.	295,7	0,3	0,6	0,7	-
	PEG supernat	70,7	1,9	2	2,8	47,8
	Ultrafiltrat	260,3	3,3	4,3	5,4	88
LDH	Direkt ölç.	303,2	0,4	0,6	0,7	-
	PEG supernat	56,6	2,3	2,5	3,4	37,3
	Ultrafiltrat	116,1	5,2	6,1	8	38,2

Beklendiği gibi en düşük CV% sonuçları direkt ölçümde elde edilmiş olup değerler %2'den küçüktür. Tüm CV% değerleri arasında en yüksek sonuçlar ultrafiltrasyon yönteminde bulunmuştur.

4.2. Referans Aralık Çalışması Sonuçları

Referans aralık çalışmamız, enzim değerleri referans aralıklar içinde olan ve referans aralıkların üst sınırından yüksek olan bireylerde olmak üzere 2 ayrı grupta yapılmıştır.

1. grup aynı 60 bireyden oluşmasına rağmen, 2.grup, 4 enzimi de aynı anda yüksek 60 birey bulunamadığı için farklı bireylerden oluşturulmuştur. Bu gruplara ait demografik veriler tablo 10’da verilmiştir.

Tablo 10. 1. ve 2. grup referans bireylerin demografik verileri

	<u>1.Grup</u>	<u>2.Grup</u>			
		<u>AST</u>	<u>Amilaz</u>	<u>CK</u>	<u>LDH</u>
Kadın	31 (%48)	26(%43)	27(%45)	28(%47)	30(%50)
Erkek	29 (%52)	34(%47)	33(%55)	32(%53)	30(%50)
Yaş	19-65 (ort:42)	19-65 (ort:46.8)	20-65 (ort:49,5)	20-64 (ort:44)	19-64 (ort:48,1)

PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle, amilaz, CK, AST ve LDH enzimleri için % recovery referans aralıkları 1. ve 2. grup için ayrı ayrı belirlenmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testiyle kontrol edildikten sonra parametrik yöntemle %90 güven aralığında hesaplanmıştır. Referans aralık sonuçları tablo 11 ve tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 11. 1.gruptaki referans aralık sonuçları

Enzim	Direkt ölçüm (U/L)	PEG Supernat (U/L)	UF (U/L)	<u>PEG recovery</u>		<u>UF recovery</u>	
				RI (%)	Median(%)	RI (%)	Median (%)
Amilaz	19-100	6-33	20-102	53-78	65,2	61-104	82,7
AST	9-38	3-15	5-21	37-81	60,3	34-77	61,3
CK	10-174	4-64	7-90	53-91	71,3	38-78	57,2
LDH	139-255	29-67	51-133	33-61	47,1	27-54	41,3

RI=Referans interval

Tablo 12. 2.gruptaki referans aralık sonuçları

Enzim	Direkt ölçüm RI (U/L)	PEG Supernat RI (U/L)	UF RI(U/L)	<u>PEG recovery</u>		<u>UF recovery</u>	
				RI (%)	Median(%)	RI (%)	Median (%)
Amilaz	106-1973	32-814	72-1927	44-79	62,1	56-119	86,6
AST	40-638	9-196	19-470	32-75	52,5	30-78	52,4
CK	179-4156	43-1264	96-1997	45-94	73,1	37-78	57,1
LDH	262-1131	47-336	77-407	28-63	45,7	25-50	36,3

RI=Referans interval

1. ve 2. gruplar arasındaki PEG çöktürme ve UF yöntemi % recovery değerleri Mann-Whitney U testiyle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar tablo 13 ve 14’de gösterilmiştir.

Tablo 13. 1. ve 2.grup arasında PEG çöktürme yöntemiyle saptanan % recovery değerlerinin karşılaştırılması

Enzim	1. Grup PEG % R.I	2. Grup PEG % R.I	İki grup arası fark Mann-Whitney t.
Amilaz	53-78	44-79	P<0,05
AST	37-81	32-75	P<0,05
CK	53-91	45-94	P>0,05
LDH	33-61	28-63	P>0,05

Tablo 14. 1. ve 2. grup arasında ultrafiltrasyon yöntemiyle saptanan % recovery değerlerinin karşılaştırılması

Enzim	1.Grup UF % R.I.	2.GRUP UF % R.I.	İki grup arası fark Mann-Whitney t.
Amilaz	61-104	56-119	P<0,05
AST	34-77	30-78	P>0,05
CK	38-78	37-78	P>0,05
LDH	27-54	25-50	P<0,05

Tablo 13’de 1. ve 2. grup arasında PEG çöktürme yöntemiyle elde edilen referans aralıklara bakıldığında, 4 enzim içinde 2. gruptaki alt referans limitleri 1.guba göre düşük bulunmuştur. Ancak istatistiksel olarak bakıldığında, iki grup

arasında amilaz ve AST enzimleri için fark bulunmuştur($p<0,05$). CK ve LDH enzimleri için fark bulunamamıştır($p>0,05$).

Tablo 14’de 1. ve 2. grup arasında ultrafiltrasyon yöntemiyle elde edilen referans aralıklara bakıldığında CK ve LDH enzimleri için benzer görünmektedir. Ancak, amilaz ve AST enzimi için 2.grupta alt referans limitler hafif düşük bulunmuştur. Ayrıca, amilaz için 2. grupta üst referans limit daha yüksek bulunmuştur. Ancak iki grup arasındaki farka bakıldığında sadece amilaz enziminde anlamlı fark bulunmuştur($p<0,05$).

4.3. Ultrafiltrasyon ve PEG Çöktürme Yöntemleriyle Saptadığımız

Makroenzim Vakalarının Tanısının Farklı Yöntemlerle Desteklenmesi

Çalışmamızda, kliniklerden makroenzim şüphesiyle danışılan veya Laboratuvar Bilgi Yönetim Sisteminde karşılaştığımız uygunsuz sonuçları bulunan hastalara ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme yöntemlerini uyguladık. Ayrıca bir makroCK vakasını da referans aralık belirleme çalışması sırasında tespit ettik. Bu yöntemlerle saptadığımız 3 makroCK, 3 makroLDH ve 2 makroamilaz vakasını farklı yöntemlerle konfirme etmeye çalıştık. Konfirmasyon amacıyla, CK ve LDH için agaroz jel elektroforezini, amilaz için ise amilaz/kreatinin klirensi oranını kullandık.

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme % recovery değerleri, belirlediğimiz referans aralıkların altında kalan 3 vaka, makro CK olarak düşünüldü. Bu vakalara ait veriler tablo 15’de verilmiştir.

Tablo 15. Saptadığımız 3 makroCK vakasının verileri

	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Total CK(U/L)	PEG% recov	UF% recov	Elektrof. Makro%
Vaka 1	47	Kadın	Göğüs ağrısı	538	14	20	79
Vaka 2	37	Kadın	Mide maligne neoplazmı	379	21	19	30
Vaka 3	59	Erkek	Hipertansiyon Kr.İs.kalp has	279	35	30	56

Saptadığımız makroCK vakalarının elektroforez işlemi ile elde edilmiş jel görüntüsü resim 1’de verilmiştir.



Resim 1. CK izoenzimlerinin jel görüntüsü

1. ve 2.sütun: kontrol numunesi; 4-5-7-8-9-11-12.sütunlar: sadece CK MM bandı içermekte
3.sütun: Vaka 1-Makro CK tip 1 6.sıra: Vaka 2-Makro Ck tip 2
10.sütun: Vaka 3-Makro CK tip 1

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme yöntemleriyle saptadığımız 3 vakadan 2 tanesini makroCK tip 1, 1 tanesini de makroCK tip 2 olarak elektroforez yöntemiyle konfirme ettik.

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme % recovery değerleri, belirlediğimiz referans aralıkların altında kalan 3 vaka, makroLDH olarak düşünülmüştür. Bu vakalara ait veriler tablo 16’da verilmiştir.

Tablo 16: Saptadığımız 3 makroLDH vakasının verileri

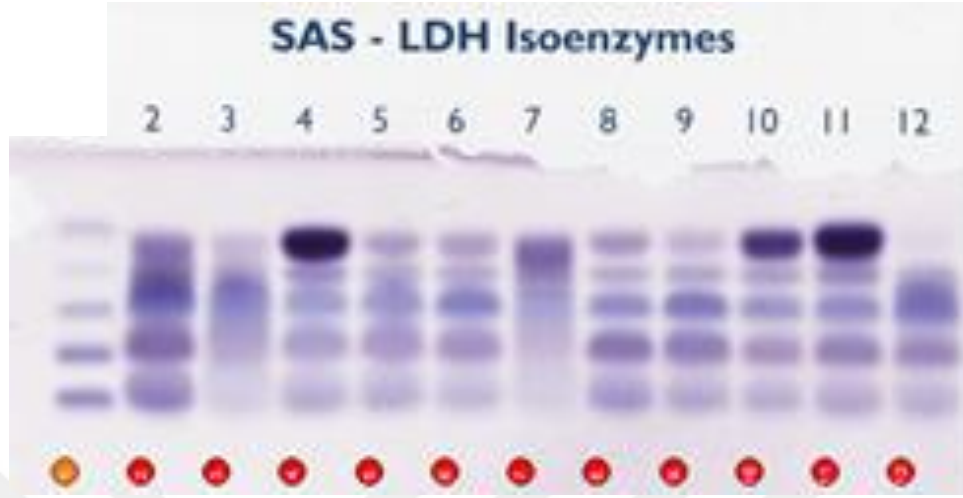
	Yaş	Cinsiyet	Tanı	LDH (U/L)	PEG % recov	UF%
Vaka 1	70	Erkek	Mezotelyoma	340	3	14
Vaka 2	58	Kadın	Hipotiroidizm	323	4	20
Vaka 3	43	Kadın	Ülseratif Kolit Vit. D eksikliği	427	3	18

Saptadığımız makroLDH vakalarının elektroforez işlemi ile elde edilmiş jel görüntüleri resim 2 ve 3’de verilmiştir.



Resim 2. LDH izoenzimlerinin jel görüntüsü-1

6.sütun: Vaka 1-MakroLDH; diğer sütunlar non-makro izoenzim formları



Resim 3: LDH izoenzimlerinin jel görüntüsü-2

1.sütun: Kontrol

3.sütun: Vaka 2-Makro LDH 7.sütun: Vaka 3-Makro LDH

Diğer sütunlar non-makro izoenzim formları

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme yöntemleriyle saptadığımız 3 makroLDH vakasını elektroforez yöntemiyle konfirme ettik.

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme % recovery değerleri, belirlediğimiz referans aralıkların altında kalan 2 vaka, makroamilaz olarak düşünülmüştür. Bu vakalara ait veriler tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Saptadığımız 2 makroamilaz vakasının verileri

	Yaş	Cinsiyet	Tanı	Amilaz U/L	Lipaz U/L	Amilaz PEG%	Amilaz UF%	Amilaz/ Kreatinin Klirensi Oranı
Vaka 1	59	Erkek	DM	337	14	5	31	%0,19
Vaka 2	52	Kadın	Migren	192	33	15	42	%0,31

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme yöntemleriyle saptadığımız makro amilaz vakalarının her ikisinde de amilaz/kreatinin klirensi oranı, makro amilazda beklendiği gibi $<1\%$ bulunmuştur.



5. TARTIŞMA

Makroenzimler, normal enzim yapılarına göre daha yüksek moleköl ağırlıklarına sahiptirler. Makro enzimlerin klirensi, normal enzimlere göre daha yavaş olduğu için plazmada birikirler ve enzim aktivitelerinin yüksek ölçölmesine neden olabilirler(1).

Açıklanamayan enzim yüksekliğinin bir nedeni olan makroenzimlerin, düşünölmemesi veya tanısının konulmasındaki eksiklikler, pahalı, gereksiz ve hatta invazif girişimlerin yapılmasına neden olabilir(2). Bu bakımdan, açıklanamayan enzim yüksekliği olan veya makroenzimden şüphelenildiği durumlarda tanısı konabilmelidir.

Makroenzimler, seyrek görölmele beraber, popölasyonun %1,5-2,5'unda göröldeğü düşünölmeleedir(4). Ancak günümüzde, özellikle büyük laboratuvarlarda hergün binlerce enzim ölçümü yapıldığı düşünöldeğünde, birçok hastada, tanı koymada zorluklara neden olabilen saptanmış veya saptanmamış makroenzim olduğu sonucu çıkarılabilir.

Makroenzimleri saptamada, Jel filtrasyon kromotografisi, ultrasantriföl, elektroforez gibi komplike, külfetli metodlar vardır, ancak birçok laboratuvarla bu ekipmanlar mevcut değildir(3).

Polietilenglikol çöktürme yönteminin, basit bir teknik olup, makroamilazı saptamada, jel filtrasyon yöntemine iyi bir alternatif olabileceği ve makroamilazı saptamada kullanılabileceği gösterilmiştir(89,90,91). Polietilenglikol çöktürme

yönteminin diğer makroenzimleri de saptamada kullanılabilirliğini gösteren birçok çalışma mevcuttur(64,68,3,4).

Ultrafiltrasyon yöntemi, makroprolaktin tayininde kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, makroenzimlerin saptamasıyla ilgili yapılmış çok az sayıda çalışma ve veri bulunmaktadır. Literatürde sadece, Wyness. ve ark. yaptığı 2 yayın bulunmaktadır(4,96).

Literatürde, polietilenglikol çöktürme yöntemiyle makroenzimleri saptayabilmek için alınması önerilen % recovery değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda bu değer, enzim düzeyleri referans aralıklarının içinde olan bireylerde belirlenmişken, bazı çalışmalarda enzim düzeyleri referans aralığın üst limitinden yüksek bireylerde belirlenmiştir. Ayrıca, PEG çöktürme işleminde kullanılan PEG konsantrasyonları ve santrifüj süreleri de farklılık göstermektedir(3,4,91,92).

Polietilenglikol yöntemiyle makroenzimleri saptayabilmek için alınması önerilen % recovery değerlerinde farklılıklar bulunmasından dolayı, bizde laboratuvarımızda sık karşılaşılan amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için % recovery referans aralıklarını belirlemeye çalıştık. Ultrafiltrasyon yöntemiyle yapılmış çok kısıtlı çalışma bulunduğu için, bu yöntemle de % recovery referans aralıklarını belirlemeye çalıştık.

Yapılan çalışmalarda, makroenzimleri saptayabilmek için alınması önerilen % recovery değerleri, bazı çalışmalarda, enzim düzeyleri referans aralıklarının içinde olan bireylerde belirlenmişken, bazı çalışmalarda enzim düzeyleri referans

aralığın üst limitinden yüksek bireylerde belirlenmiştir. Literatürde, referans aralık çalışmalarının sağlıklı bireylerde yapılması önerilmesine rağmen(93,94), çalıştığımız makroenzim popülasyonunun, enzim değerleri, sıklıkla referans aralığın üst limitinden yüksektir. Bizde bu amaçla, hem enzim değerleri referans aralığın içinde olan bireylerde, hem de enzim değerleri referans aralığın üst limitinden yüksek olan bireylerde, ayrı ayrı % recovery referans aralıklarını belirledik ve karşılaştırdık.

Çalışmamızda, PEG çöktürme yönteminde, %25'lik PEG 6000 kullandık. Eşit hacimlerde PEG solüsyonu ve serumdan eşit hacimlerde karıştırıp, vorteksledik. On dakika oda ısısında inkübasyondan sonra, 3000 rpm'de (650g) masaüstü ependorf santrifüjünde, santrifüjledik. Süpernatandan enzim analizlerini gerçekleştirdik. Patteet ve ark. yaptığı bir çalışmada, makroAST tayininde kullanılmak üzere, %10, %15, %20 ve %25'lik PEG 6000 konsantrasyonlarının etkilerini karşılaştırmışlar ve optimum sonucu %25 PEG 6000 solüsyonunda elde etmişler. Ayrıca, 10 dakika ve 30 dakika 3000 rpm'de santrifüj arasında anlamlı fark bulamamışlar(95). Yapılan başka bir çalışmada ise, makroCK tayininde, %25 PEG 6000 , 30 dakika santrifüj; %25 PEG 8000, 30 dakika santrifüj ve %25 PEG 6000, 10 dakika santrifüj yöntemlerini karşılaştırmışlar ve üç yönteminde kullanılabileceğini, ancak optimum metod olarak %25 PEG 6000, 10 dakika santrifüj yöntemini önermişler(28). Biz de bu veriler ışığında, çalışmamızda %25 PEG 6000, 10 dakika santrifüj yöntemini uyguladık.

Ultrafiltrasyon yönteminde, 100 000 Da cutt-off değerli hazır filtreler kullandık. On sekiz saat santrifüj sonrası, ultrafiltrattan enzim tayinlerini

gerçekleştirdik. Literatürde, ultrafiltrasyon yöntemini makroenzim tespitinde kullanan sadece 2 çalışma bulunmaktadır(4-96). Biz de çalışmamızı bu yayınlardaki yönteme göre yaptık.

İmpresizyon çalışmasını, 1. ve 2. seviye ticari iç kalite kontrol materyaliyle gerçekleştirdik. Beklendiği gibi en düşük CV% değerlerini direkt ölçümde elde ettik. Her iki seviyede de en yüksek CV% değerlerini ultrafiltrasyon çalışmasında elde ettik. En yüksek CV% değerini ise 8,9 ile amilaz enziminde ve 1. seviye iç kalite kontrol materyalinde bulduk. Wyness. ve ark. yaptığı impresizyon çalışmasında, tek, yüksek seviye iç kalite kontrol materyali kullanılmış ve PEG yöntemi için total CV% değerlerini amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için sırasıyla 5,1; 4,4; 3,8 ve 9,3 bulmuşlar(4-96). Biz ise total CV% değerlerini aynı sırayla, 2,7; 3,4; 2,8 ve 3,4 olarak, daha düşük bulduk. Bu küçük farklar, bizim PEG çalışmamızın tek kişi tarafından yapılmasına, farklı marka kalite kontrol materyali kullanmamıza veya Wyness. ve ark. bizden farklı olarak %25’lik PEG 8000 kullanmalarına bağlı olabilir. Davidson. ve ark. yaptığı çalışmada ise, yüksek ve tek seviye kalite kontrol materyali kullanılarak, PEG 6000 çöktürme yöntemi için total CV% değerleri aynı sırayla 11,2; 5,9; 10,8 ve 7,3 bulmuşlardır(3). PEG yöntemi için en düşük CV% değerleri bizim çalışmamızda bulunmuştur.

Ultrafiltrasyon yöntemiyle yapılmış tek impresizyon çalışmasını Wyness ve ark. yapmışlardır. Yüksek seviye kalite kontrol materyali kullanarak yaptıkları çalışmada, total CV% değerlerini amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için sırasıyla 2,9; 3,4; 2,8 ve 6,3 bulmuşlardır(4,96). Bizim çalışmamızda ise, total

%CV değerlerini 2.seviye iç kalite kontrolü için, aynı sırayla, 6,9; 7,4; 5,4 ve 8 olarak bulduk. Aynı marka filtre, santrifüj süresi ve hızını kullanmamıza rağmen total CV% değerlerini yüksek bulmamızın nedeni, farklı marka kontrol materyalleri kullanmamıza veya bizim soğutmalı ependorf santrifüjünde, 15 °C'da santrifüj etmemize bağlı olabilir. İlginç olarak impresizyon çalışmasında elde ettiğimiz mean değerlerden hesapladığımız % recovery değerlerine baktığımızda, çok benzer sonuçlar elde ettiğimizi gördük. Wyness ve arkadaşlarının impresizyon çalışmasından elde ettiği mean değerlerden hesapladığı % recovery değerlerini amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için sırasıyla 107, 82, 90 ve 48 bulmuşlar. Bizim çalışmamızda ise aynı sırayla 109, 81, 88 ve 38 olarak bulduk. LDH haricinde impresizyon çalışmasındaki mean değerlerden hesapladığımız % recovery değerlerini çok benzer bulduk. Amilaz enziminin yüksek olan bu % recovery değerleri, enzimin molekül ağırlığının daha düşük olmasına ve daha kolay filtre olabilmesine bağlıdır.

Çalışmamızdaki, 1. seviye kalite kontrol materyali impresizyon çalışmasındaki mean değerlerden hesapladığımız PEG çöktürme % recovery değerlerine bakıldığında, amilaz, AST, CK ve LDH değerleri için sırasıyla 78, 54, 70 ve 47 bulunmuştur. 2. seviye kalite kontrol materyali için mean değerlerden hesapladığımız % recovery değerleri aynı sırayla 69, 44, 48 ve 38 olarak bulunmuştur. İkinci seviye kalite kontrol materyali impresizyon çalışmasındaki mean değerlerden hesapladığımız % recovery değerleri düşük bulunmuştur. İki seviye kalite kontrol materyali impresizyon çalışmasındaki ultrafiltrasyon yönteminin mean değerlerinden hesapladığımız % recovery değerlerine

baktığımızda ise sonuçlar birbirine çok benzer bulunmuştur. Diğer çalışmalarda, tek seviye kalite kontrol materyaliyle impresizyon çalışması yapıldığı için bu farkı belirleyememişlerdir(3,4,96).

Çalışmamızda amilaz enzimi için PEG çöktürme yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 53-78 (median 65,2), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 44-79 (median 62,1) olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$).

Wyness. ve ark. amilaz değeri referans aralıkların içinde olan bireylerde yaptığı çalışmada, PEG yöntemi için % recovery referans aralığı 38-78 olarak bulmuşlardır(4). Bizim çalışmamızdaki her iki gruba ait alt referans aralığına göre düşük bulmuşlardır. Saptadıkları bu geniş aralık, bizden farklı olarak kullandıkları PEG 8000 konsantrasyonuna, bizim çalışmamızın tek kişi tarafından ve az sayıda numune grupları halinde çalışılmasına bağlanabilir. Ancak onların çalışmasının güçlü yönü olan, 125 bireyde yapılmış olması olup, referans aralığındaki bu geniş dağılımı açıklayabilir. Levitt ve ark'nın, 42 normal, 16 hiperamilazemik ve 18 konfirme makro amilaz numunelerinde yaptığı çalışmada, % recovery cut-off değerini 48 olarak bulmuşlar(90). Lawson tarafından, hiperamilazemik 454 bireyle yapılan büyük çalışmada, PEG çöktürme yöntemi, jel filtrasyon kromatografisiyle karşılaştırılarak incelenmiş ve % recovery cut-off değeri %43 olarak önerilmiş. (91). Bizim yaptığımız çalışmada 1. gruptaki bireylerde alt referans aralığı 53, 2.gruptaki bireylerde alt referans aralığı 44 olarak bulduk. Bu çalışmalardan da yola çıkarak, yanlış pozitiflik oranını da arttırmamak için 2. gruptaki referans aralıklar bizim laboratuvarımız için uygundur. Ayrıca

saptadığımız iki makroamilaz hastasında da %5 ve %15 gibi referans aralığın çok altında PEG sonuçlarıyla karşılaştık. Bu hastaların tanısını aynı zamanda amilaz/kreatinin klirensi oranıyla da konfirme ettik.

Çalışmamızda amilaz enzimi için ultrafiltrasyon yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 61-104 (median 82,7), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 56-119 (median 86,6) olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$).

Ultrafiltrasyon yöntemiyle amilaz için % recovery referans aralıklarının hesaplandığı tek çalışma bulunmaktadır(4). Bu çalışmada bulunan % recovery referans aralıkları sağlıklı popülasyonda çalışılmış olup, 86-113 (median 104) olarak bulunmuştur. Bu çalışmada, makroamilazı saptama açısından, PEG çöktürme yöntemiyle ultrafiltrasyon yöntemi karşılaştırılmış ve 11 makroamilaz hastasını da her iki yöntemin tespit edebildiği görülmüş(4). Ayrıca ultrafiltrasyon yönteminde, amilazın % recovery referans aralıklarının, PEG yöntemine göre daha yüksek olmasının, klinisyenler tarafında amilaz-makroamilaz ayrımını kolaylaştırabileceği belirtilmiş. Bizim çalışmamızda, ultrafiltrasyon yöntemiyle, amilaz için referans aralıklar her iki grubumuzda da düşük bulunmuştur. Aynı marka filtre, santrifüj süresi ve hızı kullanmamıza rağmen referans aralıkların oldukça farklı çıkması ilginçtir. Bizim çalışma da farklı olarak, masa üstü santrifüjler 18 saat boyunca aşırı ısındığı için, soğutmalı ependorf santrifüjünde 15 °C'da çalışılmıştır. Diğer çalışmada ise masaüstü santrifüjü kullanıldığı belirtilmesine rağmen sıcaklıkla ilgili bilgi bulunmamaktadır. Ancak, diğer çalışmanın 125 birey de yapılması bu çalışmanın güçlü yönüdür. Bu bakımlardan,

kendi laboratuvarımız şartlarında elde ettiğimiz 2. gruptaki referans aralıkları(56-119), yanlış pozitif sonuç vermemek açısından da uygun bulduk. Arada kalan numuneler, amilaz/kreatinin klirensi oranıyla konfirme edilebilir. Saptadığımız 2 makroamilaz hastasının % recovery değerleri 31 ve 42 olup, ultrafiltrasyon yöntemi bu hastaları saptayabilmiştir.

Çalışmamızda AST enzimi için PEG çöktürme yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 37-81 (median 60,3), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 32-75 (median 52,5) olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur($p<0.05$). Alt ve üst limitler arasındaki farka bakıldığında, enzimin bu yöntem için değişkenliğinin yüksek olduğu sonucuna varılabilir.

Davidson ve ark. yaptığı çalışmada, farklı hastalıkları olan, enzim düzeyi yüksek 40 kişilik grupta yaptığı çalışmada, PEG çöktürme yöntemi ile AST enzimi için % recovery referans aralığını 47-82 olarak belirlemişlerdir(3). Wyness. ve ark. 125 sağlıklı kişide yaptığı çalışmada ise referans aralık olarak 26-88 bulmuşlardır(96). Patteet ve ark. normal ve yüksek AST seviyelerinden oluşan 31 bireyde yaptığı çalışmada ise % recovery referans aralıklarını 37,5-58 arasında bulmuştur(95). Careproso ve ark. pediatrik popülasyonda yaptığı çalışmada ise makroAST tespiti için eşik değer % 26,7 olarak verilmiştir(64). Çalışmalarda görüldüğü gibi, bizim kendi referans aralık belirleme çabamızı destekler nitelikte, çok farklı % recovery referans aralıkları mevcuttur. Laboratuvarımızda, 2. gruptaki % recovery referans aralıklarını, yanlış pozitif sonuç verme ihtimalini de azaltmak için 32-75 olarak almayı uygun bulduk.

Çalışmamızda AST enzimi için ultrafiltrasyon yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 34-77 (median 61,3), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 30-78 (median 86,6) olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). Alt ve üst limitler arasındaki farka bakıldığında, enzimin bu yöntem için değişkenliği yüksek gibi görünmektedir.

Ultrafiltrasyon yöntemiyle AST enzimi için % recovery referans aralıklarının belirlendiği tek çalışma bulunmaktadır(96). 125 sağlıklı bireyde yapılan bu çalışmada, % recovery referans aralıkları 50-89 (median:69) olarak bulunmuş. Amilaz enziminde olduğu gibi, bizim çalışmamızdaki % recovery değerleri, diğer çalışmaya göre düşük bulunmuştur. Ultrafiltrasyon yöntemi için amilaz değerlendirmesinde yaptığımız yorumlar AST enzimi içinde geçerli gibi görünmektedir. Laboratuvarımız koşullarında elde ettiğimiz 2. gruptaki referans aralıklarını kendi laboratuvarımız için uygun bulduk. Hem bizim çalışmamızda, hem de diğer çalışmada, ultrafiltrasyon yöntemi için AST enzimini valide edecek bir çalışma yapılmamıştır. Diğer enzimlerde yaptığımız konfirmasyon çalışmasını da makroAST hastamız olmadığı için yapamadık. AST enzimi için, ultrafiltrasyon yöntemiyle daha çok çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda CK enzimi için PEG çöktürme yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 53-91 (median 71,3), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 45-94 (median 52,5) olarak bulduk. Referans aralığının alt limiti 2.grupta daha düşük bulunmasına rağmen, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$).

Wyness ve ark.'nın 125 sağlıklı bireyde yaptığı çalışmada, PEG çöktürme yöntemi ile CK enzimi için % recovery referans aralığını 36-85(median 57) olarak belirlemişlerdir(4). Yaptıkları çalışmada % recovery referans aralıklarını, bizim çalışmamızdaki her iki gruba göre düşük bulmuşlardır. Bu fark, bizden farklı olarak kullandıkları PEG 8000 konsantrasyonuna, bizim çalışmamızın tek kişi tarafından ve az sayıda numune grupları halinde çalışılmasına bağlanabilir. Ancak çalışmalarındaki referans birey sayısının fazla olması çalışmalarının güçlü yönüdür. Davidson ve ark. yaptığı çalışmada, farklı hastalıkları olan, enzim düzeyi yüksek 40 kişilik grupta yaptığı çalışmada, PEG çöktürme yöntemi ile CK enzimi için % recovery referans aralığını 47-82 olarak belirlemişlerdir(3). Davidson ve ark.'nın 2012 yılında yaptığı bir başka çalışmada, enzim düzeyi yüksek 255 hastada, elektroforez yöntemi ile makroenzim olmadıklarından emin oldukları numunelerde, % recovery referans aralığının alt limiti belirlenmiş ve % 53 olarak bulunmuştur(24). Bu alt limit bizim 1. grubumuzdaki alt referans limitle uyumludur. Ancak diğer çalışmalarda alt limitlerin daha düşük bulunmasından dolayı ve yanlış pozitif makroenzim tanısından kaçınmak için, 2. gruptaki alt limit olan %45 i referans alt limitimiz olarak kabul etmeyi uygun bulduk.

Laboratuvarımızda saptadığımız 3 makroCK vakasında, PEG çöktürme yöntemiyle % recovery değerlerini 14, 21 ve 35 bulduk. Her üç vakada referans alt limitimiz olan % 45'in altındaydı. Bu vakaları CK izoenzim elektroforeziyle konfirme ettik ve 2 vakayı makroCK tip 1, bir vakayı da makroCK tip 2 olarak belirledik.

Çalışmamızda CK enzimi için ultrafiltrasyon yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 38-78 (median 57,2), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 37-78 (median 57,1) olarak bulduk. İki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$), ayrıca ilginç olarak, her iki grupta da referans aralığımız aynı bulunmuştur.

Ultrafiltrasyon yöntemiyle CK enzimi için % recovery referans aralıklarının belirlendiği, yine Wyness ve ark. tarafından yapılmış tek çalışma bulunmaktadır(4). 125 sağlıklı bireyde yapılan bu çalışmada, % recovery referans aralıkları 43-73 (median:58) olarak bulunmuş. Ayrıca bu çalışmada, elektroforez yöntemiyle elde edilmiş makroCK bandı aktivitesi oranı %22'den büyük olması koşuluyla, PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemlerini, elektroforez yöntemine karşı valide ettiklerini belirtmişler. Ancak makroenzim oranının, total CK aktivitesi oranı $< \%22$ olan koşullarda, hala elektroforez yönteminin daha sensitif olduğunu belirtmişler. Çalışmamızda referans aralıkları, diğer çalışmaya göre düşük bulduk. Ultrafiltrasyon yöntemiyle makroamilaz saptanması bölümünde yaptığımız tartışma CK enzimi içinde geçerli gibi durmaktadır. Ultrafiltrasyon yöntemiyle, CK enzimi için, kendi laboratuvar koşullarımızda elde ettiğimiz, %37-78 referans aralığını, laboratuvarımızda kullanmayı uygun bulduk.

Laboratuvarımızda saptadığımız 3 makroCK vakasının ultrafiltrasyon işlemleriyle saptanmış % recovery değerlerini 20, 19 ve 30 olarak bulduk ve her 3 vakada belirlediğimiz alt referans limit olan %37'nin altında bulundu. Ancak CK enzimi için ultrafiltrasyon yöntemiyle daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Çalışmamızda, LDH enzimi için PEG çöktürme yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 33-61 (median 47,1), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 28-63 (median 45,7) olarak bulduk. Referans aralıklar 2. grupta, 1. gruba göre düşük bulunmuştur. Ancak iki grup verileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır($p>0.05$).

Diğer makroenzim türlerinden farklı olarak, LDH enzimi için PEG yöntemiyle % recovery referans aralık belirleyen çalışma sayısı kısıtlıdır. Wyness. ve ark. yaptığı çalışmada PEG yöntemiyle, LDH enzimi için % recovery referans aralığı 18-52 (median:32) bulmuşlardır(96). Davidson ve ark. enzim değerleri yüksek 40 hastada yaptığı çalışmada ise, % recovery referans aralığını 30-88 olarak bulmuşlardır(3). Davidson ve ark. bulduğu referans aralık, bizim çalışmamızla uyumlu bulunmuştur. Wyness. ve ark. çalışmasıyla, bizim çalışmamız arasındaki farklılıklardan daha önce bahsedildi, ancak çalışmalarının kuvvetli yönü 125 bireyde referans aralık belirlemeleridir. Biz de laboratuvarımızda, diğer çalışmalarla da daha uyumlu olan 2.gruptaki referans aralıklarını kullanmayı uygun bulduk. Literatürde, makroLDH saptama özellikleri bakımından, PEG yöntemi için herhangi bir validasyon çalışması bulunamadı. Diğer enzimlerden farklı olarak LDH enzimi için PEG yöntemiyle yeni çalışmalar yapılmasına ihtiyaç vardır. LDH enziminin, makroenzim çalışmalarında geri planda kalmasının nedeni, LDH enziminin yükselmesine neden olan spesifik bir hastalığın olmayışı olabilir.

Laboratuvarımızda saptadığımız 3 makroLDH vakasında, PEG çöktürme yöntemiyle % recovery değerlerini, ilginç olarak 3, 3 ve 4 olarak çok düşük

değerlerde bulduk. Her üç vakada referans alt limitimiz olan % 28'in altındaydı. Bu vakaları LDH izoenzim elektroforeziyle konfirme ettik.

Çalışmamızda LDH enzimi için ultrafiltrasyon yöntemiyle 1. gruptaki % recovery referans aralığını 27-54 (median 41,3), 2. gruptaki % recovery referans aralığı ise 25-50 (median 57,1) olarak bulduk. İki grup arasındaki aralıklar birbirine benzer görünmektedir ancak iki grup verileri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur($p<0.05$).

Ultrafiltrasyon yöntemiyle LDH enzimi için % recovery referans aralıklarının belirlendiği tek çalışma bulunmaktadır(96). 125 sağlıklı bireyde yapılan bu çalışmada, % recovery referans aralıkları 27-63 (median:45) olarak bulunmuş. Diğer enzimlerin aksine, LDH enzimi için belirledikleri referans aralıkları, bizim çalışmamızla uyumlu bulundu. Biz de laboratuvarımızda kullanmak üzere 2. gruptan elde ettiğimiz referans aralıklarını kullanmayı uygun bulduk. Ancak ultrafiltrasyon yönteminin LDH enzimi için validasyonunu yapan bir çalışma bulunmamaktadır. LDH enzimi için, ultrafiltrasyon yöntemiyle daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Laktat dehidrogenaz enziminin molekül ağırlığı yaklaşık 130 000 Da'dır. Ancak bizim ultrafiltrasyon yönteminde kullandığımız filtreleri cut-off değeri 100 000 Da'dır. Bu farka rağmen, ilginç olarak LDH enzimi ultrafiltrata geçebilmektedir. Ayrıca saptadığımız makroLDH vakalarını da saptamayı başarmıştır. Ancak ek çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Yaptığımız impresizyon çalışmasına geri dönersek, ultrafiltrasyon yöntemiyle CK ve LDH enzimleri için 1. seviye kalite kontrol materyalinden elde ettiğimiz mean değerlerden hesapladığımız % recovery değerleri sırasıyla 84,2 ve 89,3 bulundu. Ancak bu değerler bu enzimler için belirlediğimiz referans aralıkların üst sınırından bile yüksektir. Aynı durum CK ve LDH enzimleri için 2. seviye kalite kontrol materyali içinde geçerlidir. Bu durum, kullandığımız kalite kontrol materyallerinin liyofilize olması, ayrıca koruyucu, rekombinant insan CK MM, CK MB, AST gibi farklı katkıların eklenmesi bu duruma sebep olmuş olabilir. Bu bakımdan impresizyon çalışmasını, kendi oluşturacağımız serum havuzundan yapmamız daha uygun olabilirdi.

Ultrafiltrasyon yöntemi, PEG çöktürme yöntemine göre uzun santrifüj süresi ve filtre maliyeti açısından dezavantajlı gibi durmaktadır. CK enzimi hariç validasyon çalışması da bulunmamaktadır. Ultrafiltrasyon yöntemiyle yeni yapılacak çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda, referans aralıklarını belirledik ancak yeterli makroenzim hastamız olmadığı için yöntemleri karşılaştıramadık.

5. SONUÇ

Çalışmamızda, 2 seviye iç kalite kontrol materyali kullanarak direkt ölçüm, PEG çöktürme yöntemi ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle amilaz, AST, CK ve LDH için impresizyon çalışması yaptık. Beklendiği gibi en düşük CV % değerlerini direkt ölçümde elde ettik. En yüksek CV% değerlerini ultrafiltrasyon yönteminde bulduk.

Altmış adet sağlıklı hasta ve altmış adet enzim değerleri yüksek serum kullanarak, iki ayrı grupta, PEG çöktürme ve ultrafiltrasyon yöntemleriyle, amilaz, AST, CK , LDH enzimleri için % recovery referans aralıklarını saptadık.

Dört enzim içinde, her iki yöntemde de alt referans limitleri enzim düzeyleri yüksek grupta daha düşük bulduk. Bazıları literatürle uyumlu olduğu için, bazılarında da yanlış pozitiflikten sakındığımız için 2.gruptaki referans aralıklarını laboratuvarımızda uygulamayı uygun bulduk.

Ultrafiltrasyon yöntemi ve PEG çöktürme yöntemiyle saptadığımız makroenzim vakalarını LDH ve CK enzimi için elektroforez yöntemiyle, amilaz için ise amilaz/kreatinin klirensi oranıyla konfirme ettik.

7.KAYNAKLAR

- 1- Turecky L. Macroenzymes and their clinical significance. Bratislavské lekárske listy 105.7/8 (2004): 260-263.
- 2- Galasso P J, Scott CL, O'brien JF . "The macroenzymes: a clinical review." Mayo Clinic Proceedings.1993; Vol. 68. No. 4.
- 3- Davidson, DF, Watson D J. Macroenzyme detection by polyethylene glycol precipitation. Annals of clinical biochemistry,2013; 40(5), 514-520.
- 4- Wyness SP, Hunsaker J J, La'ulu S L, Rao LV, Roberts W L. Detection of macro-creatine kinase and macroamylase by polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration methods. Clinica Chimica Acta, 2011;412(23), 2052-2057.
- 5- Burtis, CA, Ashwood ER, Bruns DE . Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. Elsevier Health Sciences, 2012.
- 6- Bishop ML, Edward PF, Schoeff LE. Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
- 7- Panteghini M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. Clin Biochem 1990; 23: 311-9.
- 8- Lewis, JR, Mohanty SR. Nonalcoholic fatty liver disease: a review and update. Digestive diseases and sciences.2010; 55(3), 560-578.
- 9- Kaplan and Pesce's : Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation Published by Pesce Kaplan Publishers 2009

- 10- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 1957; 28: 56-63.
- 11- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Ferard G, Ferrero CA, Franck PF, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C, part 5, reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate-aminotransferase. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 725-33.
- 12- Demetriou JA, Drewes PA, Gin JN. Enzymes. In: Henry RJ, Cannon DC, Winkelman JE, editors. *Clinical chemistry: principles and technics*. 2nd ed. Hagerstown, MD: Harper & Row; 1974. p. 815-1001.
- 13- Stromme JH, Rustad P, Steenland H, Theodorsen L, Urdal P. Reference intervals for eight enzymes in blood of adult females and males measured in accordance with the International Federation of Clinical Chemistry reference system at 37°C: part of the Nordic Reference Interval Project. *Scand J Clin Lab Invest* 2004; 64: 371-84.
- 14- Panteghini M, Ceriotti F, Pagani F, Secchiero S, Zaninotto M, Franzini C; for the Italian Society of Clinical Biochemistry and Clinical Molecular Biology (SIBioC) Working Group on Enzymes. Recommendations for the routine use of pancreatic amylase measurement instead of total amylase for the diagnosis and monitoring of pancreatic pathology. *Clin Chem Lab Med* 2002;40:97-100.

- 15- Somogyi M. Modifications of two methods for the assay of amylase. Clin Chem 1960; 6: 23-35.
- 16- Schumann G, Aoki R, Ferrero CA, Ehlers G, Fearde G, Gella FJ, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C, Part 8: reference procedure for the measurement of catalytic concentration of α -amylase. Clin Chem Lab Med 2006; 44: 1146-1155.
- 17- Gillard BK, Simbala JA, Goodglick L. Reference ranges for amylase isoenzymes in serum and plasma of infants and children. Clin Chem 1983; 29: 1119-1123.
- 18- Oliver IT. A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase and myokinase. Biochem J 1955; 61: 115-22.
- 19- Rosalki SB. An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. J Lab Clin Med 1967; 69: 696-705
- 20- Szasz G, Gerhardt W, Gruber W. Creatine kinase in serum. 3. Further study of adenylate kinase inhibitors. Clin Chem 1977; 23: 1888-92.
- 21- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Fearde G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 °C. Part 2. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of creatine kinase. Clin Chem Lab Med 2002; 40: 635-42.

- 22- Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. Clin Chem 1978; 24: 1966-70.
- 23- Schumann G, Klauke R. New IFCC reference procedures for the determination of catalytic activity concentrations of five enzymes in serum: preliminary upper reference limits obtained in hospitalized subjects. Clin Chim Acta 2003; 327: 69-79.
- 24- Davidson DF, Scott JG. Detection of creatine kinase macroenzymes. Annals of clinical biochemistry. 2012; 49(5), 482-485.
- 25- Babson, AL, Phillips GE. (1965). A rapid colorimetric assay for serum lactic dehydrogenase. Clinica Chimica Acta, 12(2) (1965), 210-215.
- 26- Schumann G, Bonora R, Ceriotti F, Clerc-Renaud P, Ferrero CA, Férard G, et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37°C. Part 3. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of lactate dehydrogenase. Clin Chem Lab Med 2002;40:643-648
- 27- Pagani F, Bonora R, Panteghini M. Reference interval for lactate dehydrogenase catalytic activity in serum measured according to the new IFCC recommendation. Clin Chem Lab Med 2003; 41: 970-971.
- 28- Ciriza CP, Varo N. Macro Creatine Kinase: Comparison of Different Screening Methods and Revision of the Bibliography Biochemistry & Analytical Biochemistry 2015 (2015).

- 29- Moriyama T, Tamura S, Nakano K, Otsuka K, Shigemura M, Honma N. Laboratory and clinical features of abnormal macroenzymes found in human sera. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(6):658-67
- 30- Hsiao JF, Ning HC, Gu PW, Lin WY, Chu PH. Clinical role of recurrently elevated macro creatine kinase type 1. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2008;22(3):186-91
- 31- Remaley AT, Wilding P. Macroenzymes: biochemical characterization, clinical significance, and laboratory detection. *Clin Chem*. 1989 Dec;35(12):2261-70.
- 32- Klonoff DC. Macroamylasemia and other immunoglobulin-complexed enzyme disorders. *Western Journal of Medicine*. 1980; 133.5: 392.
- 33- Wilkinson JH. Clinical significance of enzyme activity measurements [Review]. *Clin Chem* 1970;16:882-90.
- 34- Sudo K, Maekawa M, Watanabe H, et al. A case of immunoglobulin G conjugated with lactate dehydrogenase producing both loss of enzyme activity and an abnormal isoenzyme pattern. *Clin Chem* 1986;32:1420-2.
- 35- Hirano T, Matsuzaki H, Miura M, Kajima E, Tamura N, Sekine T. An immunoglobulin G inhibiting lactate dehydrogenase activity. *Clin Chum Acts* 1986;159:17-25.
- 36- Eeidner N, Lott JA, Yale VD, Wahl RL, Little RA. Immunoglobulin-complexed aspartate aminotransferase. *Clin Chem* 1983;29:382-4

- 37- Wilding P, Cooke WT, Nicholson GI. Globulin-bound amylase: a cause of persistently elevated levels in serum. 1964;Annals of Internal Medicine 60.6: 1053-1059
- 38- Berk JE, Kizu H. Wilding P, Searcy RL. Macroamylasemia: a newly recognized cause for elevated serum amylase activity. New England Journal of Medicine.1967; 277(18), 941-946
- 39- Levitt MD, Cooperband SR. Hyperamylasemia from the binding of serum amylase by an 11S IgA globulin. New England Journal of Medicine.1968; 278.9 : 474-479.
- 40- Kreutzer HH, Jacobs PH, Francke C.Lactate dehydrogenase isoenzymes: irregularities in electrophoretic mobility. Clinica Chimica Acta 11.2 (1965): 159-169
- 41- Ganrot PO. Lupoid cirrhosis with serum lactic acid dehydrogenase linked to an γ A immunoglobulin. Experientia 1967; 23.7 : 593-593.
- 42- Nagamine M, Okuma S. Serum alkaline phosphatase isoenzymes linked to immunoglobulin G. Clin Chim Acta. 1975; 15;65(1):39-46.
- 43- Konttinen A, Murros J, Ojala K, Salaspuro M, Somer H, Räsänen J. A new cause of increased serum aspartate aminotransferase activity. Clin Chim Acta. 1978; 1;84(1-2):145-7.

- 44- Kajita Y, Majima T, Yoshimura M, Hachiya T, Miyazaki T, Ijichi H, Ochi Y. Demonstration of antibody for glutamic pyruvic transaminase (GPT) in chronic hepatic disorders. Clin Chim Acta. 1978; 1;89(3):485-92.
- 45- Urdal P, Landaas S. Macro creatine kinase BB in serum, and some data on its prevalence. Clinical chemistry.1979; 25(3), 461-465.
- 46- Virji MA. Circulating prostatic acid phosphatase-immunoglobulin complexes in Sjogren's syndrome. Clinica chimica acta.1985; 151(3), 223-230.
- 47- Stein W, Bohner, J, Bahlinger M. Macro lipase—a new member of the family of immunoglobulin-linked enzymes. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,1987; 25(12), 837-844.
- 48- Maekawa M, Sudo K, Kanno T. A case of rheumatoid arthritis with various enzyme-immunoglobulin complexes. Clinica chimica acta,1986; 157(1), 45-53.
- 49- Türkçapar N, Özden A. Makroenzimler.Güncel Gastroenteroloji.2005 Haziran, 161-166
- 50- Urdal P, Landaas S, Kierulf P, Stromme JH. Macroamylase immunoglobulins show high affinity for animal and human amylases. Clinical chemistry,1985; 31(5), 699-702
- 51- Tomasi T B, Tan E M, Solomon A, Prendergast RA. Characteristics of an immune system common to certain external secretions. The Journal of experimental medicine,1965; 121(1), 101-124.

- 52- Ludvigsen CW, Muus C, Meyer I, Haven M. Creatine kinase variant type I in children with anoxic insult. *Clinical chemistry*,1986; 32(4), 689-691.
- 53- Ozaslan E, Sivri B. Makroenzimler ve makroamilazemi. *Güncel Gastroenteroloji*, 1998 Haziran; 163-169
- 54- Deprettere A J, Eykens A, Van Hoof V. Disappearance of macroamylasemia in a celiac patient after treatment with a gluten-free diet. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*,2001; 33(3), 346-348.
- 55- Whelan PV, Malkus H. A macro creatine kinase isoenzyme in serum of apparently healthy individuals. *Clinical chemistry*,1983; 29(7), 1411-1414
- 56- Levitt MD, Rapoport M, Cooperband SR. The renal clearance of amylase in renal insufficiency, acute pancreatitis, and macroamylasemia. *Annals of internal medicine*,1969; 71(5), 919-925
- 57- Berk, JE, Fridhandler L, Montgomery K. Simulation of macroamylasaemia by salivary-type (S type') hyperamylasaemia. *Gut*,1973; 14(9), 726-729.
- 58- Sturk A, Sanders GTB. Macro enzymes: prevalence, composition, detection and clinical relevance. *J Clin Chem Clin Biochem*,1990; 28(2), 65-81
- 59- Moriyama T, Takebe T, Nobuoka M, Makino M.Characterization of amylase linked immunoglobulin G to distinguish human salivary and pancreatic isoamylases. *Clinica chimica acta*,1988; 174(1), 25-33.

- 60- Takashi K, Kayoko S. Properties of amylase-linked immunoglobulins. *Clinica Chimica Acta*, 1977 ;76(1), 67-77
- 61- Nakajima M, Ito K, Kuwa K, Nakayama T, Kitamura M. Occurrence of persistent elevated levels of serum glutamic oxaloacetic transaminase as a result of enzyme-immunoglobulin complex formation with a report of two cases. *Gastroenterol Jpn.* 1980;15(4):330-6.
- 62- Nagamine M, Okochi K, Complexes of immunoglobulins A and G with aspartate aminotransferase isoenzymes in serum, *Clin. Chem.* 29 (1983) 379–381.
- 63- Moriyama T, Nobuoka M, Makino M. Incidence and properties of aspartate aminotransferase-immunoglobulin complexes in patients with a high serum aspartate to alanine aminotransferase ratio. *Clinica Chimica Acta*, 1990; 190(1-2), 47-56.
- 64- Caropreso M, Fortunato G, Lenta S, Palmieri D, Esposito M, Vitale DF, Vajro P. Prevalence and long-term course of macro-aspartate aminotransferase in children. *The Journal of pediatrics*, 2009; 154(5), 744-748.
- 65- Jacobs E, Anzalone T, Sarkozi L, Immunoprecipitation method for CK-MB analysis re-evaluated: influence of CK-BB and macro-CK on blank activities, *Clin. Chem.* 34 (1988) 585–588
- 66- Bohner J, Stein W, Kuhlmann E, Eggstein M. Serum creatine kinase BB linked to immunoglobulin G, *Clin. Chim. Acta* 97 (1979) 83–88

- 67- Yuu H, Ishizawa S, Takagi Y, Gomi K, Senju O, Ishii T. Macro creatine kinase: a study on CK-linked immunoglobulin, Clin. Chem. 26 (1980) 1816–1820
- 68- Fahie-Wilson MN, Burrows S, Lawson GJ, Gordon T, Wong W, Dasgupta B. Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals. Annals of clinical biochemistry, 2007; 44(4), 377-383.
- 69- Tozawa T, Electrophoretic analysis of enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance, J. Chromatogr. 569 (1991) 347–365.
- 70- Lundh B, A macromolecular serum lactate dehydrogenase activity in a case of leukemia, Clin. Chim. Acta 16 (1967) 305–309.
- 71- Nagamine M, Lactate dehydrogenase isoenzymes linked to immunoglobulin A in two cases, Clin. Chim. Acta 36 (1972) 139–144
- 72- Biewenga J, Feltkamp TE, LDH–IgA immunoglobulin complexes in human serum, Clin. Chim. Acta 58 (1975) 239–249.
- 73- Biewenga J, Feltkamp TE, Lactate dehydrogenase (LDH)–IgG3 immunoglobulin complexes in human serum, Clin. Chim. Acta 64 (1975) 101–116
- 74- Fujita K, Immunochemical study of immunoglobulins bound to lactate dehydrogenase, Clin. Chim. Acta 264 (1997) 163–176.
- 75- Tozawa T, Enzyme-linked immunoglobulins and their clinical significance,

Electrophoresis 10 (1989) 640–644

76- Durr HK, Bode C, Krupinski R, et al. A comparison between naturally occurring macroamylasemia and macroamylasemia induced by hydroxyethyl starch. Eur J Clin Invest 1978;8:189-91.

77- Kohler H, Kirch W, Weihrauch TR, et al. Macroamylasemia after treatment with hydroxyethyl starch. Eur J Clin Invest 1977;7:205-11.

78- Stein W, Bohner J, Rein W, Maulbetsch R. Macro creatine kinase type 2: results of a prospective study in hospitalized patients. Clin Chem 1985;31:1959.-64.

79- Stein W, Bohner J, Bahlinger M. Analytical patterns and biochemical properties of macro creatine kinase type 2. Clinical Chem 1985;31:1952-8.

80- Kanemitsu F, Kawamshi I, Mizushima J. The origin of a cathode-migrating creatine kinase found in serum from a cancer patient. Clin Chim Acts 1980;122:377-83

81- Wenham PR, Horn DB, Smith AF. Multiple forms of gammaglutamyltransferase: a clinical study. Clin Chem 1985;31:569-73.

82- Huseby NE. Multiple form of serum gamma-glutamyltransferase: association of the enzyme with lipoproteins. Clin Chim Acta 1982;124:103-12.

83- Crofton PM, Smith AF. High-molecular-mass alkaline phosphatase

in serum and bile: physical properties and relationship with other high-molecular-mass enzymes. Clin Chem 1981;27:860.-6.

84- De Broe ME, Borgers M, Wieme RI. The separation and characterization of liver plasma membrane fragments circulating in the blood of patients with cholestasis. Clin Chim Acta. 1975 Mar 24;59(3):369-72

85- Mercer DW, Talamo TS. Multiple markers of malignancy in sera of patients with colorectal carcinoma: preliminary clinical studies. Clin Chem 1985;31:1824-8.

86- Nishio H, Sakuma I, Nakamura S, Horai T, Ikegami H, Matsuda M. Diagnostic value of high molecular weight alkaline phosphatase in detection of hepatic metastasis in patients with lung cancer. Cancer 1986;57:1815-9.

87- Traynor OJ, Wood CB, Echeteu ZO, Whitaker KB, Moss DW. Measurement of high molecular weight forms of enzymes in serum in the detection of hepatic metastases of colorectal cancer. Cancer 1983;53:483-7

88- Kiechle FL, Quattrocioni-Longe, TM, Brinton DA, Gordon SC, Sykes E, Elkhaila MY. Autoantibodies to specific enzymes: a review. Annals of Clinical & Laboratory Science, 1996; 26(3), 195-207

89- Ventrucci M, Cipolla A, Middonna M, Racchini C, Pollini E, Melzi GV. Macroamylase detection in serum using selective precipitation: a rapid and reliable assay. Ital J Gastroenterol Hepatol 1999;31:846-9.

- 90- Levitt MD, Ellis C. A rapid and simple assay to determine if macroamylase is the cause of hyperamylasemia. *Gastroenterology* 1982;83:378–82.
- 91- Lawson GJ. Prevalence of macroamylasaemia using polyethylene glycol precipitation as a screening method. *Ann Clin Biochem* 2001;38:37–45.
- 92- Fahie-Wilson MN, Burrows S, Lawson G J, Gordon T, Wong W, Dasgupta B. Prevalence of increased serum creatine kinase activity due to macro-creatine kinase and experience of screening programmes in district general hospitals. *Annals of clinical biochemistry*,2007; 44(4), 377-383
- 93- Fahie-Wilson M, Halsall D. Polyethylene glycol precipitation: proceed with care. *Annals of clinical biochemistry*,2008; 45(3), 233-235.
- 94- Suliman A M, Smith TP, Gibney J, McKenna, TJ. Frequent misdiagnosis and mismanagement of hyperprolactinemic patients before the introduction of macroprolactin screening: application of a new strict laboratory definition of macroprolactinemia. *Clinical chemistry*,2003; 49(9), 1504-1509.
- 95- Patteet L, Simoens M, Piqueur M, Wauters A. Laboratory detection of macro-aspartate aminotransferase: case report and evaluation of the PEG-precipitation method. *Clinical biochemistry*,2012; 45(9), 691-693.
- 96- Wyness SP, Hunsaker J J, La'ulu S, Roberts W L. Reference intervals for six enzymes after polyethylene glycol precipitation and ultrafiltration. *Clinica Chimica Acta*,2011; 412(11), 1161-1162.

8.ÖZET

MAKROENZİM TESPİTİNDE KULLANILAN POLİETİLEN GLİKOL ÇÖKTÜRME VE ULTRAFİLTRASYON YÖNTEMLERİYLE CK, LDH, AST VE AMİLAZ İÇİN LABORATUVARIMIZDAKİ YÜZDE RECOVERY REFERANS ARALIKLARININ BELİRLENMESİ VE KARŞILAŞTIĞIMIZ MAKRO ENZİMLERİN TANISININ FARKLI YÖNTEMLERLE DESTEKLENMESİ

Makroenzimler, normal enzim yapılarına göre daha yüksek molekül ağırlıklarına sahiptirler. Makroenzimlerin klirensi, normal enzimlere göre daha yavaş olduğu için plazmada birikirler ve enzim aktivitelerinin yüksek ölçülmesine neden olabilirler.

Açıklanamayan enzim yüksekliğinin bir nedeni olan makroenzimlerin, düşünülmemesi veya tanısının konulmasındaki eksiklikler, pahalı, gereksiz ve hatta invazif girişimlerin yapılmasına neden olabilir. Bu bakımdan, açıklanamayan enzim yüksekliği olan veya makroenzimden şüphelenildiği durumlarda tanısı konabilmelidir.

Literatürde, PEG yöntemiyle, amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için belirlenmiş çok farklı % recovery referans aralıkları bulunmaktadır. Ultrafiltrasyon yöntemiyle makroenzim saptanmasına dair çok kısıtlı çalışma ve veri bulunmaktadır. Ayrıca bazı çalışmalarda referans aralıklar, enzim aktivitesi normal bireylerde belirlenmişken, bazı çalışmalarda ise enzim aktivitesi yüksek bireylerde belirlenmiştir. Bizde laboratuvarımızda dört enzim için, her iki

yöntemle de, hem sağlıklı bireylerde hem de enzim değerleri yüksek bireylerde referans aralıklarımızı belirledik. Çalışmamızı 60 sağlıklı bireyde, 60'da enzim düzeyleri yüksek bireylerde gerçekleştirdik.

Sağlıklı bireylerde referans aralıklarını PEG yöntemiyle amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için sırasıyla 53-78; 37-81; 53-91 ve 33-61 olarak bulduk. Enzim düzeyi yüksek bireylerde sırasıyla 44-79; 32-75; 45-94 ve 28-63 olarak bulduk.

Sağlıklı bireylerde referans aralıklarını ultrafiltrasyon yöntemiyle amilaz, AST, CK ve LDH enzimleri için sırasıyla 61-104; 34-77; 38-78 ve 27-54 olarak bulduk. Enzim düzeyi yüksek bireylerde sırasıyla 56-119; 30-78; 37-78 ve 25-50 olarak bulduk.

Referans aralık alt limitlerini, enzim düzeyi yüksek grupta, tüm sonuçlarda düşük bulduk. Yanlış pozitiflikten kaçınmak için, enzim düzeyi yüksek bireylerdeki referans aralıklarını laboratuvarımızda kullanmaya karar verdik. Ancak ultrafiltrasyon yöntemi için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Ultrafiltrasyon ve PEG çöktürme yöntemleriyle saptadığımız, 3 makroCK ve 3 makroLDH vakasının tanısı elektroforez yöntemiyle, 2 makroamilaz vakasının tanısını ise amilaz/kreatinin klirensi oranını kullanarak konfirme ettik.

Anahtar kelimeler: makroenzimler, referans aralık, Polietilenglikol

9. SUMMARY

DETERMINATION OF RECOVERY % REFERENCE INTERVALS FOR CK, LDH, AST, AMYLASE WITH POLYETHYLENEGLYCOL PRECIPITATION AND ULTRAFILTRATION METHODS USED FOR MACROENZYME DETECTION AND SUPPORTING THE MACROENZYME DIAGNOSIS VIA DIFFERENT METHODS

Macroenzymes have higher molecular weights than normal enzyme forms. Clearance of macroenzymes are much more slowly than usual enzymes, so that they accumulate in the plasma and may cause measurement of higher enzyme activities.

Not thinking of macroenzymes as a cause of increased enzyme levels or lacking the diagnosis of macroenzyme elevation can cause unnecessary, expensive and even invasive procedures. From this perspective unexplained high enzyme levels or suspected macroenzyme elevation must be recognised.

In literature there are several % recovery reference intervals established with PEG precipitation method for amylase, AST, CK and LDH. Lesser publication and data exists for detecting macroenzymes with ultrafiltration method. Besides in some of these publications reference intervals were determined for healthy people whereas the others in people who had high enzyme levels. In this thesis reference intervals are established for AST, amylase, LDH, CK with two different methods mentioned before for both healthy population and people have high levels of enzyme activities.

The reference intervals established for amylase, AST, CK, LDH in healthy people via PEG method are 53-78, 37-81, 53-91, 33-61 respectively; for the people have high enzyme levels intervals are 44-79, 32-75, 45-94 and 28-63 respectively.

The reference intervals established for amylase, AST, CK, LDH in healthy people via ultrafiltration method are 61-104, 34-77, 38-78, 27-54 respectively; for the people have high enzyme levels intervals are 56-119, 30-78, 37-78, 25-50 and 28-63 respectively.

Lower limits of reference intervals detected decreased for all enzyme activities in people who have high enzyme levels. Avoiding of falsely positive results we decided to use reference intervals established for the people who have high enzyme levels. However for ultrafiltration method more research need to be done.

Detected with PEG precipitation method and ultrafiltration method, 3 macroCK and 3 macroLDH patients confirmed with electrophoresis method; 2 macroamylase patients confirmed with amylase/creatinin ratios.

Key words: macroenzymes, reference intervals, polyethyleneglycol

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı: Mehmet

Soyadı: Çingirt

Doğum Yeri ve Tarihi: Soma - 13.04.1984

Eğitimi: 2012-2016: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.

2002-2009: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Yabancı Dili: İngilizce

e-mail: mcingirt@gmail.com

Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Türk Klinik Biyokimya Derneği

Türk Biyokimya Derneği