

ÇEŞİTLİ KARACİĞER HASTALIKLARINDA SERUM GLUTAMAT DEHİDROGENAZ AKTİVİTE SEVİYELERİ

Dr. Serap ÇELEBİ (x)
Dr. Ebubekir BAKAN (xx)
Dr. M. Ramazan YİĞİTOĞLU(x)
Dr. Bahattin ADAM (x)

ÖZET :

Bu çalışma çeşitli karaciğer hastalığı olan toplam 85 hasta (36 kadın ve 49 erkek) ile tamamen sağlıklı 50 kontrol şahıs üzerinde yapıldı. Hasta ve kontrollerin serumlarında glutamat dehidrogenaz aktivite seviyeleri tespit edildi. Kontrollerden elde edilen sonuçlara dayanılarak glutamat dehidrogenaz için bölgemiz referans değerlerinin $(3,9, \pm 1,3 \text{ U/L})$ olduğu tespit edildi. Hastalarda hastalığın tipine bağlı olarak kontrollere oranla daha yüksek GLDH aktivitesinin olduğu bulundu.

GİRİŞ:

Glutamat dehidrogenaz (GLDH: E.C.:1.4.1.3) oksidoredüktaz grubu enzimlerdendir. Bu grup enzimler elektron alarak ya da vererek oksidoredüksiyon reaksiyonlarını katalize etmektedirler(1,2). İlk defa 1938 yılında Adler ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir(3). En fazla başta karaciğer olmak üzere kalb ve böbrek dokusu hücreleri mitokondrilerinde bulunur (1,2,3,4,5,6). Karaciğerde özellikle asinusların sentrilubal (perivenöz) sahasında yüksek oranda mevcuttur (1,2,6,7). Karaciğerdeki GLDH düzeyi kalb kasındaki 17, iskelet kasındaki 80 kat ve pankreastaki 28 kat daha fazladır (8,9). Ayrıca beyin hücreleri ve lökositlerde de bulunmaktadır (1,2).

Bir çok hastalıkta serum GLDH aktivitesi artmaktadır. Ancak bu artış daha çok kronik karaciğer yetmezliği, akut ve kronik hepatitler, siroz, hepatik koma, primer ve metastatik karaciğer kanserleri extrahepatik kolestazis, alkol ve ilaçlara bağlı toksik karaciğer hastalığı gibi çeşitli karaciğer hastalıklarında klinik yünden önem arz etmektedir (1,2,5,10,11,12).

x Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

xx Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Doçenti

MATERYAL VE METOD

Çalışmamız Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesinin çeşitli kliniklerinde yatan toplam 85 hasta üzerinde yapıldı. Vak'aların 36'sı kadın 49'u erkekti. Kontrol grubu olarak, hiç bir şikayeti olmayan 50 sağlıklı kişi alındı. Klinik ve laboratuvar bulguları ile tanısı konulmuş hastalıklar Tablo-1' de verilmiştir.

Tablo-1: Hastalık tipi ve cinsiyete göre vak'aların dağılımı

Hastalık	Toplam sayısı	Cinsiyet	
		Kadın	Erkek
Akut hepatit	32	15	17
Kronik hepatit	12	5	7
Siroz	16	3	13
Karaciğer kanserleri	10	5	5
Karaciğer absesi	5	1	4
Mekanik ikter	10	7	3
Toplam	85	36	49

Numunelerin alınması: Karaciğer harabiyeti ön tanısıyla hastanemiz kliniklerine yatırılan ve karaciğer enzimleri yüksek bulunan hastalar ile hiç bir şikayeti olmayan sağlıklı kişilerden plastik bir enjektörle 5 ilâ 7 ml. arasında değişen vena kanları alındı. Oda ısısında yaklaşık 30 dakika bekletildikten sonra pıhtılaşan kanlar 3500 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek serumu ayrıldı. Bu serumlarda GLDH aktivitesi ölçüldü. Analiz yapılmayacaksa en fazla 7 gün olmak üzere serumlar derin dondurucuda (-20°C) saklandı.

Serumda GLDH aktivitesinin ölçülmesi: GLDH aktivitesi UV enzimatik metotla ölçüldü.

a- Metodun Prensibi :

α - ketoglutarat + NADH + NH_4^+ $\xrightarrow{\text{GLDH}}$ Glutamat + NAD + H_2O şeklinde işleyen reaksiyonda, ortama substrat (α - ketoglutarat) ve koenzim (NADH) ilâve edilerek serumdaki GLDH'ın etkisiyle azalan NADH miktarını spektrofotometrik olarak 340 nm de ölçme esasına dayanır.

b— Kullanılan Reaktifler:

1— Trietanolamin Tampon çözeltisi (pH 8.0; 50 mM) : 100 ml tampon çözelti için, 0.823 ml % 97'lik trietanolamin, 2 mol/l'tik amonyum asetattan 6.2 ml. ve 0.11539 gr EDTA kullanıldı. PH 8.0'a ayarlandı ve 4 derecede plastik şişede saklandı.

2— Koenzim çözeltisi (32.2) mmol ADP/L, 6.45 mmol NADH/L, 65 u/ml LDH).

0.07808 gr ADP, 0.02287 gr NADH ve 1000 u/ml'lik LDH'dan 0.325 ml. alındı ve trietanolamin tamponuyla 5 ml'ye tamamlandı. Bu tampon içindeki koenzim çözeltisi +4°C'de saklamak kaydıyla 24 saat içinde kullanıldı.

3— Substrat Çözeltisi (217 mmol)

3. 17037 gr α - ketoglutarat redistile su ile 100 ml'ye tamamlandı. Bu çözelti cam şişe içerisine +4°C de saklandı.

c— Deneyin Yapılışı:

Reaksiyon Karışımı	Test
Koenzim Çözeltisi	400 ul
Serum	25 ul
Substrat Çözeltisi	20 ul

Bir tübe sırasıyla pipetlendi, tüp muhtevası iyice vortekslendi. Bekletilmeden 37°C'de 340 nm'de absorbansı okundu. Okumalar 30 saniye ön inkübasyondan sonra 60 saniyelik aralarla iki defa olmak üzere alındı.

Enzim aktivitesi absorbansları okunamayacak kadar fazla olan serumlar seyreltilerek (serum/serum fizyolojik : 1/3) tekrar çalışıldı. Okunan absorbanslar dilüsyon katsayısı (4) ile çarpılarak sonuçlar hesaplandı.

Hipcrilipemik ve hemolizli serumlar kullanılmadı.

d— Sonuçların Hesaplanması:

30. saniyedeki absorbans A_1 , 60. saniyedeki A_2 ve 120. saniyedeki A_3 kabul edilerek hesaplama aşağıdaki şekilde yapıldı

$$\frac{A_2 - A_1 = A_1/dk}{(A_1 \times F) (A_2 \times F)} = \text{GLDH aktivitesi (U/L)}$$

2

F '' — 10000'' olarak alındı. Faktör, NADH'ın molar ekstinsiyonu x numunenin dilüsyonundan elde edildi.

BULGULAR

Hasta ve kontrol grubunan elde edilen bulgular ve istatistiksel değerlendirmeler tablo-11'de verilmiştir. İki grup arasında 't' testi yapılarak farkın önemlilik derecesi tesbit edildi.

Tablo-II: Çeşitli karaciğer hastalıklarında serum GLDH aktivitesinin kontrollerle karşılaştırılması

Gruplar	n	x	±	SD	t	p<
Akut Hepatit	32	22.7		18.4	5.77	0.001
Kronik Hepatit	12	19.2		11.0	4.81	0.001
Siroz	16	21		15.0	4.55	0.001
Karaciğer Kanseri	10	9.1		2.9	5.56	0.001
Karaciğer Absesi	5	21.5		14.4	2.73	0.05
Kontrol	50	3.9		1.3		

Akut hepatit, kronik hepatit, siroz, karaciğerin primer ve metastatik kanserlerinde yapılan karşılaştırmalar istatistik yönden çok önemli bulundu ($p<0.001$). Başka bir ifadeyle, serum GLDH aktivitesi hasta gruplarında kontrollere göre anlamlı derecede yüksekti. Karaciğer absesi 5 vak'ada $p<0.05$ derecesinde istatistiksel açıdan az önemli bulundu. Abse bu 5 vak'anın ikisinde santral lob'da, üçünde periferde lokalizeydi.

TARTIŞMA

Bu çalışmada serum GLDH aktivitesi ölçümüyle çeşitli karaciğer hastalıklarının teşhis ve ayırıcı tanısında yardımcı olacak bir kriteri ortaya koymayı amaçladık. Bu arada GLDH'nın bölgemizdeki normal değerlerini de tesbit etmiş olduk.

Sağlam kişilerdeki GLDH aktivitesi için çalışılan metoda göre farklı değerler tesbit edilmiştir. Normal değerler 25°C'de 4 U/L olarak bildirilmiştir (6,13). 30°C'de yapılan ölçümlere ait normal değerlendirmeler yayınlanmamıştır(6). 37°C'de ise 7 U/L (6) ve 4 U/L (14,15,16) gibi iki farklı değer bildirilmiştir. Bizim kontrol grubu aldığımız sağlıklı kişilerde GLDH aktivitesi 2.2-7.2 U/L arasında değişmektedir. Çeşitli çalışmalarda bulunan normal değerler ile bizim bulduğumuz normal değerler tablo-III' de verilmiştir.

Tablo- III: Normal kişilerdeki GLDH aktivitesi araştırmalarına ait değerler

Araştırmacılar	Isı (°C)	Normal değerler (U/L)	
		Kadın	Erkek
Schmidt, E., Schmidt, F.N.	25	3	4
Jung, K., Pergande, M.	37	6.4	11
Schmidt, E.	37	7	7
King, J.	37	4	4
Ellis, G.	37	4	4
Mills, P.R., Spooner K.J.	37	4	4
Bizim sonuçlar	37	3.9±1.3	3.9±1.3

Tablo-II'de gösterildiği gibi en yüksek GLDH aktivitesi viral hepatitli hastalarda tesbit edildi. Bu gruptaki hastaların yalnızca birinde serum GLDH aktivitesi normal değerler içinde olup hastalık semptomları hafifti. Daha önce yapılan araştırmalarda da bu konuda benzer sonuçlar bildirilmiştir (1,6,17).

Akut hepatitteki GLDH artışını sırasıyla şu hastalık grupları takip etti.

Karaciğer absesi: Bu grupta 5 hastanın serumunda GLDH aktivitesi ölçüldü. Bunlardan ikisinde GLDH aktivitesi çok yüksekti. Bu hastalarda abse santral lob'da lokalizeydi. Geri kalan üç hastadaysa orta derecede yüksek GLDH aktivitesi bulundu. Bunlarda abse lokalizasyonu periferik lobda idi. Bu da GLDH lokalizasyonu ile ilgili girişte belirttiğimiz ifadeleri doğrulamaktadır.

Siroz: Enzim aktivite seviyeleri yüksek bulunmakla beraber kompanse sirozlu hastalarda dekompanse sirozlulara göre daha düşük değerler tesbit edildi. Ellis ve arkadaşlarının bu konuda yaptıkları bir çalışmada bulunan sonuçlar (16) bizim sonuçlarımızı desteklemektedir. Kompanse sirozlu olupda aynı zamanda alkol kullanan 4 vak'ada bulunan GLDH değerleri, dekompanse sirozlularınkisine yakındı. Bu sonucumuzda yapılan önceki çalışmalarla desteklenmektedir (15,18,19). Araştırmamızda sirozluların hiçbirinde normal GLDH aktivitesi bulunmadı.

Kronik hepatit: 12 kişilik grubun hepsinde normalden yüksek değerler tesbit edildi. Plomteux tarafından yapılan benzer bir çalışma ile sonuçlarımız uygunluk göstermektedir (20).

Karaciğer kanserleri: Çalışmamızda bu hastalık grubunda bulunan hastaların hepsinde serum GLDH seviyeleri normalden yüksekti. Bu sonuçlar da literatürlerle uyum içindedir (9,12,21).

SUMMARY

SERUM GLUTAMATE DEHYDROGENASE ACTIVITY LEVELS IN VARIOUS LIVER DISEASES

Blood samples were obtained from patients with various hepatic diseases (36 female and 49 male) and from 50 apparently healthy subject for controls. Serum was assayed for glutamate dehydrogenase (GLDH). The results from controls were used to obtain a reference range for glutamate dehydrogenase (3.9 ± 1.3 U/L). The levels of GLDH in the patients were higher than those of healthy subjects, depending on the disease type.

KAYNAKLAR

1. Tekman Ş., Öner N., Genel Biokimya, 3. Baskı, İstanbul, Fatih Yayınevi, 1981, s. 335-366, 248.

2. Smith E.L., Hill R.L., White A., Principles of Biochemistry, 7th ed., London., Mc Graw-Hill Book Co., 1983, p 210-220.
3. Kaya N., Karacığer ve Pankreas Hastalıklarında Lösin Aminopeptidaz ile diğer bazı enzimlerin serumdaki aktivite seviyelerinin tayini. Yüksek Lisans tezi, Erzurum, 1986.
4. Lehninger A.L., Biochemistry, 2nd ed., New York, Worth Publ, 1977, p 183, 565, 694.
5. Kachmar J.F., Moss D.t.; Enzymes. Tietz N.W., Fundamentals of Clinical Chemistry, London, W.B. Saunders Co., 1976, p 601-610, 652-657.
6. Tietz N.W., Text book Clinical Chemistry, London, WB Saunders Co., 1986, p 690-723.
7. Martin D.W., Mayes P.A., Rodwell V.W., Harper's Review of Biochemistry, 18th ed., California, MLan Med. Publ., 1981, p 61, 275.
8. Zilva J.F., Pannall P.R., Semptom ve teşhiste laboratuvar, Ankara, Güven kitapevi, 1978, s 273, 252.
9. Enzyme Diagnosis in Diseases of the Heart, Liver, and Pancreas, Adolph L., Lorenz R., Karger S., 1982, p 12, 86-104.
10. Bhagavan N.V., Biochemistry, 2nr. , J.B. Lippicott Co., 1978, p 576.
11. Boyer P.B., Lardy H., Myrbac K., The Enzymes, Volume 7,2 nd ed., HNew York, 1963, p 3-24.
12. Gudel W.G., Habicht A., Kleissl J., Schmidt V., Wieland O.H., The Diagnostic significance of liver cell in homogeniety : Serum enzymes in patients with with central necrosis and the distribution of glutamate dhydrogenase in normal liver, Z. Klin. Chem. Biochem, 1975, 13: 311-318.
13. Boehringer Mannheim GmbH Diagnositica Cat. No: 124320.
14. Schmidt E., and Schmidt F.W., Method of Enzymatic Analysis, 1974, p 496.
15. Mills P.R., Spooner R.J., Serum glutamate dhydrogenase as a marker of hepatocyte necrosis in alcoholic liver diseases. Br Med Jour, 1981, 19 Sep, vol 281.
16. Ellis G., Goldberg D.W., et al, Serum Enzyme Tests in Diseases of the Liver and Biliary Tract, American Soc of Clin Patho., August 1978, 248-255.
17. Ideo G., Franchis R., et al, Serum cytosolic mitochondrial enzyme ratio: A Tool for the estimation of the severity of acute hepatitis, Z. Klin Chem. u. Klin Biochem., 10 Jg, 1972, 74-76.
18. Salaspuro M., Use of Enzymes for the diagnosis of Alcohol-Related organ damage, Enzyme, 1987, 37: 87-107.

19. Waes L., Lieber C.S., Glutamate Dhydrogenase: a reliable marker of liver cell necrosis in the alcoholic, Br Med J Jour, 1977, 2: 1508-1510.
20. Plomteux G, Multivariate Analysis of an Enzymic Profile for the Differential Diagnosis of Viral Hepatitis, Clin Chem, 1980, 26:113, 1897-1899.
21. Schmidt E., Schmidt F.W., Enzymol Biol. Clin., 1863,3,73-79.