

İdrar N-Asetil-Beta-D-Glukosaminidaz Aktivitesi: İki Farklı Tayin Yönteminin Karşılaştırılması

A Comparative Study of Determination of Urinary N-Acetyl-Beta-D-Glucosaminidase Activity

Klara Dalva¹, Mevhibe Balk², Gül Sevim Saydam², Selime Ayaz², İzak Dalva³

¹ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji BD

² S.B.Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı

³ Özel Bayındır Hastanesi Üroloji Bölümü

Amaç: Lizozomal bir enzim olan N-asetil-beta-D-glukosaminidaz (NAG), renal tübüler hasarın erken belirleyicilerinden biridir. Bu çalışmada NAG aktivitesinin ölçümünde kullanılacak güvenli ve kolayca uygulanabilir bir yöntemin belirlenmesi için p nitrophenyl N acetyl-B-D-glucosaminide (PNP-NAG) ve m, cresolsulfon phtaleinyl N, B, D glucosaminide (MCP-NAG) gibi kolorimetrik değerlendirmeye imkanı veren iki farklı substrat kullanılarak yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada 40 sağlıklı ve 40 böbrek yetmezliği olan hasta idrarındaki NAG aktiviteleri PNP-NAG ve MCP-NAG substratları ile ölçülerek, sonuçlar karşılaştırıldı. PNP NAG substratı ile çalışırken örnekler jel filtrasyonundan önce ve sonra reaksiyona sokularak jel filtrasyonunun sonuçları ne şekilde etkilediği test edildi.

Bulgular: PNP-NAG (jel +), PNP-NAG (jel -) ve MCP-NAG yöntemleri ile elde edilen sonuçlar ortalamaya sırasıyla, hasta grubunda sırasıyla (27.5 U/L, 25.96 U/L ve 16.5 U/L) kontrol grubuna sırasıyla (5.66 U/L, 5.38U/L ve 3.62 U/L) olup; değerler hasta grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (p<0.001).

Sonuç: Bu çalışmada, PNP-NAG substratı kullanılarak jel filtrasyonu yapmadan uygulanan yöntem, ölçüm aralığının daha geniş olması ve uygulama kolaylığı nedeniyle rutin kullanım için daha uygun bulunmuştur. İdrar NAG aktivitesi, renal tübüler hasarın erken belirlenmesi için kullanılacak oldukça duyarlı, kolay uygulanabilen ve ekonomik bir belirteçtir.

Anahtar Sözcükler: **İdrar N-asetil-D-glukosaminidaz, Tübüler Hasar, PNP-NAG, MCP, NAG**

Aim: One of lysozomal enzymes N-Acetyl-Beta-D-glucosaminidase (NAG), is a sensitive parameter of renal tubular injury. In order to determine a confidential and easily applicable method we have plan to measure and compare the results of NAG activities with two different substrates namely p-nitrophenyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (PNP-NAG) and m-cresolsulfon-phtaleinyl-N-B-D-glucosaminide (MCP-NAG).

Material-Methods: We measured urinary NAG levels using PNP-NAG and MCP-NAG substrates in 40 healthy persons, and in 40 renal failure patients. We also tested the effect of gel filtration on PNP-NAG method.

Results: The urinary NAG levels measured by two different substrates were 27.5 u/L and 16.5 u/L in chronic renal failure group, 5.66 U/L and 3.62 U/L in control group. The differences between two groups were significant (p<0.001).

Conclusion: The measurement of urinary NAG levels using PNP-NAG substrate is an easy, efficacious and cost effective method and the measurement range is wider comparing with MCP-NAG. This method may take part in the determination and management of renal tubular injury.

Key Words: **Urinary N-acetyl-D-glucosaminidase, Tubular Injury, PNP-NAG, MCP, NAG**

İdrarla atılan enzimlerden biri olan N-asetil-B-glukosaminidaz (NAG, EC 3.2.1.30), renal tübüler hasarın erken ve duyarlı belirteçlerinden biridir (1). Proksimal renal tübül epitel hücrelerinde bulunur ve epitel hücrelerince idrara atılır (2,3).

NAG, molekül ağırlığının büyüklüğü (140 kDa) nedeniyle glomerüllerden filtre edilemez, bu nedenle, idrarda NAG aktivitesinin artması, proksimal tübüler hasarın göstergesi olarak kabul edilir (4). Tübüler hasarın erken belirlenmesinde kullanılan, alfa-1 mikroglobulin ve beta-2 mikroglobulinin glomerüllerden filtre edilmeleri ve tü-

Başvuru tarihi: 17.01.2011 • Kabul tarihi: 13.05.2011

İletişim

Uz. Dr. Klara DALVA
Ankara Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalı
Tel : 0 312 508 27 39
Fax : 0 312 309 58 69
Gsm : 0 532 574 36 85
E-Posta Adresi: dalva@medicine.ankara.edu.tr

büleri hasar durumunda tübüllerden kısmen reabsorbe edilmeleri nedeniyle, NAG aktivitesi daha iyi bir belirteç olarak kabul edilmektedir (5).

Sağlıklı kişilerde idrar NAG aktivitesi düşüktür (1). Akut ve kronik böbrek yetmezliklerinde (6-8), böbrek greftinin reddinde (9,10), nefrotoksisitede (11-14), hipertansiyonda (15) ve diyabetik nefropatide (16-18) idrar NAG aktivitesi yükselir.

İdrar, serum, BOS sıvılarında böbrek, karaciğer dokularında yapılan çalışmalarda NAG'ın A, B, I ve I2 izoenzimlerinin varlığı gösterilebilmiştir (19). İdrardaki enzimin esas kaynağı proksimal tübül epitel hücreleridir. NAG, molekül ağırlığı büyük olduğu için glomerüller yoluyla idrara geçemez (1,4). Glomerüler geçirgenliğin çok arttığı durumlarda bile serumda belirgin olan A izoenzimine idrarda rastlanmamıştır (20).

NAG aktivitesi, enzimatik, kolorimetrik veya fluorometrik olarak tayin edilebilir (21-25). Fluorometrik yöntemlerde 4-methyl-umbelliferyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (4 MU-NAG) (21), kolorimetrik yöntemlerde ise p-nitrophenyl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (PNP-NAG) (22), m-cresolsulfon-phtaleinyl-N-B-D-glucosaminide (MCP-NAG) (23), omega-nitrostyryl-N-acetyl-B-D-glucosaminide (MNP-NAG) (24) substrat olarak kullanılabilir. NAG aktivitelerinin, 24 saatlik idrarda veya rasgele idrar örneklerinde eş zamanlı kreatinin ölçümleri ile birlikte değerlendirilebileceğine dair farklı görüşler mevcuttur (2, 25-27).

NAG aktivitesinin -80° -20° C de stabilitesini birkaç ay koruyabildiği ve 5 kere eritilip çözülmesi ile aktivitesini kaybetmediği belirlenmiştir(28).

Bu çalışmada sağlıklı kişilerde ve kronik böbrek yetmezliği olan hasta grubunda PNP-NAG ve MCP-NAG substratları ile idrar NAG aktivitesini tayin ettik. Yöntemleri kesinlik, geri kazanım, doğrusalılık, sensitivite yönlerinden değerlendirdik.

Gereç ve Yöntem

Gereç

NAG aktivitesinin tayini için kontrol grubuna ait idrar örnekleri sağlıklı laboratuvar personelinden; hasta grubuna ait örnekler ise S.B. Türkiye Yüksek İhtisas Eğitim ve Araştırma Hastanesi (TYİH) Üroloji Servisinde yatan, kronik böbrek yetmezlik tanısı almış olan hastalardan alındı.

İdrar örnekleri sabah 9:00-11:00 saatleri arasında steril koşullarda alındı. Konik tabanlı tüplere aktarılan idrar örnekleri (15 mL) 900g de 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Tübün üst kısmında kalan hücresel elemanlardan uzaklaştırılmış olan idrar toplanarak NAG aktivitesi ve kreatinin tayini için 2 mL ayrıldı. Kalan idrar örnekleri, kesinlik, geri kazanım ve sensitivite çalışmaları için -35°C de dondurularak saklandı. Presizyon çalışmalarında kullanılmak üzere aynı gün içinde toplanan, aktivitesi ortalamasının üzerinde olan 6 örnekten bir idrar havuzu hazırlandı ve 3mL lik porsiyonlar halinde -35°C de dondurularak saklandı.

Spektrofotometrik ölçümler Vitatron FPS/SPS spektrofotometresinde yapıldı (Vital Scientific). pH ölçümleri için Ionolazer analog pH metresi kullanıldı (Orion Research). İdrar örnekleri Minifuge T de santrifüj edildi (Hereaus Sepatech) İdrar kreatinin ölçümleri DACOS otoanalizöründe yapıldı (Coulter).

PNP-NAG yönteminde uygulanacak olan jel filtrasyonu için, laboratuvarında Sephadex G 25 kullanarak hazırlanmış olan 8 cm uzunluk ve 1 cm çapındaki kolonlar kullanıldı.

Yöntem

PNP-NAG Yöntemi:

1981'de Horak tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (22). NAG, jel filtrasyonu ile inhibitörlerinden ayrılmadan önce (1a) ve ayrıldıktan sonra (1b) sodyum sitrat tamponunda (pH

4.4 0,1 mol/L) çözünmüş olan PNP-NAG substratı (10 mmol/L) ile reaksiyona sokuldu. 37° C de 15 dakikalık enkübasyon süresinde substratın enzimatik hidrolizi sonucu p-nitrofenilat iyonu açığa çıktı. Reaksiyon 2-amino 2-methyl 1-propanol (AMP, pH 10.25, 0.75 mol/L) ilave edilerek durduruldu ve oluşan ürün 405 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirildi.

Hesaplamalar: NAG aktivitesi, 100 µmol/l lik paranitrofenilat standardı kullanılarak aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Enzim aktivitesi (U/L): $[A(\ddot{O})-A(\ddot{O}K)] / [A(ST)-A(RK)] \times CmST \times 10 \times 1/t \times dil.fak$

A(Ö): Numunenin absorbansı

A(ÖK): Numune körünün absorbansı

A(ST): Standardın absorbansı

A(RK): Reaktif körünün absorbansı

Cm ST: Standartın mol olarak konsantrasyonu

t : Dakika olarak zaman

10: Birimi µmole çevirmek için gereken katsayı

Rasgele alınmış idrar örneklerinde sonuçlar, U/mmol kreatinin olarak da değerlendirildi.

MCP-NAG yöntemi:

Noto ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları yöntem kullanıldı (23). İdrar örnekleri sitrat tamponunda (pH 4.5, 50 mmol/l) çözünmüş olan MCP-NAG substratı (275 mmol/L) ile reaksiyona sokuldu. Onbeş dakika 37° C de bekletildikten sonra sodyum karbonat (0.3 mol /L) solusyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve oluşan renk, 30 dk içinde 580 nm de spektrofotometrik olarak değerlendirildi. NAG aktivitesi, 3-cresol-sulfonphtaleinin molar absorbtivitesine göre hesaplandı.

Enzim aktivitesi (U/L): $\Delta A/EZ \times 1000 \times TH/\ddot{O}H \times 1/t$

ΔA: Örnek reaktif körünün arasındaki

absorbans farkı
1000: mmol'ü µmol'e çeviren katsayı
TH: Toplam deney hacmi (ml)
ÖH: Örnek hacmi (ml)
E: Molar absorbtivite(L/mmol x cm)
Z: Işık yolu (cm)
t: Zaman (dk)

Rasgele alınmış olan idrar örneklerinde sonuçları U/mmol kreatinin olarak da değerlendirildi.

Bulgular

Kontrol grubunda, jel filtrasyonu uygulanmadan önce ve sonra PNP-NAG Yöntemi ile ve MCP-NAG yöntemi

mi kullanılarak elde edilen ortalama ± 2 standart sapma (SD) değerleri sırası ile 5.66 ± 4.8 U/L, 5.38 ± 4.5 U/L, 3.62 ± 3.05 U/L dir. Aynı yöntemlerle hasta grubunda elde edilen değerler ise sırası ile 27.45 ± 24.6 U/L, 25.96 ± 23.46 U/L, 16.5 ± 16.1 U/L olup; kontrol ve hasta grupları arasındaki fark, her üç yöntem için de istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.001$) (Tablo 1).

Kesinlik (Precision) çalışması: Günler arası kesinliği belirlemek için hazırlanmış olan idrar havuzundan porsiyonlanarak dondurulan örneklerden 20 farklı günde NAG aktivitesi her üç yöntem ile de belirlendi. Jel filtrasyonu uygulanmadan önce PNP-NAG yöntemi ile SD: 0.5 U/L, CV: %4.66, jel filtrasyonu uygulandıktan sonra PNP-NAG Yöntemi ile SD: 0.59 U/L, CV: %3.82,

MCP -NAG Yönteminde ise SD: 0.45 U/L, CV: %5,29 olarak bulundu.

Analitik geri kazanım (Recovery) çalışması: Bu amaçla düşük, orta, yüksek aktiviteli üç idrar örneğine aktivitesini belli miktarda arttıracak kadar NAG standart çözeltisi ilave edildi. Her üç yöntemle bulunan % geri kazanım (beklenen değer % kaçının elde edilebildiği) değerleri % 93.8 ile % 98.8 arasında bulundu (Tablo 2).

Sensitivite: Doğru olarak belirlenebilen en düşük aktivite PNP-NAG yöntemi ile 0.15 U/L, MCP-NAG yöntemi ile 0.5 U/L olarak belirlenmiştir.

PNP-NAG yönteminde reaksiyon 45 U/L ye kadar lineer ilerlemekte, bu değer üstündeki aktivite için idrarın seyreltilmesi gerekmektedir. MCP-NAG yönteminde ise reaksiyonun 119 U/L lik aktiviteye kadar doğrusal olarak ilerlediği tesbit edilmiştir.

Tablo 1: Her üç yöntem ile tesbit edilen idrar NAG aktivite değerleri

	PNP-NAG JEL(+) Yöntemi	PNP-NAG JEL(-) Yöntemi	MCP-NAG Yöntemi
Kontrol	$5,66 \pm 4,8$ U/L $0,43 \pm 0,24$ U/mmol kr	$5,38 \pm 4,5$ U/L $0,40 \pm 0,26$ U/mmol kr	$3,62 \pm 3,05$ U/L $0,27 \pm 0,16$ U/mmol kr.
Hasta	$27,5 \pm 24,6$ U/L $6,59 \pm 13,8$ U/mmol kr.	$26,0 \pm 23,5$ U/L $6,21 \pm 12,7$ U/mmol kr.	$16,5 \pm 16,1$ U/L $3,89 \pm 7,5$ U/mmol kr.
U/L: Ünite/Litre, U/mmol kr.: Ünite/milimol kreatinin			

Tablo 2: Geri kazanım (recovery) çalışması sonuçları

Yöntem	Beklenen Aktivite(U/L)	Bulunan Aktivite(U/L)	% Recovery
PNP-NAG jel (+)	3,55	3,51	98,8
	15,76	15,10	95,8
	39,84	35,58	96,8
PNP-NAG jel (-)	3,47	3,41	98,3
	15,30	14,70	96,1
	39,91	38,02	97,3
MCP-NAG jel	1,32	1,23	93,8
	8,74	8,27	94,6
	28,25	27,40	97,0

Tablo 3: PNP-NAG, MCP- NAG yöntemleri ile normal bireylerde tesbit edilmiş olan NAG aktiviteleri

Yöntem	Yazar	Olgu sayısı	NAG aktivite (U/mmol kre.)
PNP-NAG	TYİH Biyokimya Lab	40	$0,42 \pm 0,12$
	Goren et al (11)	36	$0,47 \pm 0,28$
	Jung et al (6)	66	0,44
MCP- NAG	TYİH Biyokimya Lab	40	$0,27 \pm 0,16$
	Cooper et al (30)	12	$1,70 \pm 9,2$
	Shimajo et al (31)	57	$0,20 \pm 0,01$

Substrat olarak PNP-NAG'ın kullanıldığı ve örneklerin jel filtrasyonundan geçirildiği yöntem ile PNP substratının kullanıldığı ancak jel filtrasyonu yapılmayan yöntem ve MCP-NAG yöntemi ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında yöntemler arasında iyi bir ilişki bulunduğu görülmüştür (sırasıyla, $r=0.994$, $r=0.981$).

Tartışma

İdrar NAG aktivitesinin kolorimetrik tayininde PNP-NAG ve MCP-NAG substratları yaygın olarak kullanılmaktadır (22, 23). Biz çalışmamızda, bu substratları kullanarak 40 normal ve 40 böbrek yetmezlikli hastada idrar NAG aktivitelerini belirledik.

NAG aktivitesinde görülen gün içi değişiklikler ile ilgili farklı görüşler vardır (21, 23). Yirmidört saatlik idrar toplama işlemi zor olup, doğru olarak uygulanması zor olabilir. Sabah ilk idrarın toplanması ve belirlenen NAG aktivitesinin itrah hızı olarak veya kreatinine oranlanarak verilmesi tercih edilebilir (21). Çalışmamızda sabah 9:00-11:00 saatleri arasında toplanan idrar örneklerini kullanarak sonuçları U/L ve U/

mmol kreatinin olarak ifade ettik ve değerlendirdik.

Sağlıklı kişilerin idrar örneklerinden oluşan kontrol grubunda PNP-NAG substratı ile bulduğumuz değerler, Jung ve ark., Goren ve ark. nın bildirdikleri değerler ile uygunluk içindeydi. MCP-NAG substratı ile bulduğumuz değerler ise Shimojo ve ark ile Cooper ve ark. nın bildirdiği değerlere oldukça yakındı (Tablo 3).

İdrarda NAG enziminin kompetitif inhibisyonuna neden olan düşük molekül ağırlıklı bazı inhibitörler mevcuttur (22). Jel filtrasyonu ortamdaki inhibitörleri uzaklaştırmak için uygulanan yöntemlerden biridir. Biz de bu amaçla Sephadex G 25 ile jel filtrasyon kromatografisi tekniğini kullandık. PNP-NAG substratı ile jel filtrasyonundan önce ve sonra NAG aktivitesini ölçerek sonuçları karşılaştırdık. Jel filtrasyonundan sonraki NAG aktivitelerinde, öncekine göre % 6 lık bir yükseklik gözledik. Jel filtrasyonundan önce ve sonra yapılan NAG aktivitesi ölçümleri arasında oldukça iyi bir korelasyon bulduk ($r=0.994$). Jung ve ark ise numune/reaktif oranını 1/6 olarak aldıklarında jel filtrasyonundan önce

elde edilen değerlerin jel filtrasyonundan sonra elde edilenler ile aynı olduğunu bildirmişlerdir (6). Buna göre jel filtrasyonu rutin analizler için zorunlu bir işlem gibi görünmemektedir.

MCP-NAG yönteminde oluşan ürünün absorbansı 580nm de maksimum olduğundan idrarda bulunan bilirubin, hemoglobün gibi kromojenlerin sonuca olan etkisi ortadan kalkmakta ve böylece, bir avantaj olarak, numune körlerinin kullanılması gereği ortadan kalkmaktadır. MCP-NAG in molar absorbtivitesinin PNP-NAG'inkinden yüksek olması (sırasıyla 40.67 ve 18.6 l/mmol x cm) bir avantaj gibi görünmektedir. NAG, PNP-NAG yöntemi ile tayin edildiğinde numune körleri kullanılsa bile maliyet daha düşük olmakta ve enzim PNP-NAG substratı ile daha iyi reaksiyona girdiğinden düşük konsantrasyonlarda bile yeterli absorbans değişiklikleri elde edilebilmektedir. Bir U/L lik enzim aktivitesi PNP-NAG yönteminde 0.047 absorbans değişikliğine sebep olurken; bu absorbans değişikliği MCP-NAG substratı ile 4.7 U/L lik enzim aktivitesine karşı gelmektedir. Buna göre MCP-NAG yöntemi hataya daha açık bir yöntemdir.

Doğru olarak belirlenebilen en düşük aktivite PNP-NAG yöntemi ile 0.15 U/L, MCP-NAG yöntemi ile 0.5 U/L olarak belirlenmiş olup; PNP-NAG yönteminin sensitivitesinin, MCP-NAG yöntemindekinden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bir uygulamanın iyi bir yöntem olarak kabul edilebilmesi için kesinlik çalışmalarında CV değerlerinin düşük olması beklenmektedir (29). Bu çalışmada, örneklerin jel filtrasyonundan geçirilmesinden önce ve sonra PNP-NAG yöntemi ile aktiviteleri ölçüldüğünde CV değerleri sırasıyla %3.8, % 4.66; MCP-NAG yönteminde %5,29 olarak bulunmuştur. Her üç yöntem ile de bulunan değerler %5'e yakın olup; kabul edilebilir düzeylerde dir.

Yapılan bu çalışmada örneklerin jel filtrasyonundan geçirilmeden PNP-NAG substratı ile tayin edildiği yöntem, kolaylığı duyarlılığı, kesinlik ve maliyeti bakımından rutin kullanıma uygun bulunmuştur. İdrarda NAG aktivitesi tayininin, klinik biyokimya laboratuvarlarında renal tubular hasarın erken tanısında ve prognozun takibinde kullanılabilir önemli testler arasında yer alabileceği görüşünü taşımaktayız.

KAYNAKLAR

- Wellwood JM, Ellis BG, Price RG, et al . Urinary N-acetyl- beta-D-glucosaminidase activities in patients with renal disease. Br Med J. 1975; 3(5980):408-11.
- Conchic J , Vindlay J, Levvy AG. Mammalian glycosidases: Distribution in the body. Biochem J 1959 ;77:318-325
- Bourbouze R, Baumann FC, Bonvalet JP, et al. Distribution of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase isoenzymes along the rabbit nephron. Kidney Int. 1984; 4:636-42
- Etherington C, Bosomworth M, Clifton I, et al. Measurement of urinary N-acetyl-b-D-glucosaminidase in adult patients with cystic fibrosis: before, during and after treatment with intravenous antibiotics. J Cyst Fibros. 2007; 1:67-73.
- Moriguchi J, Inoue Y, Kamiyama S, et al. N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) as the most sensitive marker of tubular dysfunction for monitoring residents in non-polluted areas. Toxicol Lett. 2009;190(1):1-8.
- Jung K, Schulze BD, Sydow K. Diagnostic significance of different urinary enzymes in patients suffering from chronic renal diseases. Clin Chim Acta. 1987 ;1683:287-95.
- Sherman RL, Drayer DE, Leyland-Jones BR, Reidenberg MM. N-acetyl-beta-glucosaminidase and beta 2-microglobulin. Their urinary excretion in patients with renal parenchymal disease. Arch Intern Med. 1983;143(6):1183-5.
- Kang HK, Kim DK, Lee BH, et al Urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and malondialdehyde as a markers of renal damage in burned patients. J Korean Med Sci. 2001;16(5):598-602.
- Kind PR. N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine of patients with renal disease, and after renal transplants and surgery. Clin Chim Acta. 1982 ;119(1-2):89-97.
- Sandman R, Margules RM, Kountz SL. Urinary lysosomal glycosidases after renal allotransplantation: Correlation of enzyme excretion with allograft rejection and ischemia. Clin Chim Acta.1973;45(4):349-59.
- Goren MP, Wright RK, Osborne S. Two automated procedures for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase determination evaluated for detection of drug-induced tubular nephrotoxicity. Clin Chem. 1986;32(11):2052-5.

12. Meyer BR, Fischbein A, Rosenman K, et al. Increased urinary enzyme excretion in workers exposed to nephrotoxic chemicals. *Am J Med.* 1984;76(6):989-98.
13. Etherington C, Bosomworth M, Clifton I, et al. Measurement of urinary N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase in adult patients with cystic fibrosis: Before, during and after treatment with intravenous antibiotics. *Journal of Cystic Fibrosis* 2007; 6: 67-73
14. Mariguchi J, Inoue Y, Kamiyama S, et al. N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase(NAG) as the most sensitive marker of tubular dysfunction for monitoring residents in non-polluted areas. *Toxicology letters* 2009; 190:1-8
15. Johnston ID, Jones NF, Scoble JE, et al. The diagnostic value of urinary enzyme measurements in hypertension. *Clin Chim Acta.* 1983;133(3):317-25.
16. Severini G, Aliberti LM, Di Girolamo M. N-acetyl-beta-glucosaminidase isoenzymes in serum and urine of patients with diabetes mellitus *Clin Chem.* 1988;34(12):2430-2432
17. National Institute for Clinical Excellence. Management of type 2 diabetes. Renal disease-prevention and early management clinical guideline. F. London : Natioanal Institute for Clinical Excellence 2002.
18. Basturk T, Altuntaş Y, Kurklu A, ve ark. Urinary N-Acetyl-beta-D-glucosaminidase as an earlier marker of diabetic nephropathy and influence of low-dose perindopril/indapamide combination. *Ren Fail* 2006; 28(2):125-8
19. Ellis BG, Tucker SM, Thompson AE, et al. Presence of serum and tissue forms of N-acetyl-beta-glucosaminidase in urine from patients with renal disease. *Clin Chim Acta.* 1975; 64(2):195-202.
20. Kunin C M, Chesny R W, Craig W A, et al. Enzymuria as a glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease . *Pediatrics* 1987; 62:751-760
21. Vigano A, Cavanna G, Capodaglio P, et al. Methodological and clinical aspects of urinary N-acetyl-glucosaminidase in pediatric subjects. *Biochem Med.* 1981;25(1):26-33.
22. Horak E, Hopfer SM, Sunderman FW Jr. Spectrophotometric assay for urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase activity. *Clin Chem.* 198; 27(7):1180-5.
23. Noto A, Ogawa Y, Mori S, et al. Simple, rapid spectrophotometry of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, with use of a new chromogenic substrate. *Clin Chem.* 1983; 29(10):1713-6.
24. Yuen CT, Price RG, Chattagoon L, et al. Colorimetric assays for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and beta-D-galactosidase in human urine using newly-developed omega-nitrostyryl substrates. *Clin Chim Acta.* 1982; 124(2):195-204.
25. Tassi C, Mancuso F, Feligioni L, et al. Expression models of urinary N-Acetyl- -D-glucosaminidase in patients with chronic renal insufficiency. *Clin Chim Acta* 2004; 346:129-133
26. Welwood JM, Price RG, Ellis BG, et al. A note on the practical aspects of the assay of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. *Clin Chim Acta* 1976; 69:85-91
27. Muller D, Sievers E, Eggert P. Influence of hyperfiltration on the measurement of urinary NAG *Pediatr. Nephrol.* 1999; 13:519-23
28. Lockwood TD, Bosmann HB: the use of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in human renal toxicology 1. partial Biochemical characterisation and excretion in humans and release from the isolated perfused rat kidney. *Toxicol and App Pharm.* 1979; 49:323-336
29. Bauer JD *Clinical Laboratory Methods* 9th edition, St Louisse Missouri.C.V. Mosby Company; 1982 p:3-18
30. Cooper EH, Forbes MA. Evaluation of a new test for N-acetyl-beta-D-glucosaminidase in urine. *Clin Chem.* 1984; 30(4):593-4.
31. Shimojo N, Kitahashi S, Naka K, et al. Comparison of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and alanine aminopeptidase activities for evaluation of microangiopathy in diabetes mellitus. *Metabolism* 1987; 36(3):277-80.