



Deneyisel Siroz Oluşturulmuş Ratlarda Serum Adenozin Deaminaz (ADA) Aktivite Düzeyleri

Serum Adenosine Deaminase Activity Levels in Rats With Experimentally - Induced Cirrhosis

Bilal ÜSTÜNDAĞ¹İ. Halil BAHÇECİOĞLU²Halit CANATAN¹İbrahim H. ÖZERCAN³Nadire ÇİNKİLİNÇ⁴

Özet

Deneyisel olarak karaciğer sirozu oluşturulan ratlarda, pürin metabolik yolunun önemli bir enzimi olan, Adenozin Deaminaz'ın (ADA, E.C.3.5.4.4.) serum aktivite düzeyleri ölçülerek sirozdaki önemi incelendi.

Çalışmada 180-240 gram ağırlığında Swiss-Wistar Albino cinsi toplam 30 adet erkek rat kullanıldı. Ratlar kontrol grubu (n:15) ve Siroz oluşturulacak grup (n:15) olarak ikiye ayrıldı. Uygulama grubuna 0.15 ml /100 g olacak şekilde 3/4 v/v zeytin yağında hazırlanmış karbon tetraklorür (CCl₄) haftada 3 gün derialtına enjeksiyon şeklinde toplam 6 hafta uygulandı. Kontrol grubuna ise aynı oranda serum fizyolojik uygulandı. Serum ADA aktivite düzeyleri Guisti Metodu ile kolorimetrik olarak ölçüldü. Çalışma sonucunda kontrol grubu serum ADA aktivite düzeyleri (7,92 ± 1,51 U/L) ve sirotik grup serum ADA aktivite düzeyleri arasında (16,38 ± 2,79 U/L) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu gözlemlendi (p<0.001). Histopatolojik incelemede karaciğerde sirozun tam olarak gelişmiş olduğu belirlendi. Serum AST, ALT ve alkalen fosfataz enzim düzeylerinde de kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, anlamlı bir yükselme olduğu tespit edildi (p<0.01, p<0.01, p<0.05).

Sonuç olarak deneyisel karaciğer sirozunda serum ADA aktivite düzeylerinin önemli ölçüde arttığı, mevcut veriler ile karaciğer sirozu ve benzeri karaciğer hastalıklarında

yeni bir marker olarak kullanılabileceği düşünülerek, bu durumun yapılacak daha ileri çalışmalarla desteklenmesi sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: Karaciğer sirozu, Adenozin deaminaz (ADA), Karbon tetraklorür (CCl₄)

Abstract

Adenosine Deaminase (ADA) is known to be an important constituent of purine metabolic pathway. The level of serum ADA activity was measured in rats with experimentally-induced cirrhosis and its significance in cirrhosis was investigated.

In this study, thirty Swiss-Wistar Albino male rats weighing 180 to 240 g were used. The rats were divided into two groups as control (n:15) and experimentally-induced cirrhosis group (n:15). Diluted Carbon tetrachloride in olive oil as a (v/v) 0.15 ml /100 g was injected subcutaneously to experimental group, three times weekly for six weeks. Similar amounts of saline was injected to the control group.

The level of serum ADA activity was measured colorimetrically by Guisti method. A statistical difference concerning the level of serum ADA activity was observed between cirrhotic (16,38 ± 2,79 U/L) and control groups (7,92 ± 1,51 U/L) (p<0.001). Histopathological examination revealed extensive liver cirrhosis. Serum aspartate transaminase, alanine transaminase and alkaline phosphatase ac-

1 Yrd. Doç. Dr. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD ELAZIĞ

2 Yrd. Doç. Dr. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, ELAZIĞ

3 Yrd. Doç. Dr. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Patoloji AD, ELAZIĞ

4 Araş. Gör. Dr. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, Elazığ

tivities were significantly increased in experimental group as compared with controls ($p<0.01$, $p<0.01$, $p<0.05$).

In summary, the level of serum ADA enzyme activity was observed to be increased in the experimentally induced liver cirrhosis. The present findings suggest that serum ADA enzyme levels may be a new marker for cirrhosis and similar liver diseases. Further clinical and basic research is needed to clarify and support our findings.

Key words: Liver Cirrhosis, Adenosin deaminase(ADA), Carbon tetrachloride (CCl₄)

GİRİŞ

Adenozin deaminaz; (E.C.3.5.4.4. ADA, Adenozin aminohidrolaz) pürin nükleotidlerinden adenozinin, geri dönüşümsüz bir hidrolitik deaminasyon ile ürünleri olan inozin ve amonyağa çevrilmesini katalize etmektedir (1,2). Memeli dokularında en fazla T lenfositlerinde olmakla beraber, yaygın olarak çeşitli dokularda da bulunan ADA'nın bilinen iki izoenzimi vardır ve pürin nükleotidlerinin metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır (3). İmmün sistemin fonksiyonları ve gelişiminde lenfosit matürasyonu ve aktivasyonu aracılığıyla etkili olduğu sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ortaya konulmuş olan Adenozin deaminazın genetik olarak eksikliğinde şiddetli kombine immün yetmezlik durumları görülmekte ve immün yetmezlik, T hücreli lösemi, lenfoma ve bazı virütik hastalıklarda adenozin deaminaz aktivitesinin ve izoenzimlerinin ölçülmesinin faydalı bir parametre olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (3,4). ADA izoenzimleri (ADA1 ve ADA2) hemen hemen bütün insan dokularında sitoplazmada ve büyük oranda da lenfoid dokularda bulunmaktadır. ADA1 ana izoenzim olup, özellikle lenfoid organlarda, eritrositlerde ve serumda bulunmaktadır. ADA2 ise diğer dokularda da olmakla beraber temel olarak serumda görülür. ADA aktivitesinin hematolojik malignansilerde, karaciğer hastalıklarında ve infeksiyon hastalıklarında serumda önemli ölçüde arttığı bildirilmektedir (3,5). Tüberkülozlu hastalarda serum ve plevral sıvıda artmış ADA aktivitesinin hücreli immünite ile ilişkili olarak anlamlı bir artış gösterdiği, yine tüberküloz peritonit gelişmiş hastalarda asit sıvıda ADA aktivite düzeylerinin karaciğer sirozu varlığında daha anlamlı olarak değiştiği ve bu hastalarda ADA aktivite ölçümünün faydalı olduğu rapor edilmektedir (6). Ya-

pılan diğer çalışmalarda özellikle immün sistem yetersizliği ve kronik karaciğer hastalıklarında, Hepatit B, Halotan ile oluşan hepatit ve parsiyel hepatektomi sonrasında ADA aktivitelerinde değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir (6,7).

Bu sebeple değişik etyolojik nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan kronik bir karaciğer hastalığı olan karaciğer sirozunda ADA aktivitesinin belirlenmesi, hastalığın tanısındaki önemini araştırma amacıyla yaptığımız bu çalışmada deneysel karaciğer sirozunda ADA aktivite düzeylerindeki değişimler incelendi.

MATERYAL VE METOD

Çalışmamızda 180-240 gram ağırlığında Wistar albino cinsi toplam 30 adet rat kullanıldı. Ratlar öncelikle kontrol grubu (n:15) ve siroz oluşturulacak grup (n:15) olarak ikiye ayrıldı. Uygun ortamlarda düzenli gün ışığı alan ratlar standart rat yemi ile beslendiler.

Siroz oluşturulacak gruptaki ratlara, yaygın olarak deneysel karaciğer sirozu oluşturmak amacıyla kullanılan karbon tetraklorür (CCl₄), 3/4 v/v zeytin yağı içinde olacak şekilde hazırlanmış solüsyondan, 0.15 ml/100 g olarak haftada 3 gün derialtı enjeksiyon yöntemiyle uygulandı ve bu uygulama toplam 6 hafta sürdürüldü (8). Kontrol grubuna ise aynı şekilde serum fizyolojik uygulandı. Uygulamalar sonunda ratlar bir gece önceden aç bırakılarak, ertesi gün sabah dekapitasyon işlemi ile kesilerek kanlar alındı. Alınan kan örnekleri 2500-3000 devirde 10 dakika çevrilerek elde edilen serum örneklerinde biyokimyasal parametreler ile ADA aktivite düzeyleri ölçüldü.

Biyokimyasal parametrelerden aspartat aminotransferaz (AST, E.C.2.6.1.1.) ve alanin aminotransferaz (ALT, E.C.2.6.1.2.) aktivite düzeylerinin tayininde Bergmeyer ve ark. (9) tarafından modifiye edilmiş metoda dayalı olarak çalışan AST ve ALT kitleri (UV-Kinetik ölçüm, AST ve ALT kitleri, Technicon Corp., New York, U.S.A) kullanılırken, alkalen fosfataz (ALP, E.C. 3.1.3.1.) ise Bessey ve ark. (10) tarafından modifiye edilmiş metodla çalışan ALP kiti (Kolorimetrik-kinetik, substrat: p-nitrofenil fosfat, ALP kiti, Technicon Corp,



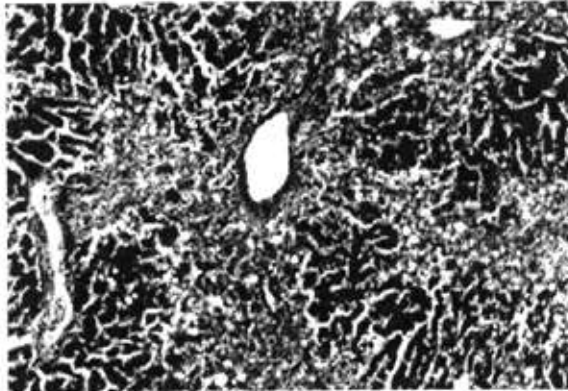
New York, U.S.A) ile Technicon RA-XT oto-analizörde (Technicon Corp, New York, U.S.A) tayin edildi. Serum Adenozin deaminaz aktivite düzeyleri ise Guisti metodu (11) ile kolorimetrik olarak Shimadzu UV-1201 spektrofotometre (Shimadzu Corp., Japan) ile ölçüldü ve değerler U/L olarak verildi. Enzim aktivitesi ünite olarak, 1 dakikada, 1 mikromol adenozini, pH 7.1 ve 37 °C gibi optimal şartlarda inozin ve amonyağa dönüştüren enzim miktarı olarak tanımlandı (5).

Histopatolojik incelemeler için ratlardan alınan karaciğer doku örnekleri % 10'luk formalin içerisinde fikse edilip, rutin takipten sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikrometre kalınlığında alınan kesitlere Masson Trichrome ve Hematoksilen Eozin boyaları uygulandıktan sonra, ışık mikroskobu ile değerlendirildi (12).

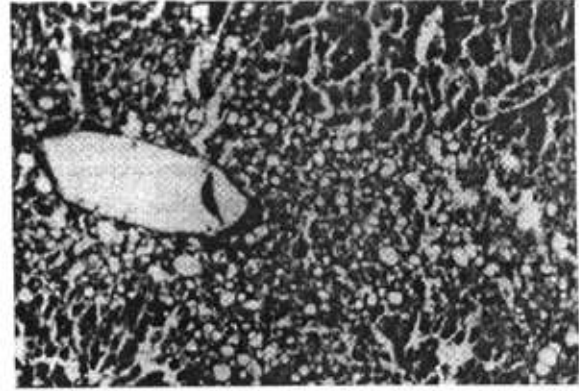
Kontrol grubu ve siroz oluşturulan grupların biyokimya değerleri ve serum ADA aktivite düzeyleri arasındaki farklılıklar Student-t testi kullanılarak değerlendirildi. Veriler ortalama±SD (standart deviasyon) olarak verildi.

SONUÇLAR

Uygulamalar sonunda kesilen ratlardan alınan karaciğer dokularında yapılan histopatolojik incelemeler sonunda CCL₄ uygulanmış ratlarda, karaciğerde portal alanlarda fibröz doku artımı ve mononükleer hücre infiltrasyonları ile köprüleşme nekrozu görüldü (Resim 1). Ayrıca karaciğerde yoğun yağlı dejenerasyon alanlarının varlığı saptandı (Resim2).



Resim 1. Karbon tetraklorür uygulanmış ratlarda, karaciğerde portal alanlarda yoğun bağ dokusu artımı (Masson Trichrome x 100)



Resim 2. Karbon tetraklorür uygulanmış ratlarda, karaciğerde yağlı dejenerasyon (Hematoksilen Eozin x 100)

Biyokimyasal çalışmalar sonucunda sirotik grupta [AST (398,42±19,25 U/L), ALT (612,15±98,21 U/L) ve ALP (56,10±12,836 U/L)] değerlerinin kontrol grubuna [AST (97,20±10,53 U/L), ALT (218,45±28,33 U/L) ve ALP (18,77±3,27 U/L)] göre anlamlı olarak yükseldiği görüldü (p<0.01, p<0.01 ve p<0.05) (Tablo I). Enzim düzeyleri ve histopatoloji bulguları, karaciğer siroz tablosunun tam olarak yerleştiğini göstermektedir.

Tablo I. Kontrol ve CCL₄ uygulanan ratlarda karaciğer enzim düzeyleri

	Kontrol	CCL ₄ Uygulanan Grup
AST (SGOT) (U/L)	97.20±10.51	398.42±19.25**
ALT (SGPT) (U/L)	218.45±28.33	612.15±98.21**
Alkalin Fosfataz (ALP)(U/L)	18.77±3.27	56.10±12.83*

* p<0.05 (Kontrol-CCL₄ uygulanan grup) (Student-t testi)

** p<0.01 (Kontrol-CCL₄ Uygulanan grup) (Student-t testi)

Gruplardan elde edilen serumlarda Guisti metodu ile kolorimetrik ölçümler sonunda elde edilen kontrol grubuna ait adenozin deaminaz aktivite değerleri 7,92 ± 1.51 U/L iken, CCL₄ uygulanmış sirotik rat grubunda 16,38 ± 2.79 U/L olarak ölçüldü. Bu iki grup arasında oldukça anlamlı bir farklılığın olduğu görülmektedir (p<0.001) (Tablo II). Elde edilen ADA aktivite düzeylerinin karaciğer sirozundaki diagnostik değerlendirilmelerde kullanılabilirliği açısından yapılan spesifite, özgüllük, pozitif prediktif ve

negatif prediktif değerler açısından bakıldığında, Cut-of değeri olarak 12 U/L alındığında deneysel siroz oluşturduğumuz grupta duyarlılık % 80, özgüllük % 90,9 olarak ölçülürken pozitif prediktif değer % 88,8 ve negatif prediktif değer % 81,8 olarak belirlendi (13).

Tablo II. Kontrol ve CCL₄ uygulanan grup serum ADA aktivite değerleri.

	Kontrol (n:15)	CCL ₄ Uygulanan Grup (n:15)
Adenozin Deaminaz (ADA)(U/L)	7.92±1.51	16.38±2.79*

* p<0.001 (Kontrol-CCL₄ uygulanan grup) (Student-t testi)

TARTIŞMA

Birçok araştırmacıya göre özellikle immün sistemin ve T hücrelerinin çalışmasının bir göstergesi olarak kabul edilen ve son zamanlarda üzerinde yoğun çalışmalar yapılan Adenozin deaminaz enzimi, insan vücudunda en fazla T lenfositlerinde olmak üzere bir çok dokuda yaygın olarak bulunmakta olup farklı hastalıklarda serum düzeylerindeki artışla immün sistem modülatörü olan bir marker olarak değerlendirilebileceği ileri sürülmektedir (4,14,15,16). ADA aktivite düzeylerinin hücrel bağışıklığın stimüle olduğu bir çok hastalıkta yüksek olduğu bildirilmektedir. Zira, pürin nükleotidlerin metabolizmasında önemli bir rol oynayan ve adenozinin deaminasyonunu katalizleyerek inosine dönüşümünü sağlayan adenozin deaminazın lenfosit proliferasyonu ve farklılaşması ile ilişkili olduğu bilinmektedir (4). Bu yüzden immün sistem ile yakın ilişkili olması, etyolojisinde diğer etkenler yanında immün sistemin de suçlandığı kronik sistemik hastalıklarda incelenmesini önemli hale getirmiştir. Şiddetli kombine immün yetmezliğin görüldüğü, doğuştan veya sonradan kazanılmış çeşitli hastalıklarda; serum, eritrosit ve diğer vücut sıvılarının ADA aktivitelerinin belirlenmesi hastalıkların tanı ve tedavisinin takibinde önemli bilgiler sağlamaktadır (3,14,17). Bu konuda yapılmış diğer

çalışmalarda ADA enziminin iki ayrı izoenziminin olduğu ve ADA 1 izoenzimin büyük kısmının hücre içi ADA aktivitesine bağlı olduğu, diğer izoenzim olan ADA 2 aktivitesinin ise perifer kan dolaşımında aktive olmuş lenfositlerden ve kronik karakterli aktif sistemik hastalıklarda immün sistem kaynaklı olduğu gösterilmiştir (2,3,7). Bandyopadhyay ve ark. (18) tarafından ratlar üzerinde yapılan, ADA aktivitesi ve kortikosteron düzeyleri ile immün cevap ilişkisinin incelendiği çalışmada düşük doz teofilin uygulaması ile dalak ve karaciğerde ADA aktivitesinin artmasına karşılık karaciğer dokusunda bir artışın olmamasına karşılık yüksek doz ve uzun süreli olarak teofilin uygulamasında dalak ve karaciğerde ADA aktivitesinin azaldığı, timusta ise ADA aktivitesinin arttığı gözlenmiştir. Bu sonuç uzun süreli teofilin uygulamasının farklı dozlarda vücuttaki immün cevabı potansiyalize veya supresse edebileceğini göstermekte olup, ADA aktivitesinin immün sistemle çok yakın ilişkide olduğunu ve immün sistem ile ilişkili hastalıklarda ADA aktivitesinin diagnostik anlamı olacağını göstermektedir (18). Blackburn ve ark. (19) tarafından yapılan ve ADA eksikliğinin deneysel olarak ilk kez genetik düzeyde yapıldığı çalışmada ise farelerde ADA geninin gastrointestinal tractus dışında bütün dokularda belirli bir oranda ADA aktivitesi sağladığı ve bunun neticesinde özellikle timus dalak ve karaciğer gibi dokularda doku spesifik metabolik etkiler ortaya çıktığını bildirmekteler (19).

ADA aktivitesinin akut viral hepatit, romatoid artrit, psitakozis, brusella, sarkoidozis gibi bir çok hastalık yanında kronik bir karaciğer hastalığı olan ve maalesef gittikçe artan sıklıkta görülen karaciğer sirozunda da artış gösterdiği bir çok araştırmacı tarafından ileri sürülmektedir (20,21). Ayrıca kronik karakterli tüberküloz gibi bazı hastalıklarda plevra sıvısında artmış ADA aktivite düzeylerinin yanı sıra Hillebrand ve ark (22) tarafından yapılan bir çalışmada kronik bir karaciğer hastalığı olan sirozda komplikasyon olarak gelişen asit sıvıda da ADA aktivite düzeylerinde artış olduğu ve bu artışın diagnostik bir parametre olarak kullanılabileceği ileri sürülmektedir. Bu yüzden karbon tetraklorür kul-



lanarak gerçekleştirdiğimiz deneysel karaciğer sirozunda serum ADA aktivite düzeylerinin bu hastalığındaki önemini araştırdığımız çalışmamızda, siroz oluşturduğumuz gruptaki ratlardaki serum ADA düzeylerinin (16.38 ± 2.79 U/L), kontrol grubu ratlar ile kıyaslandığında (7.92 ± 1.51 U/L) istatistiksel olarak anlamlı bir yükselmeye ($p < 0.001$) olduğunu tespit ettik. Çalışma yaptığımız ratlardan alınan serumlardaki enzim çalışmalarında karaciğer hücre hasarının bir göstergesi olan hücre içi enzimlerden özellikle ALT ve AST düzeyleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak ($p < 0.001$ ve $p < 0.001$) artarken serum ADA aktivite düzeyleri de kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p < 0.001$). Dolayısıyla artmış olan bu enzim düzeyleri karaciğerde meydana gelen hücre hasarını göstermekte ve bir paralellik göstermektedir. Çünkü gerek ALT ve AST, gerekse ADA aktivitesindeki bu artış zedelenmiş hepatositlerden kaynaklanmaktadır. Nitekim ALP düzeyleri kontrol grubuna göre hafif artış göstermekle ($p < 0.05$) beraber fazla artmamıştır. Enzimlerde görülen bu artış karaciğerde meydana gelmiş olan hücre harabiyetini ve nekrozunu gösterdiği gibi yapılan histopatolojik çalışmalarda da ratların karaciğer doku incelenmesinde, karaciğerde portal bölgede yoğun fibrosis ve mononükleer hücre infiltrasyonlarının olduğu ve karaciğerde hepatositlerin zedelenmesi görülmektedir. Bu bulgular karaciğer sirozunun tam olarak gerçekleştiğini göstermektedir.

Kobayashi ve ark. (23) özellikle akut ve kronik karakterli karaciğer hastaları üzerinde yaptıkları çalışmalarında sağlıklı kontrol grubunda ADA aktivite düzeylerini 14.6 ± 0.9 U/L olarak ölçerken, alkolik sirozda 49.8 ± 2.8 U/L, kronik aktif hepatitte 30.7 ± 1.0 U/L ve primer bilier sirozlu hastalarda 20.1 ± 1.5 U/L olarak ölçmüşlerdir ve bu ADA aktivite düzeylerindeki artışın anlamlı olduğunu bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada kontrol grubu ratlara göre artmış olan ADA aktivite düzeylerinin gerçekleşen karaciğer hücre nekrozunun şiddeti ile ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. Kobayashi ve arkadaşlarının da (23) değişik etyolojik nedenli karaciğer hastalıkları incelediklerinde en fazla artışın

alkolik siroz ve akut hepatitte olduğunu göstermelerine rağmen primer bilier sirozlu hastalarda çok fazla artışın olmaması da bu fikrimizi desteklemektedir. Ellis ve arkadaşları da (24) karaciğer hastalıklarında, sirozda görülen sarılığın ayırıcı tanısında artmış olan serum ADA aktivitesinin faydalı olabileceğini bildirmektedir. Ayrıca bu konuda yapılan çeşitli çalışmalarda da özellikle karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomada ADA aktivitesinin artmış olduğu bildirilmiştir (5,7).

Daha önce yapılmış çalışmalar ve bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar karaciğer hastalıklarında ve özellikle karaciğer sirozunda ADA aktivitesinde önemli bir artış olduğunu göstermektedir. Buradan hareketle serum ADA aktivitesinin karaciğer hastalıklarının tanısında ve özellikle gelişebilecek olan asit (22), ödem (25) gibi komplikasyonlar ile verilecek immün supresif ilaçların etkinliğinin değerlendirilmesi yoluyla yeni bir parametre olarak kullanılabileceğini önermekte ve ADA izoenzim düzeyinde daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Rafael, F., Joseph, M.A., Dolors, C., Estela, M., and Joan, L. (1990) Association of adenosine deaminase with erythrocyte and platelet plasma membrane : An Immunological study using light and electron microscopy. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 38(5): 653-658.
2. Niedzwicki, J.G., Liou, C., Abernethy, D.R., Lima, J.E., Hoyt, A., Lieberman, M., Bethlenfalway, N.C. (1995) Adenosine deaminase isoenzymes of the opossum *Didelphis Virginiana*: initial chromatographic and kinetic studies. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 111(2):291-298.
3. Valdes, L., San Jose, E., Alvarez, D., Valle, J.M. (1998) Adenosine deaminase isoenzymes analysis in pleurals effusions: diagnostic role and relevance to the origin of increased ADA in tuberculous pleurisy. *Eur. Respir. J.* 9(4):747-751.
4. Migchielsen, A.A., Knaan-Schanzer, S., Breuer, M.L., Hershfield, M.S., Valerio, D. (1997) Generation of normal lymphocyte populations following trans-

- plantation of adenosine deaminase deficient fetal liver cells. *Bone Marrow Transplant.* 19(11):1137-1143.
5. Muraoka, T., Katsuramaki, T., Shiarashi, H., Yokoyama, M.M. (1990) Automated enzymatic measurement of adenosine deaminase isoenzyme activities in serum. *Anal. Biochem.* 187:268-272.
 6. Soliman, A.A., el-Aggan, H.A., el-Hefnawy, A.M., Mahmoud, S.A., Abo Deya, H. (1994) The value of ascites adenosine deaminase activity and interferon gamma level in discriminating tuberculous from non-tuberculous ascites. *J Egypt Soc. Parasitol.* 24 (1):93-105.
 7. Shakil, A.O., Korula, J., Kanel, G.C., Murray, N.G., Reynolds, T.B. (1996) Diagnostic features of tuberculous peritonitis in the absence and presence of chronic liver disease: a case control study. *Am. J Med.* 100(2):179-185.
 8. Aleynik, I.S., Leo, A.M., Ma, Y., Aleynik, K.M., Lieber, S.C. (1997) Polyenylphosphatidyl choline prevents carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation while it attenuates liver fibrosis. *Hepatology* 27:554-561.
 9. Bergmeyer, H.U., Scheibe, P., and Wahlefeld, A.W. (1978) Optimization of method for aspartate aminotransferase and alanin aminotransferase. *Clin. Chem.* 24:58-73.
 10. Bessey, O.A., Lowry, O.H., Brock, M.J. (1946) A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol. Chem.* 164:321-329.
 11. Guisti, G. Adenosine deaminase. In: Bergmeyer, H.V. Ed. (1974) *Methods of enzymatic analysis*, s1092-1099, Academic Press, Newyork, U.S.A.
 12. Adler, M., and Fenton, S. (1979) Fatty liver hepatitis and cirrhosis in obese patients. *Am. J Med.* 67:811-817.
 13. Buncher, C.R., Weiner, D. Statistisc. In: Bircher, S. Ed. (1989) *Clinical Chemistry, Theory, Analysis and Correlation*, s262-279, The C.V. Mosby Company, 11830, Industrial Drive St louis, Missouri, U.S.A.
 14. Stancikava, M., Lukac, J., Istok, R., Cristalli, G., Rovensky, J. (1998) Serum adenosine deaminase activity and it's isoenzyme pattern in patients with systemic Lupus erthromatousus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 16(5): 583-586.
 15. Hoshino, T., Yamada, K., Masuoka, K., Tsuboi, I., Itoh, K., Nonaka, K., Oizumi, K. (1994) Elevated adenosine deaminase activity in the serum of patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Practice.* 25:97-102.
 16. Singh, L.S., Sharmo, R. (1998) Alloxan diabetes regulates adenosine deaminase activity in mice tissue and age specific correlation. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 46(1): 55-61.
 17. Manuel, F.B., Alice, P., Maria, A.L., Ermelinda, V.G., Antonio, R.C. (1990) Serum and pleural adenosine deaminase. Correlation with lymphocytic populations. *Chest.* 97: 605-10.
 18. Bandyopadhyay, B.C., Poddar, M.K. (1997) Theophylline-induced changes in mammalian adenosine deaminase activity and corticosterone status: possible relation to immune response. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 19(3): 181-184.
 19. Blackburn, M.R., Datta, S.K., Wakamiya, M., Vartabedian, B.S., Kellems, R.E. (1996) Metabolic and immunologic consequences of limited adenosine deaminase expression in mice. *J Biol. Chem.* 271 (25): 15203-15210.
 20. Word, C.D. (1986) Serum adenosine deaminase assay in sarcoidosis has little clinical usefulness. *Clin. Chem.* 32:7,1429.
 21. Amar, D., Attai, L.A., Gupta, K.S., Jones, A. (1992) High adenosine deaminase activity in pleural effusion due to psitacosis. *Chest.* 101:31,881-2.
 22. Hillebrand, D.J., Runyon, B.A., Yasminch, W.G., Rynders, G.P. (1996) Ascitic fluid adenosine deaminase insensitivity in detecting tuberculous peritonitis in the United States. *Hepatology* 24(6): 1408-14212.
 23. Kobayashi, F., Ikeda, T., Marumu, F., Sato, C. (1993)



- Adenosine deaminase isoenzymes in liver disease. *Am. J Gastroenterol.* 88 (2) : 266-71.
24. Ellis, G., Goldberg, D.M., Spooner, R.J., Ward, A.M. (1978) Serum enzyme tests in disease of the liver and biliary tree. *Am. J Clin. Pathol.* 70(2): 248-58.
25. Ferrer, J.S., Munoz, X.G., Orriols, R.M., Light, R.W., Morrel, F.B. (1996) Evolution of idiopathic pleural effusion: a prospective long term follow-up study. *Chest.* 109(6): 1508-13.