

753807

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MEME KANSERLİ HASTALARDA TÜMÖR M2-PİRÜVAT  
KİNAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

Erkan GÖRÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Levent KAYRIN

ADANA-2006

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

MEME KANSERLİ HASTALARDA TÜMÖR M2-PİRÜVAT  
KİNAZ ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

Erkan GÖRÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI  
Prof. Levent KAYRIN

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
TF2005YL3 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez No:.....


ADANA-2006


## KABUL VE ONAY FORMU


### Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Meme Kanserli Hastalarda Tümör M2-Piruvat Kinaz Enziminin Karakterizasyonu” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

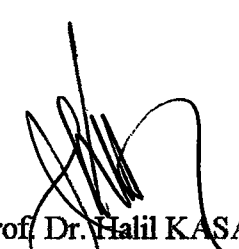
Tez Savunma Tarihi : 13 / 11 / 2006

  
Prof. Dr. Levent KAYRIN  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Kıymet AKSOY  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

  
Prof. Dr. Berksoy ŞAHİN  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun ..16.11.2006....tarih ve ..27/5-4.... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Halil KASAP  
Enstitü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kıymet AKSOY, Prof. Dr. Nurten DİKMEN, Doç. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK, Doç. Dr. Abdullah TULİ ve Yrd. Doç. Dr. Tamer İNAL 'a, ayrıca destek ve sevgilerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri, teknik elemanları ve personeline de teşekkür ederim.

Tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Levent KAYRIN' a ayrıca teşekkür ederim. Ayrıca tezimin yürütülmesinde yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen Dahiliye-Onkoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Berksoy ŞAHİN ve Genel Cerrahi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Cem Kaan PARSAK' a da teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince bana maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme ve en yakın arkadaşlarıma da ayrıca teşekkür ederim.

Tez çalışmasını TF2005YL3 no' lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Kimyager Erkan GÖRÜR

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER.....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	4
2.1. PİRUVAT KİNAZ ENZİMİ (PK).....	4
2.1.1 GENEL ÖZELLİKLERİ.....	4
2.1.2. İZOENZİMLERİ.....	5
2.1.2.1. Karaciğer (L) Tipi Piruvat Kinaz.....	7
2.1.2.2. Kas (M1)Tipi Piruvat Kinaz.....	9
2.1.2.3 Eritrosit (R) Tipi Piruvat Kinaz.....	10
2.1.2.4. M2 Tipi Piruvat Kinaz.....	12
2.1.3. KİMYASAL YAPISI.....	14
2.1.3.1 Molekül Ağırlığı ve Aminoasid Dizisi.....	14
2.1.3.2 Domainleri.....	17
2.1.4. ETKİ MEKANİZMASI.....	18
2.1.4.1. Fonksiyonu.....	18
2.1.4.2. Mekanizması.....	20

2.2. TÜMÖR M2 TİPİ PİRUVAT KİNAZ .....	22
2.3. MEME KANSERİ .....	26
2.3.1. Türkiye’ de Meme Kanseri.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	29
3.1. GEREÇLER.....	29
3.1.1. Cihazlar .....	29
3.1.2. Kimyasal Maddeler.....	29
3.2.ÖRNEK SEÇİMİ VE TEMİNİ.....	30
3.3. ÇALIŞMA ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI .....	30
3.3.1. Kan Örnekleri.....	30
3.3.2. Doku Örnekleri.....	31
3.3.2.1 Doku Homojenatının Hazırlanışı.....	31
3.4. YÖNTEMLER.....	31
3.4.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	31
3.4.1.1 Lowry Yöntemi ile Protein Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	31
3.4.1.2 Piruvat Kinaz Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı.....	32
3.4.2. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN ÖLÇÜMÜ.....	34
3.4.3. PİRUVAT KİNAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ.....	35
3.4.4. ELISA KİT ÇALIŞMASI.....	38
4. BULGULAR.....	41
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇLAR .....	66
7. KAYNAKLAR.....	68
8. ÖZGEÇMİŞ.....	78

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1</b> : Piruvat kinaz enziminin domainleri.....	17
<b>Şekil 2</b> : Fosfoenol piruvatın piruvata dönüşüm tepkimesi.....	19
<b>Şekil 3</b> : Piruvat kinaz enziminin aktif bölgesi.....	20
<b>Şekil 4</b> : Normal ve tümörlü hücrede glikoliz metabolizması.....	22
<b>Şekil 5</b> : Tümör M2-PK'nın dimerik ve tetramerik yapıya dönüşümü.....	24
<b>Şekil 6</b> : Lowry Yöntemi ile Protein Standart Eğrisi.....	41
<b>Şekil 7</b> : Hasta ve Kontrol grubunun plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması.....	45
<b>Şekil 8</b> : Hasta değişik doku tiplerinin ve kontrol grubunun plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması.....	46
<b>Şekil 9</b> : İnvaziv duktal karsinom evrelerinin plazma piruvat kinaz spesifik aktivite (Beutler) ortalaması.....	47
<b>Şekil 10</b> : İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 2' deki hastaların plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması.....	49
<b>Şekil 11</b> : İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 3' deki hastaların plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması.....	49
<b>Şekil 12</b> : : Hastaların normal ve tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması.....	52
<b>Şekil 13</b> : Hastaların normal dokularına ait değişik doku tiplerinin spesifik aktivite ortalaması.....	53
<b>Şekil 14</b> : Hastaların tümörlü dokularına ait değişik doku tiplerinin spesifik aktivite ortalaması .....	54

<b>Şekil 15:</b> ELISA Kit Standart Eğrisi.....	55
<b>Şekil 16:</b> ELISA yöntemi ile değişik doku tiplerinin plazma piruvat kinaz aktivite ortalaması.....	59
<b>Şekil 17:</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların (ELISA) evrelerinin piruvat kinaz aktivite ortalaması.....	60
<b>Şekil 18:</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların (ELISA) EVRE 2' deki piruvat kinaz aktivite ortalaması.....	60



## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 1:</b> Piruvat kinaz izoenzimlerinin çapraz tepkimeleri.....	6
<b>Tablo 2:</b> Memelilerde piruvat kinaz izoenzimlerinin lokalizasyonu.....	7
<b>Tablo 3:</b> L tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri.....	8
<b>Tablo 4:</b> M1 tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri.....	10
<b>Tablo 5:</b> R tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri .....	11
<b>Tablo 6:</b> M2 tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri.....	13
<b>Tablo 7:</b> Piruvat kinaz izoenzimlerinin genel özellikleri.....	14
<b>Tablo 8:</b> Değişik kaynaklardan elde edilen piruvat kinaz izoenzimlerin moleküler ağırlıkları.....	15
<b>Tablo 9:</b> Piruvat kinaz izoenzimlerinin aminoasid içerikleri (mol/ 55 000 g enzim).....	16
<b>Tablo 10:</b> Piruvat kinaz tiplerinin canlılar arasındaki dağılım oranı.....	18
<b>Tablo 11:</b> Kontrol grubuna ait plazma protein miktarı ve piruvat kinaz enziminin aktivitesi.....	42
<b>Tablo 12:</b> Hasta grubunun patolojik bulguları ve plazma spesifik piruvat kinaz enzim aktivitesi.....	43
<b>Tablo 13:</b> Hasta ve kontrol grubuna ait plazma piruvat kinaz spesifik aktivitesinin istatistik sonuçları .....	45
<b>Tablo 14.a:</b> Hastalara ait değişik doku tiplerinin ve kontrol grubunun plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları.....	46
<b>Tablo 14.b:</b> Kontrol grubu ve değişik doku tiplerinin istatistiksel karşılaştırılması.....	46
<b>Tablo 15.a:</b> İnvaziv Duktal Karsinom evrelerinin plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları .....	47
<b>Tablo 15.b:</b> İnvaziv Duktal Karsinom evrelerinin istatistiksel karşılaştırılması .....	47
<b>Tablo 16:</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 2 (Beutler) plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları .....	48
<b>Tablo 17:</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 3' deki hastaların plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları .....	49
<b>Tablo 18:</b> Hastaların normal ve tümörlü doku örneklerinin piruvat kinaz spesifik aktivitesi.....	50
<b>Tablo 19:</b> Hastaların normal ve tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları .....	52
<b>Tablo 20.a:</b> Hastaların normal dokularının piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları.....	53
<b>Tablo 20.b:</b> : Hastaların normal dokularına ait değişik doku tiplerinin karşılaştırılması.....	53
<b>Tablo 21.a:</b> Hastaların tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik	

aktivitelerinin istatistik sonuçları .....	54
<b>Tablo 21.b:</b> Hastaların tümörlü dokularına ait değişik doku tiplerinin karşılaştırılması .....	54
<b>Tablo 22:</b> ELISA yöntemi ile kontrol grubuna ait örneklerinin plazma piruvat kinaz aktivitesi .....	55
<b>Tablo 23:</b> Hastaların patolojik verileri ve plazma (ELISA) piruvat kinaz aktiviteleri.....	56
<b>Tablo 24.a:</b> Hastaların ELISA kit yöntemi ile değişik doku tiplerine göre plazma piruvat kinaz aktiviteleri .....	58
<b>Tablo 24.b:</b> Değişik doku tiplerinin (ELISA) ve kontrol grubunun plazma piruvat kinaz aktivite karşılaştırılması .....	58
<b>Tablo 25.a :</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu (ELISA) evrelerinin plazma piruvat kinaz aktivitelerinin istatistik sonuçları.....	59
<b>Tablo 25.b :</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların (ELISA) evrelerinin istatistiksel karşılaştırılması .....	59
<b>Tablo 26:</b> İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların EVRE 2 (ELISA) plazma piruvat kinaz aktivitelerinin istatistik sonuçları .....	60

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1:</b> Lowry yöntemiyle standart eğri çalışması.....	34
<b>Çizelge 2 :</b> Lowry yöntemiyle protein tayini .....	35
<b>Çizelge 3:</b> Piruvat kinaz aktivite ölçümü.....	37
<b>Çizelge 4:</b> ELISA Kit Çalışması .....	39

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

PK.....	: Piruvat Kinaz
ATP.....	: Adenozin Trifosfat
PEP.....	: Fosfoenolpiruvat
ADP.....	: Adenozin Difosfat
FDP.....	: Fruktoz-1,6-difosfat
EDTA.....	: Etilen Diamin Tetraasetikası
ELISA.....	: Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
kDa.....	: Kilo Dalton
ePK.....	: Eritrositer Piruvat Kinaz
SE.....	: Sedimentasyon Equilibrium
JF.....	: Jel Filtrasyonu
kcal.....	: Kilo Kalori
$\Delta G$ .....	: Serbest enerji
c-AMP.....	: Siklik AMP
GTP.....	: Guanin Trifosfat
GDP.....	: Guanin Difosfat
CTP.....	: Sitozin Trifosfat
UTP.....	: Üridin Trifosfat
Tu M2-PK.....	: Tümör M2 Piruvat Kinaz
NADH.....	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NAD.....	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
HPV-16.....	: Human Papilloma Virus Type 16
CEA.....	: Carcinoembriyonic antigen
HCG.....	: Human Chorionic Gonadotropin
AFP.....	: Alfa Fetoprotein
NSE.....	: Nöron Spesifik Enolaz
PAPP.....	: Poly-(ADP-riboz) Polimeraz
WHO.....	: Dünya Sağlık Örgütü
IARC.....	: International Agency on Cancer for Research
MOPS.....	: 3-(N-morfolino) propan sülfonikası
POD.....	: Peroksidaz
TMB.....	: 3,3',5,5'-tetra-metil benzidin

## ÖZET

### MEME KANSERLİ HASTALARDA TÜMÖR M2-PK (PİRÜVAT KİNAZ) ENZİMİNİN KARAKTERİZASYONU

Glikoliz yolunun anahtar enzimlerinden Piruvate kinaz (E.C.2.7.1.40, ATP: Pyruvate-O-phosphotransferase) fosfoenolpiruvatın (PEP) piruvata dönüşümü ile ATP oluşumunu katalizlemektedir. Piruvat kinaz tetramer yapıdadır. Memelilerde, piruvat kinaz enzimi M1, M2, L ve R tip olmak üzere dört farklı izoenzimi bulunmaktadır. İzoenzimler kinetik, düzenleyici özellikleri ve lokalize olduğu dokuya göre farklılık göstermektedir.

Günümüze değin yapılan araştırmalarda, tümörlü hücrelerde metabolik değişikliğin kontrolünde M2 tip piruvat kinazın rolü saptanmış olup hemen hemen tüm çoğalan hücrelerde fazla miktarlarda bulunduğu, özellikle tümörlü hücrelerde ise bu miktarın çok fazla arttığı gözlenmiştir. Karsinogenez süresince, piruvat kinazın dokuya özgün izoenzimlerinden M1-PK kas, L-PK karaciğer, R-PK eritrosit izoenzimlerinin ortadan kalktığı M2-PK' nın sentezinin arttığı bulunmuştur. M2-PK enziminin substratı olan PEP'e karşı yüksek affinite gösteren aktif tetramerik yapıda ve PEP'e daha az affinite gösteren dimerik yapıda bulunabilmektedir. Dimerik formda olan M2-PK hücreSEL PEP derişiminde neredeyse inaktif durumdadır.

ScheBo Biotech firması Tümör M2-PK' nın EDTA-plazmada ölçümü için ELISA yöntemini geliştirmiştir. İmmünohistolojik boyama sonuçlarıyla uyumlu olarak, böbrek, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanserli hastaların EDTA-plazma örneklerinin Tümör M2-PK miktarı , tümörlerin metastatik durumlarını direk yansıtmaktadır.

Meme kanseri yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olduğu için dünyadaki en önemli üçüncü kanser türüdür. Çalışmada, plazma ve doku örneklerinin piruvat kinaz enzim spesifik aktivitesi 92 hastada Beutler ve ELISA yöntemleri ile çalışıldı. Hem ELISA hem de Beutler yöntemi ile çalışılan, kontrol ve hasta gruplarına ait plazma örneklerinin piruvat kinaz aktiviteleri karşılaştırıldı ve anlamlı bir fark ( $p < 0.001$ ) bulundu. Ayrıca, Beutler yöntemi ile çalışılan tümörlü ve normal doku örneklerinin PK aktiviteleri arasında farklılık olduğu gözlendi ( $p < 0.001$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Meme Kanseri, Piruvat Kinaz, Tümör M2- piruvat kinaz

## ABSTRACT

### CHARACTERIZATION OF TUMOR M2-PK (PYRUVATE KINASE) ENZYME IN BREAST CARCINOMA

Pyruvate kinase (EC 2.7.1.40, ATP: Pyruvate-O-phosphotransferase), a key enzyme in glycolysis, catalyzes conversion of phosphoenolpyruvate (PEP) into pyruvate with regeneration of adenosine triphosphate (ATP). Pyruvate kinase is a tetramer. In mammalian tissues, four distinct isoenzymes of pyruvate kinase are found: M1-type; M2-type ; L-type, and R-type. These isoenzymes differ in kinetic and regulatory properties and localization in different tissues.

The key regulator of the metabolic alterations found in tumor cells is the glycolytic isoenzyme pyruvate kinase type M2 that is generally expressed in all proliferating cells and overexpressed in all tumor cells investigated to date. During carcinogenesis a shift in the pyruvate kinase isoenzyme equipment always takes place, such that the tissue-specific isoenzymes disappear (such as M1-PK in muscle and brain, L-PK in liver and kidney, and R-PK in red blood cells), and M2-PK is expressed. M2-PK can exist in a highly active tetrameric form with a high affinity to its substrate, phosphoenolpyruvate (PEP), and in a dimeric form with a low PEP affinity. The dimeric form of M2-PK is virtually inactive at cellular PEP concentration.

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of Tumor M2-PK in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-plasma is available from ScheBo Biotech AG. In accordance with results from immunohistological staining, the amount of Tumor M2-PK in EDTA-plasma samples from patients with renal cell carcinoma, pancreatic, lung, breast, and colon cancer directly reflected the metastatic state of the tumors. Carcinoma of the breast, the third most common cancer worldwide, accounts for the highest morbidity and mortality. In the present study, pyruvate kinase specific activity of plasma and tissue samples were studied with Beutler and ELISA method in 92 patients. Pyruvate kinase activities of plasma samples are belonging to control and patient groups which were studied both ELISA and Beutler methods were compared and were found significant result ( $p < 0.001$ ). Also, pyruvate kinase activities of tumor and normal tissue samples which studied with Beutler method were compared and the results were found  $p < 0.001$ .

**Key Words:** Breast Carcinoma, Pyruvate Kinase, Tumor M2- pyruvate kinase.

# 1. GİRİŞ

Genel anlamda kanser; hücrel döngü kontrolünün kaybolmasına bağı olarak değişime uğramış bir hücreden, birçok hücrenin meydana gelmesi olayıdır. Bu hücreler normalinden hızlı olarak bölünen hücrelere dönüşmüş olup kendilerini çevreleyen dokudan daha farklı morfolojik ve biyokimyasal özellikler göstermektedir<sup>(45)</sup>.

Çeşitli organlarda gelişerek her yaşta bireyleri etkileyen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir. Kanser vakaları içinde meme kanseri kadın sağığını tehdit eden en önemli malign hastalık olup yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Meme kanseri dünyadaki en önemli üçüncü kanser türü olup kanser ölümlerinde ikinci sıradadır. Bir kadının yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma olasılığı %13,1'dir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 183 000 invaziv meme kanseri teşhis edilmekte ve her yıl yaklaşık 41 000 kadın bu nedenle yaşamını yitirmektedir. Ülkemizde meme kanseri kadınlar arasında diğer kanser türlerine göre birinci sırada yer almaktadır. Son verilere göre Türkiye de meme kanseri oranı % 24.1 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi güçtür. Ancak mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir. Ancak meme kanserinden dolayı ölüm oranları son yıllarda giderek azalmaktadır. Bu azalmanın nedenleri arasında erken tanı yöntemlerinin geniş insan popülasyonlarında etkin bir şekilde uygulanması ve sistemik tedavide elde edilen hedefe yönelik tedavi seçeneklerindeki başarılı sonuçlar sayılabilir<sup>(62, 63,64,65)</sup>.

Piruvat kinaz (E.C.2.7.1.40), glikoliz yolunda adenozin difosfatın substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize eden glikoliz yolunda bulunan allosterik bir enzimdir<sup>(17,41)</sup>. Enzim, fonksiyonunu gösterebilmesi için tek değerlikli iyonlardan  $K^+$ 'a, iki değerlikli iyonlardan  $Mg^{2+}$  ya da  $Mn^{2+}$ 'e mutlaka gereksinim duyar. Kinetik özellikleri, elektrik mobiliteleri, aminoasid içerikleri ve çeşitli dokulardaki dağılımlarına göre insan piruvat kinazı 4 farklı izoenzime (M1, M2, L ve R) sahiptir<sup>(15)</sup>. Diğer taraftan immünolojik ve lökalle olduğu gene göre iki temel gruba ayırmak mümkündür. M tipi M1 ve M2 izoenzimleri, L tipi ise L ve R izoenzimleri şeklindedir. R tip piruvat kinaz olgun eritrositlerde, L tip piruvat kinaz karaciğer ve böbrek gibi

glukoneojenik dokularda bulunmaktadır. R ve L tip piruvat kinaz fruktoz-1,6-difosfat (FDP) tarafından aktive edilmektedir <sup>(16)</sup>. M1 tip piruvat kinaz yetişkin iskelet kasında bulunan tek izoenzim olup kalp kası ve beyinin ana izoenzimidir <sup>(17,18)</sup>. M1 tip piruvat kinazın kinetik ve düzenleyici özellikleri diğer 3 tipten farklı olarak fosfoenol piruvat (PEP)' a karşı Michaelis-Menten kinetiği göstermekte ve FDP tarafından aktive olmamaktadır <sup>(19-21)</sup>. M2 tip piruvat kinaz fetus ve tümör dokularının majör izoenzimi olup en fazla erişkin dokularda bulunur <sup>(16,22)</sup>. M2 tip piruvat kinaz PEP'a karşı sigmoidal kinetik özellik göstermekte olup FDP tarafından da aktive olmaktadır. M2 izoenzimi elektroforetik ve immünolojik olarak M1 izoenzimine, kinetik olarak ta L izoenzime benzemektedir <sup>(17,18,23)</sup>.

Tümör hücrelerinin enzimoloji ile ilişkisi, tümör hücrede karbonhidrat, pürin ve pirimidin metabolizmasını düzenleyen enzimlerin aktivitelerinin değişikliğe uğramasından ileri gelmektedir. Tümörlü hücrelerinin metabolizmasındaki gerekli enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin hızlı çalışması nedeniyle benign veya malign tümörlerde piruvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir<sup>(15)</sup>. Meme kanserli hastalarda tümörlü doku piruvat kinaz aktivitesinin sağlıklı doku aktivitesine göre artış göstermesi, bu enzimin meme kanserinde belirteç olarak görev yapabileceğini düşündürmektedir<sup>(21,52,53,55)</sup>.

Beyin tümörleri, retinoblastomalar, rhabdomyosarcomalar, medullar tiroid kanserleri, karaciğer, meme kanserleri ve hepatomalar gibi neoplastik dokularda tümör M2 tip piruvat kinazda değişim olduğu tespit edilmiş ve tümörlü dokuda bulunan M2 tip ile malignite arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla saptanmıştır. M2 tip piruvat kinaz enzimi tümör hücrelerinde değişime uğramış ve Tümör M2 izoenzimi olarak isimlendirilmiştir. Tümör M2 izoenzimi karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde aktif rol oynamaktadır <sup>(21,52,53,54)</sup>. Genelde piruvat kinaz enziminin bütün izoenzimlerinin, aktif durumlarının eş tetramerik yapıda olmasına karşılık tümör hücrelerinde, piruvat kinazın M2 izoenzim yapısı bozulur ve ağır basan formu dimeriktir. Tümör hücrelerinin karakteristik metabolizması ile dimerik M2 piruvat kinaz derişiminde çarpıcı bir artma olur. Vücut sıvılarında mevcut olan Tümör M2 piruvat kinaz, tümör hücre dönüşümleri ve nekrozları ile tümör hücrelerinden aktarıldır. Bazı araştırmacılara göre; Tümör M2 ve M tip aynı genden, L tip ise farklı genden sentezlenmektedir<sup>(2,55)</sup>. M ve L izoenzimleri ile karşılaştırıldığında Tümör M2 tip



piruvat kinaz farklı kinetik özellik göstermektedir. Hipodermiste piruvat kinaz aktivitesinin arttığı ve malign dokularda M formdan değişik bir izoenzim olan Tümör M2 formun olduğu rapor edilmiştir. Tümör M2-piruvat kinaz enziminin EDTA (Etilen Diamin Tetraasetikasit)'lı tam kan plazmasında, esas olarak iki monoklonal antikor yöntemine dayalı ELISA (Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay) ile ölçülebilmektedir<sup>(21,53,55)</sup>.

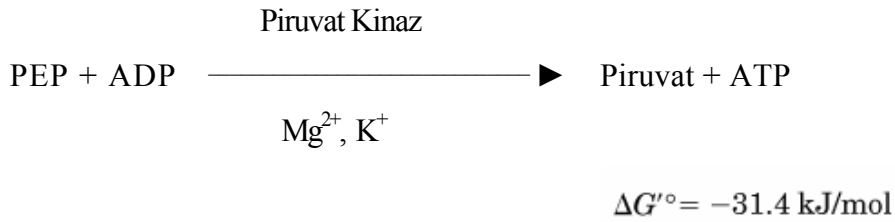
Tümör M2-piruvat kinaz enzimi çeşitli kanser türlerinde hastalığın takibinde kullanılabilir. Dünyada gittikçe önem kazanan ve çeşitli kanserlerde belirteç olarak kullanılan Tümör M2-piruvat kinaz enziminin ELISA yöntemi ile plazmadaki aktivitesinin ölçülmesi, bu yöntemin oldukça masraflı olması nedeni ile daha ucuz bir yöntem olan Beutler yöntemi ile ölçülerek her iki yöntemin karşılaştırılması; normal ve tümörlü dokuların piruvat kinaz aktivitesi karşılaştırılarak kanser olgularını tanı ve takibinde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 PİRUVAT KİNAZ ENZİMİ (PK)

#### 2.1.1 GENEL ÖZELLİKLERİ

Glikolizde ikinci adenzin trifosfat (ATP)'nin sentezlendiği tepkime piruvat kinaz tarafından katalizlenir. Piruvat kinaz glikolitik yolun bu son basamağında fosfoenol piruvat (PEP)' tan adenzin difosfat (ADP)'a bir fosforil grubun transferinde arabuluculuk yaparak ATP ve piruvatı oluşturur. Tepkime negatif serbest enerjiye sahip olması nedeniyle fizyolojik koşullarda geri dönüşümsüzdür. Piruvat kinaz, glikoliz yolunun kontrolünü sağlayan üç enzimden birisidir <sup>(1,2)</sup>.



Genel olarak piruvat kinaz, yaklaşık 200-250 kDa ağırlığında olan 4 monomerden oluşmaktadır. Her bir monomer yaklaşık 500 aminoasidden meydana gelmiş tetramerik yapıya sahiptir<sup>(3-8)</sup>. Bu monomerler üç majör domain ve bunlara ek olarak küçük N-terminal domain içermektedir <sup>(2,4,5)</sup>. Piruvat kinaz enziminin domainlerinin kombinasyonu ve alt ünitelerin rotasyonu, aktif bölgede geometrinin değişimine neden olmaktadır <sup>(8)</sup>. Bu rotasyon, piruvat kinaz enziminin aktif R formunu veya aktif olmayan T formunu oluşturur <sup>(4)</sup>. Piruvat kinaz enziminin aktif olmayan T formundan, aktif R formuna geçişindeki değişiklikler substratın enzime bağlanmasını sağlar <sup>(2, 9,10,11)</sup>.

Piruvat kinaz enzimi, aktivitesini gösterebilmesi için tek değerlikli iyonlardan  $K^{+}$ 'a, iki değerlikli iyonlardan  $Mg^{2+}$  ya da  $Mn^{2+}$ 'e mutlaka gereksinim duyar<sup>(2)</sup>. Enzim yapısında, etkili moleküllerin bağlanabileceği aktif ve allosterik bölgelere sahiptir<sup>(12,13)</sup>. Allosterik ve aktif bölgeler domainlerin yüzeyinde bulunmaktadır<sup>(2,8)</sup>. Aktif bölge A, allosterik bölge C domaininde lokalizedir. C domainine aktivatör olan FDP'nin bağlanması etkisiyle aktif bölge allosterik bölgeden uzaklaşır ve substrat olan PEP' in bağlanması için bir sinyal görevi göster<sup>(2,3)</sup>.

Eritrosit piruvat kinaz(ePK) enzim eksikliğinin kalıtsal bir hastalık olan nonsferositik hemolitik anemiye neden olduğu 1961'den beri bilinmektedir. Bunun yanı sıra Boivin ve arkadaşları birçok hematolojik bozukluklarda kazanılmış piruvat kinaz defektini rapor etmişlerdir. Yapılan bir çok araştırma değişik kan hastalıklarında kazanılmış eritrositer piruvat kinaz eksikliğini rapor etmiştir. Bunlar arasında akut lösemiler, malignant lenfomalar ve miyelodisplastik sendromlar sayılmaktadır. Bu tip eritrositer PK defektleri kendilerini sadece aktivite düşüşü ile değil, ePK' nın kinetik parametrelerinin değişmesi ile de karakterizedir<sup>(8,14)</sup>.

### 2.1.2. İZOENZİMLERİ

Kinetik özellikleri, elektrik mobiliteleri, aminoasid içerikleri ve çeşitli dokulardaki dağılımlarına göre insan piruvat kinazı 4 farklı izoenzime (M1, M2, L ve R) sahiptir<sup>(15)</sup>. Diğer taraftan piruvat kinazı immünolojik ve lokalize olduğu gene göre L ve M tipi olmak üzere iki temel gruba ayırmak mümkündür. M tipi M1 ve M2 izoenzimleri, L tipi ise L ve R izoenzimlerini içermektedir. R tip piruvat kinaz olgun eritrositlerde, L tip piruvat kinaz karaciğer ve böbrek gibi glukoneojenik dokularda bulunmaktadır. R ve L tip piruvat kinaz FDP tarafından aktive edilmekte ve substratı olan PEP' e karşı allosterik bir davranış göstermektedir<sup>(16)</sup>. M1 tip piruvat kinaz yetişkin iskelet kasında bulunan tek izoenzim olup kalp kası ve beyinin ana izoenzimidir<sup>(17,18)</sup>. M1 tip piruvat kinazın kinetik ve düzenleyici özellikleri diğer 3 tipten farklı olup PEP' e karşı Michaelis-Menten kinetiği göstermekte ve FDP tarafından aktive olmamaktadır<sup>(19-21)</sup>. M2 tip piruvat kinaz fetus ve tümör dokularının majör izoenzimi olup en fazla erişkin dokularda bulunur<sup>(16,22)</sup>. M2 tip piruvat kinaz PEP' a karşı sigmoidal kinetik özellik göstermekte olup FDP tarafından da aktive olmaktadır. M2 izoenzimi

elektroforetik ve immünolojik olarak M1 izoenzimine, kinetik olarak ta L izoenzime benzemektedir <sup>(17,18,23)</sup>.

Piruvat kinaz izoenzimlerinin genetik yapısı hakkında, bir çok görüş vardır. Bazı çalışmalarda, 4 çeşit dokuya özgün piruvat kinazın ayrı ayrı genlerin ürünü olduğu savunulmuş fakat son yapılan çalışmalarda, immünolojik olarak 4 tip izoenzimin çapraz tepkime vermeyen 2 büyük gruba ayrıldığı gösterilmiştir(Tablo 1) <sup>(24)</sup>.

**Tablo 1.** Piruvat kinaz izoenzimlerinin çapraz tepkimeleri .

	<b>M1</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>M2</b>
	<b>izoenzimi</b>	<b>izoenzimi</b>	<b>izoenzimi</b>	<b>izoenzimi</b>
Anti-M1	+	-	-	+
Anti-L	-	+	+	-
Anti-R	-	+	+	-
Anti-M2	+	-	-	+

“+” antijen-antibodi tepkimesi var, “-” antijen-antibodi tepkimesi yok.

R ve L izoenzimlerinin aynı gen (PKLR) ürünü olduğu ve aynı mRNA’ dan değişik splicing yoluyla sentezlendiği gösterilmiştir. M1 ve M2 izoenzimlerinin ise aynı gen (PKM) ürünü olduğu gösterilmiştir (Tablo 2) <sup>(8,25,26)</sup>.

**Tablo 2:** Memelilerde piruvat kinaz izoenzimlerinin lokalizasyonu.

	<b>R tip PK</b>	<b>L tip PK</b>	<b>M1 tip PK</b>	<b>M2 tip PK</b>
<b>Lokalizasyonu</b>	Eritrosit	Karaciğer, İnce bağırsak Böbrek	Beyin, Kalp İskelet kası	Fetal hüceler, Tümör hücreleri Akciğer Lökosit
<b>Gen</b>	PKLR	PKLR	PKM	PKM
<b>Aminoasid sayısı</b>	574	543	531	531

### 2.1.2.1. Karaciğer (L) Tipi Piruvat Kinaz

L tipi piruvat kinaz karaciğerin majör, böbrek ve bağırsağın ise minör izoenzimidir. Karaciğerde yüksek oranda L tipi piruvat kinazın bulunması, bu enzimin karaciğerdeki glikoliz ve glukoneogenez yollarının düzenlenmesinde büyük rolü olduğunu ortaya koymaktadır<sup>(1,13,27-29)</sup>. Substratı olan PEP' e karşı allosterik bir davranış gösteren L tipi PK izoenzimi, FDP varlığında aktive olmakta ve  $K_{0.5}$  değeri düşerek kinetik eğrisini sigmoidalden hiperboliğe doğru değiştirmektedir. Ayrıca ATP ve alanin tarafından allosterik olarak inhibe olmaktadır. Fakat inhibisyon FDP ilavesi ile ortadan kalkmaktadır. Yapılan çalışmalarda, FDP yokluğunda L tip piruvat kinazın PEP için  $K_{0.5}$  değeri 0.3-0.9 mM ve Hill sabitesi 1.6-2.9 arasında bulunmuş iken bu değerler FDP ilavesi ile  $K_{0.5}$  için 0.03-0.5 mM arasına ve Hill sabitesi için ise 1'e düşmüştür. Bütün bunlara aksine, şartlar ne olursa olsun ADP için saturasyon eğrisi hiperbolik bir karakter göstermektedir<sup>(24)</sup>.

Dört ayrı FDP bağlanma bölgesinin gözleendiği L tipi izoenzimin, FDP ilavesi ile optimum pH' ı azalmaktadır. İzoelektrik nokta, FDP yokluğunda 6.0-6.3 arasında değişirken, FDP varlığında bu değer 5.3'e kadar düşmektedir. L tip izoenzimin sentez ve aktivitesi çoğunlukla diyet durumu tarafından da kontrol edilmektedir. Karaciğer

ekstraktlarındaki enzimin total aktivitesi yemekten önce düşük iken yemekten sonra önemli derecede artmaktadır<sup>(24,30,31)</sup>.

Tablo 3' da L tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri özetlenmiştir<sup>(24)</sup>.

**Tablo 3:** L tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri

Enzim Kaynağı	Tavuk	Sıçan	Domuz	Sığır	İnsan
Özellikleri					
Spesifik aktivite ( U/gr protein)	320	220-258	280-300	63,4	190
Sıcaklık (°C)	37	30	37	25	-
K <sub>m</sub> (PEP)-(FDP) mM	0,79	0,3-0,96	0,3-0,6	0,5	-
Hill sabiti	2,9	1,6-2,0	2,3	-	-
K <sub>m</sub> (PEP)+(FDP) mM	-	0,04-0,15	0,025-0,05	-	-
Hill sabiti	-	1,0	1,1	-	-
K <sub>0,5</sub> (FDP) (µM)	-	0,06-0,1	0,015	-	-
K <sub>m</sub> (ADP) (mM)	0,26	0,07-0,4	0,3	-	-
K <sub>i</sub> (ATP) (mM)	-	0,1-0,15	-	-	-
K <sub>i</sub> (ALA) (mM)	-	1-10	-	-	-
Opt. pH (-FDP)	-	6,5	6,5	-	-
(+FDP)	-	-	6,8-7,0	-	-
pI (-FDP)	6,3	5,8-6,0	6,0-6,2	-	6,28
(+FDP)	6,3	5,2-5,3	5,3	-	5,85
Molekül Ağırlığı (kDalton)	193	208-220	202-265	215	220-240
Altbirim Sayısı	4	4	4	4	4
Altbirim Molekül Ağırlığı (kDalton)	52	57-79	50-62	54	60

Japonya'da Satoh, Tani ve arkadaşları 1988 yılında yapılan bir çalışmada insan karaciğer tipi (L) piruvat kinaz (PKL) genini, 1. kromozomun q21 bandında olduğunu göstermişlerdir. Piruvat kinaz L izoenzim geni, 11 intron ve 12 exon içermekte olup 9,3 kilobazlıktır. Birinci exon R tipine özgü dizinimi içerir. İkinci

exon ise 350 baz çiftlik olup L tipine özgüdür. Birinci exon "exon R", ikinci exon "exon L" olarak isimlendirilir. Kalan tüm exonlar her iki izoenzim için aynıdır <sup>(27)</sup>.

### **2.1.2.2. Kas (M1) Tipi Piruvat Kinaz**

Kalp kası ve beynin majör izoenzimi olup yetişkin iskelet kasında bulunan tek piruvat kinaz tipidir. Glikolitik hızın belirlenmesinde rolü olmayan M1 izoenzim tipi, pasif bir izoenzim olup kinetik davranışı Michaelis-Menten modeline uyar. Alanin tarafından inhibe olmayan M1 tipi ayrıca ADP ve PEP ile hiperbolik saturasyon eğrileri göstermektedir. FDP' den etkilenmeyen M1 tipi piruvat kinaz dört adet izoenzim içinde en kararlı ve en kolay saflaştırılabilen form olup, değişik kaynaklardan saflaştırılan M1 tipi piruvat kinazlar, benzer fiziksel, kimyasal ve kinetik karakteristikler göstermektedir. Ayrıca özgün ayıraçlarla yapılan inaktivasyon çalışmalarından, her aktif bölge için temel bir sülfidril ve arginin rezidüsünün olduğunu her bir ADP bağlanma yeri için ise lizin ε-amino grubunun olduğunu göstermişlerdir. İzoenzimlerin hemen hemen eşit miktarda glutamat ve aspartat içerdikleri de gösterilmiştir <sup>(11,24,29,32,33)</sup>.

M1 tipi piruvat kinaz eşit ağırlıklı dört alt birimden meydana gelmiş olup alt birim molekül ağırlıkları 53 000- 63 000 arasındadır. Genel olarak, ADP için  $K_m$  değeri 0.3 mM ve ATP için inhibisyon sabiti 3.0-3.5 mM arasında bulunmuştur. M1 tipi izoenzimin optimum pH' sın 7.5 civarında ve izoelektrik noktasında 8.5-8.9 arasında olduğu bulunmuştur. Chem ve arkadaşları M1 tipi piruvat kinaz geninin 15. kromozom uzun kolunda ve q22→ qter bandında bulunduğunu rapor etmişlerdir <sup>(34)</sup>.

Tablo 4' de M1 tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri özetlenmiştir <sup>(24)</sup>.

**Tablo 4:** M1 tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri

<b>Enzim Kaynağı</b> <b>Özellikleri</b>	<b>Kurbağa İskelet</b>	<b>Tavuk Göğüs</b>	<b>Sıçan Femoral</b>	<b>Tavşan İskelet</b>	<b>Kedi İskelet</b>	<b>Sığır Boyun</b>	<b>Sığır Kalp</b>	<b>İnsan İskelet</b>
Spesifik aktivite (U/ gr protein)	133,10	236	780	300-360	300	233	260	270
Sıcaklık (°C)	25	25	37	30	25	25	30	25
K <sub>m</sub> (PEP) mM	0.06	0.06-0.09	0,08	0,086	-	0,04	-	0,035
Hill sabiti	-	1,0	1,0	-	-	-	-	-
K <sub>m</sub> (ADP) (mM)	-	0,3	0,3	0,3	-	-	-	-
K <sub>i</sub> (ATP) (mM)	-	-	3,0-3,5	-	-	-	-	-
Opt. pH	-	-	-	-	-	7.1	-	7,5
pI	-	8,5-8,8	-	-	-	8,9	-	-
Molekül Ağırlığı (kDalton)	220	212-215	250	230-240	-	230	220	230-241
Altbirim Sayısı	4	4	-	4	4	4	4	4
Altbirim Molekül Ağırlığı(kDalton)	55	53-54	-	53-57	60	57	55	60-63

### 2.1.2.3 Eritrosit (R) Tipi Piruvat Kinaz

İnsan eritrositleri, piruvat kinazın sadece R tipi izoenzimini içermektedir. Elektroforetik ayrımı L tipi ile beraber başarılıdır. Yapılan bir çok araştırmada, L tipi izoenzim ile R tipi izoenzim arasında bir çok benzerliğin olduğunu ortaya çıkarmıştır. Her iki izoenzim kinetik ve immünolojik özellikler açısından birbirine benzerlik gösterirken elektroforetik olarak birbirinden ayrılabilir (14,29,35). Chem ve arkadaşları insan eritrosit izoenziminin aminoasid bileşimini rapor



etmişlerdir. R tipi PK izoenziminin, arginin ve triptofan haricinde, aminoasid içeriği bakımından L tipi izoenzime çok benzediğini rapor etmişlerdir<sup>(36)</sup>. Yapılan çalışmalarda, R izoenziminin aminoterminal ucunda bulunan 33 aminoasidin L izoenziminde bulunmadığını, geri kalan 541 aminoasid kalıntısının L ve R tipi izoenzimde aynı olduğu gösterilmiştir<sup>(37)</sup>. Allosterik bir enzim olan R tipi piruvat kinaz, FDP tarafından aktive, ATP tarafından inhibe edilmektedir. R tipi için rapor edilen kinetik değerler ile L tipi değerlerin homoloji gösterdiği bildirilmiştir (Tablo 3 ve Tablo 5). R tipi izoenzimin  $K_{0.5}$  değeri fosfoenolpiruvat için 0.48-0.63 mM arasında iken bu değer FDP varlığında 0.06 mM'a düşmektedir. Gaireau ve arkadaşları bu izoenzim için izoelektrik noktayı 7.1 olarak rapor etmişlerdir. Bu değer L tipi izoenzime ait değerden daha yüksektir. Tablo 5' de R tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri özetlenmiştir<sup>(24,29)</sup>.

**Tablo 5:** R tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri

<b>Enzim Kaynağı</b>	<b>İnsan</b>
<b>Özellikleri</b>	
Spesifik aktivite	57.9-300
Sıcaklık	30
$K_m$ (PEP) – FDP (mM)	0.48-0.63
Hill sabiti	1.2-1.6
$K_m$ (PEP) + FDP (mM)	0.06
Hill sabiti	0.8-0.9
$K_{0.5}$ (FDP) ( $\mu$ M)	0.04-0.06
$K_m$ (ADP) (mM)	0.44-0.6
pI (-FDP)	7.1
Molekül Ağırlığı (kDa)	200-240
Altbirim Sayısı	4
Altbirim Molekül Ağırlığı (kDa)	59-60

#### 2.1.2.4. M2 Tipi Piruvat Kinaz

M2 tipi piruvat kinaz enzimi, yetişkin dokularında geniş bir dağılıma sahiptir. Akciğer, böbrek, yağ dokusu gibi yetişkin dokularında, fetal dokularda, lökosit, plateletlerde ve birçok tümöral dokuda mevcut kompleks tip piruvat kinaz olarak kabul edilmektedir. M2 tipi piruvat kinaz eş moleküler ağırlıklı ve benzer yapıda dört alt birimden oluşmuştur<sup>(24,37)</sup>.

Saflaştırılmış M2 tipi izoenziminin özellikleri, diğer izoenzim tiplerinden oldukça farklı yapıya sahiptir. Çeşitli doku ve organizma M2 tipi izoenzimlerinin izoelektrik noktaları, bulunduğu dokuya göre büyük oranda farklılık göstermektedir. Genelde M1'den düşük, L'den büyüktür<sup>(37)</sup>. FDP yokluğunda PEP için  $K_{0.5}$  değeri 0.2-0.4 mM arasında değişirken FDP ilavesi ile çok az bir değişme gözlenir. ADP için  $K_m$  değeri 0.2-0.4 mM arasında iken ATP ve alanin için  $K_i$  değerleri sırası ile 2.5 mM ve 0.6 mM'dir. M2 tipi piruvat kinaz izoenzimi, allosterik bir davranış gösterirken kinetik özellikler bakımından L tip izoenzimden farklıdır. Tablo 6'da M2 tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri özetlenmiştir<sup>(24,29)</sup>.

**Tablo 6:**M2 tipi piruvat kinaz izoenziminin fiziksel, kimyasal ve kinetik özellikleri.

<b>Enzim Kaynağı</b>	<b>Tavuk Akciğer</b>	<b>Domuz AH130</b>	<b>Domuz Böbrek</b>	<b>İnsan Böbrek</b>	<b>İnsan Akciğer</b>
<b>Özellikleri</b>					
Spesifik aktivite (U/ gr protein)	520	770	500	127	274
Sıcaklık (°C)	37	37	30	-	30
K <sub>m</sub> (PEP)-(FDP) mM	0,2	0,4	-	-	0,3
Hill sabiti	1,3	1,4-1,5	-	-	1,06
K <sub>m</sub> (PEP)+(FDP) mM	0.11	-	-	-	0,25
K <sub>m</sub> (ADP) (mM)	0,21	-	-	-	0,38
K <sub>i</sub> (ATP) (mM)	-	2,5	-	-	-
K <sub>i</sub> (ALA) (mM)	-	0,6	-	-	-
pI (-FDP)	8,3	-	5,6	7,7	-
(+FDP)	6,7	-	-	-	-
Molekül Ağırlığı (kDalton)	188	216	210-249	207	250
Altbirim Sayısı	4	-	4	4	4
Altbirim Molekül Ağırlığı (kDalton)	50	-	58-61	51	62

Tablo 7’ da ise piruvat kinazın dört izoenziminin genel özellikleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir<sup>(24)</sup>.

Eritrosit piruvat kinaz aktivitesi için bölgemizde yapılan çalışma da bu değer 13.08+4.79 EU/gr Hb olarak belirlenmiştir . Akın ve arkadaşları ise Antalya yöresinde 617 kadın ve 573 erkek de yaptıkları çalışmada, eritrosit piruvat kinaz enzim aktivitesi 19.8+4.0 EU/gHb değerini bulmuşlardır. Yapılan çalışmalarda enzim aktivitesi, erkeklerde kadınlıklarından biraz daha yüksek bulunmuştur. Bunun fiziksel aktivite farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir<sup>(38,39,40)</sup>.

**Tablo 7:** Piruvat kinaz izoenzimlerinin genel özellikleri.

<b>İzoenzim</b>	<b>M1</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>M2</b>
<b>Özellikleri</b>				
K <sub>m</sub> (PEP)-(FDP) (Mm)	0,04-0,09	0,3-1,0	0,5-0,6	0,2-0,4
Eğrinin Şekli	Hiperbolik	Sigmodial	Sigmodial	Hiperbolik
K <sub>m</sub> (PEP)-(FDP) (Mm)	-	0,03-0,15	0,06	-
Eğrinin Şekli	Hiperbolik	Hiperbolik	Hiperbolik	Hiperbolik
FDP ile Aktivasyon	Hayır	Evet	Evet	Evet
K <sub>i</sub> (ATP) (mM)	3-4	0,1-0,2	-	2,5
L – Alanin ile inhibisyon	Hayır	Evet	Evet	Evet
K <sub>m</sub> (ADP) (mM)	0,3-0,4	0,1-0,4	0,4-0,6	0,2-0,4
Molekül Ağırlığı (kDa)	210-250	200-240	200-240	190-250
Altbirim Sayısı	4	4	4	4
Monomerler	Aynı	Aynı	İki tür	Aynı
Altbirim Molekül Ağırlığı (kDa)	53-63	50-62	59-60	50-62
pH opt. (-FDP)	7,1-7,5	6,5	-	-
(+FDP)	7,1-7,5	6,8-7,0	-	-
pI (-FDP)	8,5-8,9	5,8-6,3	7,1	5,6-8,3
(+FDP)	8,5-8,9	5,2-5,3	-	6,7
Amino Terminal	Bloklanmış	Bloklanmış	-	Bloklanmış

### 2.1.3. KİMYASAL YAPISI

#### 2.1.3.1 Molekül Ağırlığı ve Aminoasid Dizisi

Piruvat kinaz enzimi, 200-250 kDa ağırlığında olup her bir monomeri 500-600 aminoasidden meydana gelmiş, tetramerik bir yapıya sahiptir<sup>(15-19,41)</sup>. Çeşitli

kaynaklardan elde edilen memeli piruvat kinaz izoenzimlerinin farklı metotlarla bulunan moleküler ağırlıkları Tablo 8’de verilmiştir <sup>(24)</sup>.

**Tablo 8:**Değişik kaynaklardan elde edilen piruvat kinaz izoenzimlerin moleküler ağırlıkları

<b>Tip</b>	<b>Kaynak</b>	<b>Ölçüm Metodu</b>	<b>Tetramer Molekül Ağırlığı (Dalton)</b>	<b>Altbirim Molekül Ağırlığı (Dalton)</b>
<b>M1</b>	Tavşan İskelet Kası	JF	250.000	-
	Sığır İskelet Kası	SE	230.000	57.000
	Fare İskelet Kası	JF	234.000	58.600
	Sıçan İskelet Kası	SE	250.000	-
<b>M2</b>	Sıçan Dalak	JF	240.000	60.000
	Fare Dalak	JF	238.000	59.000
<b>L</b>	Sığır Karaciğer	SE	215.000	54.000
	Sıçan Karaciğer	SE	208.300	57.000
	İnsan Karaciğer	JF	220.000-240.000	-
<b>R</b>	İnsan Eritrosit	SE	225.000	59.000-60.000

SE : Sedimentasyon Equilibrium

JF: Jel Fitasyonu

Değişik kaynaklardan elde edilen değişik tip piruvat kinaz enzimlerinin aminoasid içerikleri ve izoelektrik noktaları ise Tablo 9’de özetlenmiştir. Tablo 9’ da görüldüğü gibi M1 ve L (veya R) formları arasında aminoasid bileşimi açısından önemli farklılıklar saptanmıştır<sup>(24)</sup>.

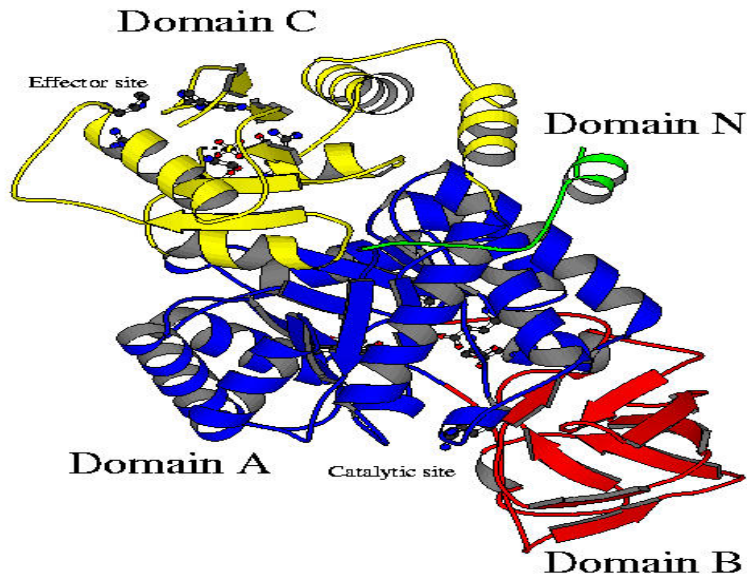
**Tablo 9:** Piruvat kinaz izoenzimlerinin aminoasid içerikleri (mol/ 55 000 g enzim)

İzoenzim Enzim kaynağı	M1			R	L	M2	
	Tavşan	Domuz	İnsan	İnsan	Domuz	İnsan Böbrek	Domuz Böbrek
<b>Aminoasid</b>							
Lizin	34	35	33	20	20	30	33
Histidin	14	14	12	10	10	11	12
Arginin	26	30	27	50	34	28	30
Aspartik asit	47	46	46	33	35	45	46
Glutamik asit	48	47	54	56	60	47	49
Prolin	21	24	20	23	20	24	23
Glisin	39	39	38	41	46	27	40
Alanin	57	54	50	50	56	45	54
Valin	43	46	42	46	46	40	45
Metiyonin	16	17	18	11	10	26	14
İzolösin	31	30	32	32	39	32	33
Lösin	38	38	37	40	43	35	38
Tirozin	9	9	9	7	8	8	10
Fenilalanin	15	16	16	14	15	15	16
Sistein	8	8	14	6	7	13	9
Treonin	24	26	25	20	25	26	27
Serin	28	26	27	31	30	30	26
Triptofan	3	3	3	8	3	3	4
<b>pI</b>	7.25-8.90			7.1	5.8-6.2	7.0-7.8	

Diğer yandan, domuz dokularından elde edilen M1 ve M2 tipi izoenzimler arasında, aminoasid içerikleri açısından fark çok az iken, insan M1 ve M2 tipleri arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir<sup>(42,43)</sup>. Arginin ve triptofan haricinde, L ve R tipi piruvat kinazlar aminoasid içeriği bakımından birbirlerine benzerdir. Ancak R tipi izoenzim L tipi izoenzimden daha fazla arginin içerir ve dolayısıyla daha yüksek izoelektrik noktaya sahiptir. FDP' in ilavesi M2, L ve R tipi piruvat kinazın izoelektrik noktalarını düşürürken, bütün izoenzimlerinin N-terminalinin bloklanmış olduğu rapor edilmiştir<sup>(5,8,24,44)</sup>.

### 2.1.3.2. Domainleri

Her bir monomer A, B, C majör domain ve N terminal domainini içermektedir. A ve C büyük domain, B ve N ise küçük domainlerdir. A ve C monomerlerin merkezinde, B domaini ise merkezden biraz uzakta olup monomerin bükülebilir kısmını oluşturmaktadır. ( $\alpha/\beta$ )<sub>8</sub> tabakalarından meydana gelmiş olan A domaini PK monomerlerinin en büyük domaini olup A1 ve A2 olmak üzere iki alt birimden oluşmuştur. B domaini ise, A domainin  $\alpha$ 3 ve  $\beta$ 3 tabakaları arasında sıkışmış olup düzensiz 9  $\beta$  kırmalı tabakadan oluşmuştur. C domaini ise A domainine benzer 5  $\alpha$ -helix ve 5  $\beta$  kırmalı tabakası içermektedir. N-terminal domaini en küçük domain olup helix-dönüş-helix motiflerini içermektedir<sup>(2-8)</sup>.



Şekil 1 : Piruvat kinaz enziminin domainleri.

Piruvat kinaz enziminin kristal yapısı ve karakterizasyonu mantar, E.coli, Lershmonia mexicana, kedi, tavşan ve insan eritrositlerinden izole edilerek çalışılmıştır. Piruvat kinaz enziminin bütünsel yapısının, domainlerinin ve T-R formlarının canlılar arasındaki yüzde olarak farklılıkları Tablo 10’te özetlenmiştir<sup>(3-8)</sup>.

**Tablo 10:**Piruvat kinaz tiplerinin canlılar arasındaki dağılım oranı

		T - formu		R - formu mantar	M1 Tavşan
		L. mexicana	E.coli		
<b>Bütün yapı</b>	<b>L. mexicana</b>	0	57.4	50.3	49.0
	<b>E.coli</b>	57.4	0	56.7	52.0
	<b>R - Mantar</b>	50.3	56.7	0	48.6
	<b>M1 Tavşan</b>	49.0	52.0	48.6	0
<b>A Domain</b>	<b>L. mexicana</b>	0	44.6	38.8	32.6
	<b>E.coli</b>	44.6	0	43.4	39.3
	<b>R - Mantar</b>	38.8	43.4	0	37.2
	<b>M1 Tavşan</b>	32.6	39.3	37.2	0
<b>B Domain</b>	<b>L. mexicana</b>	0	68.4	61.1	60.0
	<b>E.coli</b>	68.4	0	68.4	63.2
	<b>R - Mantar</b>	61.1	68.4	0	57.9
	<b>M1 Tavşan</b>	60.0	63.2	57.9	0
<b>C Domain</b>	<b>L. mexicana</b>	0	73.3	64.1	71.8
	<b>E.coli</b>	73.3	0	73.3	67.9
	<b>R - Mantar</b>	64.1	73.3	0	63.4
	<b>M1 Tavşan</b>	71.8	67.9	63.4	0

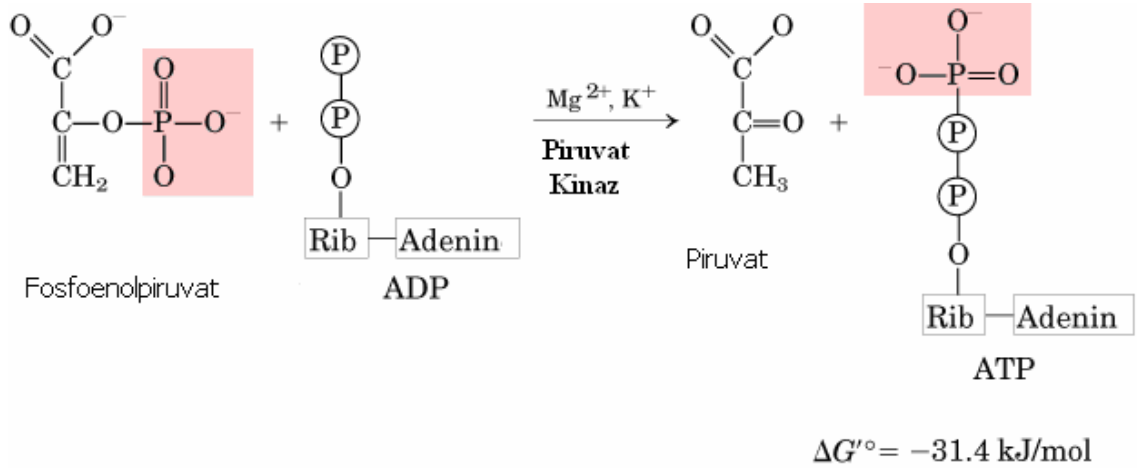
## 2.1.4. ETKİ MEKANİZMASI

### 2.1.4.1. Fonksiyonu

Piruvat kinaz ya da diğer adıyla ATP: Piruvat 2-O-fosfotransferaz (E.C.2.7.1.40) glikolitik yolun 3 anahtar enziminden birisidir. Glikolitik yoldaki üç tersinmez



tepkimeden sonuncusunu kataliz etmektedir. Piruvat kinaz, bu son basamakta, PEP' in fosfat grubunu ADP' a transfer edmekte ve sonuçta ATP ve piruvat elde edilmektedir. Bu tepkimede PEP' in 1 molekülü için 7,5 kcal' lik enerji elde edilir, piruvat kinaz enzimi glikoliz ve özellikle de glikoneogenezin göreceli olarak hızının kontrol edilmesinde görev alır<sup>(2,41,45)</sup>.



**Şekil 2:** Fosfoenol piruvatın piruvata dönüşüm tepkimesi.

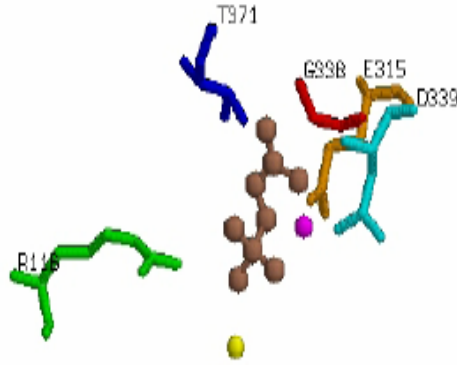
Bu tepkimede PEP üzerindeki fosforil grubu ADP' ye aktarılır ve tepkime sonucunda negatif serbest enerji ( $\Delta G$ ) açığa çıkar. Fizyolojik koşullar altında negatif  $\Delta G'$  e sahip olan bu tepkime ürünler yönünde ve tersinmezdir. Tepkimede PEP hidrolizi  $\Delta G = -62,2 \text{ kJ/mol}$ , ATP oluşumu  $\Delta G = 30,8 \text{ kJ/mol}$  serbest enerjiye sahiptir. Tepkime sonunda serbest enerji  $\Delta G = -31,4 \text{ kJ/mol}$  olmaktadır. Piruvat kinaz enziminin kontrolü bazı fizyolojik hormonal ve allosterik mekanizmalarla sağlanmaktadır<sup>(2,45)</sup>.

FDP , substratı olan PEP ve Mg-ADP' ye karşı enzimi daha duyarlı hale getirerek aktiviteyi arttırır. Piruvat kinazın fosforilasyonu (N-terminal ucundaki serin kalıntısı siklik AMP(cAMP) tarafından fosforlanabilir) enzimin substrata olan affinitesini ve FDP' nin aktivatör etkisini azaltmaktadır<sup>(2,26,46)</sup>.

Piruvat kinaz enzimini, kataliz tepkimesinde substratı, kofaktörü ve koenzimi enzimin allosterik ve aktif bölgesine bağlanarak aktiveyi sağlarlar. ATP , PEP ve tek değerlikli (veya iki değerlikli) katyonlarının bağlanma bölgesi enzimin A ve B

domainlerindedir. ADP' nin bağlanma bölgesi ise A ve C domainlerindedir. Allosterik etki gösteren moleküllerde C domainine bağlanmaktadır. Aktivatör etki gösteren FDP, C domaini üzerinde arginin, serin ve treonin aminoasid kalıntılarına bağlanarak etkisini göstermektedir <sup>(2,9)</sup>.

Aktif bölge A domaininde olup B domaini de kısmen bu bölgeyi içermektedir. C domainine FDP'nin bağlanmasıyla, aktif bölge allosterik bölgeden uzaklaşır ve PEP' in bağlanması için bir sinyal görevi göstermektedir <sup>(2,3)</sup>. Bu durum A domainin 6. ve 8. bölgelerindeki katalitik bölgeyi aktif hale getirmektedir. A domaininin 6. ve 7. bölgelerindeki treonin, glisin, glutamik asit ve aspartik asit kalıntıları ve 8. bölgedeki arginin, bunlara ek olarak metal iyonları ile katalitik bölgenin geometrik şeklini düzenlemekte ve böylece fosforilasyon gerçekleşmektedir (Şekil 3) <sup>(2,7-9)</sup>.



**Şekil 3:** Piruvat kinaz enziminin aktif bölgesi.

#### 2.1.4.2. Mekanizması

Piruvat kinaz enzim aktivitesi  $K^+$ ,  $Mn^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  gibi kofaktörler tarafından kontrol edilmektedir. Hayvansal kaynaklardan elde edilen piruvat kinaz üzerinde yapılan çalışmalarda, enzimin tek değerlikli iyon olarak potasyuma ( $K^+$ ) ve iki değerlikli iyon olarakda iki magnezyuma ( $Mg^{2+}$ ) gereksinim duyduğunu ve bunların yüksek derişimlerinin inhibitör etkisinin olduğu rapor edilmiştir <sup>(2,3,24)</sup>.

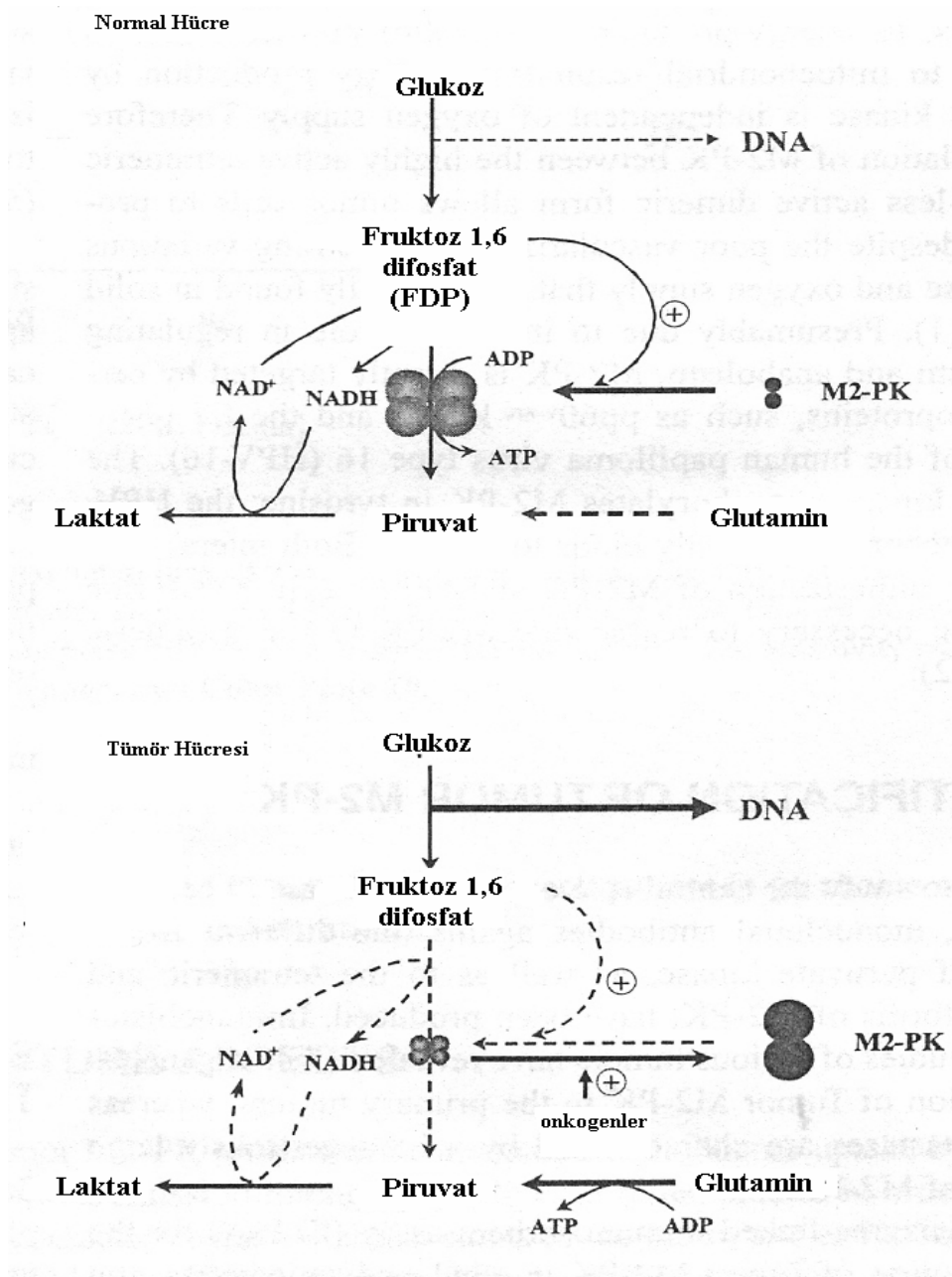
İki tane  $Mg^{2+}$  iyonundan her biri aktif bölgedeki glutamik asit ve aspartik asit kalıntılarını etkileyerek ADP ve PEP' teki negatif yüklü oksijen atomlarını stabilize etmektedir.  $K^+$  iyonu ise aktif merkezdeki treonin, serin, aspartik asit ve aspartat kalıntılarının koordinasyonu ve substrat stabilizasyonu için gereklidir<sup>(2,9,46)</sup>. Farklı aminoasit yan zincirleri için spesifik reaktiflerle yapılan geri dönüşümsüz inhibisyon deneyleri, enzim aktivitesinde arginin, lizin, histidin ve sistein rezidülerinin önemli rollerinin olduğunu göstermiştir<sup>(24,45)</sup>.

Piruvat kinazın farklı tipleri ile yapılan çalışmalar, substratların bağlanma sırası ve mekanizma detayları açısından, tek bir kinetik yolun olmadığını göstermiştir. 1961 yılında Reynard ve arkadaşları tavşan kası piruvat kinazı ile yaptıkları çalışmada, substratın enzime gelişi güzel bağlandığını göstermişlerdir. Ainworth ve Macfarlane ise bu sonuçları doğrulamışlardır. İnsan piruvat kinaz enziminde ise bağlanma sırasında olduğu ve önce PEP' in bağlandığını sonrada Mg-ATP' nin bağlandığını düşündürmüştür. Diğer yandan domuz karaciğer enzimde yapılan kinetik çalışmalarda, enzimin davranışı ping-pong şeklinde olan mekanizmayı desteklediği görülmüştür. Benzer varyasyonlar memeli olmayan kaynaklardaki piruvat kinazın kinetik davranışında da görülmektedir<sup>(2,3,47-49)</sup>.

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda ise piruvat kinaz enzimi mekanizmasının, iki basamaklı tepkime ile gerçekleştiğini; birinci basamakta PEP'ten fosforil grubunun transferi ve ATP ürününün oluşumu, ikinci basamakta ise keto formundaki piruvata proton aktarımı ile piruvatın oluştuğu rapor edilmiştir<sup>(2,9)</sup>.

## 2.2 TÜRÖR M2 TİPİ PİRUVAT KİNAZ

Tümör metabolizmasının en belirgin karakteristik özelliği yüksek glikolitik kapasite, yüksek fosfometabolit seviyesi ve glukoz karbonunun diğer biyosentezlere (nükleik asit, fosfolipid, aminoasit sentezi gibi) yönelmesidir. Bunun yanında (ATP+GTP) : (CTP+UTP) oranının düşük ve glutamin kapasitesinin yüksek olmasıdır (Şekil 4) <sup>(50, 51)</sup>.



Şekil 4: Normal ve tümörlü hücrede glikoliz metabolizması

Günümüze değin yapılan araştırmalarda, tümörlü hücrelerde metabolik değişikliğin kontrolünde M2 tipi piruvat kinazın rolü saptanmış olup hemen hemen tüm çoğalan hücrelerde fazla miktarlarda bulunduğu, özellikle tümörlü hücrelerde ise bu miktarın çok fazla arttığı gözlenmiştir<sup>(50,51)</sup>.

Karsinogenez süresince, piruvat kinazın dokuya özgün izoenzimlerinden M1-PK kas, L-PK karaciğer, R-PK eritrosit izoenzimlerinin ortadan kalktığı M2-PK' nin sentezinin arttığı bulunmuştur. Piruvat kinaz enziminin bütün izoformlarının aktif formlarının, eş tetramerik yapıda olduğu bilinmektedir. Fakat tümör hücrelerinde, piruvat kinazın M2 izoenzim yapısı bozulur ve ağır basan formu dimeriktir. Tümör hücrelerde her zaman M2-PK' nin, düşük aktiviteye sahip dimerik formu bulunmaktadır. M2-PK'nin dimerik formu bu nedenle Tümör M2-PK (Tu M2-PK) olarak adlandırılmaktadır.

Beyin tümörleri, retinoblastomalar, rhabdomyosarcomalar, medullar tiroid kanserleri karaciğer, meme kanserleri ve hepatomalar gibi neoplastik dokularda Tümör M2 tipi piruvat kinazın varlığı tespit edilmiş ve Tümör M2 tipi ile malignite arasında bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Tümör M2 izoenzimi karbonhidrat metabolizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır<sup>(21,52-54)</sup>. Vücut sıvılarında mevcut olan tümör M2-piruvat kinaz miktarı, tümör hücre dönüşümleri ve nekrozları ile tümör hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Tümör M2 tipi piruvat kinaz, M ve L izoenzimleri ile karşılaştırıldığında, farklı kinetik özellikler göstermektedirler<sup>(45, 50,55)</sup>.

M2-PK enzimi, substratı olan PEP'e karşı yüksek affinite gösteren aktif tetramerik yapıda ve PEP'e daha az affinite gösteren dimerik yapıda bulunabilmektedir. Dimerik formda olan M2-PK hücresel PEP derişiminde neredeyse inaktif durumdadır. M2-PK dimerik formda olduğunda glukoz karbonları nükleik asit, fosfolipid ve aminoasid sentezinde kullanımı artmaktadır (şekil 4). Ayrıca tümör hücreleri enerji ihtiyacını glikolize benzer bir yol olan, glutamin aminoasidin laktata dönüşümü sağlayan glutaminoliz ile gerçekleştirirler. Piruvat kinaz enziminin inhibe olması piruvat ürününün eksikliğine neden olmaktadır. Yüksek seviyedeki glikolitik fosfometaboliti olan FDP ve serin aminoasidi, enzimin dimerik yapıdan tetramerik yapıya dönüşmesini sağlamaktadır. Piruvat kinaz enzimi PEP'ten ADP (veya GDP)' ye bir fosfat grubu transfer edilmesini katalizleyerek piruvat ve ATP (veya GTP)' nin oluşmasını sağlar ve sonuçta glikolitik yolda, piruvat kinaz net enerji üretiminden

sorumlu duruma gelir. Sonuçta piruvat kinaz enzimi ATP:ADP (veya GTP:GDP) oranının adenilat kinaz ve 6-fosfofrukto kinaz ile birlikte AMP seviyesinde kontrol eder. AMP derişiminin artması, NAD (nicotinamide adenine dinucleotide), UTP(uridine triphosphate) ve CTP (cytidine triphosphate) sentezinin azalmasına bu da DNA sentezi ve hücre çoğalmasını inhibe eder. Bu mekanizma ile M2-PK hücrenin enerji-tüketme ve beslenme adaptasyonunu sağlamaktadır<sup>(50, 51)</sup>.

Tümör M2-PK yüksek FDP ve serin derişiminde yüksek aktiviteye sahip tetramerik yapıya dönmekte ve glukoz karbonları anabolik yol olan sentez yolundan, katabolik yol olan enerji yoluna dönüşmektedir. Diğer taraftan FDP ve serine karşılık alanin ve pirolin enzimin dimerik yapısının oluşmasını aktive etmektedir<sup>(51)</sup>.



**Şekil 5:** Tümör M2-PK'nın dimerik ve tetramerik yapıya dönüşümü

Anabolizma ve katabolizmanın düzenlenmesinde M2-PK'nın merkezi kontrolü pp60<sup>v-src</sup> kinaz ve HPV-16 (human papilloma virus type 16)'ı proteini olan E7 onkoproteinler tarafından sağlanmaktadır. pp60<sup>v-src</sup> kinaz tirozin kalıntısı üzerinden M2-PK'yı fosforlamakta, HPV-16 E7 proteini ise direk M2-PK'ya bağlanmaktadır. Her iki etkileşim M2-PK'nın dimerizasyonuna yol açarken yüksek FDP ve serin düzeyleri gerekli tetramerik formdaki M2-PK'yı oluşturmaktadır<sup>(50, 51)</sup>.

Hücre metabolizmasında piruvat kinaz enziminin temel rolünü araştırmak için yapılan çalışmalarda, piruvat kinaz enziminin farklı izoenzimleri için tetramerik ve dimerik monoklonal antikorlar üretilmiştir. Çeşitli tümörlerin immünohistolojik çalışmalarında, Tümör M2-PK'nın heterojen dağılım gösterdiği tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra onların metastazları M2-PK'nın yüksek miktarı ile karakterizedir.

İmmünohistolojik boyama sonuçlarıyla uyumlu olarak, böbrek, pankreas, akciğer, meme ve kolon kanserli hastaların EDTA-plazma örneklerinin Tümör M2-PK

düzeyleri, tümörlerin metastatik durumlarını direk yansıtmaktadır. Diğer taraftan Tümör M2-PK düzeyinin metastazın güçlü bir belirteci olmasına rağmen organa spesifik bir belirteç değildir. Tümör M2-PK'nın önerilen cut-off değeri 15 U/mL olup bu da malign olmayan hastalıklarla % 90 spesifite göstermektedir. Araştırmalar tümör dışında ağır inflamasyon ve çoklu travma gibi durumlarda da Tümör M2-PK miktarının arttığını göstermişlerdir. Bu Tümör M2-PK başlıca çoklu travmadan sonra PK seviyesi 20 kat artmış olan granülositlerden salınmaktadır. Tümör M2-PK plazma derişimi çeşitli tümörlerde tümör boyutunu ve büyüklüğü yansıtmakta ve tümör evrelemede iyi korelasyon göstermektedir<sup>(56,57)</sup>.

Ayrıca, metastatik olmayan tümörler için sensitivite uygun geleneksel organ spesifik belirteçler ile Tümör M2-PK'nın kombinasyonu ile daha da güçlendirilebilir. Bunlar kolon kanseri için CEA (Carcinoembriyonic antigen), pankreas kanseri için CA19-9, özafagus ve mide kanserlerinde CA 72-4, testis kanserinde HCG (Human Chorionic Gonadotropin) ve AFP (Alpha Fetoprotein), akciğer kanserinde CYFRA 21-1 veya NSE (Neuron-Spesifik Enolaz)'dur<sup>(51,58-60)</sup>. Silikolizli hastalarda akciğer kanserini tespit etmek için X-Ray kullanmak kısıtlı tanısal değer taşımaktadır. Şüpheli lezyonların pre-invaziv evredeki tanısı, malign ve benign hastalıklı ayırıcı tanısında tümör belirteçleri kullanılarak geliştirilebilir.

Bazı kemoterapatik ilaçları cipsplatin, cyclophosphamide ve vinblastine veya DNA'ya zarar veren radyasyon gibi tedavi teknikleri, glikolizi ve NAD seviyesini azaltmaktadır. DNA tamirinden sorumlu ve NAD kullanan PARP (poly-(ADP-riboz) polymerase) enzimini etkilemektedir. Azalan NAD seviyesi gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenaz enzimini inhibe etmekte ve FDP'nin seviyesini artırmaktadır. Normal hücre döngüsünde artmış FDP seviyesinde dimerik M2-PK formu tetramerik forma dönüşür. Tümör hücrelerinde ise tersi bir durum gerçekleşmektedir. Bundan dolayı normal hücre döngüsünde yeterli NTPs (nucleotide triphosphats) ile DNA tamiri yapılabilir ve hücreler yaşamını sürdürebilmektedir.

Tümör hücrelerinde M2-PK'nın tetramerizasyonu için artmış FDP seviyeleri yeterince yüksek değildir. Sonuçta tümör hücreleri DNA tamiri ve apoptozise giden hücreler için yeterince yüksek NTP oluşturmamaktadır. Tümör M2-PK miktarı böbrek kanserindeki nekroza uğramış bölgelerde artmış olduğu gösterilmiştir<sup>(50)</sup>. Bu nedenle, tümör hastaların EDTA plazma örneklerinden Tümör M2-PK'nın ölçümü tümör tedavi

süresince tümör hücrelerinin durumlarının direk izlenmesine olanak sağlamaktadır. Meme kanseri, metastatik böbrek kanseri ve akciğer kanserli hastalardaki çalışmalarda, Tümör M2-PK seviyeleri direk olarak tümör tedavi protokolünün başarılı veya başarısız uygulanmasını yansıttığı bildirilmektedir<sup>(56,60,61)</sup>.

Bundan dolayı Tümör M2-PK' nin EDTA plazma düzeyi tümör tedavi süresince klinisyenlerin kişisel uygulamalarında verimli bir gösterge olarak kabul edilmektedir. Ayrıca enzim düzeyi tümör tedavisinde her hasta için doz, süre ve tedavi seçiminde yol gösterici olarak kullanılmaktadır.

## 2.3 MEME KANSERİ

Genel anlamda kanser; hücrel döngü kontrolünün kaybolmasına bağlı olarak değişimine uğramış bir hücreden, birçok hücrenin meydana gelmesi olayıdır. Bu hücreler normalinden hızlı olarak bölünen hücrelere dönüşmüş olup kendilerini çevreleyen dokudan daha farklı morfolojik ve biyokimyasal özellikler göstermektedirler<sup>(45)</sup>.

Çeşitli organlarda gelişerek her yaştaki bireyleri etkileyen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir. Kanser vakaları içinde meme kanseri kadın sağlığını tehdit eden en önemli malign hastalık olup yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Meme kanseri dünyadaki en önemli üçüncü kanser türü olup kanser ölümlerinde ikinci sıradadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) her yıl 183 000 invaziv meme kanseri teşhis edilmekte ve her yıl yaklaşık 41 000 kadın bu nedenle yaşamını yitirmektedir. Ancak meme kanserinden dolayı ölüm oranları son yıllarda giderek azalmaktadır. Bu azalmanın nedenleri arasında erken tanı yöntemlerinin geniş insan popülasyonlarında etkin bir şekilde uygulanması ve sistemik tedavide elde edilen hedefe yönelik tedavi seçeneklerindeki başarılı sonuçlar sayılabilir<sup>(62- 65)</sup>.

Gerek gelişmiş gerekse gelişmekte olan ülkelerde en sık kadınlarda görülen kanser türü meme kanseridir. Kadınlarda kanserden ölüm nedenlerinin de başında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 1990 yılında yaptığı çalışmada, 796.000



yeni meme kanserli olgu ve 314.000 meme kanserinden ölüm tespit edilmiş ve yine WHO'ya bağlı International Agency on Cancer for Research'ün (IARC) 2002 yılındaki değerlendirmesinde; 1.152.000 yeni meme kanserli olgu ve 411.000 meme kanserinden ölüm olduğu kaydedilmiştir. Bu on iki yıllık süre içerisinde, meme kanserinin sıklık ve mortalite oranlarında %25'lik artış görülmektedir. Meme kanserli hastalarda tüm evrelere göre 5 yıllık sağ kalım oranları, gelişmiş ülkelerde %73 iken, gelişmekte olan ülkelerde %53 olarak bildirilmektedir. Aradaki bu önemli fark, gelişmiş olan ülkelerde tarama mamografisi sayesinde erken tanı ve daha iyi tedavi olanakları ile açıklanabilir. Meme kanseri mortalite oranı; gelişmiş olan ülkelerde %30 (190.000 ölüm / 636.000 olgu), az gelişmiş ülkelerde ise %43'dür(221.000 ölüm / 514.000 olgu).

Sekiz kadından birinde hayatının bir döneminde meme kanseri gelişmektedir. Tüm dünyada her 2 dakikada yeni bir meme kanseri teşhis edilmekte ve her 13 dakikada bir kadın meme kanserinden ölmektedir<sup>(66)</sup>. Bütün kadınlar aile hikayesi olmaksızın meme kanseri yönünden risk altındadırlar. Gerçekte meme kanserli hastaların %90'ında, bu hastalığın aile hikayesi yoktur. Yaşla ilişkisiz olarak, Amerikalı siyah kadınlar dünyada meme kanserine bağlı en yüksek mortalite oranına sahiptirler. Bir kadında yaşla ilişkili olarak meme kanseri gelişme şansı; 30 yaşında 2000 kadından birinde, 40 yaşında 233 kadından birinde, 50 yaşında 53 kadından birinde, 60 yaşında 22 kadından birinde, 70 yaşında 13 kadından birinde, 80 yaşında 9 kadından birinde olduğu ortaya konmuştur<sup>(67)</sup>. Bir kadının yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma olasılığı ise %13,1'dir. 2004 yılında ABD'de kadınlar arasındaki bütün yeni kanserlerin %32'sinden meme kanserinin sorumlu olacağı düşünülmektedir. Amerikan Kanser Cemiyeti 2003 yılında 211300 yeni meme kanseri teşhis edileceğini ve meme kanserinin kadınlardaki kansere bağlı ölümlerin %15'inden sorumlu olduğunu bildirmiştir. Meme kanserinin görülme oranı ortalama olarak yılda %1 artmaktadır. Meme kanserinin görülme oranında bu artışa rağmen yaşla ilişkili meme kanserine bağlı mortalite oranı daha erken tanı ve tedavideki gelişmelere bağlı olarak stabildir. Hiç doğum yapmayan, hiç çocuk emzirmeyen, erken yaşta adet görüp geç menapoza giren veya ailesinde meme kanseri bulunan bayanlar normalden daha fazla meme kanseri riski altındadır. Bu özelliklere sahip hastalar risk grubunu oluşturur<sup>(62-65,68)</sup>.

### 2.3.1. Türkiye’de Meme Kanseri

Ülkemizde meme kanseri, kadınlar arasında diğer kanser türlerine göre birinci sırada yer almaktadır. Son verilere göre Türkiye de meme kanseri oranı % 24.1 olarak belirlenmiştir<sup>(69)</sup>. Ülkemizde henüz düzenli bir meme kanseri kayıt programı olmadığından, kesin sıklığının belirlenmesi güçtür. Ancak mevcut verilere göre, doğu bölgelerimizde 20/100.000, batı bölgelerimizde ise 40-50/100.000 oranında bir sıklığın olduğu tahmin edilmektedir.

Dicle Üniversitesinde yapılan bir çalışmada, evre I, II meme kanseri oranı %21, evre II, IV meme kanseri oranı ise %79’dur. İstanbul Tıp Fakültesi Meme Ünitesi’ndeki verilere göre evre I, II meme kanseri oranı %83 olup, bu oran batı ülkelerindekine benzerdir. Antalya ve İzmir’de de erken evre meme kanseri oranı %50’den fazladır. Bu bölgesel farklılık, eğitim, ekonomik nedenler, muayene ve mamografi olanaklarının daha fazla olması, menapoz klinikleri ve halkın öncelikleri ile ilgili olabilir<sup>(69)</sup>.

Tümör hücrelerinin proliferasyon kapasitesini gösteren parametrelerin meme kanserinde prognostik öneme sahip olduğu öne sürülmektedir. Ancak bu konuda fikir birliği yoktur. Bunun nedeni kullanılan yöntemlerin standardizasyonun henüz tam olarak yerleşmemiş olmasıdır. Bu yüzden klinik pratikte rutin olarak kullanılabilir hale gelememişlerdir<sup>(62)</sup>.

Tümör hücrelerinin enzimoloji ile ilişkisi, tümör hücrede karbonhidrat, pürin ve pirimidin metabolizmasını düzenleyen enzimlerin aktivitelerinin değişikliğe uğramasından ileri gelmektedir<sup>(21,52,53)</sup>. Tümörlü hücrelerinin metabolizmasındaki gerekli enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin hızlı çalışması nedeniyle benign veya malign tümörlerde piruvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir<sup>(70)</sup>. Meme kanserli hastalarda tümörlü doku piruvat kinaz aktivitesi ile sağlıklı doku aktivitesine göre artış göstermesi, bu enzimin meme kanserinde belirteç olarak görev yapabileceğini düşündürmüştür<sup>(52,53,55)</sup>.

## 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

### 3.1. GEREÇLER

#### 3.1.1 Cihazlar :

- UV Spektrofotometre (Shimadzu UV60)
- Santrifuj (Sorvall RC 2-B, süperspeed soğutmalı)
- Santrifuj (Fisher - microcentrifuge model 235 B)
- BUZ makinası (Scotsman AF. 10)
- pH metre (BeckmanCentourSS-l)
- Elektrikli hassas terazi (Mettler H 31 AR)
- Homojenizator (Heidoiph 50110 R2RO)
- Otomatik pipet (Gilson p-20, p-200, p-1000)
- ELISA Kit
- ELISA cihazı (marka: Tecan Model: Minilyser)

#### 3.1.2. Kimyasal Maddeler:

- 3-(N-morfolino) propan sülfonikasit (MOPS)
- Potasyum klorür (KCl)
- $\beta$ -Merkaptoetanol (HSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH)
- Magnezyum klorür (MgCl<sub>2</sub>)
- Fruktoz-1,6-disfosfat (FDP)
- Adenozin difosfat (Sodyum tuzu) (ADP)
- Fosfoenolpiruvat (Trisodyum tuzu) (PEP)
- Nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)
- Laktat dehidrogenaz (LDH)
- Tris HCl tamponu (pH 7.5 )

- %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>
- %1 CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O
- %2 Na-K tartarat
- Folin-Ciocalteu ayıracı
- Standart sığır albumin çözeltisi (BSA %1)
- Deterjan ilaveli tuzlu fosfat tamponu (örnek/yıkama tamponu pH 7.2)
- Tümör M2-PK standartları
- POD- Streptavidin (peroksidaz)
- TMB (3,3',5,5'-tetra-metil benzidin)
- Stop Çözeltisi

### **3. 2. ÖRNEK SEÇİMİ VE TEMİNİ**

Çalışmamızda, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde Genel Cerrahi servisinde yatan ve daha önce Dahiliye-Onkoloji polikliniğinde meme kanseri tanısı konmuş yaş ortalaması  $48 \pm 8$  olan 92 hastadan, cerrahi işlem ile temin edilen normal, tümörlü doku ve aynı hastalardan EDTA' lı tüplere alınan venöz kan örnekleri kullanıldı. Tümörlü doku örnekleri tümörlü bölgeden alınırken, normal doku örnekleri ise cerrahi müdahale esnasında tümör bölgesinin dışında bir meme kısmından alındı. Ayrıca hiçbir tanı almamış 25 kişiden EDTA' lı tüplere alınan venöz kan örnekleri de plazma ölçümleri için kontrol grubu olarak kullanıldı.

### **3.3. ÇALIŞMA ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI**

#### **3.3.1. Kan Örnekleri**

EDTA' lı tüplere alınan venöz kan örneklerinin plazmaları 3000x g' de 5 dakika santrifuj edilerek ayrıldı. Elde edilen plazma örneklerinin protein miktarları Lowry yöntemi ile ölçüldü<sup>(71)</sup>. Plazma örneklerinin piruvat kinaz enzim aktiviteleri

ise 340 nm’de, NADH’ in azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan Beutler yöntemine göre spektrofotometrik ve ELISA kit yöntemi ile ölçüldü<sup>(72,73)</sup>.

### **3.3.2. Doku Örnekleri**

Normal ve tümörlü doku örnekleri deney süresince -85 °C ‘de saklandı. Tümörlü doku örnekler cerrahi olarak alındıktan sonra bir parçası patolojik inceleme için Patoloji Anabilim Dalı’ na gönderildi.

#### **3.3.2.1 Doku Homojenatının Hazırlanışı**

Normal ve tümörlü meme dokularının homojenatı, 1 mM EDTA, 2mM  $\beta$ -Merkaptoetanol, 50 mM KCl içeren Tris HCl (pH 7.5) tamponunda, 2200 devirde cam-teflon tip homojenizatörü ile hazırlandı. Elde edilen homojenat, +4 °C’ da 14000x g’ de 30 dakika süreyle santrifüj edilip süpernatanda protein miktarı Lowry yöntemi ile piruvat kinaz aktivitesi ise manuel olarak Beutler yöntemine göre spektrofotometrik olarak ölçüldü.

## **3.4. YÖNTEMLER**

### **3.4.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ÇÖZELTİLER VE HAZIRLANIŞI**

#### **3.4.1.1 Lowry Yöntemi ile Protein Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı**

##### **Ayıraç A ( %2 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>):**

2 gr Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 100 ml 0,1 N NaOH içerisinde çözülür.

##### **Ayıraç B (% 0,5 CuSO<sub>4</sub>):**

0,5 gr CuSO<sub>4</sub> 100 ml %1’lik sodyum sitrat içerisinde çözülür.

##### **Ayıraç C (Günlük Çözelti):**

50 ml Ayıraç A + 1 ml Ayıraç B karıştırılarak hazırlanır.

**Folin-Ciocalteu Ayıracı:**

2 L'lik bir balon jöjeye 100 g sodyum tunstat ( $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 25 g Sodyum molibdat ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 700 mL saf su, 50 mL % 85'lik  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 100 mL derişik HCl eklenerek 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Karışım soğuduktan sonra geri soğutucu çıkarılır. Karışıma 150 g  $\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 50 mL saf su, 10 damla  $\text{Br}_2$  çeker ocakta eklenir. Bu karışım 15 dakika,  $\text{Br}_2$  kokusu geçinceye kadar kaynatılır. Soğuduktan sonra karışımın hacmi 1 L'ye saf su ile tamalanarak süzülür. Süzülen ayıracın rengi altın sarısı olmalıdır. Bu ayıraç kahverengi şişede buzdolabında uzun süre saklanabilir. Deney yapılacağı zaman Folin-Ciocalteu ayıracı bire-bir oranında saf su ile sulandırılarak kullanılır.

**Stok Sığır Albumin Çözeltisi (600 µg/mL)**

% 1'lik sığır albumin çözeltisinden 3 mL alınarak 50 mL' ye redistile su ile tamamlanır.

**Standart Sığır Albumin Çözeltisi:**

Stok sığır albumin çözeltisinden derişimleri 100-500 µg/mL olacak şekilde değişik derişimlerde standart çözeltiler hazırlanır.

**3.4.1.2 Piruvat Kinaz Aktivitesinin Ölçümünde Kullanılan Çözeltiler ve Hazırlanışı****BIM ( Esas İnkübasyon Karışımı)**

Toplam 50 mL hacim içinde;

- 1.046 g 3-(N-morfolino) propan sulfonikasit (MOPS)(100 mM)(M..A: 209.3)
- 0.746 g Potasyum Klorür (KCl)(200 mM) (M.A. 76.56)
- 0.071 mL β-Merkaptoetanol (20 mM) (M.A. 78.13, d:1.12 kg/L)

çözülerek hazırlanan çözelti -20 °C' de dondurularak saklanır.

**Magnezyum Klorür ( $\text{MgCl}_2$  )(100 mM):**

0.4066 g (M.A. 203.3)  $\text{MgCl}_2$ , toplam hacim 20 mL olacak şekilde redistile suda çözülerek hazırlanır ve -20 °C' de dondurularak saklanır.

**Fruktoz-1,6-Difosfat (FDP)(20 mM):**

0.16244 g (M.A. 406.1) bir miktar redistile suda çözülüp hacim 20 mL'ye tamamlanıp, standart piruvat kinaz enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmak üzere. -20 °C'de dondurularak saklanır.

**Adenozin Difosfat (ADP)(20 mM):**

Molekül ağırlığı 427.2 olan 0.08544 g ADP bir miktar redistile suda çözülüp hacim 10 mL'ye tamamlanır ve standart piruvat kinaz enzim aktivitesi ölçümlerinde kullanılmak üzere -20°C'de dondurularak saklanır.

**Fosfoenol Piruvat (PEP )(40 mM Trisodyum tuzu):**

PEP' den (M.A. 234.0) 0.0468 g alınıp toplam hacim 5 mL olacak şekilde redistile suda çözülerek hazırlanan çözelti -20°C'de dondurularak saklanır.

**Nikotinamid Adenin Dinükleotid (NADH)( 3.6 mM):**

3 mg NADH (M.A. 833.4) 1 mL redistile suda çözülür. Çözelti günlük hazırlanır.

**Laktik Dehidrogenaz (LDH)(40 U/mL):**

Stok LDH' tan 12,5 µL alınıp toplam 2 mL redistile suda çözülerek hazırlanan çözelti +4°C'de 2-3 gün saklanır.

**Adenozin Trifosfat (ATP)(20 mM):**

Toplam 10 mL redistile su içinde 0.1102 g ATP (M.A. 551.0) çözülerek hazırlanan çözelti -20°C'de saklanır.

**Tris HCl Tamponu (pH 7.5):**

1 mM EDTA (0,0372 gr) saf suda çözülüp üzerine 2 mM β-Merkaptoetanol (14,2 µL), 50 mM KCl (0,3728 gr) ve 50 mM Tris HCl (0,7882 gr) eklenerek hacim 100 mL'ye tamamlanıp 0,1 N NaOH ile pH 7,5' a ayarlanır.

### 3.4.2. LOWRY YÖNTEMİ İLE PROTEİN ÖLÇÜMÜ

Proteinler alkali ortamda bakır sülfat eklenince fosfotungstik asit ile birleşerek mavi renkli kompleks oluştururlar. Protein miktarı 750 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülerek değerlendirildi <sup>(71)</sup>. Sonuçlar standart eğri kullanılarak değerlendirildi.

$$\text{Protein } (\mu\text{g/ml}) = \frac{\text{OD örnek} \times \text{standart derişimi}}{\text{OD standart}}$$

#### Standart Eğri Çizimi

600 µg/ml’lik stok standart kullanılarak 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml ve 500 µg/ml derişiminde standartlar hazırlanır ve Çizelge 1’deki işlemler yapılarak standart eğri çizilir.

Çizelge 1: Lowry yöntemiyle standart eğri çalışması

Tüp No	Kör	1	2	3	4	5
<b>Kullanılan BSA Derişimi (µg/ml)</b>	--	100	200	300	400	500
<b>Serum Fizyolojik (µl)</b>	350	--	--	--	--	--
<b>Standart sığır albumin çözeltisi (µl)</b>	--	350	350	350	350	350
<b>Ayıraç C (mL)</b>	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
10 dakika oda sıcaklığında bekletilir						
<b>Folin-Ciocalteu Ayıracağı (µl)</b>	350	350	350	350	350	350
30 dakika oda sıcaklığında bekletilir						



Daha sonra her bir tüpte oluşan rengin absorbansı 750 nm dalga boyunda okunarak elde edilen verilerden standart grafiği çizilir (Şekil 6).

### Örnek çalışması

Lowry yöntemi ile örneklerin protein ölçümünde Çizelge 2' deki aşamalar takip edilerek yapılır.

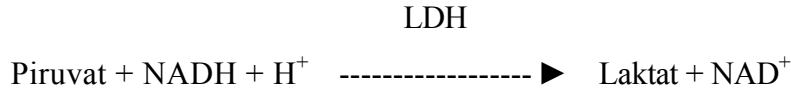
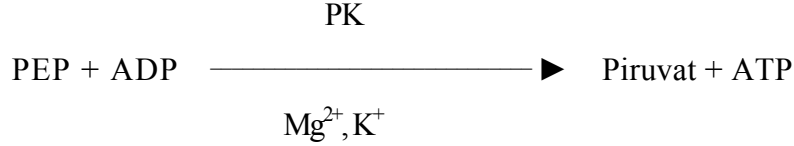
**Çizelge 2** : Lowry yöntemiyle protein tayini

<b>Tüp</b>	<b>Kör</b>	<b>Örnek</b>
<b>Serum Fizyolojik (µl)</b>	300	--
<b>Örnek (µl)</b>	--	300
<b>Ayıraç C (mL)</b>	3,0	3,0
10 dakika oda sıcaklığında bekletilir		
<b>Folin-Ciocalteu Ayıracı (µl)</b>	300	300
30 dakika oda sıcaklığında bekletilir		

Protein miktarı spektrofotometrede 750 nm dalga boyunda okunup standart eğriden değerlendirilir.

### 3.4.3. PİRUVAT KİNAZ AKTİVİTE ÖLÇÜMÜ

Enzim aktivitesinin tayininde, Beutler' in Laktat Dehidrogenaz kenetlenmiş spektrofotometrik yöntemi kullanılır. Prensip olarak deneyde piruvat kinaz tepkimesi, NADH' ın NAD' ye okside olduğu LDH tepkimesi ile birleştirildi.



PEP, piruvat kinaz enzimi varlığında piruvata dönüşür. Oluşan piruvat, LDH katalizi ile NADH varlığında laktata indirgenir. Böylece NADH, NAD' ye yükseltgenmesi piruvat kinaz enzim aktivitesiyle doğru orantılı olarak, 340 nm dalga boyunda absorbans düşüşü olarak izlenir. Tepkime 37 °C' de ışık yolu 1 cm olan kuvarz küvetlerde gerçekleştirilir. Hesaplamalar, absorbans düşüşünün 5 dakika boyunca doğrusal olduğu zaman aralığında optik dansiteler dikkate alınarak yapılır.

#### **Deneyin Yapılışı ;**

Çizelge 3' deki stok çözeltilerden, belirtilen miktarlarda koyularak inkübasyon karışımı hazırlanır. Kuvarz küvete koyulan 37 °C' deki bu karışıma enzim (15 µL örnek) ilavesiyle başlatılan tepkimenin 340 nm dalga boyundaki absorbans düşüşü 5 dakika boyunca izlenir. Toplam hacmi 600 µL' dir.. Aktivite zamana göre değişim eğrisinin doğrusal kısmından hesaplanır ve spesifik enzim aktivitesi EU/gr protein cinsinden verilir (EU/gr protein = µmol substrat/ dak./gr protein).

**Çizelge 3:** Piruvat kinaz aktivite ölçümü

Stok Çözeltiler		Kullanılan Miktar (µL)	Final Derişim
BIM pH=7.5	MOPS (100 mM) KCl (200 mM) β-Merkaptoetanol (20 mM)	300	50 mM 100 mM 10 mM
	MgCl <sub>2</sub> (100 mM)	60	10 mM
	NADH (3.6 mM)	30	0,18 mM
	LDH (24 IU)	60	2.4 mM
	FBP (20 mM)	15	0.5 mM
	ADP (20 mM)	60	2 mM
	PEP (40 mM)	60	4 mM
	Örnek	15	

Piruvat kinaz enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$A = \epsilon \times C \times L$$

A: Absorbans

$\epsilon$  : 6.22 (1 mM NADH içeren çözeltinin 340 nm dalga boyunda vermiş olduğu absorbans)

C : Derişim (Piruvat kinaz enzim aktivitesi)

L : Işık yolu (1 cm)

Enzim aktivitesi (C);

$$C = \frac{(\Delta A / 6.22) \times 40^*}{\text{gr protein}} = \dots \text{ EU / gr protein}^{**}$$

bağıntısı ile bulunur.

\* Sulandırma oranı (İnkübasyon hacmi / örnek hacmi)

\*\* EU / gr protein = µmol substrat/ dak./gr protein

#### 3.4.4. ELISA KİT ÇALIŞMASI

ScheBo Biotech firması tarafından EDTA-plazma' da Tümör M2-PK' nın kantitatif ölçümünde ELISA yöntemi kullanıldı. Yöntemin prensibinde Tümör M2-PK' ya özgün ve piruvat kinaz enziminin diğer (L, R, M1 ve M2 tipi) formlarına özgün olmayan iki monoklonal antikorun antijen ile ilişkisine dayanmaktadır.

ELISA kit kuyularında bulunan monoklonal antikor EDTA-plazma örnekleri, standartlardaki Tümör M2-PK' yı bağlamakta ve hareketsiz olmalarını sağlamaktadır. İkinci biotinlenmiş monoklonal antikor ise diğer inkübasyonda Tümör M2-PK' ya bağlanmakta ve sonraki basamakta yarım bağlanmış biotin ile peroksidaz (POD)-Streptavidin konjugasyonu gerçekleşmektedir. Bu peroksidaz TMB (3,3', 5,5'-tetrametil benzidin)' i oksitler ve renk sarıya döner. Sonuçta oksitlenmiş TMB derişimi fotometrik olarak ölçülür. Ölçülen bu değer Tümör M2-PK düzeyi ile doğru orantılıdır.

#### **Kullanılan Kimyasal Maddeler**

- Tuzlu fosfat tamponu (pH 7.2) (simple/washing buffer)
- Tümör M2-PK standartları (sodyum azid ile hazırlanmış 5, 15, 40, 100 U/mL'lık standartlar)
- Kontrol (Tümör M2-PK değeri 20 U/mL olarak sodyum azid ile ayarlanmış )
- Anti Tümör M2-PK (konjugasyonu sağlayan biotinli ikinci monoklonal antikor)
- POD-Streptavidin
- TMB
- Stop solüsyonu

ELISA kit çalışmasında kullanılan kimyasallar 4-8 °C'de son kullanma tarihine kadar saklanabilir. EDTA-plazma örnekleri ise 4 °C' de 3-4 gün, - 20 °C' de ise 2 yıla kadar saklanabilmektedir. Kimyasallardan 100 mL tuzlu fosfat tamponu üzerine 400 mL redistile su ilave edilir. Ayrıca EDTA-plazma örnekleri ve Anti Tümör M2-PK 1:100 oranında tuzlu fosfat tamponu ile seyreltilir. Diğer kimyasallar kullanıma hazır şekildedir.

### Deneyin yapılışı:

Çalışmada kör olarak seyreltilmiş tuzlu fosfat tamponu kullanılır. Standartlar ise;

Standart 1: 5 U/mL

Standart 2: 15 U/mL

Standart 3: 40 U/mL

Standart 4: 100 U/mL

olarak dört standart kullanılır. Bütün yıkama işlemleri seyreltilmiş tuzlu fosfat tamponu ile yapılır. Kit tabağındaki kuyulara Çizelge 4'deki gibi kör, standartlar, kontrol ve örneklerden 50 µL konulur.

**Çizelge 4:** ELISA Kit Çalışması

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Kör	S3	S11	S19	S27	S35	S43	S51	S59	S67	S75	S83
B	Std 1	S4	S12	S20	S28	S36	S44	S52	S60	S68	S76	S84
C	Std 2	S5	S13	S21	S29	S37	S45	S53	S61	S69	S77	S85
D	Std 3	S6	S14	S22	S30	S38	S46	S54	S62	S70	S78	S86
E	Std 4	S7	S15	S23	S31	S39	S47	S55	S63	S71	S79	S87
F	Kontrol	S8	S16	S24	S32	S40	S48	S56	S64	S72	S80	S88
G	S1	S9	S17	S25	S33	S41	S49	S57	S65	S73	S81	S89
H	S2	S10	S18	S26	S34	S42	S50	S58	S66	S74	S82	S90

S : Örnek Std : Standart

Bu işlem yapıldıktan sonra aşağıdaki basamaklar takip edilir.

- Oda sıcaklığında 60 dakika beklenir
- Süre bitiminde üç defa yıkama yapılır
- 50 µL Anti Tümör M2-PK ilave edilir
- 30 dakika oda koşullarında beklenir ve üç defa yıkanır
- 50 µL POD-Streptavidin (kullanıma hazır) ilave edilir
- 30 dakika oda koşullarında karanlıkta beklenir ve üç defa yıkanır

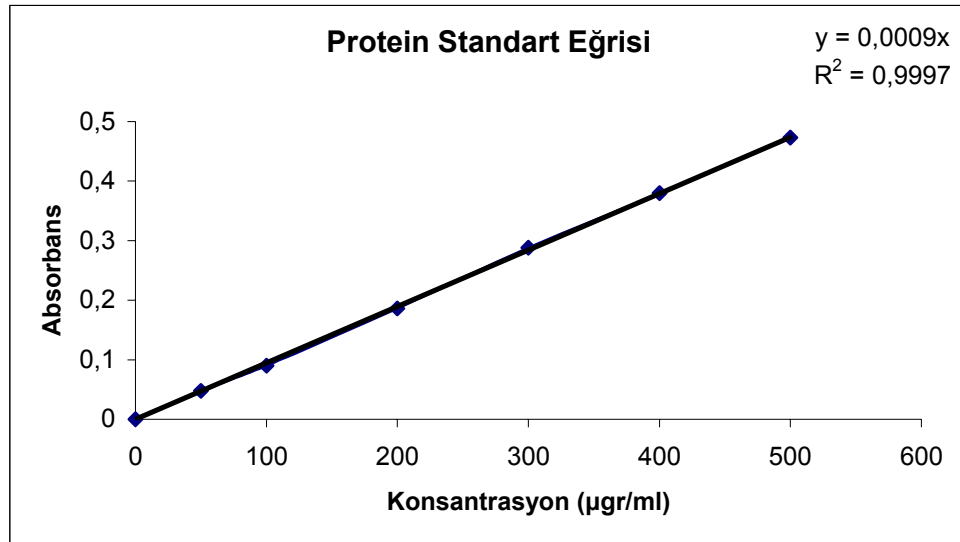
- 100 µL substrat solüsyonu (kullanıma hazır) ilave edilir
- 15 dakika oda koşullarında karanlıkta beklenir
- 100 µL stop solüsyonu (kullanıma hazır) ilave edilir
- Stop solüsyonu koyulduktan 5 dakika sonra spektrometrik 450 nm absorbansta okunur.

Bu kit çalışmasında Tümör M2-PK'in kantitatif değeri ölçülür. Tümör M2-PK için kit çalışmasında referans değeri  $\leq 15$  U/mL 'dir.

## 4. BULGULAR

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesinde Genel Cerrahi servisinde yatan ve daha önce Dahiliye-Onkoloji polikliniğinde meme kanseri tanısı konmuş yaş ortalaması  $48 \pm 8$  olan 92 hastadan, cerrahi işlem ile temin edilen normal, tümörlü doku ve aynı hastalardan EDTA' lı tüplere alınan venöz kan örneklerinde enzim aktivitesi çalışıldı. Diğer taraftan hiçbir hastalık tanısı konmamış 25 olgudan EDTA' lı tüplere alınan venöz kan örnekleri ise kontrol grubu olarak çalışıldı. Plazma ve doku örneklerine ait protein ölçümü Lowry yöntemi ile, piruvat kinaz enziminin spesifik aktivite ölçümü ise Beutler yöntemi ve ELISA kit yöntemi ile çalışıldı. İstatistik çalışmalarında ise student T testi kullanıldı.

Plazma örneklerinin ve dokuların homojenatlarının protein miktarı Lowry yöntemi ile çalışıldı. Protein miktarları standart eğriden hesaplandı (Şekil 6). Ölçülen protein miktarları spesifik aktivitelerin hesabında kullanıldı.



Şekil 6: Lowry Yöntemi ile Protein Standart Eğrisi

Plazmanın, piruvat kinaz enzim aktiviteleri 340 nm' de NADH' in azalan absorbans spektrofotometrede ölçülerek saptandı. Tablo 11' de kontrol grubuna ait 25 olgunun spesifik enzim aktivitesi ve Tablo 12' de hasta grubuna ait toplam 92 olgunun piruvat kinaz spesifik aktivitesi ve olguların patolojik bulguları verildi.

**Tablo 11:** Kontrol grubuna ait plazma protein miktarı ve piruvat kinaz enziminin aktivitesi

<b>Kontrol No</b>	<b>Protein (gr/mL)</b>	<b>Spesifik Aktivite (U/gr protein)</b>
1	0,068	1,45
2	0,065	1,26
3	0,076	0,66
4	0,071	4,07
5	0,068	3,61
6	0,063	3,28
7	0,083	1,99
8	0,080	1,64
9	0,070	1,20
10	0,062	2,39
11	0,066	2,36
12	0,057	2,01
13	0,073	4,11
14	0,062	3,52
15	0,059	3,63
16	0,048	3,56
17	0,065	1,40
18	0,073	0,98
19	0,037	0,52
20	0,071	0,52
21	0,061	2,71
22	0,066	2,01
23	0,060	1,12
24	0,064	1,19
25	0,079	3,53



**Tablo 12:** Hasta grubunun patolojik bulguları ve plazma spesifik piruvat kinaz enzim aktivitesi

Hasta No	Yaş	Hasta Doku Tipi	Evre	Protein (gr/ ml)	Spesifik Aktivite (U/gr protein)
1	47	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,066	1,03
2	52	Lobüler Karsinom	2B	0,065	4,77
3	52	Lobüler Karsinom	2A	0,068	4,89
4	49	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,063	1,78
5	58	Fibroz Değişiklik		0,069	9,57
6	61	Fibroz Değişiklik		0,075	4,22
7	38	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,070	5,20
8	40	Fibroz Değişiklik		0,075	1,55
9	44	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,069	2,06
10	52	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,067	2,01
11	55	Lobüler Karsinom	2B	0,056	3,40
12	36	Fibroz Değişiklik		0,064	13,04
13	38	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,071	4,44
14	31	Fibroz Değişiklik		0,042	5,89
15	50	Fibroz Değişiklik		0,057	2,64
16	57	Fibroz Değişiklik		0,078	7,08
17	63	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,057	2,12
18	39	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,074	1,77
19	35	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,076	2,52
20	47	Lobüler Karsinom	3B	0,089	1,68
21	49	Fibroz Değişiklik		0,066	4,37
22	54	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,084	2,79
23	52	Fibroz Değişiklik		0,071	6,09
24	46	Fibroz Değişiklik		0,086	1,75
25	44	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,106	2,40
26	55	Fibroz Değişiklik		0,085	2,95
27	65	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,053	4,97
28	37	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,061	7,44
29	35	Fibroz Değişiklik		0,079	10,25
30	56	Fibroz Değişiklik		0,083	4,90
31	55	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,063	6,43
32	41	Fibroz Değişiklik		0,060	4,92
33	48	Fibroz Değişiklik		0,067	6,05
34	54	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,080	4,14
35	61	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,060	2,22
36	59	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,059	7,25
37	44	Lobüler Karsinom	2B	0,072	5,69
38	48	Fibroz Değişiklik		0,065	1,61
39	52	Fibroz Değişiklik		0,068	2,04
40	37	Fibroz Değişiklik		0,065	1,88
41	34	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,068	6,40
42	44	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,042	6,50
43	48	Lobüler Karsinom	3A	0,068	7,10
44	45	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,075	5,88
45	58	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,054	3,55

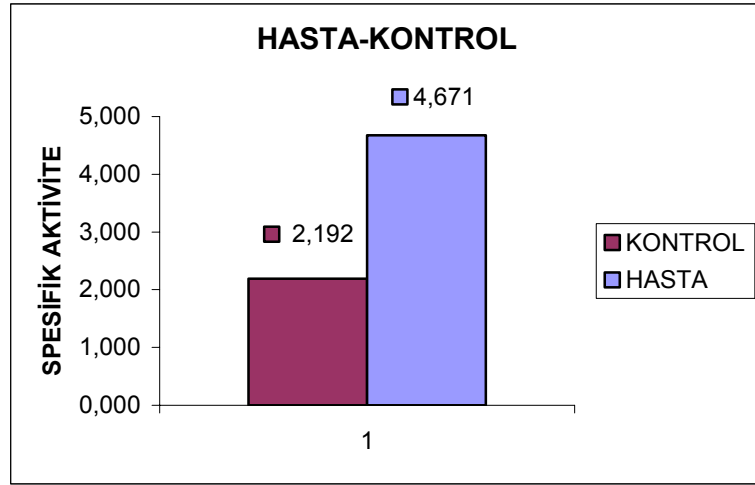
Hasta No	Yaş	Hasta Doku Tipi	Evre	Protein (gr/ ml)	Spesifik Aktivite (U/gr protein)
46	62	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,067	0,95
47	63	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,055	9,55
48	55	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,070	3,62
49	45	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,071	3,88
50	48	Lobüler Karsinom	2B	0,074	7,47
51	47	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,055	4,22
52	51	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,066	5,92
53	52	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,083	4,77
54	49	Fibroz Değişiklik		0,072	2,47
55	48	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,075	3,73
56	42	Fibroz Değişiklik		0,076	6,10
57	39	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,071	11,15
58	51	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,065	4,16
59	50	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,045	2,73
60	55	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,042	3,33
61	53	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,016	2,85
62	60	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,057	4,53
63	48	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,072	3,76
64	38	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,042	1,23
65	41	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,077	4,05
66	43	Fibroz Değişiklik		0,072	10,91
67	34	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,044	2,19
68	45	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,079	1,34
69	65	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,067	1,20
70	41	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,064	5,02
71	43	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,075	9,53
72	42	Fibroz Değişiklik		0,081	2,03
73	44	Fibroz Değişiklik		0,069	5,12
74	45	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,048	6,63
75	31	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,073	0,74
76	34	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,067	1,95
77	39	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,062	3,32
78	48	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,060	15,28
79	45	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,066	1,24
80	55	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,041	8,38
81	52	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,051	8,70
82	45	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,056	0,78
83	44	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,046	1,46
84	33	Fibroz Değişiklik		0,061	3,61
85	57	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	0,060	2,98
86	48	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,065	4,28
87	61	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	0,038	1,64
88	56	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,057	2,17
89	55	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	0,056	1,02
90	57	Lobüler Karsinom	2B	0,060	1,11
91	58	İnvaziv Duktal Karsinom	1	0,065	8,87
92	55	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	0,074	7,52

Hasta ve kontrol grubuna ait plazma örneklerinin Beutler Yöntemi ile ölçülen piruvat kinaz spesifik aktivitesinin istatistik sonuçları Tablo 13 ve Şekil 7’ de gösterildi.

**Tablo 13:** Hasta ve kontrol grubuna ait plazma piruvat kinaz spesifik aktivitesinin istatistik sonuçları

	Plazma Spesifik Aktivite (Beutler Yöntemi)	
	Hasta	Kontrol
<b>N (kişi sayısı)</b>	92	25
<b>Ortalama</b>	4,67	2,19
<b>Standart Sapma</b>	3,22	1,17
<b>p*</b>	<b>0,000</b>	

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 7:** Hasta ve Kontrol grubunun plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması

Değişik doku tipine sahip hastalara ait plazma örneklerinin Beutler yöntemi ile ölçülen piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları Tablo 14.a’ da ve Tablo 14.b’ de ise p değerleri verildi. Kontrol grubunun ve hastaların değişik doku tiplerine ait piruvat kinaz spesifik aktivite ortalamalarının grafiği ise Şekil 8’ de gösterildi.

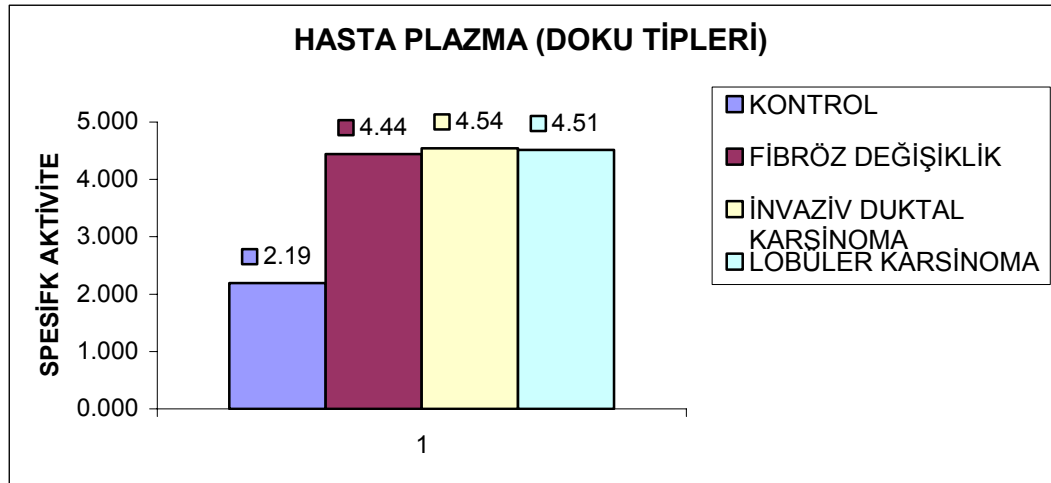
**Tablo 14.a:** Hastalara ait değişik doku tiplerinin ve kontrol grubunun plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları

Doku Tipi	N	Ortalama	Standart Sapma
Fibröz Değişiklik	24	4,44	2,56
İnvaziv Duktal Karsinom	60	4,54	3,85
Lobüler Karsinom	8	4,51	2,32
Kontrol	25	2,19	1,17

**Tablo 14.b:** Kontrol grubu ve değişik doku tiplerinin istatistiksel karşılaştırılması

p*	Kontrol	İnvaziv Duktal Karsinom	Lobüler Karsinom
Kontrol	1,000	-	-
İnvaziv Duktal Karsinom	0,000	1,000	-
Lobüler Karsinom	0,026	0,973	1,000
Fibröz Değişiklik	0,000	0,857	0,899

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 8:** Hasta değişik doku tiplerinin ve kontrol grubunun plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması

Değişik doku tiplerinden invaziv duktal karsinom olan hastaların evrelerinin, plazma piruvat kinaz spesifik aktivitesinin istatistik sonuçları Tablo 15.a' da ve evrelerin birbirleriyle karşılaştırılması Tablo 15.b' de verildi. Evrelerin spesifik aktivite ortalamalarının grafiği Şekil 9' da gösterildi.

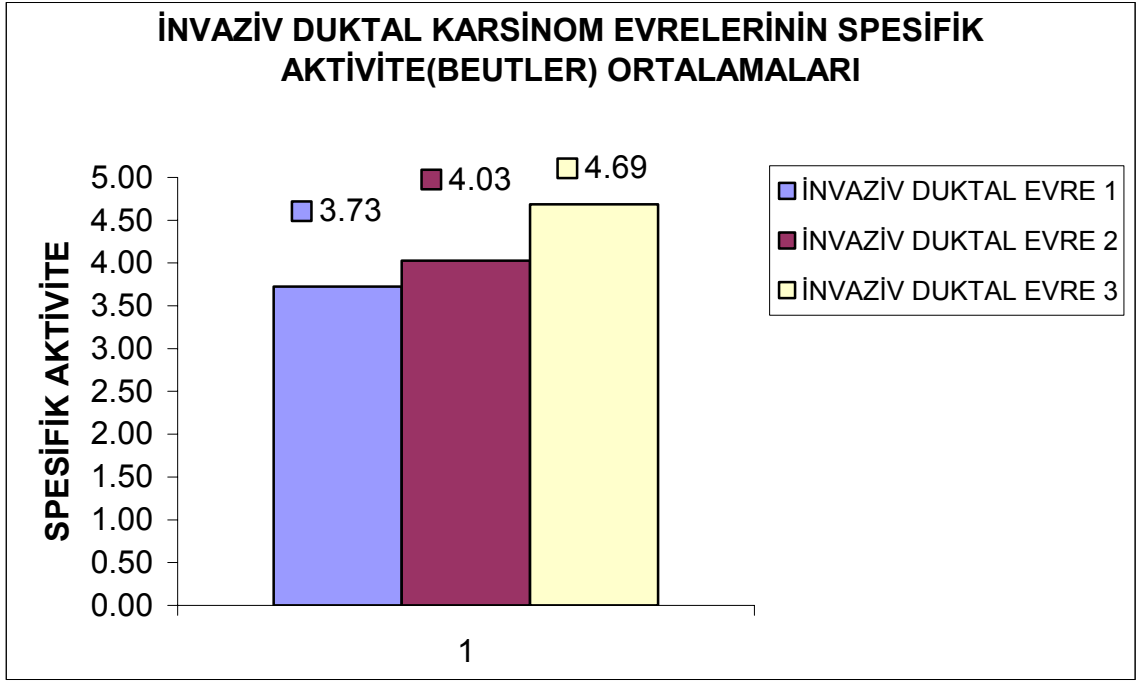
**Tablo 15.a:** İnvaziv Duktal Karsinom evrelerinin plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları

İnvaziv Duktal Karsinom			
	N	Ortalama	Standart Sapma
EVRE 1	9	3,73	2,26
EVRE 2	30	4,03	2,58
EVRE 3	21	4,69	3,66

**Tablo 15.b:** İnvaziv Duktal Karsinom evrelerinin istatistiksel karşılaştırılması

p* (İnvaziv Duktal Karsinom)	EVRE 1	EVRE 2
EVRE 1	1,000	-
EVRE 2	0,528	1,000
EVRE 3	0,244	0,419

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



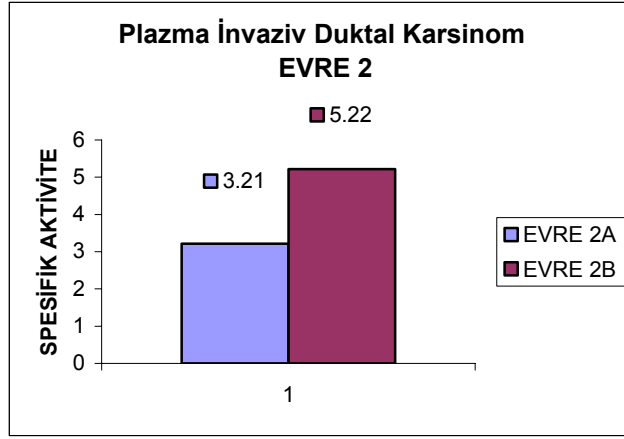
**Şekil 9:** İnvaziv duktal karsinom evrelerinin plazma piruvat kinaz spesifik aktivite (Beutler) ortalaması

EVRE 2 ve EVRE 3’ deki invaziv duktal karsinomlu hastaların evrelerinin kendi içindeki plazma spesifik aktivite düzeylerinin istatistik karşılaştırılması Tablo 16’ da ve Tablo 17’ de verildi. Ayrıca evrelerin spesifik aktivite ortalamalarının grafikleri Şekil 10 ve Şekil 11’ de gösterildi.

**Tablo 16:** İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 2 (Beutler) plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalamalarının istatistik sonuçları

İnvaziv Duktal Karsinom EVRE 2			
	N	Ortalama	Standart Sapma
EVRE 2A	20	3,21	2,11
EVRE 2B	10	5,22	2,53
<b>p*</b>	<b>0,045</b>		

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$

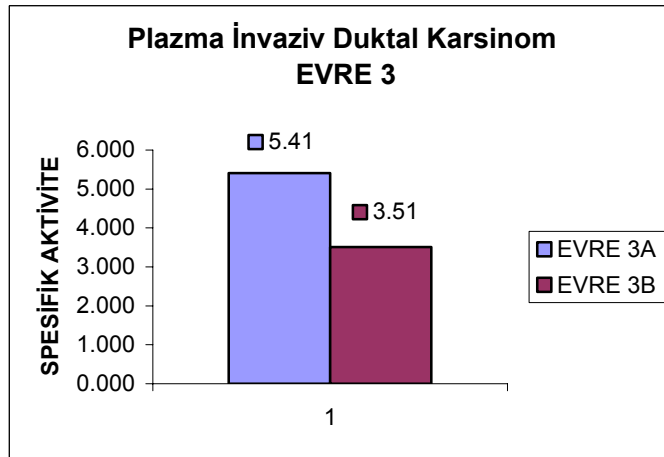


**Şekil 10:** İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 2' deki hastaların plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması

**Tablo 17:** İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 3' deki hastaların plazma piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları

İnvaziv Duktal Karsinom EVRE 3			
	N	Ortalama	Standart Sapma
EVRE 3A	13	5,41	3,151
EVRE 3B	8	3,51	2,269
<b>p*</b>	<b>0,219</b>		

\*önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 11:** İnvaziv Duktal Karsinomlu EVRE 3' deki hastaların plazma piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması

Dokuların Lowry ile protein ölçümü, ardından Beutler yöntemi ile piruvat kinaz enziminin spesifik aktivitesi çalışıldı. Normal ve tümörlü dokuların, değişik doku tipleri ve patolojik verileri Tablo 18’de özetlendi. Çalışmamızda 92 hastanın normal ve tümörlü dokuları çalışıldı.

**Tablo 18:** Hastaların normal ve tümörlü doku örneklerinin piruvat kinaz spesifik aktivitesi

Hasta No	Değişik Doku Tipi	Normal Doku		Tümörlü Doku	
		Protein (gr/mL)	Spesifik Akt. (U/gr protein)	Protein (gr/mL)	Spesifik Akt. (U/gr protein)
1	İnvaziv Duktal Karsinom	71,2	0,15	43,5	0,61
2	Lobüler Karsinom	46,0	0,16	68,9	0,31
3	Lobüler Karsinom	64,1	0,12	49,9	0,30
4	İnvaziv Duktal Karsinom	93,5	0,07	111,8	0,12
5	Fibroz Değişiklik	96,5	0,18	55,7	0,56
6	Fibroz Değişiklik	89,5	0,07	49,6	0,51
7	İnvaziv Duktal Karsinom	26,4	0,18	31,3	0,28
8	Fibroz Değişiklik	146,4	0,07	133,2	0,25
9	İnvaziv Duktal Karsinom	52,6	0,11	62,6	0,40
10	İnvaziv Duktal Karsinom	45,6	0,15	71,8	0,21
11	Lobüler Karsinom	122,2	0,18	144,0	0,03
12	Fibroz Değişiklik	52,3	0,13	49,3	0,37
13	İnvaziv Duktal Karsinom	88,9	0,19	56,9	0,03
14	Fibroz Değişiklik	59,2	0,10	45,2	0,11
15	Fibroz Değişiklik	135,0	0,19	131,5	0,17
16	Fibroz Değişiklik	72,6	0,10	76,3	0,29
17	İnvaziv Duktal Karsinom	72,6	0,13	45,6	0,55
18	İnvaziv Duktal Karsinom	49,6	0,13	36,8	0,45
19	İnvaziv Duktal Karsinom	49,6	0,18	64,7	0,34
20	Lobüler Karsinom	43,7	0,21	69,9	0,32
21	Fibroz Değişiklik	111,9	0,11	69,6	0,38
22	İnvaziv Duktal Karsinom	90,5	0,07	59,8	0,41
23	Fibroz Değişiklik	96,4	0,08	85,6	0,34
24	Fibroz Değişiklik	58,0	0,15	63,2	0,14
25	İnvaziv Duktal Karsinom	61,8	0,18	47,6	0,46
26	Fibroz Değişiklik	92,3	0,10	89,7	0,28
27	İnvaziv Duktal Karsinom	38,6	0,24	39,7	0,78
28	İnvaziv Duktal Karsinom	33,0	0,20	40,3	0,87
29	Fibroz Değişiklik	105,1	0,10	82,0	0,42
30	Fibroz Değişiklik	58,2	0,13	78,9	0,17
31	İnvaziv Duktal Karsinom	119,2	0,09	79,3	0,32
32	Fibroz Değişiklik	58,8	0,11	65,5	0,63
33	Fibroz Değişiklik	85,6	0,12	120,2	0,26
34	İnvaziv Duktal Karsinom	82,3	0,19	52,1	0,65
35	İnvaziv Duktal Karsinom	72,3	0,12	44,8	0,55
36	İnvaziv Duktal Karsinom	92,8	0,19	42,1	0,82
37	Lobüler Karsinom	53,5	0,19	39,3	0,98
38	Fibroz Değişiklik	58,6	0,13	83,7	0,16



Hasta No	Değişik Doku Tipi	Normal Doku		Tümörlü Doku	
		Protein	Spesifik Akt.	Protein	Spesifik Akt.
		(gr/mL)	(U/gr protein)	(gr/mL)	(U/gr protein)
39	Fibroz Değişiklik	48,0	0,17	149,3	0,22
40	Fibroz Değişiklik	47,2	0,26	49,6	0,26
41	İnvaziv Duktal Karsinom	72,6	0,16	61,4	0,11
42	İnvaziv Duktal Karsinom	59,4	0,24	84,6	0,21
43	Lobüler Karsinom	64,6	0,20	48,4	0,76
44	İnvaziv Duktal Karsinom	55,2	0,16	45,3	0,77
45	İnvaziv Duktal Karsinom	88,5	0,12	60,2	0,56
46	İnvaziv Duktal Karsinom	59,6	0,18	77,6	0,26
47	İnvaziv Duktal Karsinom	48,0	0,33	39,6	1,04
48	İnvaziv Duktal Karsinom	78,9	0,18	32,1	0,54
49	İnvaziv Duktal Karsinom	68,9	0,17	37,4	0,41
50	Lobüler Karsinom	39,3	0,24	39,0	0,85
51	İnvaziv Duktal Karsinom	56,7	0,15	59,8	0,13
52	İnvaziv Duktal Karsinom	43,7	0,13	89,3	0,20
53	İnvaziv Duktal Karsinom	45,2	0,27	42,3	0,74
54	Fibroz Değişiklik	80,5	0,16	68,9	0,32
55	İnvaziv Duktal Karsinom	45,2	0,20	47,4	0,48
56	Fibroz Değişiklik	64,1	0,10	47,8	0,08
57	İnvaziv Duktal Karsinom	47,4	0,11	32,6	0,77
58	İnvaziv Duktal Karsinom	80,9	0,31	50,7	0,69
59	İnvaziv Duktal Karsinom	47,4	0,05	95,6	0,12
60	İnvaziv Duktal Karsinom	92,7	0,12	57,0	0,38
61	İnvaziv Duktal Karsinom	116,9	0,04	145,2	0,17
62	İnvaziv Duktal Karsinom	174,9	0,06	113,3	0,35
63	İnvaziv Duktal Karsinom	55,7	0,27	54,7	0,46
64	İnvaziv Duktal Karsinom	41,1	0,16	69,8	0,24
65	İnvaziv Duktal Karsinom	123,0	0,06	57,6	0,36
66	Fibroz Değişiklik	105,4	0,13	48,5	1,07
67	İnvaziv Duktal Karsinom	48,6	0,30	113,7	0,33
68	İnvaziv Duktal Karsinom	54,5	0,17	85,0	0,19
69	İnvaziv Duktal Karsinom	44,5	0,27	43,1	0,29
70	İnvaziv Duktal Karsinom	76,3	0,22	36,7	0,79
71	İnvaziv Duktal Karsinom	41,5	0,24	45,7	1,13
72	Fibroz Değişiklik	85,6	0,17	69,8	0,19
73	Fibroz Değişiklik	84,6	0,18	58,6	0,37
74	İnvaziv Duktal Karsinom	89,6	0,20	56,1	0,73
75	İnvaziv Duktal Karsinom	173,1	0,10	199,3	0,09
76	İnvaziv Duktal Karsinom	76,4	0,13	115,9	0,19
77	İnvaziv Duktal Karsinom	64,9	0,21	101,5	0,37
78	İnvaziv Duktal Karsinom	44,9	0,17	43,4	0,76
79	İnvaziv Duktal Karsinom	98,4	0,06	65,1	0,05
80	İnvaziv Duktal Karsinom	47,0	0,10	58,4	0,44
81	İnvaziv Duktal Karsinom	95,1	0,15	96,5	0,31
82	İnvaziv Duktal Karsinom	75,3	0,16	105,8	0,16
83	İnvaziv Duktal Karsinom	61,3	0,21	45,9	0,36
84	Fibroz Değişiklik	63,5	0,15	49,9	0,39

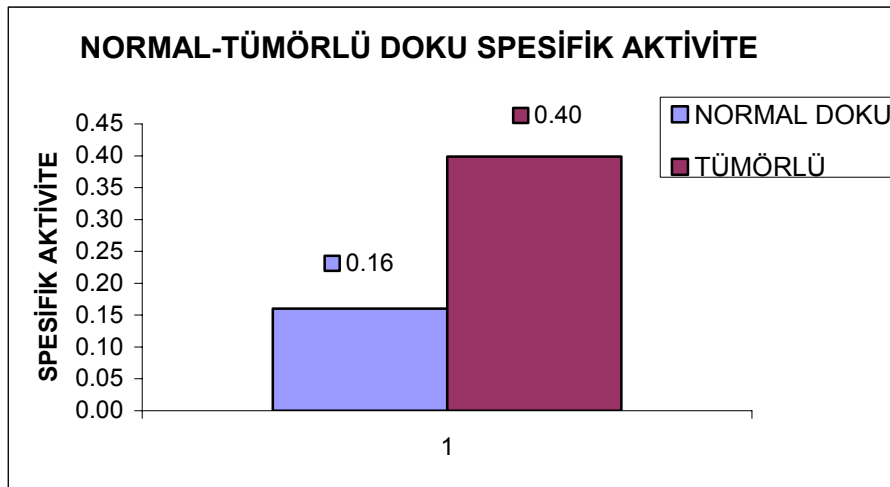
Hasta No	Değişik Doku Tipi	Normal Doku		Tümörlü Doku	
		Protein (gr/mL)	Spesifik Akt. (U/gr protein)	Protein (gr/mL)	Spesifik Akt. (U/gr protein)
85	İnvaziv Duktal Karsinom	63,5	0,16	93,4	0,23
86	İnvaziv Duktal Karsinom	159,5	0,05	67,5	0,12
87	İnvaziv Duktal Karsinom	39,9	0,12	46,0	0,18
88	İnvaziv Duktal Karsinom	79,9	0,15	72,3	0,21
89	İnvaziv Duktal Karsinom	102,7	0,08	113,2	0,15
90	Lobüler Karsinom	91,5	0,13	100,1	0,25
91	İnvaziv Duktal Karsinom	93,7	0,15	54,7	0,64
92	İnvaziv Duktal Karsinom	73,3	0,17	96,5	0,41

Hastaların normal ve tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları Tablo 19’ da verildi. Dokuların spesifik aktivite ortalamalarının grafiksel görünümü ise Şekil 12’ de verildi.

**Tablo 19:** Hastaların normal ve tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları

Doku Tipi	N	Ortalama	Standart Sapma
Normal Doku	92	0,16	0,06
Tümörlü Doku	92	0,40	0,25
p*	0,000		

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 12:** Hastaların normal ve tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik aktivite ortalaması

Hastaların normal ve tümörlü dokularının spesifik aktivitelerinin istatistik verileri ve spesifik aktivite ortalamalarının grafiği Tablo 20.a, Tablo 20.b ve Şekil 13’ de verildi. Tümörlü dokuların istatistiksel verileri ve grafiği ise Tablo 21.a, Tablo 21.b ve Şekil 14’ de özetlendi.

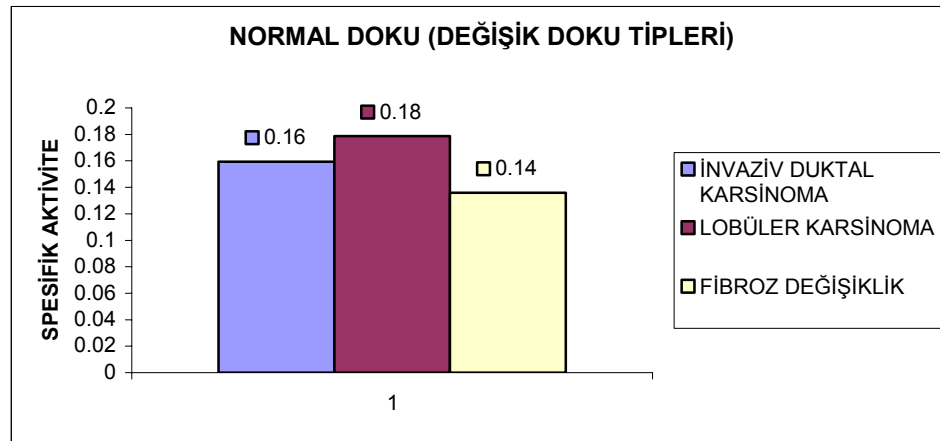
**Tablo 20.a:** Hastaların normal dokularının piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları

Normal Doku Değişik Doku Tipi			
	N	Ortalama	Standart Sapma
İnvaziv Duktal Karsinom	60	0,16	0,06
Lobüler Karsinom	8	0,18	0,04
Fibröz Değişiklik	24	0,14	0,04

**Tablo 20.b:** : Hastaların normal dokularına ait değişik doku tiplerinin karşılaştırılması

p* ( Normal Doku)	İnvaziv Duktal Karsinom	Lobüler Karsinom
İnvaziv Duktal Karsinom	1,000	-
Lobüler Karsinom	0,217	1,000
Fibröz Değişiklik	0,018	0,000

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 13:** Hastaların normal dokularına ait değişik doku tiplerinin spesifik aktivite ortalaması

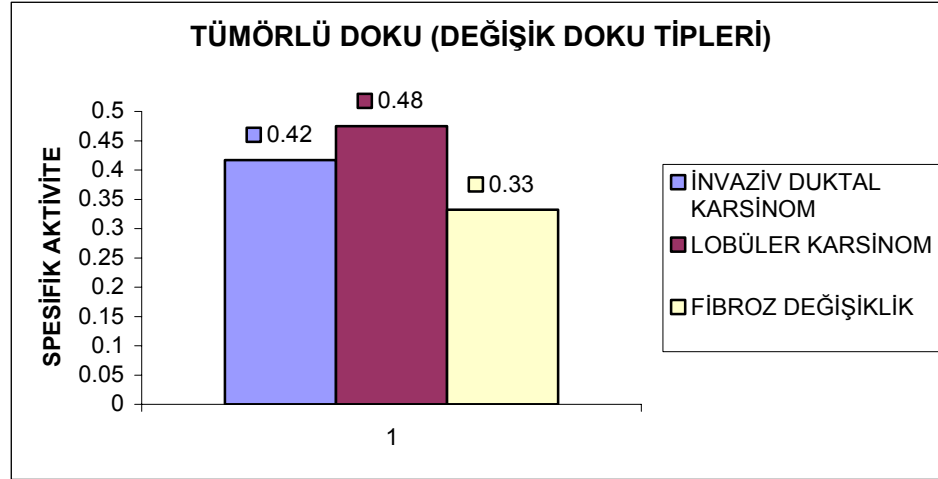
**Tablo 21.a:** Hastaların tümörlü dokularının piruvat kinaz spesifik aktivitelerinin istatistik sonuçları

Tümörlü Doku (Değişik Doku Tipi)			
	N	Ortalama	Standart Sapma
İnvaziv Duktal Karsinom	60	0,42	0,26
Lobüler Karsinom	8	0,48	0,34
Fibröz Değişiklik	24	0,33	0,21

**Tablo 21.b:** Hastaların tümörlü dokularına ait değişik doku tiplerinin karşılaştırılması

p* ( Tümörlü Doku)	İnvaziv Duktal Karsinom	Lobüler Karsinom
İnvaziv Duktal Karsinom	1,000	-
Lobüler Karsinom	0,644	1,000
Fibröz Değişiklik	0,050	0,002

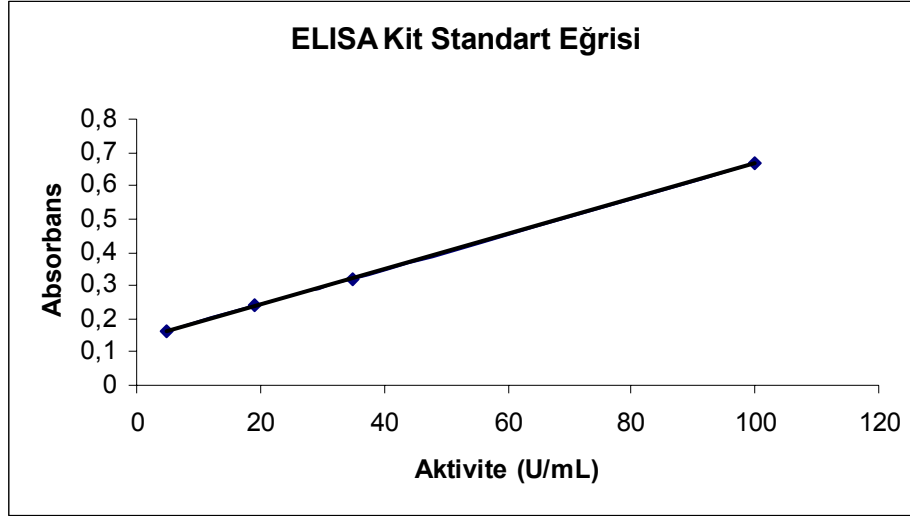
\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 14:** Hastaların tümörlü dokularına ait değişik doku tiplerinin spesifik aktivite ortalaması

Çalışmada, piruvat kinaz aktivitesi ELISA kit yöntemiyle de çalışıldı. ELISA kit yöntemiyle norma l 0 olgunun plazma piruvat kinaz aktiviteleri Tablo 22' de verildi. Plazma piruvat kinaz aktiviteleri ELISA kit yöntemiyle ölçülen 80 olgunun

patolojik bulguları ve enzim aktiviteleri Tablo 23' de verildi. ELISA kit yönteminde kullanılan standart eğri ise Şekil 15' de verildi.



Şekil 15: ELISA Kit Standart Eğrisi

Tablo 22: ELISA yöntemi ile kontrol grubuna ait örneklerinin plazma piruvat kinaz aktivitesi

Kontrol	Aktivite (U/mL)
1	13,98
2	14,96
3*	5,00
4	6,00
5	12,03
6*	11,12
7*	6,56
8	5,00
9	9,32
10	9,65

\* Beutler yönteminde kullanılan kontrollerden farklı örnek.

ELISA kit yöntemiyle Tümör M2-PK aktiviteleri ve patolojik verileri Tablo 23'te verilmiştir.

**Tablo 23:** Hastaların patolojik verileri ve plazma (ELISA) piruvat kinaz aktiviteleri

Hasta No	Değişik Doku Tipi	Evre	Aktivite (U/mL)
1	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	10,85
2	Lobüler Karsinom	2B	Çalışılmadı
3	Lobüler Karsinom	2A	100,00
4	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	100,00
5	Fibroz Değişiklik		10,85
6	Fibroz Değişiklik		7,99
7	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	6,09
8	Fibroz Değişiklik		5,14
9	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	83,69
10	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	Çalışılmadı
11	Lobüler Karsinom	2B	9,90
12	Fibroz Değişiklik		22,83
13	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	100,00
14	Fibroz Değişiklik		18,27
15	Fibroz Değişiklik		31,20
16	Fibroz Değişiklik		10,66
17	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	11,04
18	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	12,56
19	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	16,36
20	Lobüler Karsinom	3B	18,08
21	Fibroz Değişiklik		18,84
22	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	8,95
23	Fibroz Değişiklik		14,08
24	Fibroz Değişiklik		100,00
25	İnvaziv Duktal Karsinom	1	81,41
26	Fibroz Değişiklik		17,51
27	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	78,56
28	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	34,24
29	Fibroz Değişiklik		39,19
30	Fibroz Değişiklik		31,96
31	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	5,71
32	Fibroz Değişiklik		100,00
33	Fibroz Değişiklik		18,84
34	İnvaziv Duktal Karsinom	1	12,75
35	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	12,56
36	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	15,41
37	Lobüler Karsinom	2B	Çalışılmadı
38	Fibroz Değişiklik		Çalışılmadı
39	Fibroz Değişiklik		Çalışılmadı
40	Fibroz Değişiklik		10,47
41	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	7,61

Hasta No	Değişik Doku Tipi	Evre	Aktivite (U/mL)
42	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	35,19
43	Lobüler Karsinom	3A	6,28
44	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	7,61
45	İnvaziv Duktal Karsinom	1	52,69
46	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	5,00
47	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	36,33
48	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	Çalışılmadı
49	İnvaziv Duktal Karsinom	1	5,00
50	Lobüler Karsinom	2B	22,45
51	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	51,55
52	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	31,39
53	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	11,99
54	Fibroz Değişiklik		9,71
55	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	5,00
56	Fibroz Değişiklik		16,74
57	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	17,89
58	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	33,48
59	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	100,00
60	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	Çalışılmadı
61	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	5,00
62	İnvaziv Duktal Karsinom	1	100,00
63	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	9,71
64	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	Çalışılmadı
65	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	48,70
66	Fibroz Değişiklik		38,81
67	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	5,00
68	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	5,00
69	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	Çalışılmadı
70	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	5,00
71	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	15,41
72	Fibroz Değişiklik		16,36
73	Fibroz Değişiklik		8,76
74	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	7,04
75	İnvaziv Duktal Karsinom	1	Çalışılmadı
76	İnvaziv Duktal Karsinom	1	9,90
77	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	5,00
78	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	17,51
79	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	12,18
80	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	Çalışılmadı
81	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	30,63
82	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	Çalışılmadı
83	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	83,31
84	Fibroz Değişiklik		24,92
85	İnvaziv Duktal Karsinom	2B	78,37
86	İnvaziv Duktal Karsinom	1	31,58
87	İnvaziv Duktal Karsinom	3A	35,38
88	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	5,71
89	İnvaziv Duktal Karsinom	2A	5,90
90	Lobüler Karsinom	2B	100,00

Hasta No	Değişik Doku Tipi	Evre	Aktivite (U/mL)
91	İnvaziv Duktal Karsinom	1	14,08
92	İnvaziv Duktal Karsinom	3B	19,98

ELISA kit yöntemi ile plazma aktiviteleri çalışılan hastaların değişik doku tiplerine göre plazmaenzim aktivitelerinin ortalamaları Tablo 24.a' da özetlendi. Tablo 24.b' de ise kontrol grubu ile değişik doku tiplerinin istatistik karşılaştırılması yapıldı. Ayrıca Tablo 24.b' de, invaziv duktal karsinom, lobüler karsinoma ve fibröz değişiklik gözlenen doku tiplerinin kendi aralarındaki ilişki verildi. Plazma aktivilerinin ortalama değerlerinin grafiği Şekil 16' de verildi.

**Tablo 24.a:** Hastaların ELISA kit yöntemi ile değişik doku tiplerine göre plazma piruvat kinaz aktiviteleri

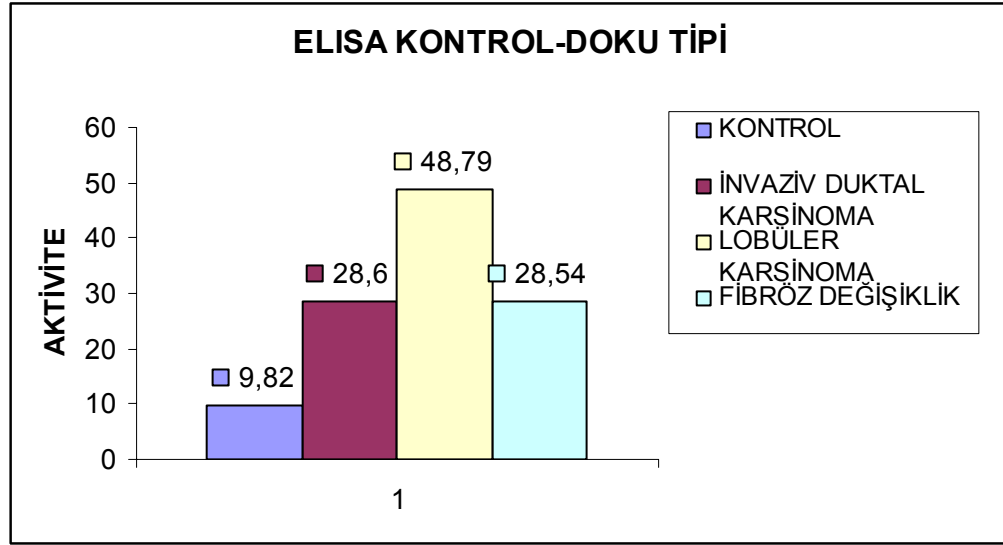
ELISA (Değişik Doku Tipleri) Plazma Aktivite	N	Ortalama	Standart Sapma
	İnvaziv Duktal Karsinom	51	28,60
Lobüler Karsinom	6	48,79	40,62
Fibröz Değişiklik	23	28,54	27,86
Kontrol	10	9,82	3,97

**Tablo 24.b:** Değişik doku tiplerinin (ELISA) ve kontrol grubunun plazma piruvat kinaz aktivite karşılaştırılması

p* (ELISA)	Kontrol	İnvaziv Duktal Karsinom	Lobüler Karsinom
Kontrol	1,000	-	-
İnvaziv Duktal Karsinom	0,000	1,000	-
Lobüler Karsinom	0,042	0,472	1,000
Fibröz Değişiklik	0,004	0,994	0,023

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$





**Şekil 16:** ELISA yöntemi ile değişik doku tiplerinin plazma piruvat kinaz aktivite ortalaması

ELISA yöntemi ile çalışılan invaziv duktal karsinomlu hastaların değişik evrelerinde saptanan aktivite sonuçları ve bunların grafikleri Tablo 25.a, Tablo 25.b ve Şekil 17’ de verildi. Aynı şekilde invaziv duktal karsinomlu EVRE 2’ deki olguların bulgular Tablo 26 ve grafiği Şekil 18’ de verildi. Tablo 25.b’ de ise EVRE 1’in diğer evreler ile karşılaştırılmasındaki p değerleri verildi.

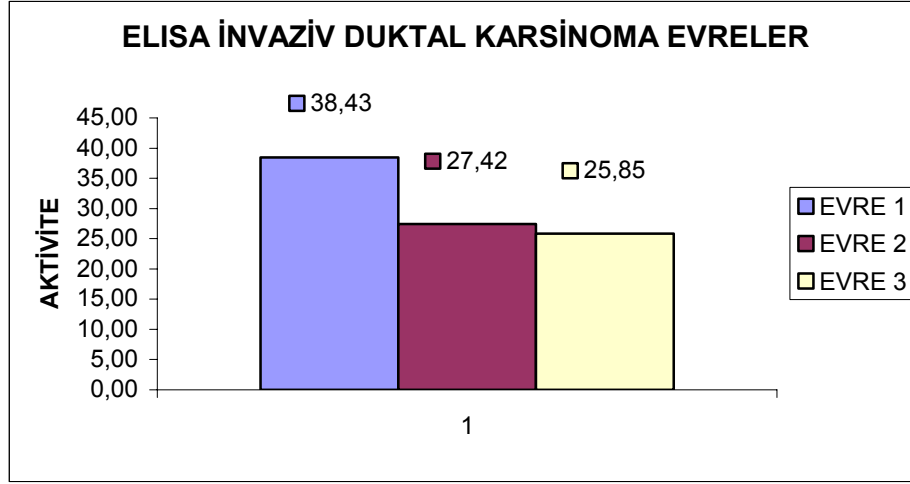
**Tablo 25.a :** İnvaziv Duktal Karsinomlu (ELISA) evrelerinin plazma piruvat kinaz aktivitelerinin istatistik sonuçları

İnvaziv Duktal Karsinom (ELISA)			
	N	Ortalama	Standart Sapma
EVRE 1	8	38,43	36,12
EVRE 2	25	27,42	26,19
EVRE 3	18	25,847	23,26

**Tablo 25.b :** İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların (ELISA) evrelerinin istatistiksel arşılaştırılması

p* ELISA (İnvaziv Duktal Karsinom )	EVRE 1	EVRE 2
EVRE 1	1,000	-
EVRE 2	0,067	1,000
EVRE 3	0,091	0,825

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$

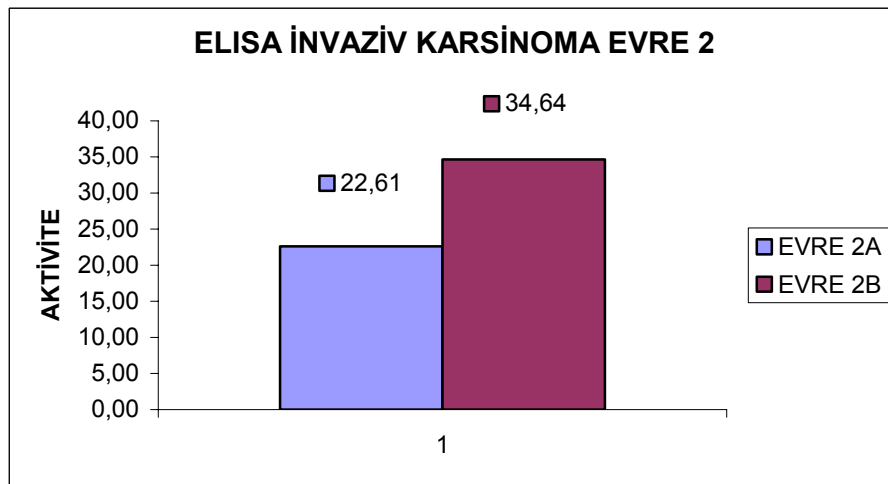


**Şekil 17:** İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların (ELISA) evrelerinin piruvat kinaz aktivite ortalaması

**Tablo 26:** İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların EVRE 2 (ELISA) plazma piruvat kinaz aktivitelerinin istatistik sonuçları

İnvaziv Duktal Karsinom EVRE 2 (ELISA)			
	N	Ortalama	Standart Sapma
EVRE 2A	15	22,61	19,038
EVRE 2B	10	34,64	30,992
<b>p*</b>	<b>0,251</b>		

\* önemlilik değeri  $p < 0,050$



**Şekil 18:** İnvaziv Duktal Karsinomlu olguların (ELISA) EVRE 2' deki piruvat kinaz aktivite ortalaması

## 5. TARTIŞMA

Hücrelerin birçoğu enerji ihtiyaçlarının büyük kısmını oksijenli solunumla karşılamaktadırlar. Bu reaksiyonlar dizisinin, glikolitik yola ait üç anahtar enziminden birisi piruvat kinaz enzimidir. Piruvat kinaz enzimi, adenosin difosfatın substrat düzeyinde fosforilasyonunu katalize etmektedir. Kinetik özellikleri, elektrik mobiliteleri, aminoasit içerikleri ve çeşitli dokulardaki dağılımlarına göre insan piruvat kinazı 4 farklı izoenzime (M1, M2, L ve R) sahiptir. Diğer taraftan immünolojik ve lokalize olduğu gene göre iki temel gruba ayırmak mümkündür. M tipi M1 ve M2 izoenzimleri, L tipi ise L ve R izoenzimleri şeklindedir<sup>(54, 73)</sup>.

Çeşitli organlarda gelişerek her yaştaki bireyleri etkileyen kanser, kardiyovasküler hastalıklardan sonra en sık rastlanan ölüm nedenidir. Kanser vakaları içinde meme kanseri kadın sağlığını tehdit eden en önemli malign hastalık olup yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir. Meme kanseri dünyadaki en önemli üçüncü kanser türü olup kanser ölümlerinde ikinci sıradadır. Bir kadının yaşamı boyunca meme kanserine yakalanma olasılığı %13,1'dir<sup>(62, 63)</sup>.

Tümör hücrelerinin enzimoloji ile ilişkisi, tümör hücrede karbonhidrat, pürin ve pirimidin metabolizmasını düzenleyen enzimlerin aktivitelerinin değişikliğe uğramasından ileri gelmektedir. Tümörlü hücrelerinin metabolizmasındaki gerekli enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin hızlı çalışması nedeniyle benign veya malign tümörlerde piruvat kinaz aktivitesinin genellikle arttığı rapor edilmiştir. Bu da tümör hücrelerinin metabolizmasındaki enerji ve metabolitlerin sağlanması için glikolizin gerekliliğini açıklamaktadır<sup>(5, 31,32,33, 73)</sup>.

Yılmaz ve arkadaşları, meme tümörlerinde piruvat kinaz ve G6PD aktivitelerini Beutler yöntemi ile ölçmüş ve yüksek bulmuşlardır. Benzer bulgular diğer kanser gruplarında da görülmektedir<sup>(73)</sup>. Çalışmamızda da kontrol grubu ile hasta grubunun plazma piruvat kinaz enziminin spesifik aktivite ortalamaları arasında Tablo13' de görüldüğü gibi istatistik olarak farklı bulunmuştur ( $p < 0.050$ ). Ayrıca çalışmamızda hasta grubunun değişik doku tiplerindeki plazma enzim aktivitesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hepsinde de  $p < 0.05$  değerinde olup anlamlı bir farkın olduğu bulunmuştur (Tablo 14.b). Ancak invaziv duktal karsinomlu olguların plazma, lobüler

karsinom ve fibröz değişiklik gösteren gruplara plazma aktivitesi kendi içlerinde kıyaslandığında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür (Tablo 14.b).

Aynı şekilde Hilf ve arkadaşları normal meme örnekleri ile duktal meme karsinomunda piruvat kinaz aktivitesini karşılaştırdıklarında karsinomlu dokuda aktivitenin arttığını rapor etmişlerdir. Mastektomi esnasında lenfotik metastaz olmayan kanserlerde incelenen parametrelerin çoğunda farklılık olmamasına rağmen, piruvat kinaz aktivitesinde belirgin bir artış saptanmıştır. Bu veri, duktal karsinomların yalnız hücre sayısındaki artışa bağlı olmayan farklı bir metabolik kapasiteye sahip olduğunu göstermektedir<sup>(73, 74)</sup>.

İnvaziv duktal karsinomlu grubunun plazma aktivitesi kendi içinde evreleri arasında bir kıyaslama yapıldığında evreler arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Tablo 15.b). Fakat EVRE 2 grubunun kendi içinde kıyaslamasında EVRE 2A ve EVRE 2B arasında azda olsa farklılık gözlenmiştir ( $p= 0.045$ , Tablo 16), EVRE 3' de ise anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 17).

Tiroid kanseri ve hepatomalarda normal doku ile karşılaştırıldığında piruvat kinazın spesifik aktivitesinin arttığı, sarkomalarda, insan beyin tümörlerinde piruvat kinazın spesifik aktivitesinin düştüğü bildirilmiştir<sup>(75)</sup>. Ibsen ve arkadaşları piruvat kinazın spesifik aktivitesi ile meme dokusunun malinitesi arasında bir ilişki olduğunu ileri sürmüşlerdir. Malin meme kanser dokusu daha yüksek piruvat kinaz aktivitesi gösterirken, normal meme dokusu daha düşük enzim aktivitesi göstermiştir. Benign meme tümörleri normal doku ile malign tümör arasında bir değer göstermiştir. Eğer tümörün nitelik tanımı yapılacak ise insan memesindeki neoplazma örneğinin heterojen yapısının dikkatle incelenmesi gerektirmektedir. Glikolitik enzimlerin aktivitesindeki değişiklikler neoplastik meme bezinin büyümesi için önemli olduğunu düşünülmektedir<sup>(19, 75, 76)</sup>.

Çalışmamızda, plazmanın dışında hastaların normal ve tümörlü dokularının spesifik enzim aktiviteleri arasında önemli bir fark olduğu bulunmuştur (Tablo 19). Hastalara ait olan gerek normal doku gerekse tümörlü doku grupları kendi içinde kıyaslandığında invaziv duktal karsinom ile lobüler karsinom arasında bir fark bulunmazken, fibröz değişiklik de her iki doku grubu arasında zayıfta olsa bir fark gözlenmiştir (Tablo 20.b). Tümörlü ve normal dokularda lobüler karsinom grubunun

piruvat kinaz aktivite ortalamaları, invaziv duktal karsinom ve fibröz değişiklik gruplarına göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 20.a, Tablo 21.a).

Genelde piruvat kinaz enziminin bütün izoenzimlerinin, aktif durumlarının eş tetramerik yapıda olmasına karşılık tümör hücrelerinde, piruvat kinazın M2 izoenzim yapısı bozulur ve ağır basan formu dimeriktir. Yapılan çalışmalarda aynı şekilde, tümör hücrelerindeki M2 tip piruvat kinazın, böbrek medullası ve akciğer dokusunun glikolitik hücrelerinden izole edilen enzimden farklı olduğu görülmüştür. Tümör hücresindeki M2 tip piruvat kinazın spesifik formu c-AMP' ye bağlı olmayan protein kinaz tarafından inhibe edilmektedir. Bu dönüşümün nükleik asit biyosentezi için gerekli habercilerin salgılanmasını arttırdığı ve glukozdan riboza karbonhidrat akışını hızlandırdığı şeklinde yorumlanabilir<sup>(77)</sup>.

Araştırmalar tümör dışında ağır inflamasyon ve çoklu travma gibi durumlarda da Tümör M2-PK miktarının arttığını göstermişlerdir. Bu Tümör M2-PK başlıca çoklu travmadan sonra PK seviyesi 20 kat artmış olan granülositlerden salınmaktadır. Tümör M2-PK plazma derişimi çeşitli tümörlerde tümör boyutunu ve büyüklüğu yansıtmakta ve tümör evrelemede iyi korelasyon göstermektedir<sup>(63-71)</sup>. Tek olarak veya hormonal ajanlar ile birlikte trastuzumab ile tedavi edilmiş meme kanserli hastaların % 78' inde Tümör M2 piruvat kinaz aktivitesi ile hastalığın klinik safhası arasında pozitif bir korelasyon olduğunu bildirilmiş ve meme tümörünün klinik safhasının belirlenmesinde Tümör M2 piruvat kinaz enziminin araç olarak kullanılabileceğini bildirilmiştir<sup>(78,79)</sup>. Aynı şekilde Markus ve arkadaşları trastuzumab tedavisi gören metastaz meme kanserli hastalarda Tümör M2-PK seviyelerini tedavi süresince incelemişlerdir. Sonuçta Tümör M2-PK plazma düzeyinin bu hastaların tedavi seyrinin takibinde başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir<sup>(78)</sup>. Ayrıca Yılmaz ve arkadaşları da, doku MDA düzeyinin, katalaz, GSH-Px, G6PD, piruvat kinaz ve arjinaz enzimlerinin meme kanserinde "belirteç" olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir<sup>(73)</sup>.

Beutler yöntemi ile piruvat kinaz aktivitesi çalışılan örneklerin aktiviteleri ELISA yöntemiyle de çalışılmıştır. Değişik doku tiplerinin aktivite ortalamaları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, fibröz değişiklik gözlenen, invaziv duktal karsinomlu ve lobüler karsinomlu olguların aktiviteleri yüksek olduğu fakat içlerinde fibröz değişiklik gözlenen doku ile invaziv duktal karsinomlu doku arasında önemli fark olmadığı gözlenmiştir (Tablo 24.a). ELISA yöntemi ile çalışılmış materyal tiplerinin kendi içinde

anlamli fark gorulmemis, Beutler yontemi ile benzer sonuc bulunmustr (Tablo 15.b, Tablo 25.b).

ELISA yontemi ile calisilan invaziv duktal karsinom grubunun evreleri ve evrelerinde kendi icinde karstirmalarinda anlamlı bir fark olmadigi gorulmustr (Tablo 25.b).

Farklı kanser turlerinde de Tumör M2 piruvat kinaz belirteç olabilirliği ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Varga ve arkadaşlarının renal cell karsinomada(RCC) hasta takibinde Tumör M2-PK' nin tümör belirteci olarak kullanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada 83 RCC' li hasta ve 97 olgu kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışmalarında hastaların cerrahi müdahale öncesi ve sonrası EDTA-plazma örneklerinde Tumör M2-PK seviyelerini ELISA kit yontemiyle saptanmıştır. Kontrol grubunun Tumör M2-PK seviyesinin 11,37 U/mL, hastaların cerrahi müdahale öncesi seviyesini ise 21,88 U/mL olarak bulmuşlardır. Cerrahi müdahale sonrası hasta takibinde ise ilk 5 günde plazma Tumör M2-PK seviyesi 53,97 U/mL sonraki günlerde 43,5 U/mL ve birkaç ay sonra 16,3 U/mL seviyesine düşmüştür. Varga ve arkadaşları hasta ve kontrol grubu arasında önemli bir fark( $p<0.01$ ) bulmalarına rağmen sensitivitesi ve spesifitesinin düşük olması nedeniyle ELISA kit yontemin uygun bir tümör belirteci olmadığını belirtmişlerdir<sup>(80)</sup>.

Kaura ve arkadaşları servikal kanserde ve kontrol grubunda Tumör M2-PK seviyelerini EDTA-plazma örneklerinde ELISA kit yontemi ile ölçerek incelemişlerdir. Çalışmalarında servikal kanserli grup ile kontrol grubu arasında istatistik olarak sensitivite arasında önemli fark ( $p< 0.001$ ) olduğunu göstermişlerdir<sup>(81)</sup>.

Ayrıca tümör tanılarında ve takibinde kullanılan bazı belirteçler ile Tumör M2-PK' nin sensitivite karstirmalarına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Maurizio ve arkadaşları yeni bir metabolik belirteç olarak Tumör M2-PK' yı CA 19-9 ile karstirmışlardır. Akut, kronik pankreatik kanserli, benign pankreatik ve kontrol grubu olmak üzere toplam 265 olgu incelemişlerdir. Tumör M2-PK EDTA' lı plazma örneklerini ELISA kit yontemiyle incelemişlerdir. Neticede Tumör M2-PK düzeyinin metabolik belirteç olarak kullanılabileceğini fakat CA 19-9 tümör belirteci ile birlikte kullanımının daha anlamlı olacağını bildirmişlerdir<sup>(82)</sup>.

Joachim ve arkadaşları ameliyat edilemeyen akciğer kanserli hastaların takibinde Tumör M2-PK seviyesini inceleyen bir pilot çalışma yapmışlardır. Çalışmalarının

sonucunda Tumor M2-PK seviyesinin ameliyat edilemeyen akciğer kanserli hastalarda tedavinin gidişatı hakkında fikir verebileceğini ve ayrıca Tumor M2-PK'nın erken tanıda yardımcı bir belirteç olarak kullanılabilceğini rapor etmişlerdir<sup>(83)</sup>.

Zhang ve arkadaşları mide ve kolorektal kanserlerde Tumor M2-PK ekspresyonunu bunlara özgü tumor belirteç olan CEA ve CA72-4 ile karşılaştırarak incelemişlerdir. Mide kanserinde ve kolorektal kanserlerinde Tumor M2-PK seviyeleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli fark olduğunu göstermişlerdir. Mide kanserinde belirteç olarak kullanılan CA72-4 sensitivitesinin 35,37% iken Tumor M2-PK'nın sensitivitesinin 50,47% olduğunu, ayrıca kolorektal kanserinde ise CEA sensitivitesinin 43,12% iken Tumor M2-PK'nın 68.52% olduğunu bulmuşlardır. Sonuçta gerek mide gerekse kolorektal kanserinde Tumor M2-PK'nın daha yüksek sensitiviteye sahip olduğunu rapor etmişlerdir<sup>(84)</sup>.

Diğer bir çalışmada, Pezilli ve arkadaşları çalışmalarında neroendokrin tümörlerinde Tumor M2-PK ile cromogranin (CgA) sensitivitesini karşılaştırmış ve ikisi arasında anlamlı bir fark gözlememişlerdir. Tumor M2-PK'nın neroendokrin tümörlerinde çokta uygun bir belirteç olmadığını rapor etmişlerdir<sup>(85)</sup>.

Bizim çalışmamızda, ELISA kit yöntemi ile yapılan çalışmalarda kontrol grubuna göre hastaların plazma Tumor M2-PK seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunurken değişik doku tipleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 24.b, Tablo 25.b, Tablo 26 ). Fakat çalışmamızda dikkati çeken nokta, invaziv duktal karsinom grubunda evrelerin Beutler yöntemi ile sırasıyla spesifik aktivite ortalamasının yükseldiği (Tablo 15.a), ELISA yöntemi ile ölçümünde bunun aksine evre ilerledikçe spesifik aktivite ortalamasının düştüğü gözlenmiştir (Tablo 25.a).

## 6. SONUÇLAR

Çalışmamızda, Beutler ve ELISA kit yöntemiyle piruvat kinaz enziminin M2 tipi plazmada ve dokuda ölçüldü.

- Çalışmamızda kontrol plazma piruvat kinaz aktivitesinin Beutler yöntemiyle ölçümünde kontrol ve hasta grubunda önemli farklılıklar gözlemlendi ( $p < 0.001$ , Tablo 13).
- Ayrıca çalışmamızda hasta grubunun değişik doku tipleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, hepsinde de  $p < 0.05$  değerinde olup anlamlı bir fark olduğu bulundu (Tablo 14.b).
- İnvaziv duktal karsinomlu dokunun spesifik aktivite ortalaması lobüler karsinomlu ve fibröz değişiklik gözlenen doku gruplarıyla kıyaslandığında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo 14.b).
- İnvaziv duktal karsinom grubunun kendi içinde evreleri arasında bir kıyaslama yapıldığında evreler arasında anlamlı bir fark bulunmadı (Tablo 15.b). Fakat EVRE 2 grubunun kendi içinde kıyaslamasında EVRE 2A ve EVRE 2B arasında çok düşük bir fark bulundu ( $p=0,045$ ), EVRE 3' de ise anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0,219$ ) (Tablo 16, Tablo 17).
- Çalışmamızda, plazmanın dışında hastaların normal ve tümörlü dokularının enzim aktivite ortalamaları arasında yüksek bir fark olduğu bulundu ( $p = 0.000$ , Tablo 19).
- Hastalara ait olan gerek normal doku gerekse tümörlü doku grubu kendi içinde kıyaslandığında invaziv duktal karsinom, lobüler karsinom ile arasında bir fark bulunmazken, fibröz değişiklik ile her iki doku arasında zayıf bir fark bulundu (Tablo 20.b, Tablo 21.b). Tümörlü ve normal dokularda lobüler karsinom grubunun piruvat kinaz aktivite ortalamaları, invaziv duktal karsinom ve fibröz değişiklik gruplarına göre yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 20.a, Tablo 21.a).
- Beutler yöntemi ile çalışılan plazmaların 80' i ELISA yöntemi ile de çalışıldı. Çalışılan doku tiplerinin aktivite ortalamaları kontrol ile karşılaştırıldığında,



fibröz değişiklik gözlenen ve invaziv duktal karsinomlu olgular arasında anlamlı bir fark bulunurken, lobüler karsinomlu olgular ile düşük bir fark olduğu bulundu.

- ELISA yöntemi ile çalışılmış materyal tiplerinin kendi içinde karşılaştırmalarında anlamlı fark görülmedi, Beutler yöntemi ile bulunan istatistiksel sonuca benzer sonuç bulundu (Tablo 14.a, b ve Tablo 24.a, b ).
- ELISA yöntemi ile çalışılan invaziv duktal karsinom grubunun evreleri ve evrelerinde kendi içinde karşılaştırmalarında anlamlı bir fark olmadığı görüldü (Tablo 25.b, Tablo 26).

Kanserdeki enzim aktivitesinin normal dokulardakinden farklı olması, kısmen değişmiş bir gen ifadesi ile açıklanabilir. Tümör M2-PK EDTA plazma örneklerindeki enzim düzeyleri tümör tedavi süresince klinisyenlerin kişisel uygulamalarında verimli bir gösterge olabilir. Ayrıca enzim-rehberlik tümör tedavi her hasta için doz, süre, tedavi seçiminde yol gösterici olmaktadır. Tümörün metabolik durumunu belirlemek ve metabolik durumuna özgü ileri tedavi planlamak için gelecekteki çalışmalarda Tümör M2-PK seviyeleri ile glukoz kullanımı PET (positron emission tomography) ile izlenerek karşılaştırılabilecektir.

Bundan başka sağlıklı kontrol grubu ve yüksek riskli grupların (sigara içenler veya karsinogenik ajanlara maruz kalanlar) EDTA plazma örneklerinde Tümör M2-PK seviyeleri uzun süreli ölçümleri kullanılarak, Tümör M2-PK hem tek başına hem de diğer tümör belirteçleriyle malign tümörlerin erken tanısında genel tümör belirteci olarak kullanılabilir.

Meme kanserli hastaların tedavi süresince tedavinin takibinde piruvat kinaz aktivitesinin düzeyi kullanılabilir. Ancak iyi bir belirteç olarak kullanılması için referans aralığının belirlenmesi gereklidir.

## 7. KAYNAKLAR

1. **Enriqueta, M., Ponce, E.:** Comparative biochemistry and physiology Part B **2003**; 135: 197-218
2. **Valentini, G.** The allosteric regulation of pyruvate kinase. J Bio Chem **2000**; 275: 18145-18152.
3. **Jurica, M.S.** The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. Structure **1998**; 6: 195-210.
4. **Mattevi, A.** Crystal structure of escherichia coli pyruvate kinase typeI: molecular basis of the allosteric transition. Structure **1995**; 3: 729-741.
5. **Rigden, D.J.** The structure of pyruvate kinase from leishmania mexicana reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. J Mol Biol **1999**; 291: 615-635.
6. **Muirhead, H.** The structure of cat muscle pyruvate kinase. EMBO J **1986**; 5: 475-481.
7. **Larsen, T.M.** Ligand induced domain movement in pyruvate kinase: structure of enzyme from rabbit muscle with  $Mg^{2+}$ ,  $K^{+}$ , and l-phospholactate at 2.7 Å resolution. Archives of Biochem -Biophysics **1997**; 345: 199-206.
8. **Valentini, G.** Structure and function of human erythrocyte pyruvate kinase. J Bio Chem **2002**; 277: 23807-23814.
9. **Mattevi, A.** The Allosteric regulation of pyruvate kinase. FEBS Letters **1996**; 389: 15-19.

10. **Woolf, J.O.** Structural and functional linkages between subunit interfaces in mammalian pyruvate kinase. *J Mol Bio* **2001**; 312: 525-540.
11. **Ikeda, Y.** Dominant negative role of the glutamic acid residue conserved in pyruvate kinase m1 isozyme in the heterotropic allosteric effect involving fructose-1,6-bisphosphate. *J Bio Chem* **2000**; 275: 9150-9156.
12. **Hall, E.R. and Cottam, G.L.** Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic, and immunological properties. *Int J Biochem* **1978**; 9: 785-793.
13. **Schworer, C.M.** Phosphorylation of L-type pyruvate kinase by a  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase. *J Bio Chem* **1985**; 260: 13018-13022.
14. **Kanno, H.** Molecular abnormality of erythrocyte pyruvate kinase deficiency in the amish blood. **1994**; 83: 2311-2316.
15. **Eigenbrodt, E., Reinacher, M., Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Friis, R.** Double role for pyruvate kinase type m2 in the expansion of phosphometabolite pool found in tumor cells. *Crit. Rev. Oncog* **1992**; 3: 91-115.
16. **Heinrichs, M., Jacobasch, G., Scheiner-Bobis, K., Bertram, S., Eigenbrodt, E., Reinacher, M.** Human erythrocyte pyruvate kinase (L/R-pyruvate kinase): production and characterization of a monoclonal antibody. *Biomed. Biochim Acta* **1987**; 46: 223-228.
17. **Cuenillas E., Gaitan S., Bueren J.A., Tejero C.** Kinetic studies of pyruvate kinase during in vitro differentiation of gm-cfc haemopoietic precursor and bone marrow cells in mice. *Biosci Rep* **1990**; 10: 141-154.

18. **Kiffmeyer W.R., Farrar W.W.** Purification and properties of pig heart pyruvate kinase. *J. Protein Chem* **1991**; 10: 585-591.
19. **Ibsen K.H.** Interrelationships and functions of the pyruvate kinase isozymes and their variant forms: A Review *Cancer Res* **1977**; 37: 341-353.
20. **Kaloyianni-Dimitriades M.G., Beis I.D.** Purification, catalytic and regulatory properties of rana ridibunda erythrocyte pyruvate kinase. *Comp Bioche Physiol* **1984**; 7B: 245-250.
21. **Elbers J.R., Unnik J.A., Rijksen G., Oirschot B.A., Roholl P.J., Osting J., Staal G.E.** Pyruvate kinase activity and isozyme composition in normal fibrous tissue and fibroblastic proliferations. *Cancer* **1991**; 67: 2552-2559.
22. **Mazurek S., Grimm H., Oehmke M., Weisse G., Teigelkamp S., Eigenbrodt E.** Tumor M2-Piruvat Kinaz and glutaminolytic enzymes in the metabolic shift of tumor cells. *Anticancer Res* **2000**; 20: 5151- 5154.
23. **Terlecki G.** Purification and properties of pyruvate kinase type m1 from bovine brain. *Int. J. Biochem* **1989**; 21: 1053-1060.
24. **Ozüsağlam H.** Normal kişilerle ALL, relaps –All ve All’li ANLL’li kişilerde eritrosit piruvat kinaz.enziminin kinetik açıdan karşılaştırılması., Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilim Uzmanlık Tezi, Adana, **1996**
25. **Friesen R.H.E. and Lee J.C.** The negative dominant effect of t340m mutation on mammalian pyruvate kinase. *J Bio Chem* **1998**; 273: 14772-14779.
26. **Yamada K., Noguchi T.** Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression. *Biochem J* **1999**; 337: 1-11.

27. **Satoh H, Tani K, Yoshida MC, Sasaki M, Miwa S, Fujii H.** The human liver type pyruvate kinase (pk1) gene is on chromosome 1 at band q21. *Cytogenet Cell Genet* **1988**; 47: 132-133.
28. **Hall ER, Kohl EA, Cottam GL.** The subunit structure of rat liver pyruvate kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1978**; 80: 586-592.
29. **Tanrıverdi K.** Lösemili hastalarda saptanan piruvat kinaz enzim defekti mutasyonlarının belirlenmesi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, **2002**
30. **Beutler E.** Red cell metabolism and hemolysis. *Acta Hematol Jpn*, **1987**; 34: 64-68.
31. **Max-Audit I, Rosa R, Marie J.** Pyruvate kinase hyperactivity genetically determined: metabolic consequences and molecular characterization. *Blood* **1980**; 56 (5): 902-909.
32. **Takenaka M, Noguchi T, Sadhiro S, Hirai H, Yamada K, Matsuda T, Imai E, Tanaka T.** Isolation and characterization of human pyruvate kinase M gene. *Eur J Biochem* **1990**; 198: 101-106.
33. **Marie J, Garreau H, Kahn A.** Evidence of a postsynthetic proteolytic transformation of human erythrocyte pyruvate kinase into L-type enzyme. *Febs Letters* **1977**; 78: 91-94.
34. **Chem CJ, Kennelt R, Engel E, Mellman WJ, Croce CM.** Assignment of the structural genes for the a subunit of hexosaminidase a, mannosephosphate isomerase, and pyruvate kinase to the region q22 ~> qter of human chromosome 15. *Somat Cell Genet* **1977**; 3: 553-560.

35. **Hall ER, Kohl EA, Cottam GL.** The subunit structure of rat liver pyruvate kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1978**; 80: 586-592.
36. **Chem JC, rinenberg MB, Black JA.** Purification of human erythrocyte pyruvate kinase. *J Biol Chem* **1972**; 247: 7173-7180
37. **Hall ER, Cottam GL,** Isoenzyme of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties. *Int J Biochem* **1978**; 9: 785-793
38. **Van Solinge WW, Kraaijenhagen RJ, Rijksen G, Van Wijk R, Stoffer BB, Gajhede M, Nielsen FC.** Molecular modelling of human red blood cell pyruvate kinase: structural implications of a novel g1091 to a mutation causing severe nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood* **1997**; 90 (12): 4987-4995
39. **Kayrin L, Yuregir GT.** Reference values for erythrocyte pyruvate kinase in cukurova Turkey. *Biochimica Clinica* **1993**; 17 (3): 225230.
40. **Akin H, Baykal ES, Aksu A, Yücel G, Gümüşlü S.** Prevalence of erythrocyte pyruvate kinase deficiency and normal values of enzyme in a turkish population. *Human Heredity* **1997**; 47: 42-46
41. **Muirhead, H.** Isoenzymes of pyruvate kinase. *Biochem Soc Trans* **1990**; 18: 193-196.
42. **Ibsen KH, Chiu RHC, Park RH, Sanders DH, Roy S, Garrat KN, Mueller MK.** Purification and properties of mouse pyruvate kinase k and m and of a modified k subunit. *Biochemistry* **1981**; 20:1497-1506
43. **Nagno Y, Miyazaki K, Matuo Y, Yamashita J, Horio T.** Difference in physical and chemical properties between muscle-type and spleen-type isoenzym of pyruvate kinase in rat. *Biochem Biophys Res Commun* **1982** ; 104: 713-719

44. **Chem JC, Rinenberg MB, Black JA:** Purification of human erythrocyte pyruvate kinase. *J Biol Chem* **1972**; 247: 7173-7180
45. **Onat T., Emerk K.** Temel Biyokimya. Saray Medikal Yayıncılık, İzmir. **1997**; 661-662.
46. **Pilkis, S.J.** Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Ann Rev Biochem* **1988**; 57: 755-783.
47. **Macfarlane N, Ainworth S.** A kinetic study of pig liver pyruvate kinase activated by fructose biphosphate. *Biochem J* **1974**; 139: 499-508
48. **Ainwort S, Macfarlane N.** A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. *Biochem J* **1973**; 131: 223-236
49. **Dann LG, Britton BH.** Mechanism of L type pyruvate kinase from rabbit liver. Evidence Against Phosphoenzyme Formation . *Biochem J* **1977**; 161: 445-448
50. **Mazurek S, Boschek CB, Eigenbrodt E.** The role of phospho-metabolites in cell proliferation, energy metabolism and tumor therapy. *J Bioenerg Biomembr* **1997**; 29: 315-330.
51. **Mzurek S, Zwerschke W, Jansen-Durr P, Eigenbrodt E.** Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and hpv-16 e7. *Oncogene* **2001**; 20: 6891-6898.
52. **Weernink P.A.O., Rijksen G., Staal G.E.J.** Phosphorylation of pyruvate kinase and glycolytic metabolism in three human gliomacell lines. *Tumour Biol* **1991**; 12: 339-352.

53. **Helmy E., Unnik A.M., Rijksen G., Smits, G. Staal, J.** Cellular expression of K-type pyruvate kinase in normal and neoplastic human tissues. *Cancer* **1991**; 68: 2595-2601.
54. **Yilmaz S., Ozan S., Özercan I.H.** Comparison of pyruvate kinase variants from breast tumor and normal breast. *Arch Med Res* **2003**; 34: 315-324.
55. **Kwiatkowska D., Dawiskiba J., Kwiatkowska J.** Alterations in erythrocyte enzymes in cancer. *Neoplasma* **1980**; 27: 415-422.
56. **Schneider J, Morr H, Velcovsky HG, Weisse G, Eigenbrodt E.** Quantitative detection of tumor m2-pyruvate kinase in plasma of patients with lung cancer in comparison to other lung diseases. *Cancer Detec Prev* **2000**; 24: 531-535.
57. **Oehler R, Weingartmann G, Manhart N, Salzer U, Meissner M, Schlegel W.** Polytrauma induces increased expression of pyruvate kinase in neutrophils. *Blood* **2000**; 95:1086-1092
58. **Schulze G.** The tumor marker tumor m2-pk: an application in the diagnosis of gastrointestinal cancer. *Anticancer Res* **2000**; 20: 4961-4964
59. **Roigas J, Schulze G, Raytarowski S, Jung K, Schnorr D, Loening SA.** Tumor M2 pyruvate kinase in plasma of patients with urologic tumors. *Tumor Biol* **2001**; 22: 282-285.
60. **Wechsel HW, Petri E, Bichler K-H, Feil G.** Marker for renal cellcarcinoma (rcc): the dimeric form of pyruvate kinase type M2 (Tu M2-PK). *Anticancer Res* **1999**; 19: 2583-2590.



61. **Luftner D, Mesterharm J, Akrivakis C, Geppert R, Petrides PE, Wemecke KD, Possinger K.** Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer. *Anticancer Res* **2000**; 20:5077-5082.
62. **Yavuz S.** Meme kanserinde VEGF-C ekspresyonu ve klinik önemi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Adana, **2004**
63. **Jemal A, Tiwari RC, Murray T.** Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2004**; 54: 8-29
64. **Jemal A, Murray T, Samuels A, Ghafoor A, et al.** Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **2003**; 53: 5-26
65. **Parkin DM, Pisani P, Ferlay J.** Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **1999**; 49: 33-64
66. **Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J.** Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* **1999**; 83: 18-29
67. **Sampalis FS, Denis R, Picard D, Fleiszer D, Martin G, Nassif E, Sampalis JS.** International prospective evaluation of scintimammography with <sup>99m</sup>Techetium sestamibi. *The Am J of Surg* **2003**; 185: 544-549
68. **Houssami N, Irwig L, Ciatto S.** Radiological surveillance of interval breast cancers in screening programmes. *Lancet Oncol* **2006**; 7(3): 2-59-65
69. **Kanser Savaş Dairesi Başkanlığı.** T.C Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Politikası ve Kanser Verileri 1995-1999. Bakanlık Yayın Ankara, **2002**; 168
70. **Arai T., Ogino T., Gunji M., Washizu T., Komori S., Washizu M.** Changes in glucose transport activities in mammary adenocarcinoma of dogs. *Res Vet Sci* **1997**; 62: 85-86.

71. **Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al.** Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* **1951**; 193: 265-275
72. **Bücher T, Pfeleiderer G.** Pyruvate kinase in muscle. in: collowick sp, kaplan nd, eds. *methods in enzymology*. 1st ed New York: Academic Pres **1955**; 435-440
73. **Yılmaz S., Ozan S.** The interrelation of lipid peroxidation some enzyme activities in human breast carcinoma. *Turk J Biochem* **2003**; 28(4); 252-256
74. **Hilf R., Wittliff J.L., Rector W.D., Savlov E.D., Hall T.C., Orlando R.A.** Studies on certain cytoplasmic enzymes and specific estrogen receptors in human breast cancer and in onmalignant diseases of the breast. *Cancer Res* **1973**; 33: 2054-2062.
75. **Pedersen, N.** The Glycolytic enzyme activity of the human cervix uteri. *Cancer* **1975**; 35: 469-474.
76. **Larner E.H. Rutherford C L.** Application of a microchemical technique to the elucidation of enzyme activity profiles within single human mammary tumors. *Cancer* **1978**; 41: 1863-1870.
77. **Noda S., Horn F., Linder D., Schoner W.** Purified pyruvate kinases type m2 from unfertilized hen's egg substrates of protein kinase C. *Eur J Biochem* **1986**; 155: 643-651.
78. **Hoopmann M., Warm M., Mallmann P., Thomas A., Gohring U.J., Schondorf T.** Tumor M2 pyruvate kinase-determination in breast cancer patients receiving trastuzumab therapy. *Cancer Lett* **2002**; 187: 223-228.

79. **Luftner D., Mesterharm J., Akrivakis C., Geppert R., Petrides P.E., Wernecke K.D., Possinger K.** Tumor type M2 pyruvate kinase expression in advanced breast cancer. *Anticancer Res* **2000**; 20: 5077-5082.
80. **Varga Z., Hegele A., Stief T., Heidenreich A., Hofmann R.** Determination of pyruvate kinase type tumor M2 in human renal cell carcinoma: a suitable tumor marker?. *Urol Res* **2002**; 30:122-125
81. **Kaura B., Bagga R., Patel F.D.** Evaluation of the pyruvate kinase isoenzyme Tumor (Tu M2-Pk) as a tumor marker for cervical carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* **2004**; 30(3): 193-196).
82. **Maurizio V., Cipolla A., Racchini C, Casadei R., Simoni P, Gullo L.** Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer. *Digestive Diseases and Sciences* **2004**; Vol. 49: 1149–1155
83. **Schneider J., Neu K., Velcovsky H-G., Morr H., Eigenbrodt E.** Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study. *Cancer Letters* **2003**; 193: 91–98
84. **Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang GB, Shen P.** Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls. *World J Gastroenterol* **2004**; 10(11): 1643-1646
85. **Pezzilli R., Migliori M., Morselli A.M., Romboli E., Campana D., Ventrucci M., Tomassetti P.** Tumor M2-pyruvate kinase: is it a new useful marker for neuroendocrine tumors?. *Pancreatology* **2003**; 3: 209-269



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Erkan GÖRÜR 1981 yılında Hatay ilinin Samandağ ilçesinde dünyaya geldi. Samandağ Lisesi'nden 1997 yılında mezun olduktan sonra, 1998 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde okumaya hak kazandı. 1999 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'ne yatay geçiş yaparak 2002 yılında Mersin Üniversitesi'nden mezun oldu. 2002-2003 öğretim yılında Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans programına kayıt oldu. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimini 2006 yılında "Meme Kanserli Hastalarda Tümör M2-Piruvat Kinaz Enziminin Karakterizasyonu" adlı tez ile tamamladı.