

Normal ve Diabetik Rat Karaciğer Dokusunda Pirüvat Kinazın Bazı Kinetik Özelliklerinin Karşılaştırılması

Seval YILMAZ

Fırat Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Elazığ - TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 20.06.2002

Özet: Wistar-Albino cinsi erkek ratlara tek doz streptozocin (60 mg/kg) intraperitoneal verilerek diabetes mellitus oluşturulmuştur. Normal ve streptozocin etkisi ile diabet oluşturulan rat karaciğer dokusunda pirüvat kinaz enziminin kinetik özellikleri araştırılmıştır. Normal rat karaciğer doku pirüvat kinazının inkübasyon zamanı 15 dakika, optimum pH'sı 8; diabetik rat karaciğer doku pirüvat kinazının inkübasyon zamanı 10 dakika, optimum pH'sı 7 olarak bulunmuştur. Magnezyum klorür ve potasyum klorür, normal ve diabetik rat karaciğer dokusunu aktive etmiştir. Enzim substratı olan fosfoenolpirüvat fruktoz 1,6 difosfat yokluğunda sigmoidal eğri gösterirken, fruktoz 1,6 difosfat varlığında eğri hiperbolik Michaelis-Menten kinetiğine dönüşmektedir. Pirüvat kinazının fosfoenolpirüvat için Km değerinin normal ve diabetik karaciğer dokusunda farklılıklar gösterdiği ve fruktoz 1,6 difosfatın Km değerini düşürdüğü tespit edilmiş olup diabetik karaciğer dokusunda enzimin fosfoenolpirüvata ilgisinin azaldığı saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: Diabet, karaciğer dokusu, pirüvat kinaz, kinetik özellikler

Comparison of Some Kinetic Properties of Pyruvate Kinase in Liver Tissue of Normal and Diabetic Rats

Abstract: Diabetes mellitus was induced in Wistar-Albino type male rats with a single dose of streptozocin (60 mg/kg intraperitoneally). The kinetic properties of pyruvate kinase were investigated in normal and diabetic rat liver tissue. In normal rat liver tissue, the incubation period of pyruvate kinase was 15 min and the optimum pH was 8. In diabetic rat liver tissue, the incubation period of pyruvate kinase was 10 min and the optimum pH was 7. Activation was found in normal and diabetic rat liver tissues with magnesium chloride and potassium chloride. Phospho(enol)pyruvate is an enzyme substrate; in the absence of the fructose-1,6-diphosphate its graphic showed a sigmoidal plot, and in the presence of the fructose-1,6-diphosphate its graphic turned into a hyperbolic plot of Michaelis-Menten kinetics. Different Km pyruvate kinase values for phospho(enol)pyruvate were found in normal and diabetic liver tissues, and the Km value of fructose-1,6-diphosphate was determined as low. A low phospho(enol)pyruvate enzyme affinity was identified in diabetic liver tissue.

Key Words: Diabetes, liver tissue, pyruvate kinase, kinetic properties

Giriş

Diabetes mellitus; insülin hormon sekresyonunun veya insülin etkisinin azlığı sonucu karbonhidrat, protein ve yağ metabolizmasında bozukluklara yol açan kronik hiperglisemik bir metabolizma hastalığıdır. Diabetes mellituslu hastalarda doku ve organlarda biyokimyasal, morfolojik ve fonksiyonel bir takım değişiklikler meydana gelmektedir (1).

Hayvanlarda streptozocin (STZ) ve alloksan gibi diabetojenik ajanlar ile pankreas β hücrelerinin zarar görmesi sonucunda diabetes mellitusun oluşabileceği bildirilmiştir. STZ ile oluşturulmuş diabet, karbonhidrat metabolizmasında önemli değişikliklere neden olmaktadır. Karaciğerde glikolizis ve glikojen sentezi azalırken, glikoneogenesis artmaktadır (2,3).

Glikolitik yolun önemli kontrol enzimlerinden biri olan pirüvat kinaz (E.C.2.7.1.40), fosfoenolpirüvat (PEP)'i pirüvik asite dönüştüren bir enzimdir (4). Pirüvat kinaz çeşitli dokulardaki dağılımlarına göre 4 farklı izoenzime (M_1 , M_2 , L ve R) sahiptir (5). M_1 tip pirüvat kinaz; iskelet kası, kalp kası ve beyinde, R tip pirüvat kinaz; eritrosit ve hemotopoietik dokuda bulunmaktadır. Ratlarda M_2 izoenzimi karaciğer, böbrek, beyin, kalp, timus, dalak, akciğer, adipoz doku, testis, ovaryum gibi glikolitik dokularda ascites hepatoma AH-130, Walker's tümörlerinde yaygındır. M_2 tip pirüvat kinaz karaciğerde böbreğe göre daha az konsantrasyonda bulunurken, L tip büyük oranda karaciğerde, daha az oranda da böbrekte bulunmaktadır (6,7). M_1 tip pirüvat kinaz kinetik olarak hiperbolik Michaelis-Menten kinetiği gösterir ve fruktoz-1,6-difosfat (FDP) ile aktive olmaz. R tip pirüvat kinaz ise

FDP yokluğunda sigmoidal kinetik göstermekte ve FDP ile aktive olmaktadır. M_2 ve L tip pirüvat kinaz, PEP'in farklı konsantrasyonlarında sigmoidal kinetik göstermekte ve FDP ile allosterik olarak aktive, L-alanin, adenosin trifosfat (ATP) ile inhibe edilmektedir. M_2 tip pirüvat kinazda PEP'in Km değeri L tip pirüvat kinazın Km değerinden daha düşüktür (8). Laboratuvar hayvanlarında ve insanlarda pirüvat kinaz enzimi bazı neoplastik ve nonneoplastik hastalıklarda bir marker olarak kullanılmaktadır (9,10).

Diabet, kanser gibi birçok hastalıkta glikolitik enzim aktiviteleri çalışılmış ve enzim aktivitelerinin farklı olarak değişebileceği bildirilmiştir (9,11). Açlıkta ve diabette insülin düzeyinin düşmesi karaciğerde pirüvat kinaz miktarında bir azalmaya yol açmaktadır. Enzim miktarındaki değişiklik, primer olarak gen transkripsiyon düzeyindeki düşüşe de bağlı olabilir. Düşük enzim aktivitesi diabetes mellitusda glikozun pirüvata dönüşme eğilimini azaltmaktadır (12).

Bu bilgi ışığında diabet ile pirüvat kinaz enziminin kinetik özellikleri arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak amacı ile normal ve diabetik rat karaciğer dokularında pirüvat kinaz enziminin kinetik özellikleri çalışılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışmada Wistar-Albino cinsi toplam 20 adet erkek rat kullanılmıştır. Diabet oluşturulacak ratların her birine 60 mg/kg olacak şekilde tek doz streptozosin (Sigma Chemical Co, St. Louis Missouri) 0,1 M sitrat-fosfat tamponunda çözülerek intra peritoneal olarak uygulanmıştır. Kontrol grubuna sadece 0,1 M sitrat-fosfat tamponu enjekte edilmiş, hayvanlar her iki grupta da eşit koşullar altında, eşdeğer besinler ile beslenmişlerdir. Her gün ratların kuyruk veninden alınan kan glikozu glikometrede (Ames) ölçülmüş ve idrar glikozu strip ile değerlendirilerek diabetes mellitusun oluşumu kontrol edilmiştir. İlaç uygulamasını takip eden 12. günde kesilecek olan ratlar 1 gece önceden aç ve susuz bırakılmışlardır. Onikinci günün sonunda ratlar eter anestezisi altında kesilerek karaciğer dokuları alınmıştır.

Karaciğer dokuları soğuk serum fizyolojik (% 0,9'lük NaCl) ile yıkanmıştır. Süzgeç kağıdı ile suyu alınan karaciğer dokuları tartılmış, pH'sı 8 olan 1 M Tris-HCl tamponunda 1/10 oranında (w/v) sulandırılmıştır. Daha sonra 1/10 oranda sulandırılmış materyal kırılmış buz

içinde Potter-Elvehjem cam-cam homojenizatörle homojenize edilerek havuz oluşturulmuştur. Elde edilen homojenat havuzu soğutmalı santrifüjde (Sorvall RC-5C) 10,000 rpm'de +4 °C'de 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant enzim kaynağı olarak kullanılmıştır. Karaciğer doku pirüvat kinaz aktivitesi 340 nm'de nikotinamid adenin dinükleotidin azalan absorbans hızının ölçülmesi esasına dayanan Beutler ve ark. (13)'nin yöntemi ile çalışılmıştır.

Normal ve STZ ile diabet oluşturulmuş rat karaciğer dokusunda enzimatik reaksiyon için gerekli olan inkübasyon süresini tespit etmek amacı ile enzim 37 °C'de 0-30 dakika aralıklarla inkübasyona tabii tutulmuştur. 1 M Tris-HCl tamponunun 7,1-9 pH aralıklarında normal ve diabetik karaciğer doku pirüvat kinaz aktivitesi saptanmış ve pH profili çıkarılmıştır.

İnkübasyon ortamına 0-70 mM konsantrasyonlarda $MgCl_2$, 0-14 mM konsantrasyonlarda KCl, 0-5 mM konsantrasyonlarda ADP ilave edilmiş ve uygun konsantrasyonları tespit edilmiştir. Deney ortamına FDP ilave edilmeden ve 0,01 M FDP ilave edilerek farklı PEP konsantrasyonlarında pirüvat kinaz aktiviteleri ölçülmüştür.

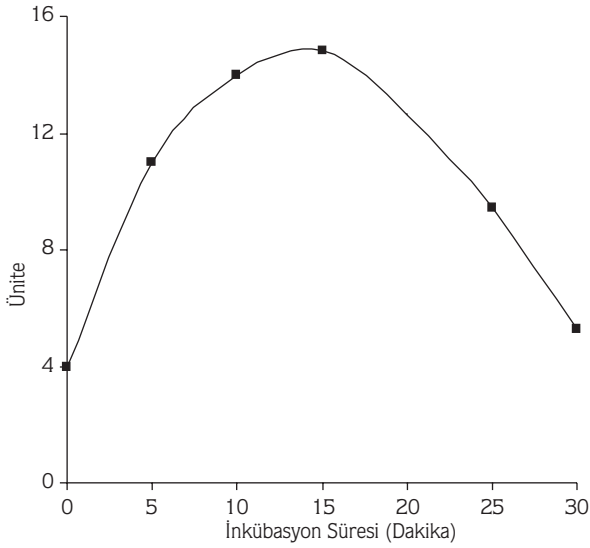
Bulgular

İnkübasyon süresi normal karaciğer dokusunda 15 dakika, diabetik karaciğer dokusunda ise 10 dakika olarak tespit edilmiştir (Şekil 1, 2). Pirüvat kinaz aktivitesinin ölçümü için en uygun pH normal karaciğer için 8, diabetik karaciğer için ise 7 olarak saptanmıştır (Şekil 3).

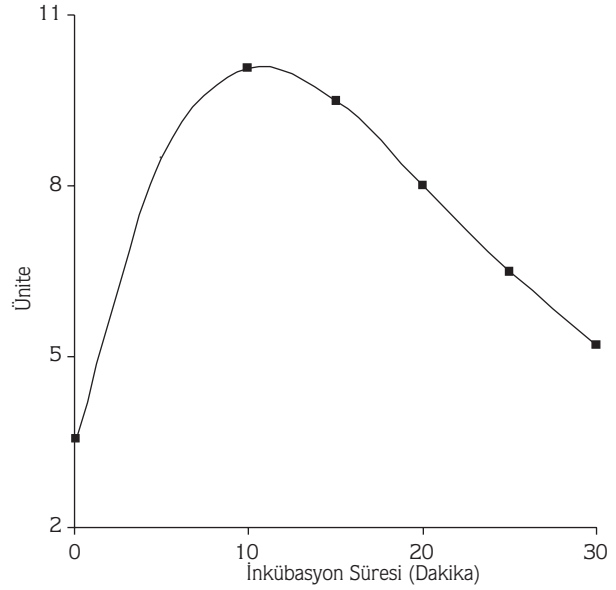
Şekil 4 ve 5'de görüldüğü gibi inkübasyon ortamının $MgCl_2$ içermediği durumda enzim aktivitesi düşüktür. İnkübasyon ortamına $MgCl_2$ 'ün ilavesi ile enzim aktivitesi belirgin olarak artmaktadır. Normal rat karaciğer doku pirüvat kinazı için optimal $MgCl_2$ konsantrasyonu 50 mM, diabetik karaciğer doku pirüvat kinazı için 30 mM olarak saptanmıştır.

Ortama KCl ilavesi ile enzimin aktivitesi artmaktadır. Normal ve diabetik karaciğer doku pirüvat kinazı için optimal KCl konsantrasyonu 8 mM olarak saptanmıştır (Şekil 6, 7).

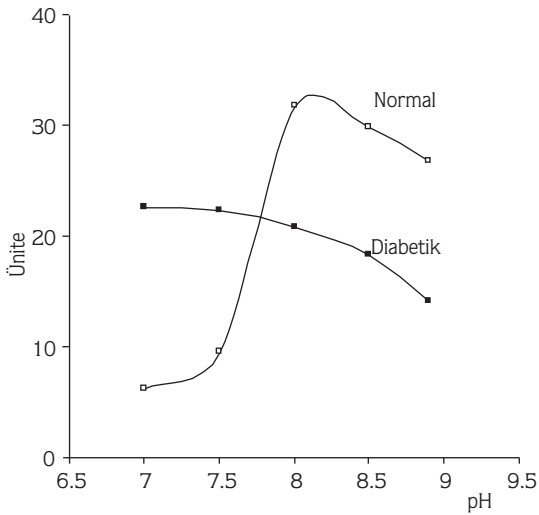
3 mM'lük adenosin-difosfat (ADP) varlığı ile normal rat karaciğer pirüvat kinaz aktivitesi 4,7 misli, diabetik ratların ise 2,5 misli artmıştır (Şekil 8, 9).



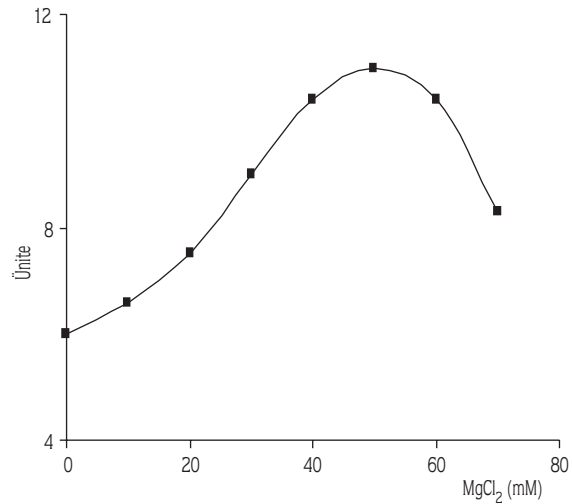
Şekil 1. Normal Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 2. Diabetik Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin İnkübasyon Süresine Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 3. Normal ve Diabetik Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinazının Optimal pH'sinin Saptanması .



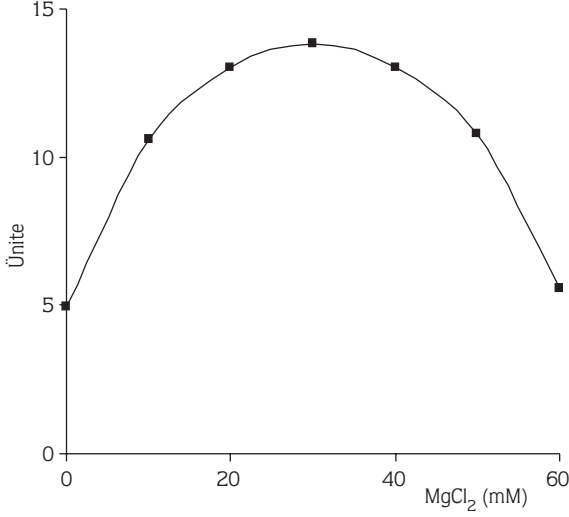
Şekil 4. Normal Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin MgCl₂ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

Normal karaciğer dokusunda pirüvat kinazının substratı PEP'e karşı Km'inin FDP varlığında 1,15 mM, FDP yokluğunda ise 2,2 mM; diabetik karaciğer dokusunda ise FDP varlığında 0,4 mM, yokluğunda ise 3,7 mM civarında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 1). FDP yokluğunda diabetik dokuda Km değerinin artması enzimin PEP'e affinitesinin azaldığını göstermektedir. Normal ve diabetik karaciğer dokusunda enzimin PEP'e olan ilgisi FDP yokluğunda sigmoidal eğri verirken

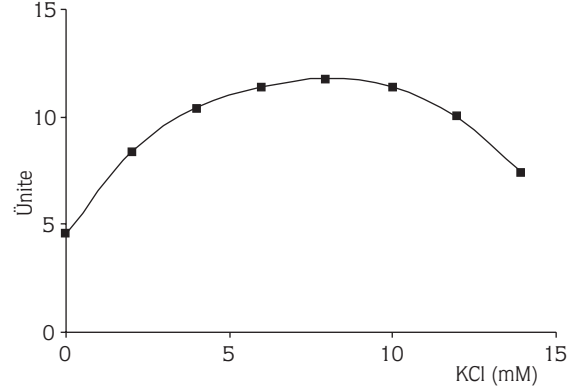
İnkübasyon ortamına FDP ilave edildiğinde bu eğri hiperbolik Michaelis-Menten kinetiğine dönüşmektedir. İnkübasyon ortamına FDP ilave edildiğinde PEP için Km değeri düşmüştür (Şekil 10, 11).

Tartışma

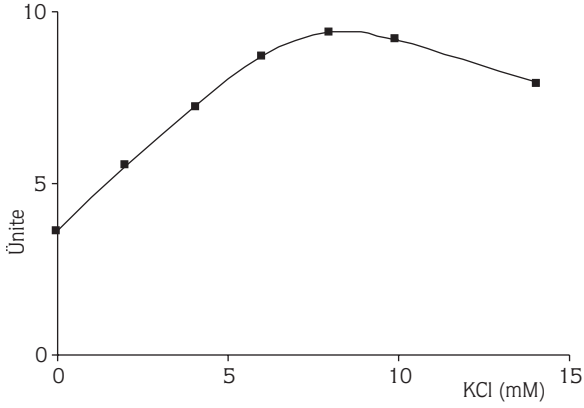
Deneysel diabetes mellitus oluşturulmuş ratlarda glikoz metabolizmasının etkilendiği ve diabetes mellitusa



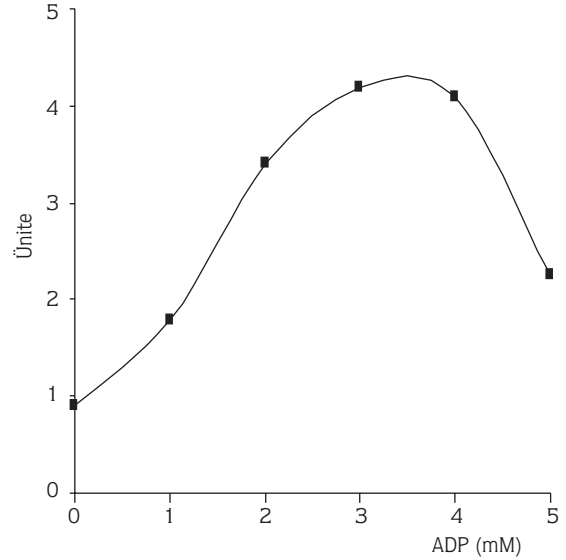
Şekil 5. Diabetik Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin $MgCl_2$ Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 6. Normal Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin KCl Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.



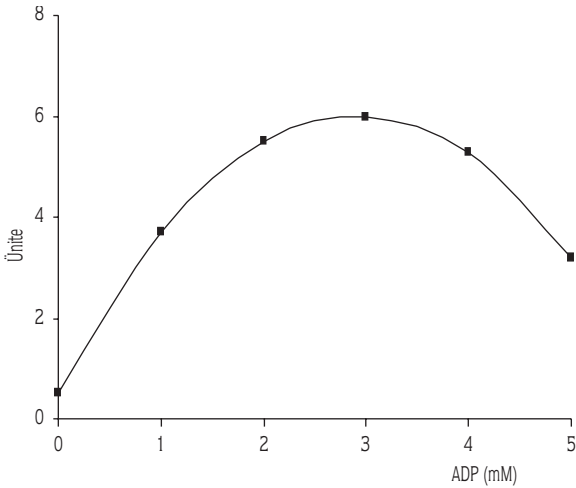
Şekil 7. Diabetik Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin KCl Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.



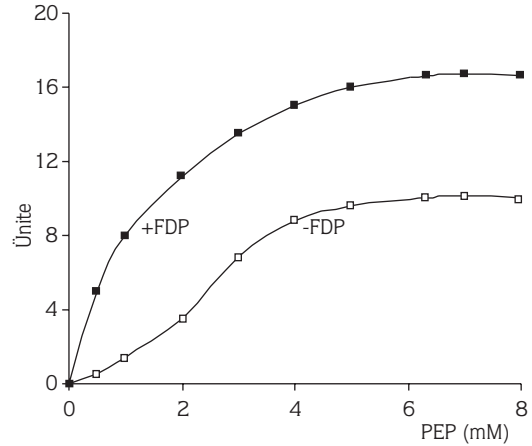
Şekil 8. Normal Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin ADP Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

bağlı olarak karaciğer pirüvat kinaz aktivitesinin azaldığı, böbrek pirüvat kinaz aktivitesinde ise günlere bağlı olarak değişikliklerin gerçekleştiği tespit edilmiştir (11). Diabette pirüvat kinaz aktivitesindeki azalma, pirüvat kinazın sentezindeki azalmadan kaynaklanabilir. Kontrol edilmeyen diabette insülin yokluğunun veya insülin sentez anormalliklerinin de pirüvat kinaz aktivitesi ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (14). Hepatomada, tiroid ve meme kanserlerinde pirüvat kinaz aktivitesinin normal dokulara göre arttığı bildirilmiştir (15-17).

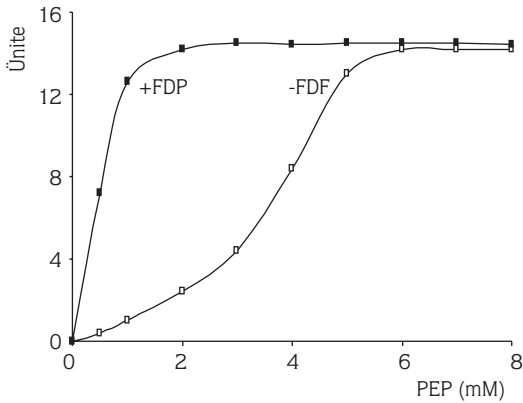
Pirüvat kinaz için optimal pH; sığır iskelet kasında 7,1, insan iskelet kasında 7,5, domuz kalp kasında 7,2, sığır beyinde 6,8-7,2 arasında bulunmuştur. M_1 tip pirüvat kinaz için optimal pH'nın 7,5, PEP eğrisinin hiperbolik; M_2 tip pirüvat kinaz için optimal pH'nın 6,9, PEP eğrisinin sigmoidal olduğu bildirilmiştir (8,18,19). Optimal pH normal rat karaciğer dokusunda 8, diabetik karaciğer dokusunda 7 olarak saptanmış, her iki karaciğer dokusunda da PEP eğrisi FDP yokluğunda sigmoidal bulunmuştur.



Şekil 9. Diabetik Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin ADP Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 10. Normal Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin PEP Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.



Şekil 11. Diabetik Rat Karaciğer Doku Pirüvat Kinaz Aktivitesinin PEP Konsantrasyonuna Bağlı Olarak Değişimi.

Tablo 1. Fruktoz 1,6 Difosfat Varlığında ve Yokluğunda Pirüvat Kinaz Enziminin Fosfoenolpirüvata Olan Km Değerleri.

	Normal Karaciğer Dokusu	Diabetik Karaciğer Dokusu
FDP (-)	2,2	3,7
FDP (+)	1,15	0,4

Pirüvat kinaz enziminin maksimal aktivite gösterebilmesi için Mg^{++} ve K^+ gibi bazı metal iyonlarına veya NH_4^+ iyonuna kofaktör olarak ihtiyacı vardır. Şekil 4-7'de görüldüğü gibi inkübasyon ortamına $MgCl_2$ ve KCl ilavesi pirüvat kinaz aktivitesini artırmıştır. Enzim ile substrat arasındaki etkileşim enzime bağlanan bu katyonlar vasıtası ile olmaktadır (20,21).

Domuz, sığır ve insanda düşük PEP konsantrasyonlarında FDP'nin L tip pirüvat kinazı önemli derecede aktive ettiği bildirilmiştir. Bu aktivasyon tavuk karaciğer, domuz böbrek, insan akciğer, köpek akciğer ve tümörleri, rat hepatoma ve rat karaciğerinde de meydana gelmektedir. FDP karaciğer, böbrek ve akciğerde pirüvat kinazı aktive etmekte, ayrıca PEP için Km değerini de

önemli derecede düşürmektedir (22-25). 0,01 M FDP ilavesi normal ve diabetik karaciğer pirüvat kinaz aktivitesini artırmış, Km değerini ise düşürmüştür.

Karaciğer dokusunda L, az miktarda da M_2 tip pirüvat kinaz izoenzimi bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda farklı türlerdeki enzim kaynaklarında pirüvat kinazın PEP'e karşı olan Km değerinin değiştiği açıklanmıştır. Birçok araştırmacı PEP için Km değerinin L tip pirüvat kinazda 0,4-2,5 mM arasında, M_2 tip pirüvat kinazda ise 0,2-0,8 mM arasında olduğunu bildirmişlerdir. M_2 tip pirüvat kinazın Km değeri L tipinkinden daha düşüktür (26-28). Pirüvat kinaz enziminin PEP'e karşı Km değerleri FDP varlığında normal karaciğer dokusunda 1,15 mM, diabetik dokuda 0,4 mM olduğunu görmekteyiz.

Kedryna ve ark. (29) ratlarda yaptıkları çalışmada normal rat karaciğer dokusu ve Ehrlich ascites tümöründen 2 tip pirüvat kinaz fraksiyonu ayırmışlardır. Fraksiyon A'yı % 21-30, fraksiyon B'yi % 51-60 arasında amonyum sülfat ile çöktürmüşlerdir. Saptanan karaciğer pirüvat kinazının A ve B fraksiyonları sırası ile L ve M₂ tip olarak kabul edilmiştir. Normal karaciğer dokusunda L tip pirüvat kinazın PEP için Km değerini 0,96 mM, M tipin Km değerini 0,7 mM olarak bulmuşlardır. Ehrlich ascites tümöründe ise Km değerini L tipte 0,45 mM, M tipte 0,19 mM saptamışlardır.

Ignacak ve Guminska (17) ratlara subkutan Morris hepatoma 7777 uygulayarak normal rat karaciğerinde ve hepatomasında 2 pirüvat kinaz fraksiyonu saptamışlardır. Normal rat karaciğerin L tip izoenzime benzetilen fraksiyon A sitozol aktivitesinin yaklaşık % 70'ini oluşturmaktadır. M₂ tip izoenzime benzetilen fraksiyon B ise sitozol aktivitesinin yaklaşık % 38'ini oluşturmaktadır. Normal karaciğerin ve hepatomanın A fraksiyonunda PEP için Km değerini 2,1 mM ile 0,75 mM olarak saptamışlardır. Normal karaciğer ve hepatoma pirüvat kinazının B fraksiyonu (M₂ tip) için Km değerini 1,40 mM, 0,55 mM bulmuşlardır. M₂ tip (fraksiyon B) L tip (fraksiyon A)'ten daha düşüktür. Hepatomada M₂ tip pirüvat kinazın substrata karşı affinitesinin arttığını

bildirmişlerdir. Diabetik rat karaciğer pirüvat kinazının Km değeri normal karaciğerden daha yüksek bulunmuştur. Bu da diabetik rat karaciğer pirüvat kinazının substratı olan PEP'e affinitesinin azaldığını göstermektedir.

Normal ve diabetik rat karaciğer doku pirüvat kinazının bazı optimal şartları belirlenmiş ve kinetik özellikleri incelenmiştir. Normal rat karaciğer pirüvat kinazının PEP için Km değeri ve pH'sı L tip pirüvat kinaz izoenzimine, diabetik rat karaciğer pirüvat kinazının PEP için Km değeri ve pH'sı ise M₂ tip pirüvat kinaz izoenziminin değerleri birbirine yakın olup, önemsiz farklılıklar bulunmuştur (26-29). Bu da kullanılan tampona, tamponun konsantrasyonuna, ısıya, saklama periyoduna ve hatta hayvanın diyetine bağlı olabilir. Diabetik karaciğer pirüvat kinazı PEP'e normal dokudaki izoenzimden daha az affinite göstermektedir. Glikolizis hızının azalması yalnız glikolizisin anahtar enzimi olan pirüvat kinaz aktivitesinin azalmasına değil, aynı zamanda enzimin ana substratı olan PEP'e affinitesinin azalmasına da bağlı olabilir. Diğer doku pirüvat kinaz izoenzimleri ile karşılaştırıldığında; normal rat karaciğer dokusundaki L izoenzimin diabetik karaciğer dokusunda azalarak M₂ izoenzime dönüşebileceği ve böylece diabetik hücrelerde izoenzimin değişebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Altuntaş, Y.: Diabetes Mellitus'un Tanımı, Tanısı ve Sınıflaması. Ed. Yenigün M. Her Yönüyle Diabetes Mellitus. Nobel Tıp Kitapevi. 51-67; 2001.
- Pilkis, S.J., El-Maghrabi, M.R., Clauss, T.H.: Hormonal Regulation of Hepatic Gluconeogenesis and Glycolysis. Annu. Rev. Biochem. 1988; 57: 755-783.
- Sochor, M., Kunjara, S., Baquer, N.Z., Mclean, P.: Regulation of Glucose Metabolism in Livers and Kidneys of NOD Mice. Diabetes. 1991; 40: 1467-1471.
- Kaloyianni-Dimitriades, M.G., Beis, I.D.: Purification, Catalytic and Regulatory Properties of Rana ridibunda Erythrocyte Pyruvate Kinase. Comp. Biochem. Physiol. 1984; 7B: 245-250.
- Muirhead, H.: Isoenzymes of Pyruvate Kinase. Biochem. Soc. Trans. 1990; 18: 193-196.
- Imamura, K., Taniuchi, K., Tanaka, T.: Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase. J. Biochem. 1972; 72: 1001-1015.
- Imamura, K., Taniuchi, K., Tanaka, T.: Multimolecular Forms of Pyruvate Kinase from Rat and Other Mammalian Tissues. J. Biochem. 1972; 71: 1043-1051.
- Kiffmeyer, W.R., Farrar, W.W.: Purification and Properties of Pig Heart Pyruvate Kinase. J Protein Chem. 1991; 10: 585-591.
- Reinacher, M., Eigenbrodt, E., Gerbracht, U., Zenk, G., Timmermann-Trosiener, I., Bentley, P., Waechter, F., Schulte-Hermann, R.: Pyruvate Kinase Isoenzymes in Altered Foci and Carcinoma of Rat Liver. Carcinogenesis. 1986; 7: 1351-1357.
- Oskam, R., Van Els, C.A., Rijksem, G., Staal, G.E.: Pyruvate Kinase Isoenzymes and Differentiation of (Neuro-) Ectodermal Tumours. Tumour Biol. 1985; 6: 75-87.
- Yılmaz, S., Üstündağ, B.: Streptozotosin ile Diabet Oluşturulan Ratların Karaciğer ve Böbrek Dokularında Pirüvat Kinaz Aktivite Düzeyleri. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 2002; 26: 549-553.
- Valera, A., Rodriguez-Gil, J.E., Bosch, F.: Vanadate Treatment Restores the Expression of Genes for Key Enzymes in the Glucose and Ketone Bodies Metabolism in the Liver of Diabetic Rats. J. Clin. Invest. 1993; 92: 4-11.
- Beutler, E., Blume, K.G., Kaplan, J.C., Löhr, G.W., Ramot, B., Valentine, W.N.: International Committee for Standardization in Haematology: Recommended Methods for Red-Cell Enzyme Analysis. Br. J. Haematol. 1977; 35: 311-340.

14. Saxena, A.K., Srivastava, P., Baquer, N.Z.: Effects of Vanadate on Glycolytic Enzymes and Malic Enzyme in Insulin-Dependent and -Independent Tissues of Diabetic Rats. *Eur. J. Pharmacol.* 1992; 1: 123-126.
15. Verhagen, J.N., Heijden, M.C.M., Dijken, J.J., Rijken, G., Kinderen, P.J., Unnik, J.A.M., Staal G.E.J.: Pyruvate Kinase in Normal Human Thyroid Tissue and Thyroid Neoplasms. *Cancer.* 1985; 55: 142-148.
16. Helmy, E., Unnik, A.M., Rijkse, G., Smits, G., Staal, J.: Cellular Expression of K-type Pyruvate Kinase in Normal and Neoplastic Human Tissues. *Cancer.* 1991; 68: 2595-2601.
17. Ignacak, J., Guminska, M.: Comparasion of Pyruvate Kinase Variants from Rat Liver and Morris Hepatoma 7777. Obtained by an Affinity Chromatography on Blue Sepharose CL-6B., *Acta Biochim. Pol.* 1993; 40: 261-267.
18. Cardenas, J.M., Dyson, R.D., Strandholm, J.J.: Bovine Pyruvate Kinases. I. Purification and Characterization of the Skeletal Muscle Isozyme. *J. Biol. Chem.* 1973; 248: 6931-6937.
19. Baranowska, B., Baranowski, T.: Pyruvate Kinase from Human Skeletal Muscle. *Mol. Cell. Biochem.* 1975; 6: 197-201.
20. Yılmaz, S.: İnsan Eritrosit ve Karaciğer Doku Pirüvat Kinazının Kinetik Özellikleri, Doktora Tezi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ, 1997.
21. Leon, O., Moran, A., Gonzalez, R: Purification and Characterization of Pyruvate Kinase from Muscle of the Sea Mollusc. *Concholepas. Com. Biochem. Physiol.*, 1982; 72B: 65-69.
22. Macfarlane, N., Ainsworth, S.: A Kinetic Study of Pig Pyruvate Kinase Activated by Fructose Diphosphate. *Biochem. J.* 1974; 139: 499-508.
23. Balinsky, D., Cayanis, E., Bersohn, I.: Comparative Kinetic Study of Human Pyruvate Kinases Isolated from Adult and Foetal Livers and from Hepatoma. *Biochemistry.* 1973; 12: 863-870.
24. Berglund, L., Humble, E.: Kinetic Properties of Pig Pyruvate Kinases Type A from Kidney and Type M from Muscle. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979; 195: 347-361.
25. Becker, K.J., Geyer H., Eigenbrodt, E., Schoner, W.: Purification of Pyruvate Kinase Isoenzymes Type M₁ and M₂ from Dog (*Canis Familiaris*) and Comparison of Their Properties with Those from Chicken and Rat. *Comp. Biochem. Physiol.* 1986; 83: 823-829.
26. Carbonell, J., Feliu, J.E., Marco, R., Sols, A.: Pyruvate Kinase. Classes of Regulatory Isoenzymes in Mammalian Tissues. *Eur. J. Biochem.* 1973; 37: 148-156.
27. Feliu, J.E., Diaz-Gil, J., Garcia-Canero, R., Gonsalvez, M.: Interconvertible Forms of Class A Pyruvate Kinase from Ehrlich Ascites Tumour Cells. *FEBS Lett.* 1975; 50: 334-338.
28. Balinsky, D., Cayanis, E., Bresohn, L: Enzymes of Carbohydrate Metabolism in Rat Hepatoma Induced by 3'-Methyl-4-Dimethylaminoazobenzene. *Biochemistry.* 1972; 12: 863-870.
29. Kedryna T., Guminska M., Marchut E.: Pyruvate Kinase from Cytosolic Fractions of the Ehrlich Ascites Tumour, Normal Mouse Liver and Skeletal Muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990; 1039: 130-133.