

BAZI HEMATOLOJİK BOZUKLUKLARDA ERİTROSİT PİRUVAT KİNAZ (PK) ENZİMİ DÜZEYİ ARAŞTIRILMASI

E. ULAKOĞLU*

E. KÖKOĞLU**

G. AKTUĞLU***

ÖZET

Eritrosik PK enzimi eksikliği akut lösemi, kronik lenfoid lösemi ve polistemia veralı olgularda kalitatif yöntemle incelenmiştir.

Akut lösemide PK enzim düzeyinin araştırılması, akut lenfoblastik lösemiler ile geniş akut non lenfoblastik lösemiler grubunun birbirinden ayırdedilmesinde histoşimik ve morfolojik özelliklerle ek olarak enzimler açısından yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

SUMMARY

RED CELL PYRUVATE KINASE (PK) ENZYME LEVELS IN SOME HEMATOLOGICAL DISORDERS

Red cell pyruvate enzyme deficiency was qualitatively studied among acute leukemia, chronic lymphocytic leukemia and polycythemia vera cases.

The detection of PK enzyme level in akute leukemia may be helpful in differentiating acute lymphoblastic leukemias from acute non lymphoblastic leukemias beside histochemical and morphological differences.

GİRİŞ

Nukleus, mitokondri, ribozom ve diğer organellerden yoksun olan olgun eritrosit, hücre replikasyonu, protein sentezi, Krebs döngüsü ve oksidatif fosforillenme gibi hücresel işlevleri göremez. Bu nedenle, sınırlı da olsa, metabolik gereksinimlerini glikolitik yoldan adenozin trifosfatı (ATP) sentezleyerek elde eder.

* I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Ana Bilim Dalı (M. Sc. Dr.).

** I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi (Prof. Dr.),
— İSTANBUL.

*** I.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Ana Bilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı
Öğretim Üyesi (Prof. Dr.), — İSTANBUL.

Piruvat kinaz enzimi (ATP: piruvat fosfotransferaz; EC 2.7. 1.40; PK) Embden-Meyerhof glikoliz yolunda ATP oluşumunu sağlayan iki enzimden biri olup eksikliği ciddi metabolik bozukluklara yol açar. Bu enzimin aktivitesi, substratları olan fosfoenol piruvat (PEP) ve adenozin difosfat (ADP), kofaktörü Mg^{+2} ve K^{+} iyonları, ürünleri piruvat ve ATP ile sınırlanmaktadır. Birçok araştırmacı tarafından enzim saf olarak elde edilmiş ve 220 000 moleküler ağırlıklı bir tetramer olduğu saptanmıştır (2, 4).

Hemolitik aneminin glikolitik enzimopatilerden ileri geldiği ilk defa Valentine, Tanaka ve Miwa tarafından ortaya konduktan sonra, eritrosit glikolizi üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (14) Eritrositlerde PK enzimi eksikliği, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi eksikliğinden sonra en sık rastlanılan bir eritrosit enzimopatidir (2). PK eksikliğine bağlı kalıtsal enzimopatilerden non sferositik konjenital hemolitik anemi ise glikoliz yolunun doğuştan bozukluğuna ait ilk ve en önemli olanıdır (11, 14).

“Edinsel” olarak adlandırılan eritrosit PK enzimi eksikliği ise ilk defa Bock ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir (5). Bundan sonra yapılan çalışmalarla, anomalinin çeşitli hematolojik bozukluklarda ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bunlar: sideroblastik anemi, primer medüller yetersizlik, akut lösemi, prelösemi, çocukluk dönemi kronik idiopatik pansitopenisi ve paroksizmal noktürnal hemoglobinüri gibi bozukluklardır (1, 12, 15).

Biz eritrosit PK enzimini kalitatif olarak akut lösemili (AL) olgularla (akut lenfoblastik lösemi “ALL” ve akut non lenfoblastik lösemi “ANLL”) kronik lenfositik lösemili (KLL) ve polistemia veralı (PV) olgularda araştırdık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız bir grup normal olgu ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hematoloji Servisine yatırılmış AL (ALL ve ANLL), KLL ve PV tanılı konmuş olgularda yapılmıştır. ANLL’li olgular FAB sınıflanmasına göre M_1 , M_2 , M_4 grubundan olup, bunlar tek tek ayrılmamış, aynı grup içinde incelenmişlerdir.

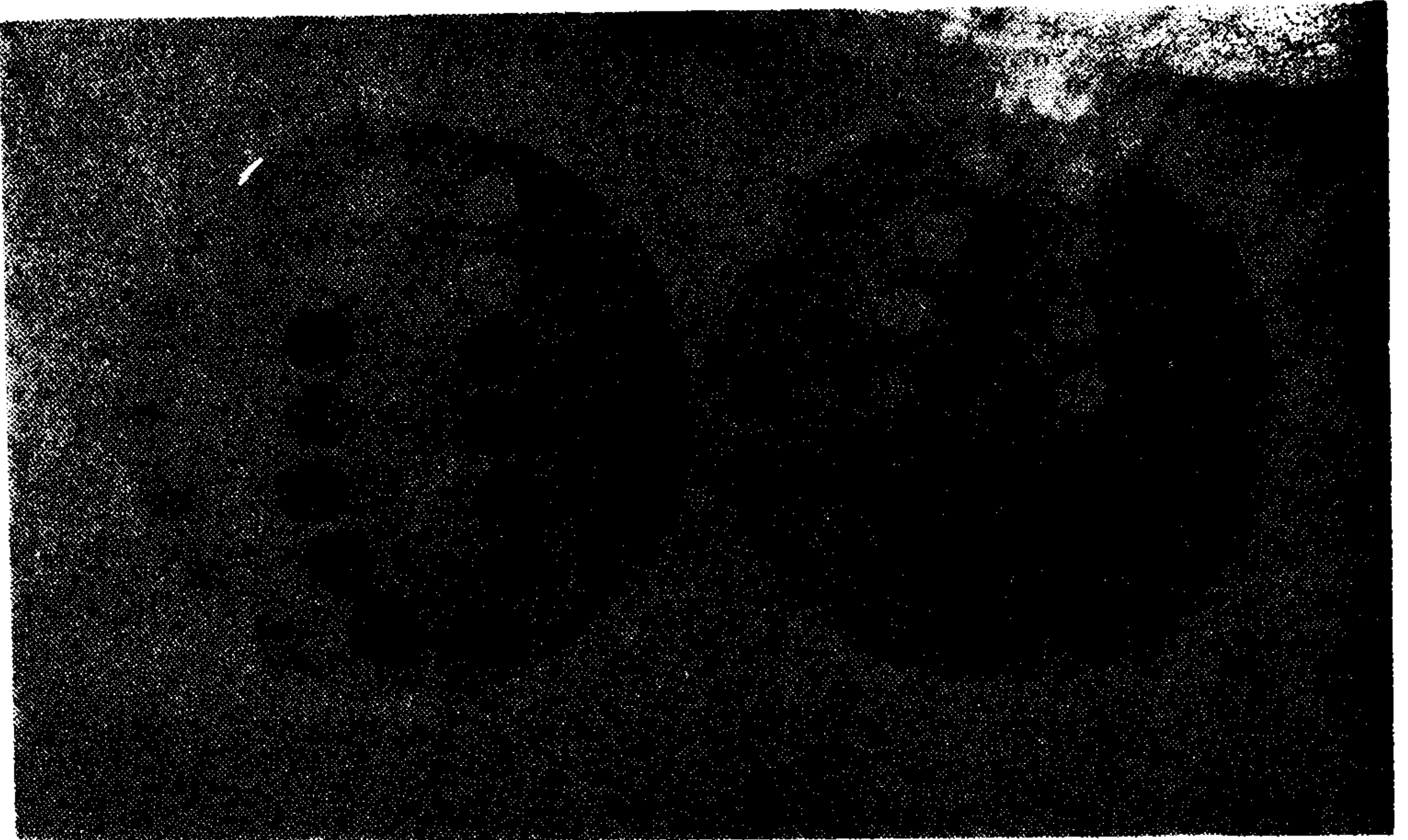
Hastaların seçiminde transfüzyon yapılmamış olmalarına özen gösterilmiş, daha önce zaman zaman transfüzyon uygulanan birkaç hastadan ise en az 3 ay içinde transfüzyon yapılmamış olanlar seçilmiştir. Tüm tetkikler hastalara ilaç uygulanmasına başlanmadan yapılmıştır. Ayrıca ANLL’li 4 olgunun birinci dereceden yakınlarının da PK enzimi incelemeleri yapılmıştır.

Test için heparinle alınan venöz kan örneklerinden plazma ayrılıp "buffy coat" dikkatle aspire edildi. Eritrositler 0.15 M NaCl çözeltisiyle 3 defa yıkandıktan sonra, bu çözeltiyle % 20'lik süspansiyonları hazırlandı. Eritrosit PK incelenmesi Sigma'dan sağlanan kalitatif screening test aracılığı ile Beutler'in yöntemi uygulanarak saptandı (3).

1 hacim hücre süspansiyonu (0.02 ml), 10 hacim (0.2 ml) reaksiyon karışımına ilave edildi. Bu karışımdan derhal filtre kâğıtları üzerine spotlama yapılarak, karışım her 5 dakikalık zaman aralığında 30 dakika süresince filtre kâğıdına uygulandı ve 37°C'da inkübe edildi. Spotlar kurduktan sonra karanlık bir odada 320-420 nm dalga boyundaki ultraviyole ışık altında filtre kâğıdı incelendi.

BULGULAR

Normal örneklerde floresans belli bir süre sonunda kaybolurken, PK enzimi eksikliklerinde eksiklik derecesine göre daha geç kaybolmaktadır Şekil 1.



Şekil 1. Normal ve Akut Myeloblastik Lösemili 2 olgunun 5'er dakikalık inkübasyon aralıklarında filtre kağıdı üzerinde uzun dalga boylu UV ışık altında floresans kaybının gözlenmesi.

Normal 7 olgunun 5'inde floresans 5. dakikada, sadece 2'sinde 10. dakikada da devam etmektedir. Bundan sonraki dakikalarda hiçbir normalde floresans saptanmamıştır. Tablo 1

Tablo 1. Normal olgularda değişik zaman aralıklarında floresans kaybı.

Grup	Olgu No	Cins	Yaş	Hmt %	Floresans Varlığı (Dakika)					
					0	5	10	15	20	25
Normal	1	K	28	42	+	+	—	—	—	—
	2	E	36	43	+	—	—	—	—	—
	3	K	24	44	+	—	—	—	—	—
	4	K	37	40	+	+	+	—	—	—
	5	E	42	44	+	+	—	—	—	—
	6	E	35	41	+	+	—	—	—	—
	7	E	60	41	+	+	—	—	—	—
Ortalama			37	42						
Yüzde %					100	71.4	28.6			

ALL'li 7 olgudan 5'inde floresans 5. dakikada, sadece 1'inde 10. dakikada devam etmiştir. Tablo II

Tablo 2. ALL'li olgularda değişik zaman aralıklarında floresans kaybı.

Grup	Olgu No	Cins	Yaş	Hmt %	Floresans Varlığı (Dakika)					
					0	5	10	15	20	25
ALL	1	K	19	29	+	+	—	—	—	—
	2	E	18	24	+	+	—	—	—	—
	3	K	37	33	+	—	—	—	—	—
	4	K	16	36	+	+	+	—	—	—
	5	E	34	30	+	+	—	—	—	—
	6	E	29	35	+	—	—	—	—	—
	7	K	25	30	+	+	—	—	—	—
Ortalama			25	31						
Yüzde %					100	71.4	14.3			

ANLL'li 9 olgudan 9'unda da floresans varlığı 5. dakikada kaydedilmiş, 7'sinde 10. dakikada, 3'ünde 15. dakikada, 1'inde ise 20. dakikada da devam etmiştir. Tablo III

KLL'li 7 olgudan 6'sında floresans 5. dakikada, 2'sinde ise 10. dakikada gözlenmiştir. Tablo IV

PV'lı 7 olgudan sadece 3'ünde floresans 5. dakikada devam etmiştir. Diğer zaman aralıklarında hiçbir floresans gözlenmemiştir. Tablo V

Tablo 3. ANLL'li olgularda değişik zaman aralıklarında floresans kaybı.

Grup	Olgu No	Cins	Yaş	Hmt %	Floresans Varlığı (Dakika)					
					0	5	10	15	20	25
ANLL	1	K	42	28	+	+	+	—	—	—
	2	E	32	20	+	+	+	+	—	—
	3	E	34	16	+	+	+	+	+	—
	4	E	46	21	+	+	+	—	—	—
	5	K	24	16	+	+	+	—	—	—
	6	E	26	21	+	+	+	+	—	—
	7	K	60	22	+	+	—	—	—	—
	8	E	35	37	+	+	—	—	—	—
	9	K	19	30	+	+	+	—	—	—
Ortalama			35	23						
Yüzde %					100	100	77.8	33.3	11.1	

Tablo 4. KLL'li olgularda değişik zaman aralıklarında floresans kaybı.

Grup	Olgu No	Cins	Yaş	Hmt %	Floresans Varlığı (Dakika)					
					0	5	10	15	20	25
KLL	1	E	45	42	+	—	—	—	—	—
	2	E	62	33	+	+	—	—	—	—
	3	E	61	25	+	+	+	—	—	—
	4	K	58	33	+	+	—	—	—	—
	5	K	80	28	+	+	+	—	—	—
	6	E	50	31	+	+	—	—	—	—
	7	E	57	37	+	+	—	—	—	—
Ortalama			59	33						
Yüzde %					100	85.7	28.6			

Tablo 5. PV'lı olgularda değişik zaman aralıklarında floresans kaybı.

Grup	Olgu No	Cins	Yaş	Hmt %	Floresans Varlığı (Dakika)					
					0	5	10	15	20	25
PV	1	K	16	45	+	+	—	—	—	—
	2	K	65	47	+	+	—	—	—	—
	3	E	42	57	+	—	—	—	—	—
	4	K	55	58	+	—	—	—	—	—
	5	K	64	64	+	—	—	—	—	—
	6	E	69	50	+	—	—	—	—	—
	7	K	64	52	+	+	—	—	—	—
Ortalama			54	53						
Yüzde %					100	42.8				

Ayrıca ANLL'li bazı hastaların birinci derecedeki yakınlarının eritrositlerinde PK aktivitesinin normallerle benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Bu grupta olgu sayısı az olduğu için %'ler verilmemiştir. Tablo VI.

Tablo 6. ANLL'li olguların birinci dereceden yakınlarında değişik zaman aralıklarında Floresans kaybı.

Grup	Olgu No	Cins	Yaş	Hmt %	Floresans Varlığı (Dakika)					
					0	5	10	15	20	25
ANLL	1	K	50	43	+	—	—	—	—	—
	2	K	49	42	+	—	—	—	—	—
	3	E	61	43	+	+	—	—	—	—
	4	K	56	44	+	+	—	—	—	—

Olguların yaşları, hematokrit değerleri ve bu değerlerin ortalamaları da tablolarda verilmiştir. PK enzimi değerleri ile bu kriterler arasında bir uygunluk saptanamamıştır.

İRDELEME

Eritrositlerde PK enzim aktivitesinin azalması en sık raslanılan enzimopatilerden biridir. FAB sınıflamasına göre akut non lenfoblastik lösemiler grubunun alt sınıflarından biri olan akut myeloblastik lösemide (AML) ise bu eksiklik edinsel bir anormali olarak bildirilmiştir (1, 11, 12).

Edinsel PK enzimi eksikliği mekanizması bugün tam olarak bilinmemekte ve konu ile ilgili birçok görüşler ileri sürülmektedir. Arnold ve ark. (1) AML'li ve normal kişilerin izolog plazmalarında yaptıkları çapraz deneylerle, hastalıklı kişilerin plazmalarında PK enzimini inaktive edici bir ajanın bulunduğu sonucuna varmışlardır. Bir başka grup araştırmacı ise (1, 9, 12, 16, 17) edinsel enzimopatilerden sorumlu olarak normal enzim proteininde meydana gelmiş olabilecek post-translasyonel değişimi ileri sürmüştür. Boivin (6) ve Hakim (8) PK eksikliğini enzim aktivitesinin düzenleyici mekanizmasındaki bir bozukluğa, bir başka grup araştırmacı ise (1, 10) defektif protein sentezine bağlı kromozomal mikrolezyonların oluşumuna bağlamışlardır.

Bu hipotezlerden bugün en çok desteklenen post-translasyonel değişikliğe ait olanıdır. AML'li kişilerin myeloblastlarında bulunan bir yıkıcı faktör, normal genç enzimi yaşlanmış şekle sokmakta, bu da kısmi enzim inaktivasyonuna neden olmaktadır (13).

Akut lösemili grupta yaptığımız çalışmaya literatürle uyum göstermektedir (7, 12). Gerek normal ve gerekse ALL'li olguların % 71.4'ünde 5. dakikada floresans saptanmışken, ANLL'li olguların % 100'ünde 5. dakikada % 77.8'inde 10. dakikada, % 33.3'ünde 15. dakikada ve % 11.1'inde de 20. dakikada floresans gözlememiz bu belirgin farkı ortaya koymaktadır. Bu olguların birinci derecedeki yakınlarında aktivite azlığını saptamamız da olayın edinsel olduğunu desteklemektedir.

KLL'li olgular da, ALL'li olgular gibi normallerle benzerlik göstermektedir. Bu bulgular literatür bulgularına uymaktadır (7).

Myeloproliferatif hastalıklardan PV'da ise normallerden daha erken sürede floresans kaybı dikkati çekmektedir. Bu olguların yalnız % 42.8'i 5. dakikada floresans göstermekte, diğer zaman aralıklarında floresans vermemektedirler. Bu bulgu da bize hastalarda enzim aktivitesinin literatürde de bildirilmiş olduğu gibi (7) artmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuda kantitatif çalışmalarımıza devam etmekteyiz.

Biz de eritrositlerde bu edinsel enzim eksikliğinin ANLL grubunda daha belirgin olmasının Paglia ve arkadaşlarının (13) ileri sürdüğü gibi myeloblastlarda var olan ve enzim inaktivasyonuna yol açacak bir faktör varlığından ileri geldiğini düşünmekteyiz.

Elde ettiğimiz sonuçlar, akut lösemide PK enzim eksikliğinin kalitatif yoldan da olsa, araştırılmasının en azından ALL'ler ile geniş ANLL'ler grubunun birbirinden ayırdedilmesinde, diğer histoşimik ve morfolojik farklılıklar yanında enzimler arasında yardımcı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Arnold, H., Blume, K.G., Löhr, G.W., Boulard, M. and Najean, Y.:** *Acquired red cell enzyme defects in hematological diseases.* Clin. Chim. Acta 57: 187, 1974.
2. **Bernard, J., Levy, J.P., Varet, B.:** *Enzymopathies du globule rouge: le déficit constitutionnel en pyruvate kinase.* Hematologie. Flammarion Medicine Science, Paris, 1981, p. 674
3. **Beutler, E.:** *A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6 phosphate dehydrogenase deficiency and glutathion reductase deficiency.* Blood, 24 (4): 553, 1966.
4. **Blume, K.G., Hoffbauer, R.W., Busch, D., Arnold, H. and Löhr G.W.:** *Purification and properties of pyruvate kinase deficient human red blood cells.* Biochim. Biophys. Acta 227: 364, 1971.
5. **Bock, H.E., Waller, H.D., Löhr, G.W. and Karges, O.:** *Besonderheiten im ferment-gehalt von megolcyten.* Klin. Wochenschr. 36: 151, 1958.

6. **Boivin, P., Galand, C., Hakim, J. and Kahn, A.:** *Acquired red cell pyruvate kinase deficiency in leukemias and related disorders.* Enzyme 19; 294, 1975.
7. **Boivin, P., Galand, C., Hakim, J. and Kahn, A.:** *Acquired erythroenzymopathies in blood disorders: study of 200 cases* Br. J. Haematol. 31: 591, 1975.
8. **Hakim, J., Boivin, P., Boucherot, J. and Troube, H.:** *Blood granulocyte abnormalities in refractory anaemias.* Lancet 1; 37, 1973.
9. **Kahn, A., Marie, J. et al.:** *Mecanisms of the acquired erythrocyte enzyme deficiencies in blood diseases.* Clin. Chim. Acta 71: 379, 1976.
10. **Kahn, A., Boivin, P., Vroclano, M. and Hakim, J.:** *Erythroleucémie avec double population érythrocytaire: coexistence dans une même population d'un affaiblissement d'un antigène de groupe, d'un déficit majeur en adénylate kinase et d'une augmentation de la fraction A₂ de l'hémoglobine.* Nouv. Rev. Fr. Hematol.: 12: 609, 1972.
11. **Keitt, S.A.:** *Pyruvate kinase deficiency and related disorders of red cell glycolysis.* Amer. J. of Med. 41: 762, 1966.
12. **Labar, B., Stavljenic, A. and Jusufhodzic, L.:** *Red cell pyruvate kinase in acute leukemia.* Enzyme 32: 178, 1984.
13. **Paglia, D.E., Valentine, W.N.:** *Evidence for molecular alteration of pyruvate kinase as a consequence of erythrocyte aging* J. Lab. Clin. Med. 76: 202, 1970.
14. **Valentine, W.N., Tanaka, K.R., Miwa, S.:** *Specific erythrocyte glycolytic enzyme defect (pyruvate kinase) in three subjects with congenital non spherocytic hemolytic anemia.* Trans. Ass. Amer. Physicians 74: 100, 1961.
15. **Valentine, W.N., Konrad, P.N., Paglia, D.E.:** *Dyserythropoiesis, refractory anemia and "pre-leukemia": metabolic features of erythrocytes.* Blood, 41 (6): 857, 1973.
16. **Van Berkel, J.C., Staal, G.E.J. et al.:** *On the molecular basis of pyruvate kinase from pyruvate kinase deficient patients* Biochim. Biophys. Acta 334: 361, 1974.
17. **William, C., Mentzer, J.R.:** *Pyruvate kinase deficiency and disorders of glycolysis. Anemias: Disorders of red cell structure and function. Hematology of Infancy and Childhood.* (Ed. Nathan, G.D. and Oski, F.A.) Chapter 17, Second edition. Saunders Company, Philadelphia, 1981, p. 566.