

Sağlıklı Çocuklarda İnsülin Reseptör Düzeyleri

Dr. İbrahim Erkul*, Dr. Dursun Odabaş**

ÖZET

Yaşları 9 ile 17 yıl arasında değişen sağlıklı 13 çocukta dolaşan lenfositlerde insülin reseptör düzeyleri araştırıldı ve % 9,10 ile % 11,81 arasında bulundu. Bulunan değerler erişkinlerdeki insülin reseptör düzeylerine göre yüksekti.

SUMMARY

Insulin receptor levels in healthy children.

Insulin receptor binding and levels on circulating lymphocytes in 13 healthy children. Their ages were changing between 9-17 years. The insulin binding rate (insulin receptor level) was found between 9,10 percent and 11,81 percent. The finding results were higher than in adults.

* : S.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğr. üyesi, Prof.Dr.

** : S.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Öğr. üyesi, Yrd.Doç.

GİRİŞ

HücreSEL düzeyde, moleküler biyoloji ve biyokimyasal alanda gerçekleşen son gelişmelerle hormonların hedef organlardaki spesifik etkilerini gösterebilmeleri için oluşan birçok mekanizma aydınlanmış bulunmaktadır. Hormonlar ile hücrelerin spesifik komponentleri arasındaki ilişkilerin kapsamlı olarak anlaşılması bazı patolojik durumlardaki temel bozukluğun da ortaya çıkarılmasına neden olmuştur.

Genel olarak polipeptit hormonların hücreler ile ilk reaksiyonları, hücrelerin yüzey membran komponentleri olan reseptörler ile ortaya çıkmaktadır. Bu grup hormonlara insülin, glukagon, parathormon, tirotropin, büyüme hormonu, gonadotropin ve ACTH örnek olarak verilebilir. Diğer bir kısım hormonlar da hücre zarından pasif diffüzyonla geçerek hücre içi reseptörlere bağlanmakta ve daha sonra spesifik etkilerini göstermektedirler. Bu gruba da steroid ve $1,25(OH)_2$ vitamin D örnek olarak verilebilir (1,2).

Hormonların fizyolojik etki yollarının iyi bilinmesi fizyopatolojik durumların da açıklanabilmesine kolaylık sağlayacaktır. Bu nedenle çalışmamızda insülinin hedef hücrelere bağlanmasını sağlayan reseptör düzeyini belirleyebilmek, dolayısıyla da insülin ile ilgili patolojik durumlarda reseptör afinitelerinin etkilerinin incelenmesine uygun bir zemin hazırlama amacı güdülmüştür.

MATERYAL ve METOD

Çalışma 1977 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda başlamış ve 1987 yılında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı

ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda tamamlanmıştır. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için öykü ve fizik muayene ile herhangi bir hastalığı olmayan 13 sağlıklı çocuk araştırmaya alınmıştır. Bunların 9'u erkek, 4'ü kız çocukları idiler. Yaşları 9-17 yıl arasında değişmekte olup, yaş ortalamaları 13.1 idi.

Çalışmada:

1- Bütün vakalarda deneyler sabahları aç karnına olmak üzere alınan örneklerde yapıldı. Vakaların kan şekerleri, idrar şeker ve asetonlarına bakıldı. Kan şekeri ölçümleri Somogy-Nelson yöntemi ile, idrar şekerlerine Clinitest* tablet ve idrar asetonlarına da Acetest** tablet kullanılarak bakıldı (3).

2- Çalışmaya alınan bütün vakalarda bir gece önce saat 21'deki kahvaltıyı izleyen 10-12 saatlik açlıktan sonra lenfositlerdeki insülin reseptörleri çalışması için 40 ml heparinize kan alındı.

3- Alınan venöz kandan izole edilen lenfositlerde Olefsky ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemle göre insülin reseptör düzeylerinin ölçümü yapıldı (4). Lenfositlerin izolasyonu ve bu işlemde kullanılan Ficoll-Hypaque solüsyonunun hazırlanmasında Böyum'un yöntemi uygulandı (5). Hazır Ficoll-Hypaque solüsyonundan 75 mm x 15 mm' lik plastik tüplere 3 ml konup, üzerlerine yarıyarıya serum fizyolojik ile sulandırılmış heparinize kandan Pastör pipeti ile tabaka yapacak şekilde ilâve edildi. Tüpler 400xG devirde (International Refrigerated Centrifuge Model PR-6) 20°C'de 30 dakika çevrildi. Santrifüj sonunda tüplerde dört tabaka oluştu. En üstte serum fizyolojik ve plazma, hemen onun altında bulanık olarak görünen halkalanmış lenfosit tabakası, daha altta Ficoll-Hypaque ve en altta da eritrositler ve granulositler vardı.

* : Clinitest tablet: Ames Company Division of Miles Laboratories ltd. England.

** : Acetest tablet: Ames Company Division of Miles Laboratories ltd. England.

Lenfosit tabakası Pastör pipeti ile taksimetrelili tüplere alındı. Bu süspansiyon 3 kere 25 mM Tris* tamponu ilâve edilerek 200 x G devirde 20°C' de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı. Son santrifüjde çökeleğin üzerindeki sıvı dökülerek elde edilen lenfosit çökeleği 25 mM Tris tamponu ile 1 ml ye tamamlanarak yeniden süspansiyon haline getirildi. Lenfosit süspansiyonu Neubauer sayma kamerasında sayılarak ml'de 50×10^6 hücre olacak şekilde tamponla sulandırıldı. Aynı zamanda Wright ile yayma yapılarak hücre türleri iyece belirlendi. Daha sonra trypan mavisini ile canlılık testi yapıldı. Hazırlanan ve canlılığı gösterilen hücre süspansiyonu % 2' den az granülosit, % 4'den az monosit ve geri kalan hücreler de canlı lenfositlerden oluşuyordu.

Çalışma sırasında yurtdışından hazır olarak temin edilen biyolojik olarak aktif monoiodoinsülin kullanıldı. Bu ^{125}I -İnsülinin** spesifik aktivitesi 100-200 microCi/microg. olup, 1 ml'de biyolojik olarak aktif 20 ng insülin içeriyordu. Soğuk insülin olarak da monokomponet domuz insülini*** kullanıldı. Bunun da 1 ml'sinde 40 ünite kristalize insülin vardı.

Bağlanma çalışması için sayılan (50×10^6 hücre/ml) ve canlılığı gösterilen lenfosit süspansiyonu kapaklı plastik tüplere kondu. Üzerlerine 0,5 ml (25 mM Tris + % 1 sığır serum albumin) tampon eklendi. 15°C'lik su banyosunda 100 dakika enkübe edildi. Ortamın son pH'ı 7,6 idi. Bütün deneylerde ortam pH'ı, enkübasyon süresi ve hücre sayısı sabit tutuldu (4,6,7). 1 ml hücre süspansiyonu içeren tüpler I, II, III diye numaralandırıldı. Bütün tüplere 1 ng ^{125}I -İnsülin (24 mikroünite) ilâve edildi. Bu doz bütün deneylerde sabit tutuldu (8). I numaralı tüpe yalnız ^{125}I -İnsülin konurken, II ve III numaralı tüplere ^{125}I -İnsüline ek olarak soğuk insülin de konarak deneydeki özgül olmayan bağlanma ihtimali ortadan kaldırıldı.

Bu işlem için II numaralı tüpe 0,5 ng (12 mikroünite) soğuk insülin ve III numaralı tüpe de 1000 ng (24.000 mikroünite) soğuk insülin ilâve edilerek bağlanmanın inhibisyonu sağlandı. 1000 ng soğuk insülin konan tüpteki bağlanmanın özgül olmadığı kabul edildi (9). 100 dakikalık enkübasyon sonunda yeniden trypan mavisıyla canlılık testi yapıldı. Bağlı ve serbest insülin Rodbell ve arkadaşlarının yöntemine göre ayrıldı (10). Deneyin bu döneminde her üç tüpten ayrı ayrı çift örnekleme ile plastik monotüplere 200 mikrolitre hücre süspansiyonu konup üzerlerine tabaka yapacak şekilde 150 mikrolitre iyice soğutulmuş tampon (25 mM Tris + % 2 sığır serum albumin) eklendi. Mikrotüpler 200 x G devirde 2 dakika süre ile +4°C' de çevrildi. Santrifüj sonunda tüplerdeki ¹²⁵I oto-matik gama sayacında 1 dakika sayıldı. Böylece tüplerdeki total radyoaktivite ortaya çıktı. Tüplerdeki çökelek üstü (süpernatant) Pastör pipeti ile alındı. Tüplerde yalnız lenfosit çökeleği kaldı. İkinci kez ¹²⁵I gama sayacında 1 dakika sayılarak lenfositlere bağlanmış olan ¹²⁵I-insülin bulunmuş oldu. 1 dakikalık sayım süresince tüplerdeki total radyoaktivite sayımı ile lenfosit çökeleğindeki sayım ayrı ayrı yapılarak lenfositlere bağlanan radyoaktif insülinin yüzdesi hesaplandı. Lenfositlere bağlanan radyoaktif insülin lenfositlerdeki boş reseptör sahalarını gösterdiği için bağlanan radyoaktivite bağlanma afinitesi yüzdesi olarak veya insülin reseptör düzeyi olarak ifade edildi.

Çalışmada elde edilen bulgular gerekli istatistik yöntemleri kullanılarak karşılaştırıldı. İstatistiksel yöntemde ortalamalar arası farkın önem kontrolü testi uygulandı (11).

BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen verileri aşağıdaki şekilde özetleyebiliriz:

Çalışma grubunda açlık kan şekerleri düzeyleri 50-80 mg/dl arasında değişmekte olup, ortalama 65 mg/dl idi. Vakaların hiçbirinde idrarda glikoz veya aseton tespit edilmemiştir. Lenfositlerdeki insülin bağlanma yüzdesi (reseptör düzeyleri) % 9,10 ile % 11,81 arasında olup, ortalama bağlanma yüzdesi $10,38 \pm 0,238$ olarak bulunmuştur. Çalışma grubundaki değerler tablo 1'de gösterilmiştir.

Vaka No	Lenfositlerdeki insülin bağlanma yüzdesi	Açlık kan şekeri(mg/dl)	İdrarda Glikoz	Aseton
1	11,81	50	-	-
2	10,19	50	-	-
3	11,60	80	-	-
4	9,71	63	-	-
5	9,28	53	-	-
6	10,96	70	-	-
7	9,93	63	-	-
8	10,35	60	-	-
9	9,10	60	-	-
10	10,67	80	-	-
11	9,63	76	-	-
12	11,28	71	-	-
13	10,38	69	-	-
Ortalama	10,38 \pm 0,238	65 \pm 2,89		

TABLO 1: Çalışma grubunun bireysel değerleri.

TARTIŞMA

Çalışma süresince hücre olarak lenfositler kullanılmıştır. Yağ hücreleri, fibroblast, karaciğer hücreleri, eritrosit ve lenfositler gibi birçok hücre türünde insülin reseptörleri çalışılmış ve bunlardan da en uygununun yağ hücresi olduğu bildirilmiştir (1,2). Ancak yağ hücresi, fibroblast ve karaciğer hücrelerinin elde edilmesi güç ve eritrositler de lenfositlere göre daha az hassas olduklarından lenfositler tercih edilmiştir.

Normal erişkinlerde insülin reseptör düzeyleri (gerek sayısal ve gerekse afinite bakımından) hakkında yapılan çalışmalar işaretli insülinin dolaşımındaki lenfositlere bağlanma oranının % 4,2 \pm 0,8 ile % 4,7 \pm 0,8 dolaylarında olduğunu göstermektedir (9). Biz de araştırmamızda önce yöntemin işlerliğini göstermek bakımından sağlıklı erişkinlerde yaptığımız çalışmada insülin lenfositlere bağlanma oranını 5 \pm 0,82 gibi daha öncekilere oldukça yakın değerler elde ettik. Sağlıklı çocuklarda insülin reseptör düzeyleri ile ilgili çalışma yok denecek kadar azdır. Bu belki de araştırmanın güç olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla beraber çocuklarda insülin reseptör düzeylerinin yüksek olması gerektiğini destekleyen bazı klinik gözlemler ve deneyler vardır. Thorsson ve arkadaşlarının yeni doğan bebeklerin kordon kanında elde ettikleri lenfositlerde insülin reseptörlerinin sayı ve afinite bakımından yüksek olduğunu gösterdikleri çalışma bunlardan biridir(12). Adı geçen çalışmada lenfositlerdeki reseptörlere bağlanma oranı % 24,3 \pm 3,5 iken, kontrol grubu olarak seçilen erişkinlerde % 4,7 \pm 0,9 olarak bulunmuştur. Diabetli anne çocuklarındaki doğum ağırlığının yüksekliği ve hiperinsülinizm de dikkate alınırca yenidoğanlardaki reseptör düzeylerinin yüksekliği insülinin intrauterin hayattaki süratli büyümeye katkısıyla yorumlanabilir (13,14,15,16).

Bu çalışmada ele alınan grupta seçilen 9 ile 17 yaşları arasındaki 9 erkek ve 4 kız toplam 13 sağlıklı çocuğun dolaşımındaki lenfositlerinde insülin reseptör düzeyleri ortalama $\% 10,38 \pm 0,238$ olarak bulunmuştur. Elde edilen bu değerler belirgin bir şekilde literatürde verilen yenidoğan reseptör düzeylerinden düşük ve fakat normal erişkinlerinkilerden yüksektir.

Sonuç olarak, çocukluk çağında insülin reseptör düzeylerinin erişkinlere oranla yüksek olarak bulunmuş olması, gelişme çağında insülinin büyümeye pozitif etkisini gösterebilmesi için reseptörlerin sayısal veya insüline bağlanma afinitelerinin artmasıyla yorumlanabilir.

KAYNAKLAR

- 1- Catt, K.J., Dufau, M.L.: The Clinical Significance of Peptide Hormone Receptors. Clinics in Endocrinology and Metabolism, 12:1, 11-45, 1983.
- 2- Kaplan, S.A.: The Insulin Receptor. J. Pediatr., 104:3, 327-335, 1984.
- 3- Frankel, S.: Blood Sugar, Method of Somogy-Nelson. Frankel, S., Reitman, S., Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis, Saint Louis, The C.V. Mosby Company, 82, 1963.
- 4- Olefsky, J., Reaven, G.M.: The Human Lymphocyte: A model for the study of insulin-receptor interaction. J. Clin. Invest., 58:1435, 1976.
- 5- Bøyum, A.: Separation of Leucocytes from blood and bone marrow. Scand J Clin Lab Invest (Suppl. 97) 21:77, 1968.
- 6- Kono, T., Barham, F.W.: The relationship between the insulin binding capacity of fat cells and cellular response to insulin, J. Biol. Chem., 246: 6210, 1971.

- 7- Krug,U., Krug,F. and Cuatrecasas,P.: Emergence of insulin receptors on human lymphocytes during invitro transformation, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 69: 2604, 1974.
- 8- Gavin,J.R., Roth,J., Neville,D.M.et al.:Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: A direct demonstration in cell culture, Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71:84, 1974.
- 9- Olefsky,J.M. and Reaven,G.M.: Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetic subjects, J. Clin. Invest. 54:1323, 1974.
- 10- Rodbell,M., Krans,H.M.J., Pohl,S.L. et al.: The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver, J.Biol. Chem. 246: 1861, 1971.
- 11- Kutsal,A. ve Muluk,Z.F.: Uygulamalı temel istatistik. Hacettepe Üniversitesi Basımevi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A₂, 126, 1972.
