

İNSAN TROMBOSİTLERİNİN AKTİVASYONUNA İNSÜLİN ETKİSİ

THE EFFECT OF INSULINE ON HUMAN PLATELET ACTIVATION

Dehen SÜR* - Ayfer BAPÇUM**

ÖZET

Bu çalışmada, yıkanmış, 20-35 yaşında insan trombositleri kullanıldı. İnsülinin tek başına ve trombin aktivasyonu sonucu oluşan trombosit depolarizasyonu, agregasyonu ve lizozomal enzim sekresyonu üzerine etkileri incelendi. İnsülinin tek başına depolarizasyon ve agregasyon üzerine etkisi görülmedi, ancak trombin aktivasyonuna bağlı depolarizasyonu ve yüksek dozda, depolarizasyon yanında, trombosit agregasyonunu da arttırdığı görüldü. Depolarizasyondaki artışın bir «insülin eşik noktası»ndan sonra gerçekleştiği ve doza bağlı olarak insülinin ilk önce depolarizasyonla ilgili mekanizmayı etkileyip, daha yüksek dozlarda agregasyonla ilgili mekanizmayı etkileyebileceği görüldü. Söz konusu dozlarda insülinin lizozomal enzim sekresyonunu etkilemediği saptandı.

SUMMARY

In this study washed, 20-35 aged human platelets were used. The effect of insulin, by itself and with thrombin activation, on the depolarisation, aggregation and lysosomal enzymes secretion was investigated. On the other hand, it was seen that insulin effected thrombin activated depolarisation and aggregation. It was figured that the increase in depolarisation becomes possible only after an «insulin threshold» has been reached. It was seen that the insulin, dose dependently, effects first the mechanism related with depolarisation and with higher doses, the mechanism related with aggregation. It was further noticed that at doses studied that are responsible for an increase in depolarisation and aggregation, insulin had no effect on lysosomal enzymes secretion dependent on thrombin activation.

* M. Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Nişantaşı/İSTANBUL.

** İ. Ü. Mühendislik Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Beyazıt/İSTANBUL.

GİRİŞ

Yerleşmiş koroner (1, 2, 3), periferal (4, 5, 6) ve serebral (7) hastalıkları olan kişilerde hiperinsülinemiye rastlandığı bildirilmektedir. Ayrıca atheroskleroza yatkınlık yarattığı bilinen diabet, glukoz intolerans, obezite, inaktivite, heperkalorik diyetler ve bazı hipertrigliseridemi vakalarında ortak bir noktanın, plazmada yüksek insülin seviyelerinin bulunduğu bildirilmiştir (1, 8, 9). Yapılan çeşitli epidemiolojik çalışmalarda (10, 11, 12) hiperinsülenemiden sonra iskemik hastalıkların geldiği belirtilmiştir. İnsülinin bu tip hastalıklarda plazma kolesterolü, kan basıncı ve kan glukozundan bağımsız bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir (1, 10, 11). Son yıllarda insülinin atheroskleroza önemli rol oynayan damar dokusu üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır (13, 14). Atheroskleroza damar dokusu yanında trombositler de önemli rol oynamaktadırlar. Trombosit agregasyonunun ve trombusun geç atheroskleroz lezyonlarında komplikasyon yaratıcı rolü artık iyice yerleşmiş bir olgu olarak kabul edilmektedir. Atherosklerozun erken safhasında trombositlerin rolü de bir çok çalışmada belirtilmektedir (15, 16, 17, 18). Diabetiklerde ve özellikle damar hastalıkları olan diabetiklerde trombositlerin reaktivitesinde artış olduğu bildirilmiştir (19, 20, 21). Bilindiği gibi diabet II tipinde plazmada yüksek insülin seviyeleri bulunurken (1), insülin eksikliğine bağlı I'inci tip diabette de, insülin tedavisinde gerekli dozun tam anlamıyla saptanamaması sonucu, yine yüksek insülin seviyelerine rastlanmaktadır (22, 23). Ancak bu çalışmalar etken çokluğu nedeniyle hiperaktivitenin nedenini açıklamak açısından yetersizdir. Bu nedenlerle insülinin trombositler üzerindeki ex vivo etkisinin inceleneceği çalışmaların, insülinin neden atherojenik olduğu konusundaki araştırmalara katkıda bulunacağı düşüncesiyle biz bu çalışmada, insülinin trombositlerin agregasyon, depolarizasyon ve lizozomal enzim sekresyonu üzerindeki etkileriyle ilgili incelemelerde bulunduk.

MATERYEL VE METOD

Maddeler : Fluoresan prob di-S-C₃ (5) (3, 3'-dipropiltiokarbosiyanin), apiraz (Boston Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Departmanı); sığır α -trombini (Parke Davis, saflaştırması Boston Üniv., Tıp Fak., Biyokimya Dept.); insan insülini, Heps (4) (2 hidroksietil)-1-piperazin etansülfonik asit) (Sigma); Sefaroz 2 B (Pharmatia), diğer kimyasal maddeler de istenilen saflıkta

olup Sigma, Pharmatia ve Merck'ten, propilen filtre Bolab'dan sağlandı.

Aletler: Fluorometre (termostat ve karıştırıcı takılmış) (Perkin-Elmer 650, IOS), spektrofotometre (termostat takılmış) (Perkin Elmer 576) spektrofotometre (Zeiss), santrifüj (HN-S).

Trombositlerin eldesi : 20-35 yaşında sağlıklı insanların venöz kanı % 3.8 sodyum sitrat ile karıştırıldı (1:9 oranında). 10 dakika 1300 rpm'de santrifüje edildi, süpernatant kısmı alınarak trombosit zengin plazma (PRP) elde edildi. Trombositler jel-filtrasyon yöntemiyle (24) sefaroz 2 B jelinden PRP'nin geçirilmesiyle elde edildi. % 0.15 U/l apiraz içeren pH'ı 7.4'e getirilmiş HEPES tamponu kullanıldı. Trombosit süspansiyonunun 1 ml'sindeki bulanıklık spektrofotometrede (Zeiss) 436 nm'de OD değeri olarak okundu. Daha önce Coulter Counter ölçümleriyle standardize edilmiş eğriden hücre sayısı bulundu.

Depolarizasyon ölçümleri : Greenberg-Sepersky S.M. ve Simons E.R.'nin önerdikleri şekilde (25, 26) hücre sayısı 60×10^6 /ml olarak kullanıldı ve fluorometrede eksitasyon 620 nm'ye (slit 6 nm), emisyon 670 nm'ye (slit 6 nm), kâğıdın yürüme hızı 20 mm/dak'ya ayarlandı, kuvvet 37°C'ye getirildi. Yalnızca insülin etkisinin incelendiği deneylerde, 1 ml hücre süspansiyonuna 1,5 mM fluoresan prob eklenerek, prob hücre içi ve dışında dengeleninceye kadar beklendi. İnsülin eklendi, 1 dakika inkübe edildi. Fluoresans değişikliği izlendi. İnsülinin trombin aktivasyonuna bağlı depolarizasyon etkisinin incelendiği deneylerde yukardaki gibi davranıldı ancak insülinle 1 dak. inkübasyondan sonra 0,05 U/60 $\times 10^6$ tr. trombin eklendi. Kontrolde ise insülin yerine HEPES tamponu kullanıldı. Depolarizasyon oranı izafi fluoresans değişikliği üzerinden hesaplandı.

$$\% \text{ Depolarizasyon oranı} = \frac{\Delta F}{F_0} \times 100 = \frac{F_{\max} - F_0}{F_0} \times 100$$

F_{\max} = depolarizasyon sonucu 15 saniyede probun bir miktar dışarı verilmesiyle meydana gelen fluoresans artışındaki maksimum noktaya kadar olan mesafe (cm).

F_0 = aktivasyondan önce hücre içi ve dışında prob dengelenmişindeki mesafe (cm).

Depolarizasyondaki artış, insülinli deneylerdeki depolarizasyon oranı yüzdelerinden kontrollerdeki depolarizasyon oranı yüz-

delerinin çıkarılmasıyla elde edildi. İnsan kanıyla çalışıldığından büyük miktarlarda kan temini güç olmaktadır. Depolarizasyonun oran olarak hesaplanması, farklı kanlarla yapılan çalışmaları kıyaslanabilir kılmaktadır (24, 26).

Lizozomal enzim sekresyonu ölçüleri : Depolarizasyon deneyinin bir devamı olarak yapılan deney sonucunda elde edildi. Hem kontrolde hem de insülinli deneylerde, depolarizasyon deneyinde anlatılmış olduğu gibi trombin eklendikten sonra 3 dakika beklendi. % 0.1 Triton X - 100 eklenerek trombosit membranları parçalandı. Tüm fluoresan probun hücre dışına çıkmasıyla görülen fluoresans artışı gözlemlendi ve düz bir çizgi elde edinceye kadar beklendi. Lizozomal enzim sekresyon yüzdesi şu şekilde hesaplandı :

$$\% \text{ Lizozomal enzim sekresyonu} = \frac{F_L - F_{\text{dip}}}{F_{\text{tx}} - F_0} \times 100$$

F_L = Aktivasyondan sonra salgılanan prob miktarına bağlı mesafe (cm).

F_{dip} = Aktivasyona bağlı depolarizasyonun ardından oluşan en içerlek noktaya kadar olan mesafe (cm).

F_{tx} = Trombosit membranlarının Triton X - 100 ile parçalanmasından sonraki maksimum fluoresans (cm).

F_0 = Aktivasyondan önce hücre içi ve dışında prob dengelenmişindeki mesafe (cm).

Lizozomal enzim sekresyonundaki fark, insülinli deneydeki değerden kontroldeki değer çıkarılmasıyla elde edildi.

Agregasyon : 600×10^6 /ml hücre ile çalışıldı. 37°C 'de 1 ml hücre süspansiyonunun spektrofotometrede 436 nm'de OD değeri okundu. Daha sonra $0.05 \text{ U}/60 \times 10^6$ tr. trombin eklendi ve yenisinden OD değeri okundu. Agregasyon, aradaki fark (ΔOD) olarak kabul edildi. Farklı kanlardan elde edilen sonuçlara t-testi (27) uygulandı. İnsülinin trombine bağlı agregasyona etkisiyle ilgili ölçümlerde ise, aynı miktar hücre sayısı ile çalışıldı. Kontrol olarak yukarıda söz edildiği gibi trombin öncesi ve sonrası OD değerleri okundu ve agregasyon ΔOD olarak kabul edildi. Deneyde, 1 ml hücre süspansiyonunun OD'si okundu, insülin eklendi, 1 dakika inkübe edildi, OD okundu ve yukarıda sözü edilen miktarda trombin eklendi ve yine OD okundu. İnsülin eklenmeden önce

ve sonraki değerler arasında (trombin eklemeyen) fark görülmediğinden, agregasyon trombin öncesi ve sonrası arasındaki fark ΔOD olarak alındı. Bu değerden kontroldeki değer çıkarılarak agregasyondaki fark ($\Delta' OD$) elde edildi. Burada da farklı kanlardan elde edilen sonuçlar t-testine göre değerlendirildi (27).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Spektrofotometre ile yapılan agregasyon ölçümlerinde, trombin aktivasyonundan sonra agregasyon, optik dansitede düşüş olarak saptanmıştır (tab. 1). Bundan sonra insülinin tek başına agregate edici etkisine bakılmış ancak insülinin böyle bir etkisi görülmemiştir (tab. 2). $2500 \mu U/60 \times 10^6$ tr. insülinle inkübe edilmiş trombositler, trombinle aktive edildiklerinde, kontrole kıyasla agregasyonda fark saptanmıştır (tab. 2). Literatürde iki farklı agregate edici ajanın birbirleriyle sinerjik etkilerinin incelendiği çalışmalarda, iki farklı agreganın tek tek agregate edici etkileri daha azken, birarada kullanıldıklarında agregasyon etkilerinin arttığı bildirilmiştir (28, 29, 30). Bu çalışma insülinin, tek başına agregate edici etkisinin görülmemesine karşın, hücrede trombinin agregate edici etkisini arttırabildiğini düşündürmektedir.

Bir çalışmada, depolarizasyonun trombin konsantrasyonuna bağlı olarak artış gösterdiği bildirilmektedir (26). Bu çalışmada, $2500 \mu U/60 \times 10^6$ tr. ile gerçekleştirilen depolarizasyon deneylerinde, insülinin tek başına, agregasyonda olduğu gibi depolarizasyonda da bir artışa neden olmadığı (tab. 3), ancak insülinle inkübe edilmiş trombositler trombinle aktive edildiklerinde, agregasyona paralel olarak, depolarizasyon oranının da artabildiği görülmüştür (tab. 3). Bu sonuç, bu dozdaki insülinin tıpkı agregan dozunu arttırıyormuş gibi bir etkiye neden olarak depolarizasyon oranındaki bir artışa, diğer bir deyişle aktivasyondaki (26) bir artışa neden olduğunu düşündürmektedir.

Lizozomal enzim sekresyonunun, trombositlerin ancak yüksek trombin dozlarında aktive edilmeleri halinde gerçekleşebildiği bildirilmiştir (31). Bu çalışmada $2500 \mu U/60 \times 10^6$ tr. insülinin neden olduğu trombin aktivasyonundaki artışın aksine lizozomal enzim sekresyonunda artışa neden olmamıştır (tab. 3). Bu sonuç, bu orandaki bir aktivasyon artışının agregasyonda bir artış yaratmasına karşın lizozomal enzim sekresyon artışına neden olacak konsantrasyonda olmadığı kanısını yaratmaktadır. Diğer bir deyişle bu dozdaki insülin, agregasyonda artışa neden olur-

Kan No.	Trombin öncesi OD (a)	Trombin sonrası OD (b)	Agregasyon Δ OD (a - b)	Farkların kareleri
1	0.050	0.024	0.026	0.000676
2	0.054	0.026	0.028	0.000784
3	0.060	0.027	0.033	0.001089
4	0.064	0.032	0.032	0.001024
5	0.068	0.032	0.036	0.001296
6	0.050	0.026	0.024	0.000576
7	0.053	0.028	0.025	0.000625
8	0.056	0.027	0.029	0.000841
9	0.038	0.017	0.017	0.000289
			$T_1=0.25$	$T_2=0.0072$

Tab. 1 - Trombine bağlı agregasyon ölçümleri (anlamlılık derecesi, $P < 0.001$).

Kullanılan insülin miktarı μ U/60 \times 10 ⁶ tr.	Kontroldeki agregasyon Δ OD (a)	İnsülinle inkübas- yondan sonraki agregasyon Δ OD (b)	İnsülinle inkübasyon + trombin aktivasyo- nuna bağlı agregasyon Δ OD (c)	İnsülinin neden ol- duğu trom- bine bağlı agregasyon artışı Δ' OD (c-a)	(c-o) de- ğerlerinin kareleri
250	0.013	0.00	0.017	0.004	
	0.033	0.00	0.030	-0.003	
	0.010	0.00	0.012	0.002	
	0.017	0.00	0.017	0.00	
2500	0.013	0.00	0.028	0.015	0.0002
	0.033	0.00	0.059	0.026	0.0007
	0.010	0.00	0.043	0.033	0.001
	0.017	0.00	0.048	0.031	0.001
				$T_1=0.105$	$T=0.003$

Tab. 2 - 250 μ U/60 \times 10⁶ tr. ve 2500 μ U/60 \times 10⁶ tr. insülinin egregasyona di-
rekt etkisi ve trombin agregasyonuna etkisi (250 μ U/60 \times 10⁶ tr. insülin
dozunda Δ' OD değerleri 0.00 olarak kabul edildi, 250 μ U/60 \times 10⁶ tr. in-
sülin dozunda ise bu değerler için, anlamlılık derecesi $0.001 < P < 0.01$)

İnsülin Miktarı µU/60x10 ⁶ tr.	İnsülinin depolarizasyona etkisi		İnsülin + trobinin depolarizasyona bağlı etkisi	İnsülinin trombine bağlı depolarizasyona etkisi		İnsülin + trombinin trombine bağlı etkisi	
	%	Oran		%	%	%	%
2500	0.0.	11.3	21.5	10.2	7.5	7.8	0.3
	0.0.	12.9	23.3	10.4	4.6	4.5	0.1
250	0.0.	27.5	32.3	4.8	2.5	2.3	0.2
	0.0.	16.1	21.2	5.1	8.3	8.0	0.3
25	—	13.7	13.7	0.0	—	—	—
	—	13.7	14.0	0.3	—	—	—
12	—	5.2	5.3	0.1	—	—	—
	—	5.2	5.6	0.4	—	—	—

Tab. 3 - İnsülinin tek başına ve trombine bağlı depolarizasyon ve lizozomal enzim sekresyonu üzerine etkileri. Her doz için 2 farklı kanla çalışılmıştır.

ken, karşı mekanizmayı yani trombus parçalayıcı olabileceği belirtilen (32) lizozomal enzim sekresyonunu arttırmamaktadır.

Yapılan bir çalışmada (25) valinomisinin sekresyon reaksiyonlarının oluşumunu engellemesine rağmen depolarizasyon oranını etkilemediği bildirilmekte ve buradan da depolarizasyonun ve sekresyonun farklı mekanizmalara bağımlılığı düşünülmektedir. Bizim çalışmamızda, $250 \mu\text{U}/60 \times 10^6$ tr. insülinin tek başına depolarizasyona etkisi olmadığı saptanmıştır (tab. 3). Bu dozdaki insülinin trombin aktivasyonuna bağlı depolarizasyona etkisi incelendiğinde, $2500 \mu\text{U}/60 \times 10^6$ tr. insülinin neden olduğu artıştan düşük de olsa depolarizasyon oranını arttırdığı görülmüştür (tab. 3). Buna karşılık aynı dozdaki insülinin, agregasyona neden olmadığı görülmüştür (tab. 2). Bu sonuç, bu dozdaki insülinin depolarizasyon ile ilgili mekanizmayı etkileyip farklı olabilecek agregasyon ile ilgili mekanizmayı etkilemediğini düşündürmektedir. Bu dozdaki insülin, $2500 \mu\text{U}/60 \times 10^6$ tr. insülin dozunundaki sonuçlara paralel olarak, lizozomal enzim sekresyonunda artışa neden olmamaktadır (tab. 3).

Yalnızca trombinle yapılan ve trombinin agregasyon üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, trombin etkisinin «insülin eşik noktası»na bağlı olduğu bildirilmektedir (32). Çalışmamızda $25 \mu\text{U}/60 \times 10^6$ tr. ve $12 \mu\text{U}/60 \times 10^6$ tr. insülin dozlarının trombin aktivasyonuna bağlı depolarizasyon oranında bir artışa neden olmadıkları görülmüştür (tab. 3). Bu olgu, insülinin trombin aktivasyonuna bağlı depolarizasyon oranındaki artışa neden olması için bir «insülin eşik noktası»nın gerektiğini düşündürmektedir.

TEŞEKKÜR: Kendilerine ait depolarizasyon metodunu öğrettikleri ve Boston Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya laboratuvarlarında çalışma yapmaya izin verdikleri için Prof. Dr. E. R. Simons'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Ruderman, N.R., Haudenschild, C. : *Prog. Cardiovas. Dis.*, 5, 373 (1984).
2. Christianensen, I., Dechert, T., Kjeruff, K. ve ark. : *Acta Med. Scand.*, 182, 283 (1968).
3. Peters, N., Hales C.N. : *Lancet*, 1, 1144 (1965).
4. Welborn, T.A., Breckinridge, A., Dollery, C.T. ve ark. : *Lancet*, 1, 1336 (1961).
5. Kingbury, K. J. : *Lancet*, 2, 1374 (1966).
6. Sorge, F., Scharzhoff, W., Newhaus, G. A. : *Diabetes*, 75, 580 (1976).
7. Gertler, M. M., Leetma, H. E., Saluste, E. ve ark. : *Geriatrics*, 27, 105 (1978).
8. Stout, R. W. : *Diabetologia*, 16, 141 (1972).
9. Stout, R. W. : *Arteriosclerosis*, 1, 227 (1981).
10. Pyorala, K. : *Diabetes Care*, 2, 131 (1979).
11. Welborn, T. A., Wearne, K. : *Diabetes Care*, 2, 154 (1979).
12. Ducimetrière, P., Eschwege, E., Papas L. ve ark. : *Diabetologia*, 19, 205 (1980).
13. Stainler, J., Rick, R., Katz, L. N. : *Circ. Res.*, 8, 572 (1960).
14. Stout, R. W. : *Diabetes*, 30 *supp.*, 2, 54 (1981).
15. Ross, R., Glomset, J. A. : *N. Eng. J. Med.*, 295, 369 (1976).
16. Ross, R. : *Arteriosclerosis*, 1, 293 (1981).
17. Fuster, V. : *Scand. J. Haemat.*, 27 *supp.*, 38, 1 (1981).
18. Hirsch, P. D. : Hillis, L. D., Campbell, W. B. ve ark. : *N. Eng. J. Med.*, 304, 685 (1981).
19. Colwell, J. A., Lopes-Virella, M., Halushka, P. V. : *Diabetes Care*, 4, 121 (1981).
20. Bern, M. N. : *Diabetes*, 27, 342 (1978).
21. Jones, R. L., Peterson, C. M. : *Diabetes*, 30 *supp.*, 2, 33 (1981).
22. Munkgaarel-Rasmussen, S., L. G., Parbst, E. ve ark. : *Diabetologia*, 11, 151 (1975).
23. Stout, R. W. : *Diabetes*, 30 *supp.*, 2, 54 (1981).
24. Horne, C. H., Norman, N. E., Schwartz, D. B. ve ark. : *Eur. J. Biochem.*, 120, 295 (1981).
25. Greenberg-Sepersky, S. M., Simons, E. R. : *J. Biol. Chem.*, 259, 1502 (1984).
26. Horne, W. C., Simons, E. R. : *Blood*, 51, 741 (1978).
27. Velicangil, S. : *Biyoistatistik*, Filiz Kitabevi, İstanbul, 1984, s. 167.
28. Ardlie, N. G., Glew, G., Schwartz, C. J. : *Nature*, 221, 417 (1966).
29. Mills, D. C. B., Roberts, G. C. K. : *J. Physiol.*, 193, 443 (1967).
30. Thomas, B. : *Exper. Bio. and Med.*, 3, 129 (1968).
31. Greenberg-Sepersky, S. M., Simons E. R. : *Anal Biochem.*, 147, 57 (1985).
32. Vermynen, J., Bedenhorst, P. N., Deckmy, H. ve ark. : *Ji. Clin. Haematol.*, 12, 107 (1983).
33. Thomas, D. P. : *Nature*, 215, 298 (1967).

(Received September 10, 1987)