

283882

T. C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TİBBİ BİLİMLERİ FAKÜLTESİ

## İNSAN AKYUVARLARINDA İNSÜLİN RESEPTÖRLERİ

(Bağlanma ve Reseptör Aracılı Pinositozun  
Karşılaştırmalı İncelenmesi)

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

İZZET HAMDİ ÖĞÜŞ

ANKARA — 1981

104

T.C.

Hacettepe Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Fakültesi

İNSAN AKYUVARLARINDA İNSÜLİN RESEPTÖRLERİ  
(Bağlanma ve Reseptör Aracılı Pinositozun  
Karşılaştırmalı İncelenmesi)

Biyokimya Programı  
DOKTORA TEZİ

---

İZZET HAMDİ ÖĞÜŞ

Rehber Öğretim Üyesi  
Prof.Dr.NAIL PAYZA

ANKARA - 1981

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde tüm olanaklarını kullanarak büyük yardımda bulunan Sayın Doç. Dr. Turgut İmir'e teşekkürü bir borç bilirim.

## İ Ç İ N D E K İ L E R

### Sayfa

1.	GİRİŞ .....	1
1.1.	İNSÜLİN .....	1
1.1.1.	Tarihçe .....	1
1.1.2.	İnsülinin yapı ve özellikleri .....	2
1.1.3.	İnsülin sentez ve salgılanmasını etkileyen etmenler .....	8
1.1.4.	İnsülinin parçalanması .....	10
1.1.5.	İnsülinin biyolojik etkileri .....	13
1.2.	İNSÜLİN RESEPTÖRLERİ .....	16
1.2.1.	İlk çalışmalar ve insülin reseptörlerinin dağılımı .....	16
1.2.2.	Reseptörün yerleşim yerleri .....	17
1.2.3.	İnsülin reseptörünün saflaştırılmasına iliş- kin çalışmalar ve özellikleri .....	19
1.2.4.	İnsülinin reseptöre bağlanmasını etkileyen etmenler .....	21
1.2.5.	Negatif kooperatif etkileşme .....	23
1.2.6.	İnsülin reseptörlerini denetleyen etmenler ...	25
1.2.7.	İnsülin reseptörlerinin değişikliğe uğra- dığı patolojik durumlar .....	28
1.3.	PİNOSİTOZ .....	30
1.3.1.	Pinositozun tanımı ve genel özellikleri .....	30
1.3.2.	Pinositoz'un çeşitleri ve reseptör aracılı pinositoz (RAP) .....	32
1.3.3.	Kaplanmış çukurcuk ve kesecikler .....	33

1.3.4.	RAP'la ilgili kinetik çalışmalar .....	35
1.3.5.	Klatrin (Clathrin) .....	37
1.3.6.	Reseptörlerin kümeleşme özellikleri .....	38
1.3.7.	Aminlerin RAP'a etkileri .....	44
1.4.	İNSÜLİN RESEPTÖRLERİYLE İLGİLİ ÇALIŞMALARI	
	KISITLAYAN ETMENLER .....	48
1.5.	AMAÇ .....	50
2.	GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	52
2.1.	Hücre süspansiyonlarının hazırlanması .....	53
2.1.1.	Kanın alınması .....	53
2.1.2.	Akyuvarların akyuvarlardan ayrılması .....	53
2.1.3.	Granülositlerin mononükleer hücrelerden ayrılması .....	53
2.1.4.	Hücrelerin canlılıklarının saptanması (Boya dışlama teste) .....	55
2.1.5.	Akyuvar formülünün yapılması .....	55
2.1.6.	Hücrelerin kümeleşmelerinin önlenmesi .....	55
2.2.	İnsülinin parçalanmasının ölçülmesi .....	55
2.3.	Sıvı faz endositozunun ölçülmesi .....	56
2.4.	Sayım çözeltisinin seçimi ve radyoaktivite- nin saptanması .....	58
2.5.	İnsülinin granülositlere bağlanmasının ölçülmesi .....	58
2.6.	Hücrelere bağlanan hormonun serbest hormon- dan ayrılması .....	59
2.7.	İnsülinin hücrelere bağlanma ve içeri alın- masının ölçülmesi .....	59

2.7.1.	Zamana göre bağlanma ve RAP'ın ölçülmesi .....	59
2.7.2.	Hücre derişimine göre insülinin granülosit- lere bağlanma ve içeri alınmasının ölçülmesi ....	60
2.7.3.	Sıcaklığın insülinin granülositlere bağlanmasına ve içeri alınmasına etkisinin ölçülmesi .....	61
2.8.	Sonuçların değerlendirilmesi .....	61
2.8.1.	Sıvı faz pinositozu değerlerinin saptanması .....	61
2.8.2.	İnsülin reseptör sayısının ve hormona olan afinitesinin hesaplanması .....	61
2.8.3.	İnsülinin zamana, hücre derişimine ve sıcaklığa göre hücrelere bağlanma ve içeri alınma sonuç- larının değerlendirilmesi .....	62
2.8.4.	Kullanılan istatistiksel yöntemler .....	63
3.	BULGULAR .....	64
3.1.	Hücrelerin ayrılmasıyla ilgili bulgular .....	64
3.1.1.	Akyuvarların alyuvarlardan ayrılması .....	64
3.1.2.	Granülositlerin mononükleer hücrelerden ayrılması .....	64
3.1.3.	Granülositlerin canlılık oranı .....	65
3.1.4.	Hücrelerin kümeleşmesine DNAaz'ın etkisi .....	65
3.2.	İnsülinin parçalanması .....	66
3.3.	Sıvı faz pinositozunun ölçülmesi .....	69
3.4.	Radyoaktivitenin sayılması .....	69
3.5.	İnsülinin granülositlere bağlanması .....	70
3.6.	İnsülinin hücrelere bağlanması ve içeri alınması..	72
3.7.	Sıcaklığın pinositoz ve bağlanmaya etkisi .....	72
3.8.	İnsülinin bağlanmasının RAP'la ilişkisi .....	77

4.	T A R T I Ő M A .....	81
5.	Ö Z E T .....	90
6.	K A Y N A K L A R .....	91

## K I S A L T M A L A R

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
ADP	: Adenozin-5'-difosfat
AIB	: Alfa-Aminoizobütirat
AMP	: Adenozin-5'-monofosfat
ATP	: Adenozin-5'-trifosfat
BSA	: Sığır serum albumini
Con A	: Konkanavalin A
DBF	: Dibütülfталat
db/s	: Dakika başına sayım
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FCS	: Fötal dana serumu
GİT	: Glutatyon insülin transhidrogenaz
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
NADPH	: Redükte nikotinamid, adenin dinükleotid
NSB	: Özgül olmayan bağlanma
PBS	: Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PMSF	: Fenilmetilsülfonil florür
POPOP	: 1,4-Bis-(5-feniloksazol-2-il)benzen
PPO	: 2,5-difeniloksazol
RAP	: Reseptör aracılı pinositoz
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TCA	: Triklorasetikasit
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon



## G İ R İ Ő

### 1.1. İNSÜLİN

#### 1.1.1. Tarihçe

İnsülin ilk olarak bulunan, saflaştırılan ve yapısı anlaşılan proteohormondur. İnsülinle ilgili ilk çalışmalar von Moring ve Minkowski'nin (1889), pankreası çıkarılmış köpeklerde insanlardaki diabetes mellitus'a benzer karbonhidrat metabolizması bozuklukları görüldüğünü saptamaları (1) ile başlamışsa da insülini bulma şerefi, pankreastan etkin bir özüt elde ederek bunun diabetik köpeklerde ve daha sonra da insanlarda iyileştirici etkisini gösteren Banting ve Best'e (1921-1922) aittir (2).

1926'da Abel, kristal halindeki ilk insülin preparatını hazırlamış (3), amino asit dizisinin anlaşılmasını ise 1960'ta Sanger (4) gerçekleştirmiştir.

1966'da Katsoyannis ilk olarak tümüyle sentetik insülin preparatını elde etmiştir (5).

### 1.1.2. İnsülinin yapı ve özellikleri

İnsülin, molekül ağırlığı 6 000 olan ve iki disülfid bağı ile birleştirilmiş iki polipeptid zincirinden oluşan bir hormondur. A ve B adı verilen bu zincirler sırasıyla 21 ve 30 aminoasit içerirler (6).

Rombohedral kristaller yapan insülin bu halinde % 0,4 oranında çinko içerir. Elde edilen preparatlarda hemen daima eser miktarlarda olmak üzere nikel, kobalt ve kadmiyuma da rastlanır. Seyreltik asit ve alkalilerde kolaylıkla çözünür. İzoelektrik noktası 5,30-5,35 olup, pH 4,5-7,0 arasında pratik olarak çözünmemektedir (7).

İnsülin pankreasta, Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerinde yapılır. Katsoyannis'in yönteminde A ve B zincirlerinin önce ayrı ayrı sentezi yapılıyor, sonra bu iki zincir birleştiriliyordu. Bu nedenle pankreasta da aynı yöntemin kullanıldığı sanılmaktaydı (6). Ancak Steiner v.d. (8) ile Chance ve yardımcılarının (9), pankreasın önce tek bir polipeptidi sentezlediğini ve daha sonra bunu bir enzimle parçalıyarak insülini oluşturduğunu gösteren çalışmaları durumu aydınlığa kavuşturdu. Bu öncül polipeptide "proinsülin" adı verildi.

84 amino asitten oluşan proinsülin pankreasta proteolitik bir enzim tarafından parçalanarak insülin ve 33 amino asitlik bir "bağlayıcı peptid"e ayrılır. Disülfid bağlarının

doğru yerleşimi ve üç boyutlu (3B) yapının gerektiği gibi korunması yönünden önce proinsülin sentezlenmesinin büyük yararı olduğu savunulmaktadır (10). Proinsülinin ve insülinin yapısı Şekil 1'de gösterilmiştir.

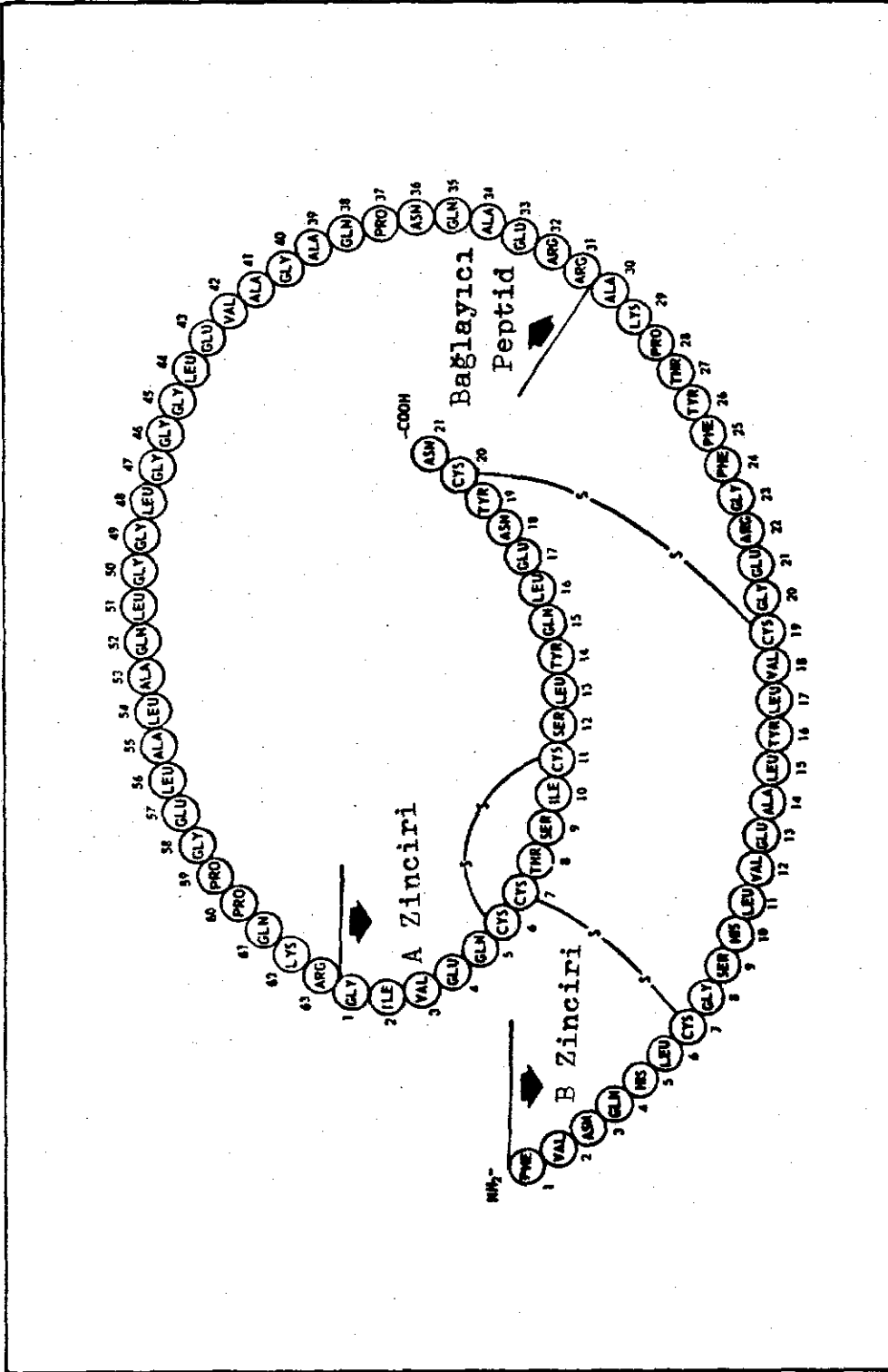
İnsülinin birincil yapısı, hayvan cins ve türlerine göre değişmektedir. Bazı balık ve küçük kemirgen türlerinde, aynı pankreasta iki ayrı yapıda insüline rastlanmaktadır (10). Önemli olan bazı insülin molekül değişiklikleri aşağıda (Tablo 1) gösterilmiştir (11).

Tablo 1. İnsülinin birincil yapısında Görülen Değişiklikler (11).

Kaynak	A8 <sup>x</sup>	A9	A10	B30
İnsan	Thr	Ser	İle	Thr
Sığır	Ala	Ser	Val	Ala
Domuz	Thr	Ser	İle	Ala
Koyun	Ala	Gly	Val	Ala
At	Thr	Gly	İle	Ala
Balina	Thr	Ser	İle	Ala
Köpek	Thr	Ser	İle	Ala
Tavşan	Thr	Ser	İle	Ser

<sup>x</sup>A ve B zincirlerinde belirtilen numaralarda saptanan amino asitler gösterilmiştir.

İnsülinin yapısal değişkenliğini evrimsel yaklaşımlarla açıklama çalışmaları bir varsayım olmaktan öteye gidememiştir. Örneğin; domuz, köpek ve balinada aynı yapıda olan insülin insandakinden yalnız bir amino asit farklıdır. Kobay ile diğer

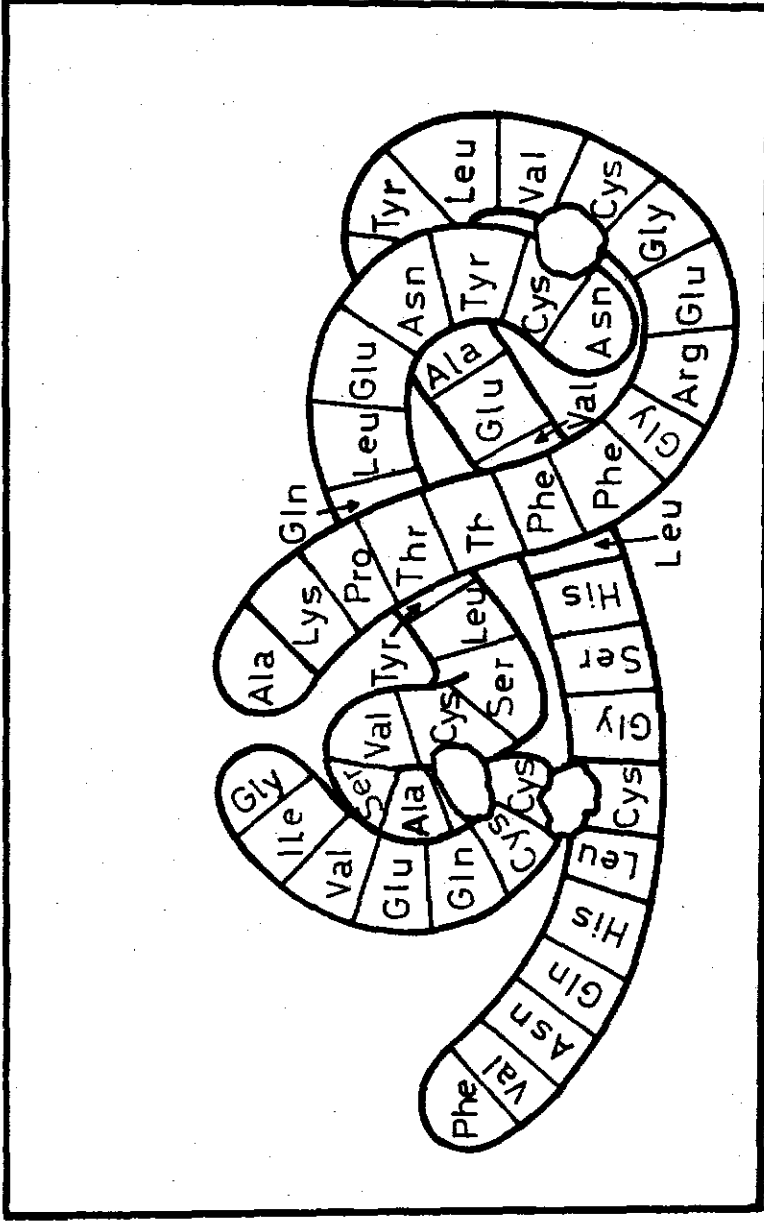


Şekil 1. Domuz Proinsülininin Amino Asit Dizisi (9).

memeliler arasındaki dizi farklılığı, memelilerle tavuk arasındaki çok daha büyüktür. Kobayla diğer memeliler arasındaki amino asit diziliş farkı memelilerle balık arasında saptanan farklılık düzeyinde bulunmuştur.

İnsülin molekülünün 3B yapısı, tek kristal x-ışını analizi ile aydınlatılmıştır (12). İnsülindeki iki zincir (A veya B) sıkı bir biçimde bir demet oluşturmaktadır. A zinciri, B zincirinin kıvrılan orta kısmı üzerinde yatarak uzanmakta, B zincirinin uç kısımları ise kol gibi uzanarak A zincirini arasına almaktadır. Böylece A zinciri molekülün bir yüzüne hapsedilmektedir. B zinciri iki nonpolar yüzey oluşturmaktadır. Dimer ve hegzamer yapan insülin moleküllerinin bu nonpolar yüzeyleri ters biçimde birbirleri üzerine kapanmaktadır. 12 000 molekül ağırlıklı üç dimer, çinko iyonu varlığında bir araya gelerek 36 000 molekül ağırlıklı hegzameri oluşturmaktadır(13). Bu bilgilerden yararlanılarak, insülin molekülünün 3B bir resmi basitleştirilmiş bir biçimde Şekil 2'deki gibi çizilmiştir.

A zincirinin uç grupları olan A1 glisin, A5 glutamin, A19 tirozin ve A21 asparajin, molekülün yüzeyinde yer almaktadırlar. İnsülinin kümeleşmesinde görev almayan bu amino asitlerin molekülden çıkarılmaları hem yapıyı hem de biyolojik etkinliğini etkilemektedir. A1 glisin yerine özellikle büyük grupların konması, biyolojik etkinliği son derece azaltmakta fakat molekülün yapısını daha az bozmaktadır. Proinsülinde bağlayıcı peptid bu grupları örtmektedir. Proinsülinin insüline oranla çok az etkin olduğu bilinmektedir. Bu nedenle A zincirinin uç



Şekil 2. Sığır İnsülininin Düşünülen Üç Boyutlu Yapısı(13).

gruplarının oluşturduğu yüzeyin biyolojik etkinlikte önemli olduğu sanılmaktadır (13).

İnsülinin birincil yapısı ile biyolojik etkinliği arasında sıkı bir ilişki vardır ve 3B yapının üç disülfid bağı ile büyük ölçüde sağlandığı kabul edilmektedir (14). Bundan yararlanılarak hangi grupların insülin etkinliğinde gerekli ve önemli olduğu anlaşılmıştır.

B zincirinin C-ucundan 8 amino asidin enzimatik olarak çıkarılması ile elde edilen dezoktapeptid insülin (DOP) doğal insülinin etkinliğinin %15'i kadarına sahiptir. Bu parça önemli olmakla birlikte biyolojik etkinlik için mutlaka gerekli değildir (6).

Dezalanin -dezasparajin insülinin (DAA) 1,1 Ü/mg (Ünite/mg protein) etkinliğe sahip olduğu saptanmıştır (15). Oysa doğal insülinde bu değer 22 Ü/mg'dır (6).

Fluoressein bağlanarak hazırlanan insülin türevlerinin biyolojik etkinlikleri de oldukça ilginçtir. Mono-, di- ve tri-fluoressein insülin türevlerinde fluorofor sırasıyla; B1, B1 A1, B1 A1 B29 amino asitlerine bağlanmaktadır. Bunların biyolojik etkinlikleri ise sırasıyla 9,6 Ü/mg, 0,9 Ü/mg, ve 0 Ü/mg olarak bulunmuştur. Bu amino asitlerin komşulukları gözönüne alınırsa (bkz. Şekil 2) bu bölgenin biyolojik etkinlik açısından önemi kolayca anlaşılır.

B30'daki alaninin kaybı ya da A21'deki asparajinin amid grubunun karboksipeptidazla hidrolizi biyolojik etkinlikte bir azalmaya yol açmamaktadır (6).

### 1.1.3. İnsülin Sentez ve Salgılanmasını Etkileyen Etmenler

İnsanda günlük insülin gereksinmesi 30-50 ünite arasında değişmektedir. Bu, total pankreatektomi yapılan bir kişide kan şekerini normal düzeyde tutabilmek için gerekli insülin miktarıdır. Normal insan pankreasının her gramı 4Ü kadar insülin içermektedir. Böylece birkaç günlük gereksinim (150-200 Ü) pankreasta depolanmış durumdadır. İnsülin pankreasta etkin biçimiyle depo edilmektedir. Bu depolama altılı (hekzamer) ya da bunun katları halinde insülin moleküllerinin bir araya gelmesi ile olur (10).

Elektron mikroskopik ve otoradyografik çalışmalar, pro-insülinin granüler endoplazmik retikulumda (RER) yapıldığını, insüline dönüştürülmesinin ise hem RER'de hem de Golgi aygıtında gerçekleştirildiğini göstermektedir (10).

İnsülin sentez hızının düzenlenmesine ilişkin bilgilerimiz oldukça kısıtlıdır. Pankreasın azımsanmayacak ölçüde insülin depolaması ve insülin içeriğinde ufak nicel oynamaları saptamanın güçlüğü nedeniyle buna şaşmamak gerekir. Bununla birlikte fetal sıçan pankreas hücre kültürlerinde hızlı insülin sentezine karşın insülin içeriği oldukça azdır ve bunun konuyu aydınlatmakta yararlı olacağı sanılmaktadır (16).

Halen yalnız glukozun, çok az miktarda da büyüme hormonunun insülinin yapısına radyoaktif amino asitlerin katılmalarına hızlandırdığı bilinmektedir. İnsülin salgılanmasını arttırdıkları bilinen tolbutamid, ACTH ve glukagon, pentozlar gibi etkisiz bulunmuştur (10).



İnsülin salgılanması oldukça karmaşık bir olay gibi görünmektedir. Ana uyarının kanda glukoz düzeyinin artması olduğu düşünülmektedir. Sıçan pankreasında, glukoz uyarımından sonraki ilk 30 saniye içinde insülin salgılanmasının arttığı, uyarının kesilmesinden 30 saniye sonra ise salgılanmanın sona erdiği saptanmıştır(17). Glukoz metabolizması inhibitörleri olan 2-deksiglukoz ve glukozaminin bu uyarıyı engellemesi, insülin salgılatmada asıl sorumlunun glukozdan çok onun bir metabolik ürünü olduğunu düşündürmektedir(18).

Ağızdan alınan ya da damar içine verilen amino asitler insülinin plazma düzeyini arttırmaktadır. Arjinin, lizin, lösin, fenilalanin, valin, metiyonin, treonin, izolösin ve triptofan insülin salgılanmasını uyarmaktadırlar. Histidinin ise etkisiz olduğu bulunmuştur. Amino asit verilmesiyle ortaya çıkan salgılama fazlalığı, kan glukoz düzeyindeki artma ile uyarılan salgılanmadan bağımsızdır. İki ayrı mekanizmanın olduğu sanılmaktadır. Örneğin, glukozun neden olduğu plazma insülin düzeyindeki artışı epinefrin ve norepinefrin engelleyebilirken, amino asitlerin uyarıcı etkisine bu iki madde etkisiz kalmaktadır. Amino asit aracılığıyla insülin sentezinin artması, amino asitleri doku proteinlerinde depolamaya yaraya bilir(6).

Epinefrin ve norepinefrinin in vivo (canda) ve in vitro (camda) deneylerde, farmakolojik etkilerine karşın insülin salgılanmasını engelledikleri gösterilmiştir(6).

Potasyum iyonu, ACTH, TSH, glukagon, sekretin, pankreo- zimin, gastrin, oksitosin ve vazopressinin de insülin salgılan-

masını arttırdığı gösterilmiştir. Ancak bu etkiler fizyolojik olmaktan çok farmakolojik niteliktedir(6).

İnsülin sentez ve salgılanmasını önleyen etmenler, daha çok toksin ve ilaçlardan oluşmaktadır.

Beta hücrelerini seçici bir biçimde zarara uğratan etmenler diabetes mellitus'a yol açmaktadır. Bunlar arasında, alloksan, ürik asit, dialürik asit, dehidroaskorbik asit, dehidroizoaskorbik asit, bazı kinolonlar, streptozotosin ve magnezyum sayılabilir. Bunlardan alloksan, deneysel olarak diabetes mellitus oluşturmakta kullanıldığından iyi bilinmektedir. Glutatyon, sistein ve dimerkaprol (B.A.L.) gibi sülfidril içeren maddeler önceden verildiğinde, alloksanla oluşan karakteristik patolojiyi önleyebilmektedir. Bu sonuç alloksanın sülfidrilli bir enzimi inhibe ettiğini düşündürülebilir. Ancak nikotinik asit, piridin, dikarboksilik asit, sodyum bisülfid ve metilen mavisi gibi sülfidril grubu içermeyen bileşikler de alloksanın etkisini engellemektedir(6).

İnsülinin salgılanmasını arttıran maddeler arasında sülfonilüre grubu ilaçları anmak gerekir. En iyi bilinen örneği tolbutamid olan bu maddeler beta hücrelerinde degranülasyona yol açmakta, insülinin salgılanma hızını arttırmaktadırlar. Pankreası çıkarılmış ya da pankreası insülin yapma yeteneğini tümüyle kaybetmiş kişilerde bu tür maddeler etkisiz kalmaktadır(6).

#### 1.1.4. İnsülinin parçalanması

İnsülin hemen tüm hücre dışı sıvılarda görülmektedir. Bu nedenle oldukça hızlı olarak ve değişik yollarla parçalan-

maktadır(6).

Kan dışında; lenf, safra ve sidikte de insüline rastlanmıştır. Böbreklerden süzülen insülin tüplerde geri emilmekte, ancak 1/10 kadarı dışarı atılmaktadır. Radyoaktif iyotla işaretlenmiş insülinin doğal insülinden farklı bir biçimde parçalandığı sanılmaktadır. Çünkü doğal insülinin plazma yarı ömrü 9 dakika iken  $^{131}\text{I}$ -insülin için bu değer 40 dakika dolayındadır(19).

İnsanda insülini parçalayan en önemli organ karaciğerdir. İn vitro deneyler insülinin parçalanmasında üç sistemin varlığını göstermiştir. Bunlar; a) disülfid bağlarını koparan ve glutatyon gibi indirgeyici maddelere gereksinme gösteren, ısıya dayanıklı, nonenzimatik bir sistem, b) yine disülfid bağlarını kıran ve kofaktör olarak glutatyon ve NADPH'ye gereksinme gösteren enzimatik bir sistem ve c) kompleks bir proteolitik sistemdir(6).

Bunlardan ikinci sırada sözü edilen glutatyon-insülin transhidrogenaz (GIT)'in kinetikleri ilk kez Katzen ve Stetten tarafından çalışılmıştır(20). GIT'le indirgeyici parçalanma, insülin metabolizmasında önemli bir yıkım yoludur(21).

Chandler ve Varandani, GIT'in sıçan dokularında dağılımını inceleyerek en etkin dokunun pankreas olduğunu saptamışlardır. Bunu sırasıyla karaciğer-bağırsak-dalak-böbrek, testis, timus ve yağ hücreleri-akciğer-beyin-kalp ve çizgili kas izlemektedir. Bu enzim sistemi hayvanda en önemli insülin parçalayıcı sistem olarak kabul edilmektedir(22).

İnsülin, karaciğer hücresi plazma zarında hızla parça-

lanmaktadır. 30°C'de 0,3 nM insülinin plazma zarı tarafından (1-2 mg protein/ml) 5 dakikada % 50'sinin, 90 dakikada ise % 90'dan fazlasının parçalandığı saptanmıştır(23).

<sup>125</sup>I-Dezalanin-dezasparajin insülin; insülin reseptörüne olan afinitesi, doğal insülininkinin % 2'si kadar olduğu halde onun kadar hızlı parçalanabilmektedir. Proinsülin ise karaciğer plazma zarları tarafından oldukça yavaş parçalanmaktadır. İnsülinin karaciğer hücreleri tarafından parçalanması, reseptöre bağlanmasından tümüyle bağımsız bir olaydır(23).

Gavin v.d. monosit, lenfosit ve alyuvarların insülin parçalanmasından sorumlu olmadıklarını, bu işi granülositlerin yaptığını göstermişlerdir(24). Chandler ve Varandini ise alyuvarların çok az da olsa insülin parçalama yeteneğine sahip olduğunu ve bunu zarsal enzimleriyle yaptığını ileri sürmüşlerdir(21).

Granülositler, in vitro çalışmalarda oldukça fazla proteolitik etkinlik göstermeleri nedeniyle bazı problemler yaratmaktadırlar. Endositoz aracılığıyla içeri alınma, zara bağlanarak ya da ekzositozla dışarı atılan enzimlerle parçalanma, insülinin ve diğer bir çok proteinin sonunu hazırlayan kaçınılmaz yollardır(25).

Alyuvarlarda, proteaz ve bu arada GIT etkinliği bakımından belirgin bireysel farklılıklar saptanmıştır(21).

Fussganger v.d. granülositlerde yaptıkları çalışmalarda 5 saatlik bir sürede ortamdaki insülinin % 60'ının parçalandığını gözlemişlerdir. Onlara göre inhibitörsüz olarak bağlanma çalışmaları yapmak olanaksızdır. Bu araştırmacılar denedikleri birçok proteaz inhibitörü ile insülin yıkımını kısmen önleyebilmiş-

lerdir. Granülositlerin insülini parçalayan proteazlarının karaciğer ve böbreğin proteazlarıyla ilgisi olmadığı sanılmaktadır. Çünkü bu enzimlerin optimum pH'leri,  $K_m$  değerleri ve inhibitörlere olan duyarlılıkları oldukça farklıdır(26).

İnsülin yıkımını engelleyen en etkin proteaz inhibitörünün fenilmetilsulfonül florür (PMSF) olduğu saptanmıştır. Bunu sırayla N-formil-L-fenilalaninklorometilketon (FPCK) ve N-alfa-p-tosil-L-lizinklorometilketon (TLCK) izlemektedir(26).

İnsülin, hem zara bağlanarak hem de ekzositozla dışarıya atılan proteolitik enzimlerle parçalanmaktadır. Sorumlu enzimler en azından iki gruba ayrılmaktadır. Bunlardan biri hızlı etki eden bir sistem olup substratla doyurulabilmekte ve PMSF ile inhibe edilebilmektedir. Diğer grup ise yavaş etkili olup doğrusal kinetik göstermekte ve PMSF ile inhibe edilememektedir (26).

#### 1.1.5. İnsülinin biyolojik etkileri

İnsülin bir çok dokuda yaygın olarak metabolik olayları etkileyen bir hormondur. Bu etkiler, zarsal taşınım gibi hızlı etkiler ve RNA ve DNA sentezi gibi yavaş etkilerdir. Ancak 50 yılı aşkın bir zamandır araştırmacılar henüz bu hormonun bu denli değişik etkileri nasıl gerçekleştirdiğini kesin olarak ortaya koyamamışlardır. İnsülinin etkilerini aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür:

- 1- Zarsal taşınımın stimüle edilmesi(27-30).
- 2- Zarsal ve çözünük enzimlerin etkinleşmesi ya da inhibisyonu(31).
- 3- Protein sentezinin stimüle edilmesi(27,28,32,33).
- 4- Protein parçalanmasının inhibisyonu(34).

- 5- Haberci RNA sentezinin stimüle edilmesi(27-29,35,36).
- 6- DNA sentezinin stimüle edilmesi(27,28,36-38) ve
- 7- Hücre morfolojisindeki değişiklikler(39,40).

Halen insülinin etkisinin, hedef hücre yüzeyindeki özgül reseptöre bağlanması sonucu oluştuğuna dair yaygın bir kanı vardır. İnsülinin etkisine ait bu teori, 1949'da Levine, Goldstein ve diğerlerinin insülinin hedef hücrelerine şeker taşınımını hızlandığını ortaya koyan çalışmalarından kaynaklanmıştır(29). Ayrıca insülinin iyonlar, amino asitler ve nükleotid öncülleri gibi diğer önemli metabolik maddelerin zarsal taşınımını arttırdığı bilinmektedir(27,28,30,36,41). Zarsal taşınımı hızlandırması insülinin ana etkilerinden biri olmakla birlikte, zarsal etkileşim, insülinin bilinen bütün etkilerini açıklamaktan uzaktır. Böbreküstü bezleri çıkarılmış sıçanda insülin, cAMP düzeyinin epinefrin tarafından yükseltilmesini engellemektedir. Bu nedenle Butcher, insülinin cAMP düzeyini ayarlayarak etkisini gösterdiğini savunmuştur(42). İnsülinin cAMP aracılığı ile etki eden hormonları antagonize ettiği, bunu cAMP'nin miktarını azaltarak yaptığı bir çok araştırmacı tarafından açıklanmıştır(27,28,36,43). Daha sonra, cAMP'deki bu azalmanın cAMP fosfodiesterazın etkinleştirilmesi sonucu ortaya çıktığı bulunmuştur(44-47). Ancak bu bulgular da yine insülinin tüm etkilerini yeterince açıklayamamaktadır. Kaldı ki belirli çevre ve koşullarda insülin cAMP'nin hücre sel düzeyini arttırabilmektedir(48). Illiano v.d. belirli doku ve koşullarda insülinin cGMP'nin hücre sel düzeyini arttırdığını bildirmiştir(49).

İnsülinin hedef hücrenin iyon (potasyum) içeriğini de-  
ğiştirdiği bilindiğinden, iyonların insülin için bir ikincil  
haberci olabileceği ileri sürülmüştür(50,51). İnsülinin ayrı-  
ca yağ hücrelerinde kalsiyum dağılımını değıştirdiği(52,53),  
plazma zarı fraksiyonlarında ATPaz etkinliğini doğrudan arttır-  
dığı(54,55) gösterilmiştir.

Başlangıçta insülinin, steroidlere ve tiroid hormonuna  
göre çok daha büyük molekül ağırlığına sahip olması nedeniyle  
hücreye giremeyeceği düşünülüyordu(56). İnsülinin yalnız plaz-  
ma zarına etki ettiğini savunan bu görüş, insülinin çözünmez  
agaroz türevlerini ilk olarak sentezleyen Cuatrecassas tarafın-  
dan destek gördü(57). Çok büyük olması nedeniyle hücreye gire-  
meyen agaroz-insülin türevlerinin, ilk çalışmalarda doğal insü-  
line yakın biyolojik etkiye sahip olduğu bildirildi(57). Ancak  
bu çalışmaların teknik yönleri yeniden gözden geçirilerek bu  
insülin türevinin, doğal insülinin biyolojik etkinliğinin an-  
cak % 1'ine sahip olduğu görülmüş(58,59), söz konusu etkinliğe  
de, zarlarla karşılaşan agaroz-insülin türevinden koparılıp ser-  
best hale geçen insülinin neden olduğu ileri sürülmüştür(60,61).

Yirmi yılı aşkın bir süre önce Lee ve Williams, sıçan-  
ların portal venine infüzyonla verdikleri radyoaktif, karaciğer  
hücrelerinden elde ettikleri çekirdek, mitokondri ve mikrozo-  
m preparatlarında rastladılar(62). Bu bulgular insülinin hücre i-  
çine girdiğini kesin olarak gösterdiği halde nedense uzun süre  
gözardı edildi.

Stein ve Gross, bağlanma ve otoradyografi yöntemleriyle,  
parçalanmamış insülini kas, karaciğer ve akciğer hücrelerinin  
sitoplazmalarında buldular(63). Terris ve Steiner, bu bulgudan

yola çıkarak insülinin parçalanabilmesi için hücre içine girmesi gerektiğini savunmuşlar(64), ancak Arguilla v.d. immünoreaktif insülinin sıçan karaciğer hücre çekirdeklerinde biriktiğini göstermeleriyle(65) bu sav geçerliliğini yitirmiştir. Ayrıca lenfositlerde yapılan benzer bir çalışmada, hem yıkanıp homojenize edilmiş hücreden elde edilen preparatlarda, hem de bu hücrelerin otoradyografilerinde insülinin çekirdekte toplandığı gösterilmiştir(66). Bütün bu bulgulardan anlaşıldığına göre; insülin, plazma zarında bağlandığı reseptörle etkileşerek zarsal taşınımında ve bazı enzim etkinliklerinde değişikliklere yol açmakta, öte yandan hücre içine girip çekirdek, Golgi aygıtı, endoplazmik retikulum ve diğer organellere bağlanarak DNA, RNA ve protein sentezine yol açan çeşitli olaylara bizzat aracılık etmektedir(67).

## 1.2. İNSÜLİN RESEPTÖRLERİ

### 1.2.1. İlk çalışmalar ve insülin reseptörlerinin dağılımı

İnsülinin, çizgili kas dokusuna bağlanması ve şeker taşınması ile olan ilgisi Wohltman ve Narahara(68) tarafından daha önce gösterilmişse de, insülin reseptörleriyle ilgili ilk çalışmalar, Cuatrecasas'ın 1971'de yağ hücrelerine hormonun özgül olarak bağlanmasını göstermesiyle(69) başlar. Aynı yıl Kono ve Barham yine yağ hücrelerinde benzer bulgular elde etmişlerdir(70). Karaciğer dokusunda da önce House v.d.(71), daha sonra Freychet v.d.(72) ile Cuatrecasas v.d.(73) tarafından insülinin plazma zarlarına özgül bir biçimde bağlandığı gösterilmiştir.

Gavin v.d. kan hücrelerinde ve fibroblastlarda insülin reseptörlerinin varlığını göstermişler(74), bu araştırmacıların lenfositlerde de insülin reseptörleri bulunduğunu ileri süren



savına karşı, Schwartz v.d.(75) lenfositlerde insülin reseptörünün olmadığını, buna karşılık makrofajlarda yüksek afinite de bu reseptörlerden bulunduğunu bağlanma deneyleri ve otoradyografik çalışmalarla kanıtlamışlardır. Hollenberg ve Cuatrecasas'ın çalışmaları da, istirahat halindeki lenfositlerde insülin reseptörünün bulunmadığını, fakat mitojenlerle uyarılan lenfositlerde insülin reseptörlerinin görülmeye başladığını ve 72 saat sonunda en üst düzeye çıktığını ortaya çıkarmıştır(76).

Gavin v.d., uyarılmamış lenfositlerin, uyarılmış olanlara göre 300 kez daha az insülin bağlayabildiklerini saptamışlardır (77). Bu çok az miktardaki bağlanmanın, kaçak olarak ortamda bulunan makrofajlardan veya kendiliğinden uyarılmış lenfositlerden ileri geldiği savunulmaktadır(76).

Plasenta üzerinde çalışan Haour ve Bertrand(78), kısa bir süre sonra da Marshall v.d.(79), bu dokuda da insülin reseptörünü bulmuşlardır.

Gambhir v.d.(80,81), insan eritrositlerinde özgül insülin reseptörlerinin bulunduğunu göstermişlerdir.

### 1.2.2. Reseptörün yerleşim yerleri

Jarett ve Smith; ferritin'e bağlanmış insülinle, elektronmikroskopik fotoğraflarda insülinin yağ hücresi plazma zarındaki yerleşimini göstermeyi başarmışlardır(82). Seri kesitlerden elde edilen resimlerde mikronkare başına ortalama olarak 90 bağlanma yeri olduğu hesaplanmış, bağlanma yerlerinin bazı bölgelerde yaygın olarak dağıldığı, diğer kısımlarda ise 3-12 ferritin molekülünden oluşan kümeciklerin varlığı saptanmıştır.

Reseptörler, dondurma-kırma (freeze-fracture) yöntemi ile

yağ hücrelerinin glikokaliksinde, fosfolipid tabakası içinde gömülü olarak saptanmıştır(83). Yağ ve karaciğer plazma zarlarının iç yüzeylerinde reseptörlere ilişkin bir bağlanma saptanamamıştır. Ters çevrilerek hazırlanan keseciklere de ferritin-insülin kompleksinin bağlanması gösterilememiştir. Reseptörler plazma zarlarının iç yüzlerindedir(83).

Enzimlerle sindirim deneyleri, insülin reseptörleri hakkındaki bilgilerimizi arttırmıştır(84). Tripsinle (50 mg/ml) inkübe edilen hücrelerin insülin bağlama kapasitesi hızla düşmekte, tripsin, insülin reseptörlerini parçalamaktadır. Fosfolipaz C ya da A ile yapılan deneylerde ise bunun tam tersi bir sonuçla karşılaşılmaktadır(84-86). Fosfolipaz uygulanmış hücrelerin insülin bağlama kapasiteleri 3-4 katına çıkmaktadır. Bu sonuç, fosfolipazın fosfolipitleri parçalayarak, zarda gömülü olan fakat insülin bağlayamayan reseptörleri açığa çıkardığını göstermektedir. Tripsin uygulanarak insülin bağlama kapasitesi azaltılmış olan hücreler yıkanarak fosfolipazla inkübe edilecek olursa, insülin bağlama kapasitesi yine tripsinle inkübe edilmeden önceki düzeyin 3-4 katına çıkmaktadır(84).

Fosfolipaz deneyleri; lenfositlerde insülin reseptörlerinin varlığı sorununu çözmekte de kullanılmıştır. Mitojenlerle uyarılmış lenfositlerde, fosfolipaz C yağ hücrelerinde olduğu gibi yine bağlanmada artışa neden olmaktadır. Oysa insülin bağlama yeteneğinden yoksun olan uyarılmamış lenfositlerde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Buradan, istirahat halindeki lenfositlerde reseptör olmadığı anlaşılmaktadır. Mitojenle uyarma yeniden reseptör sentezine yol açmaktadır. Transformas-

yonla insülin reseptörlerinin ortaya çıkması, Con A'dan başka fitohemaglutinin (PHA) ve periyodat'la da yapılan deneylerde de görülmektedir(75).

### 1.2.3. İnsülin reseptörünün saflaştırılmasına ilişkin çalışmalar ve özellikleri

İnsülin reseptörü, saflaştırılmış, hormon bağlama yeteneğine sahip ilk proteindir. Cuatrecasas, 1972'de sıçan karaciğer ve yağ hücreleri plazma zarlarından noniyonik bir deterjan olan Triton X-100 ile insülin reseptörünü çözmeyi başarmış, afinite kromatografisi yöntemi ile saflaştırmayı gerçekleştirmiştir(88, 89).

İnsülin reseptör proteininin plazma zarında çok düşük düzeylerde bulunması (toplam zar proteininin 1/1 000 000'i kadar) nedeniyle 250 000 kez gibi çok yüksek bir oranda saflaştırılması gerekmektedir(89).

Gavin v.d. ise, 1972 yılında insan lenfositlerinden insülin reseptörünü çözmeyi başarmışlardır(90,91).

İnsülin reseptörünün, insülini bağlama kapasitesi tripsinle kolayca ortadan kaldırılabilen(92,93) bir glikoproteinden oluştuğu bilinmektedir(94).

Cuatrecasas'ın çalışmalarına göre; reseptörün molekül ağırlığı 300 000 dolayındadır(92). Sürtünme oranı ( $f/f_0$ , frictional ratio) 1,5, eksenler oranı (axial ratio) ise 9 olarak bulunmuştur. Bu bilgiler bize reseptörün yassı, disk gibi bir biçimde olduğunu düşündürmektedir(11). Bu değerler asetilkolin reseptöründe de benzerdir.

Çeşitli dokulara ait hücrelerin insülin bağlama kapasite-leri oldukça geniş aralıkta dağılım göstermektedir. Scatchard analizi ile bulunan insülin reseptör sayıları hem doku farklılığı hem de araştırmacıların yöntem farklılıkları nedeniyle çok değişiktir.

Sıçan karaciğer hücresinde, hücre başına 100 000 ile 250 000 arasında değişen sayıda reseptör saptanmıştır(95-98). Yağ hücrelerinde saptanan sayı 50 000(70,99,100), monositte 7 000 ve 16 000(95,101), granülositte 1 000(26) ve eritrositte 2 000'dir(81). Karaciğer plazma zarının, mg protein başına 100 femtomol insülin bağlayabildiği saptanmıştır(73).

Sikloheksimid kullanılarak protein sentezi inhibe edildiğinde, sıçan karaciğer reseptörünün 4 saatlik bir yarı ömre sahip olduğu görülmektedir(97). İnsan lenfositlerinde ise bu süre 30-40 saattir(95).

İnsülin reseptörünün insüline fizyolojik derişimlerde yüksek bir afinitesi vardır (ortalama  $10^{-10}$  M)(93). Bu değer  $24^{\circ}\text{C}$  için  $1 \times 10^{-10}$ - $5 \times 10^{-11}$  M,  $37^{\circ}\text{C}$  için  $3 \times 10^{-9}$  M olarak bulunmuştur (102). Genel olarak hormonun reseptöre bağlanması düşük sıcaklıklarda daha sıkıca olmaktadır.

Kinetik çalışmalarda; bağlanma değişmezi ( $k_1$ ,  $k_{on}$ ),  $5 \times 10^7$ - $1,5 \times 10^5$   $\text{M}^{-1}\text{sn}^{-1}$  gibi geniş bir aralıkta değişmektedir. Ayırışma değişmezi ( $k_{-1}$ ,  $k_{off}$ ) için ise  $1 \times 10^{-3}$   $\text{sn}^{-1}$  ile  $3 \times 10^{-4}$   $\text{sn}^{-1}$  arasında değişen değerler bulunmuştur(69,73,92,99). Bu değerlerden hormon-reseptör kompleksinin yarı ömrü 15,6-42,8 dakika ( $24^{\circ}\text{C}$ ) olarak hesaplanmaktadır.

Bu arada insülin reseptörünü saflaştırmaksızın, bağlanmadan sorumlu olan proteinleri saptamak için çapraz bağlayıcılar (cross-linker) kullanarak ya da "photoaffinity labeling" yöntemleriyle çalışmalar yapılmıştır.

Mono- ve disüksinimidilsüberat (MSS ve DSS) gibi kimyasal çapraz bağlayıcılar, 1 mM derişiminde kullanıldığında, insülinin 3-O-metil glukoz taşınımı üzerine olan arttırıcı etkisi tümüyle önlenebilmektedir(103). İnsülin, K<sub>5</sub> vitamini ve Con A eklenerek 3-O-metilglukoz taşınımı en yüksek düzeye çıkarılmış yağ hücrelerinde ortama sonradan eklenen DSS, taşınım üzerinde etkili olamamaktadır. Ancak, aynı hücreler yıkanarak hormon ve tepkimeye girmemiş DSS'ten temizlendikten sonra insülinle taşınım hızı daha fazla arttırılamamaktadır. SDS-akrilamid jel elektrofrezinde insülinin DSS aracılığı ile bağlandığı protein saptanmış, molekül ağırlığının 140 000 dolayında olduğu saptanmıştır. Bu protein, insülin reseptörü gibi insüline yüksek affiniteli olup, doyma kinetiğini taklit etmektedir(103).

Yip v.d., 4-azidobenzoik asidin N-hidroksisüksimid esterini kullanarak <sup>125</sup>I-insülinin(sığır) ışığa duyarlı bir türevini sentezlemişlerdir. Sıçan yağ hücrelerine ışık altında bağlandıkları bu insülin türevini daha sonra SDS ile çözüp 2-merkaptetanol ile indirgedikleri zar preparatlarından yapılan akrilamid jel elektrofrezinde 130 000 molekül ağırlığına sahip bir proteinde bulmuşlardır(104).

#### 1.2.4. İnsülinin Reseptöre Bağlanmasını Etkileyen Etmenler

pH: İnkübasyon ortamının pH'sının düşürülmesi hormon-

reseptör kompleksinin ayrışma hızını düşürmektedir(96). İnsan lenfositlerinde insülinin reseptöre bağlanması için en uygun pH; 7,8 olarak saptanmıştır(24). Bu arada pH 7,5-8,0 arasında olan tamponlar, insülinin parçalanması için de en uygun ortamdır(26).

**Sıcaklık:** İnsan lenfosit kültürlerinde yapılan deneylerde en yüksek bağlanmanın 15 °C'de olduğu görülmüştür(24). Kinetik enerjinin artması nedeniyle genellikle yüksek sıcaklıkta kompleksin yarı ömrü kısalmaktadır(102).

**İyonik Kuvvet:** Yüksek iyonik kuvvet, insülinin yağ hücrelerine bağlanmasına beklenilenden çok daha fazla etkili olmaktadır. Örneğin 2 M derişimindeki NaCl, insülin bağlanmasını 6 kata kadar çıkarmaktadır. Bunun zarda gömülü bulunan bağlanma yerlerinin yüzeye çıkmasından ileri gelmesi olasıdır. Burada NaCl, fosfolipaz C ya da Fosfolipaz A gibi etki etmektedir(84).

**İyonların Etkisi:** İnsan lenfositlerinde insülinin reseptöre bağlanması kalsiyum, magnezyum ve EDTA'dan etkilenmemektedir(24). Kullanılan tamponlarda önemli etkilere sahiptir. PIPES insülin parçalanması açısından en kullanışlı tamponu oluştururken, bağlanma yönünden en kötü tamponlardan biri olmaktadır. TRIS için ise bunun tam tersi geçerlidir(26). Metal iyonları arasında kromun insülin etkisinde özel bir yeri vardır. 20 yıldan beri kromun, normal bir glukoz tolerans testi için mutlaka gerekli olduğu düşünülmektedir. Deneysel krom yetersizliğinin; anormal glukoz tolerans testi sonuçları, büyümenin yavaşlaması, yaşama süresinin kısılması, serum kolesterol düzeyinde artma, ve

çevresel dokuların endojen ve ekzojen insüline olan yanıtında azalma gibi patolojik etkileri vardır(105). Son olarak değinilen bulgu, kromun insülinin hedef hücre zarındaki etkisine bir kofaktör olarak görev alabileceği varsayımını yaratmıştır. Kromun, insülin ve doku insülin reseptörleriyle üçlü bir kompleks yarattığı ve böylece insülinin doku ile etkileşmesini arttırdığı düşünülmektedir(106). İnsülin reseptör etkileşmelerinde krom hakkında henüz ayrıntılı bir kinetik çalışma olmamakla birlikte; glukoz tolerans faktörü adı verilen ve anormal glukoz tolerans testi sonuçlarını normale döndürebilen bir maddeden (maya ekstresinden); nikotinic asit, sistein ve glutamik asitle birlikte kromun elde edilmesi ve yine bu maddelerle krom asetatın özel ve karmaşık bir yöntemle kaynatılarak, glukoz tolerans testi üzerinde maya ekstresi kadar biyolojik etkinliğe sahip bir kompleksin elde edilmesi ilginç görünmektedir(105).

#### 1.2.5. Negatif Kooperatif Etkileşme

Enzim-substrat ilişkilerinde de görülebildiği gibi; hormonlar, reseptörlerine olan afinitelerini, derişimleri değıştiği zaman yitirebilmektedir. Örneğin büyüme hormonunun lenfosit plazma zarlarındaki reseptörlerine olan afinitesi derişimden bağımsız olduğu ve doğrusal bir Scatchard grafiği verdiği halde insülinin kendi reseptörüne olan afinitesi, insülin derişimi arttıkça kaybolmakta ve Scatchard grafiğinde doğrusal olmayan bir özellik göstermektedir(107).

Negatif kooperativite (olumsuz kooperatif etkileşme) adı verilen bu etkileşme biçimi bir çok doku ve hormon için ayrıntılı olarak incelenmiştir(26,81,95-101). Aşırı hormon derişimlerine

karşı bir tampon gibi organizmayı koruduğu düşünölen insölin-reseptör ilişkilerinin önemli bir ögesi olmaktadır.

De Meyts v.d. hem sıçan karaciğeri plazma zarlarından elde edilen insölin reseptörlerinde, hem de insan monosit ve uyandırılmış lenfositlerinden saflaştırdıkları insölin reseptörlerinde negatif kooperatif etkileşmeye rastlamışlardır(96).

<sup>125</sup>I-İnsölinin reseptörden ayrışma hızı, hormon reseptörünün hormonla kapatılma oranı ile yakından ve doğrudan ilgilidir. In vivo derişimlerde ( $3 \times 10^{-11}$ - $2 \times 10^{-10}$  M) insölin reseptörlerinin ancak % 1-5'inin işgal edildiği, fakat bunun hormon-reseptör ayrışma hızını arttırmaya yeterli olduğu saptanmıştır(96).

Cuatrecasas; insölinin yüksek derişimlerde kolayca dimer haline geldiğini, insölin dimerlerinin reseptöre olan afinitesinin çok düşük olduğunu, serbest haldeki insölinin, reseptöre bağlanmış olan insölini reseptör üzerinden, dimerleşerek hızlı bir biçimde ayırdığını ileri sürmüş, bu arada birden fazla tür reseptörün ya da kooperatif etkileşmenin de göz önünde tutulması gerektiğini bildirmiştir(108).

De Meyts v.d. ise fizyolojik derişimlerde insölinin hemen tümünün monomer durumda olduğunu, dimerleşme ile kooperatif etkileşme arasında bir ilgi bulunmadığını, hatta dimerleşmenin baskın olduğu  $10^{-7}$  M'dan daha yüksek derişimlerde kooperatif etkileşmenin giderek kaybolduğunu ileri sürmektedirler(96).

Yüksek derişimde dimer oluşturamayan insölin türev ve çeşitlerinin (tetra(nitrotirozin) insölinin ve kobay insölini) derişimleri arttıkça ayrışma hızları da artmaktadır(96).

Dezalanin-dezasparajin insölinin doğal insölininden 100



kez daha büyük bir dimerleşme değışmezi ( $K_a$ ) vardır. Bu türev, ortama fizyolojik insülin derişiminden 10 000 kez daha derişik olarak konsa bile  $^{125}$ I-insülinin ayrışma hızını değıştirememektedir(96).

Bu bulgular, negatif kooperatif etkileşmenin, insülinin dimerleşmesinden bağımsız olduğunu göstermektedir.

İnsülin reseptörleri çözünürleştirildikleri zaman kooperatif etkileşmelerini yitirmemektedirler. Reseptör preparatları tam olarak zarsal lipitlerden temizlenememekle birlikte, plazma zarı bütünlüğü, reseptörlerarası etkileşme için gerekli olmaktadır(109).

#### 1.2.6. İnsülin Reseptörlerini Denetleyen Etmenler

Hayvan ve insan hastalık modelleri esas alınarak yapılan çalışmalarda; bir hormonun plazmadaki derişimi ile plazma zarlarında bulunan reseptörlerinin derişimi arasında ters bir ilişkinin olduğu görülmüştür(98,110-113).

İnsüline dirençli şişman-hiperglisemik farelerde aşırı hiperinsülinemiye rastlanmaktadır. Bu farelerin karaciğer, yağ ve kalp kası hücrelerinde insülin reseptörlerinin normal düzeye göre % 50-70 oranında azaldığı bulunmuştur(98,110-112). Bu hücrelerdeki reseptörler; afinite, biyolojik özgüllük, bağlanma ve ayrışma değışmezleri ve negatif kooperativite yönünden normaldir (98). Yine bu tür farelerin T lenfositlerinde de aynı bulgular elde edilmiştir. Ayrıca bu lenfositlerde alfa-aminoizobütirat taşınımı azalmıştır(114).

Hiperinsülinemili kişilerden elde edilen lenfosit ve mo-

nositlerde de insülin reseptörlerinin normale göre azalmış olduğu ve bu sayı azlığı ile hiperinsülineminin derecesi arasında bir korelasyon olduğu gösterilmiştir(115,116). Bu tür hastaların özellikle şişman olanlarında, reseptör sayısındaki azlığı, düşük kalorili diyetle normale döndürmek mümkün olmaktadır(115).

İnsülin reseptör sayısının, yüksek düzeydeki insülinle denetlenebilmesi ve azaltılması olayına "down regulation" adı verilmektedir. Ancak bunun bir çok hormon için geçerli evrensel bir olay olduğunu söylemek gerekir(117).

Huang ve Cuatrecasas; insülinin, reseptörü üzerindeki düzenleyici etkisini onun kendi proteolitik etkisine bağlamak istemişlerdir(118). Ancak bu sav, olayın özgüllüğü ile bağdaşmamaktadır. Düzenleyicilik potansiyeli hormonun biyolojik etkinliği ile paralel gitmektedir. Olay sikloheksimid ile inhibe edilmekte ve asıl önemlisi bir çok hormon aynı biçimde kendi reseptörleri üzerinde etkili olmaktadır. Kaldı ki, hormonlar her zaman reseptör düzeyini azaltıcı etki de yapmamaktadır. Örneğin Postner v.d.; prolaktinin, kendi reseptörlerini arttırıcı bir etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir(119).

İnsülinin kendi reseptörleri üzerindeki doğrudan etkileri Gavin v.d. tarafından gösterilmiştir(120). İnsülin içeren ortamda inkübe edilen insan lenfositlerinde, insülin reseptörleri zamana bağımlı olarak azalmakta ve bu olayın hızı ile ortamdaki insülinin derişimi arasında yakın bir ilişki bulunmaktadır. Yine insülin derişimine bağılı olarak reseptörlerin sayısının ancak belirli bir düzeye kadar azalması söz konusudur.

Farklı afinite ve biyolojik etkinliğe sahip insülin ben-

zerleri (analogları) ile yapılan deneylerde de aynı biçimde ve biyolojik etkinlikle yakın ilişki gösteren bir reseptör azalması bulunmuştur(120).

Bağlandığı reseptörlerle kooperatif etkileşmeye giremeyen insülin benzerleriyle yapılan deneylerde yine aynı özellikte bir kontrol mekanizması bulunmuştur. Reseptör sayısını ayarlayan mekanizmanın kooperatif etkileşmeden bağımsız olduğu anlaşılmaktadır(120).

Gavin v.d. yaptıkları çalışmada;  $10^{-7}$  M derişimdeki insülinin reseptörlerde ilk 4 saatte % 40, 24. saate ise % 50 oranında bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir(120).  $10^{-9}$  M'lık derişimde reseptör kaybı ancak % 10 dolayında bulunmakta, ilk 12 saatte ise her hangi bir azalma gözlenmemektedir. İnsülinsiz ortama alınan hücrelerde ise reseptörlerin sayısı 16 saatte eski düzeyine ulaşmaktadır.  $10^{-9}$  M'lık derişim normal düzeye dönüşü tam olarak engellemektedir. Oysa bu derişim "down regulation" olayı için yetersizdir. Bu sonuçlar, fizyolojik derişimlerde ancak kronik hiperinsülineminin reseptör düzeyini etkileyebildiğini göstermektedir(120).

Gorden v.d. ise IM-9 lenfositleriyle yaptıkları bir çalışmada, 6 saat süreyle  $10^{-6}$  M derişimde inkübe edilen hücrelerin insülin bağlama kapasitelerinin % 78 oranında azaldığını, pino-sitik keseciklerinin ise % 95 oranında artmış olduğunu göstermişlerdir(121). Benzer bir çalışmada, insan lenfosit kültürlerinde büyüme hormonunun da, kendi reseptörü üzerinde 'sayı azaltıcı' bir kontrola sahip olduğu gösterilmiştir(95). Ancak büyüme hormonunun reseptör sayısını azaltıcı etkisi için  $10^{-10}$  M gibi çok

düşük bir derişim yeterli olmaktadır. Ortamdan hormonun uzaklaştırılması ile reseptör derişimi normal düzeyine ulaşmaktadır. Bu olaylar hem insülin, hem de büyüme hormonu ile yapılan deneylerde sikloheksimid ile inhibe edilebilmiştir(95).

Reseptör sayısının ayarlanması genellikle özgüdür. Örneğin insülin, kendi reseptörlerini kontrol edebilirken büyüme hormonu reseptörlerinin derişimini etkilememektedir. Bunun tam tersi de geçerlidir(95).

Reseptörlerin endositozla hücre içine girerek parçalanmaları ya da kendi proteinlerinin sentezini önlemeleri sonucu sayılarının azaldığı kabul edilmektedir(bkz.Endositoz).

#### 1.2.7. İnsülin Reseptörlerinin Değişikliğe Ugradığı Patolojik Durumlar

İnsülin metabolizması ve insülin-doku etkileşmeleri ile ilgili en iyi ve geniş bilgilere sahip olduğumuz hastalık diabetes mellitus'tur. İnsülin yapımının ya da salgılanmasındaki bir bozukluk nedeniyle ortaya çıkan ve juvenil diyabet adı verilen çeşidinde, gerçek patoloji kaynağının bilinmesi, insülin ya da insülin salgılatırıcı ilaçların verilmesi ile patolojik bulguların normale döndürülebilmesi reseptör çalışmalarını daha çok erişkin (adult) tip diabet üzerinde yoğunlaştırmıştır.

Juvenil diabette reseptörlerin normal düzeyde bulunmuş olmasına karşın, erişkin tip diabette ve benzer metabolik bozukluklarda insülin reseptörlerinin gerek sayısında, gerekse hormona olan afinitelerinde büyük değişikliklere rastlanmıştır(122).

Erişkin tip diabette, reseptörlerin azlığı nedeniyle insüline verilen yanıtta bir düşme söz konusudur. Hastaların

insülin düzeyleri ise çoğunlukla normal olup bazen hiperinsülinemiye rastlanmaktadır(123).

İnsülin reseptörlerinde nicel ve nitel değişikliklerin saptandığı patolojik durumlardan bazıları aşağıda Tablo II'de verilmiştir:

Tablo 2. İnsüline duyarlılığın değiştiği durumlarda insülin reseptörlerinin özellikleri(122).

Patolojik Durum	Reseptör Derişimi	Reseptörün Hormona olan Affinitesi
İnsüline Dirençlilik:		
Şişmanlık	D	N
Hiperinsülinemik diabet	D	N
Glukokortikoid fazlalığı	N	D
Büyüme Hormonu fazlalığı	D	Y
Lipoatrofit diabet <sup>+</sup>	N,D	N,D
Tip A sendromu <sup>+</sup>	D,N	N
Tip B sendromu <sup>+</sup>	N,Y,D	D
Üremi	D	N
Leprechaunism <sup>+</sup>	N	N
İnsüline Duyarlılık:		
Glukokortikoid yetmezliği	N	Y
Büyüme hormonu yetmezliği	Y	Y
Egzersiz	N	Y

N; Normal, D; Düşük, Y; Yüksek.

+ Bu durumlar genellikle Acanthosis nigricans ile birlikte görülmektedir.

Bu patolojik durumlardan en ilgi çekici olanları; bilinen tedavi dozlarınının 200 katına kadar varan insüline yanıt vermeyen ve insülin reseptör derişimi sıklıkla normal bulunan Tip

A ve Tip B sendromlarıdır(122). Yoğun çalışmalarla bu hastaların plazmalarında yüksek titrede, insülin reseptörlerine karşı oluşmuş otoantikör bulunmuştur(122). Bu antikörler, insülinin reseptöre bağlanmasını ve biyolojik etkinliğini şiddetle önlemektedir(124).

### 1.3. PINOSİTOZ

#### 1.3.1. Pinositozun tanımı ve genel özellikleri

Endositoz, plazma zarından kaynaklanan kesecik ve vakuollerle hücrenin, çevresinden yabancı molekülleri alabilmesini sağlayan bir olaydır. Endositik aktivite iki kısma ayrılmıştır: Fagositoz ya da yeme, ve pinositoz ya da içme. Hem çözünen hem de parçalı maddeler, sırasıyla "pinositoz" ve "fagositoz" yoluyla içeri alındıktan sonra, sitoplazmada taşınım, hücreiçi sindirim ve sonunda "ekzositozla" dışarı atılım olayları birbirini izler(125).

Fagositoz için sözkonusu olan bakteri, parazitler, hücre kalıntıları ile bazı viruslar dışında kalan hemen bütün maddeler pinositozla içeri alınır ki bunlar; ufak parçacıklardan (lipoprotein, ferritin, kolloidler, immün kompleksler v.b.) çözünebilir makromoleküllere (enzimler, hormonlar, antikörler, yumurta sarısı proteinleri, toksinler v.b.), sıvılara ve düşük molekül ağırlıklı çözünenlere kadar uzanır(125).

Pinositoz ayrıca; organizmanın savunması, makromoleküller taşınım, hormonal transformasyon, metabolik yolların düzenlenmesi ve hücrenin beslenmesinde de önemli rol oynar(125).

Tümünde değilse bile ökaryotik hücrelerin çoğunda bu ilkel işlevler vardır. Lökosit, makrofaj, kapiller endotel hücresi tiroid epitel hücresi, yumurta sarısı(yolk) kesesi ve yumurta hücrelerinde bunlar çok daha gelişmiştir(125). Sığır serumunda fare alyuvarlarını aglutine edici ve fare makrofaj kültürlerinde pinositozu arttırıcı etmenler bulunmuştur(126).

Hem aglutine edici hem de pinositozu arttırıcı etkinlik yaşla artmakta olup fötal dana serumunda bu etkinliğe rastlanmamıştır. Cohn ve Parks bu etkinliğin büyük bir kısmını,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ile kesitlenmiş globulinde bulmuşlardır. Çeşitli özellik ve davranışları, bir makroglobulin olduğunu düşündürmektedir. Makrofaj kültüründe ufak miktarlarda sığır makroglobulininin eklenmesi pinositik etkinliği şiddetle arttırmıştır(126).

Sığır serum albümininin bağlı yağ asitlerinden arındırılması ile pinositozu kaçılayıcı etkinliği kaybolmakta, oleik ve linoleik asidin eklenmesi ile başlangıçtaki etkinliğine kavuşabilmektedir(127). Poliglutamik asidin D- ve L- izomerlerinin pinozom (pinositik kesecik) oluşumuna belirgin bir katkılarının olmasına karşın poli-DL-lizin'de bu etkiye rastlanamamıştır(127). Nötral ve bazik amino asitler pinositoz üzerine etkisizken, glutamik ve aspartik asidin etkili oldukları da Cohn ve Parks tarafından gözlenmiştir. Fakat aspartik ve glutamik asitlerin amidleri de etkisizdir. Glutamik ve aspartik asitlerin, lösin ve fenil alaninin D-izomerleri pinositozu inhibe etmektedir. D-glutamik asidin inhibisyonu L-izomeri ile kaldırılabilir. Bir çok mukopolisakkaridler (heparin, hyaluronik asit, kondroitin

sülfat) olağanüstü indükleyicidirler. Dekstran sülfat da oldukça etkin bulunmuştur. Genel olarak anyonik moleküller, hem nötral hem de katyonik moleküllerden daha iyi uyarmaya neden olmaktadır (127).

Fare makrofaj kültürlerinde ortama AMP, ADP ve ATP'nin eklenmesi çok yüksek düzeylerde sitoplazmik keseciklerin oluşmasına yol açmıştır. Adenosin 2'- ve 3'-fosfat ve 3',5'-adenosin fosfatın ise sınırlı etkiye sahip oldukları, diğer bazların nükleotidlerinin ise çok daha az etkili oldukları görülmüştür(128).

Izoelektrik noktaları 5 ya da daha düşük olan albumin ve fetuin gibi bazı proteinler etkin bir biçimde endositik kesecik oluşmasını stimüle etmektedirler(127). Aralarında lizozim, histon ve protamin'in de bulunduğu bazik proteinler ise subletal dozlarda çok az etkilidirler.

### 1.3.2. Pinositoz'un Çeşitleri ve Reseptör Aracılı

#### Pinositoz (RAP)

Bir çok hücre, farklı fakat değişmez hızlarda pinositik kesecikler oluşturarak çözülmüş maddeleri, ortamdaki derişimlerinde olmak üzere içlerine alırlar. Plazma zarına bağlanan maddelerin ise çokça bir kaç bin kez daha hızlı olarak hücreye alındığı gözlenmiştir. Bazen Konkanavalin A (Con A) gibi birden fazla bağlanma bölgesi bulunan (multivalan) bir ligandla birleşmesi, hücrede kesecik akımının uyarılmasına yol açmaktadır(125).

Sıvı faz pinositozu ve adsorptif pinositoz, başlangıçta bazı araştırmacılar tarafından, biyolojik öneme sahip bir çok maddenin hücre içine alınış biçimini tanımlamak için kullanılmıştır (129-133). Çözünen madde; pinositik kesecik içinde kalan sıvı ile



birlikte çözeltili halinde hücre içine alınmakta ve/ya da kesecik zarının iç kısmındaki özel bölgelere bağlanarak içeri girmektedir. Bunlara sırasıyla; "sıvı faz pinositozu" ve "reseptör aracılı pinositoz (RAP, adsorptif pinositoz)" adı verilmektedir. Her iki tipte de içealım (uptake) hızı; keseciklerin sayı ve büyüklüğüne ve oluşma hızına bağlıdır. Sıvı faz endositozunda hız, doğrudan maddenin derişimi ile orantılı olduğu halde, RAP'ta ayrıca hücre yüzeyindeki bağlanma yerlerinin sayısı, afiniteleri ve işlevleri de etkili olmaktadır. RAP, seçici ve deriştirici bir olay olup, hücrenin büyük hacimlerde sıvı almaksızın önemli miktarlarda özgül maddeyi içeri alabilmesini sağlamaktadır(125).

### 1.3.3. Kaplanmış Çukurcuk ve Kesecikler

Birçok endositik keseciğin sitoplazmik yüzü elektron mikroskopta düzgün olarak görünmektedir. Fakat bir çok hücre tipinde ayrıca sitoplazmaya kısa ve düzgün aralıklarla çıkıntılar yapan zara sahip keseciklerin de bulunduğu bir grup araştırmacı tarafından gösterilmiştir(134,135). Bu araştırmacıların ilk tanımlamalarından hareketle, bir örtü ile kaplanmış (coated) yapılar oldukları anlaşılan bu keseciklerin RAP yolu ile bazı maddelerin seçici olarak içeri alınmalarında kullanıldıkları düşünülmüştür(125).

İnsan fibroblast kültürlerinde, lipoprotein içealımı(136) ve yumurta hücrelerinde annenin proteinlerinin içealımı(137) çalışmaları bu savı doğrulamış ve daha ileri boyutlara ulaştırmıştır. Ferritinle bağlanmış proteinler çoğunlukla plazma zarının "kaplanmış çukurcuklarına (coated pits)" bağlanmış ve "kaplanmış kesecikler" oluşturmak üzere içeri doğru girintiler oluşturmuştur.

Kaplanmamış alanlarda çok az ferritin-protein kompleksine rastlanmıştır. Fibroblastlarda; kaplanmış bölgelerin tüm plazma zarı alanının yalnızca % 2'sini oluşturduğu, gelişen hücre yumurtasında ise plazma zarının büyük bir kısmının "kaplanmış" olduğu gözlenmiştir(137).

Kaplı kesecikler, değişik büyüklükte olmakla birlikte genellikle 50-250 nm çaptadırlar(138). Bu keseciklerin çeşitli işlevlerinden biri, gelişme evresindeki sivrisinek yumurta hücresine hücre dışından yumurta sarısı proteininin alınması, ilk kez Roth ve Porter tarafından izlenmiştir(134). Civciv yumurta hücrelerinde yapılan başka bir çalışmada da, bir hücredeki kaplı keseciklerin bir günde bir grama kadar yumurta sarısı proteini taşıyabilecekleri hesaplanmıştır(136).

Başka bir örnek te kurbağa sinir-kas kavşağında, aracı bir bileşiğin salıverilmesinden sonra zarın yeniden kullanılmasıdır. Sinir sonlanmaları, keseciklerin başlangıçta içerdikleri aracı maddenin (asetilkolin) birkaç yüz katını salıverdikleri halde yine de dolu olarak gözlenmektedir. Burada presinaptik keseciklerin içerdikleri maddeyi boşaltmak üzere presinaptik zarla birleşmelerinden sonra, bir tür RAP ile kaplı keseciklerin hızla oluştuğu ve etkin "aracı bileşiği" içeren bu keseciklerin sinir sonlanmasında biriktiği düşünülmektedir(139).

Fibroblastlarda bir çok makromolekülün, bu arada düşük-yoğunluklu lipoproteinlerin(140), epidermal büyüme etmeninin(EGF) (141), alfa 2-makroglobülinin(142) ve insülinin(143) hücreye bu yolla girdiği gösterilmiştir.

Ashwell grubunun çalışmaları, glikoproteinler üzerindeki şeker gruplarının ( in vivo ve in vitro olarak) bu proteinlerin tanınmalarında (ör. içealım) tanımlatıcı olarak görev aldıklarını düşündürmektedir. Şimdiye kadar karbonhidratlara özgül olarak çalışan ve birbirlerinden çok farklı beş ayrı RAP yolu tanımlanmıştır(144-147).

Reseptör aracılı pinositoz hakkında, LDL ile yapılan çalışmalarda bazı ayrıntılı bilgiler kazanılmıştır. Goldstein v.d. fibroblastlarda LDL ile yaptıkları çalışmalarda(140); LDL'nin önce lizozoma kaplı kesecikler tarafından taşındığını, orada protein kısmının parçalandığını, kolesterolün ise zar yapımı ve hücre içinde sterollerin düzeyini denetliyen enzimlerin düzenlenmesi için kullanıldığını gözlemişlerdir. Bu içealım olayında can alıcı nokta LDL'nin hücre yüzeyinde reseptörlere bağlanmasıdır. Ailesel hiperkolesterolemili (homozigot, reseptör negatif) kişilerin hücrelerinde iş gören LDL reseptörü bulunmamaktadır. Bu gibi kişilerin hücreleri normal yolla LDL'yi alamamakta, kolesterol metabolizması bozulmakta ve erken ateroskleroz ölüm nedeni olmaktadır.

Nadir bir allel ise LDL'yi normal olarak bağlayabilen, fakat kaplı çukurcuklara hareket edemeyen reseptör olarak tanımlanmıştır,ve burada da sonuçta LDL'nin hatalı içealımı söz konusu olmaktadır (148). Bu,normal reseptörün LDL bağlama bölgesinden başka ikinci bir aktif bölgeye-içe alınma bölgesine- sahip olmasının gerektiğini düşündürmektedir.

#### 1.3.4. RAP'la İlgili Kinetik Çalışmalar

Anderson ve diğerleri, fibroblastlarda plazma zarının

% 2'sinin kaplı çukurcuklarda bulunduğunu ve 37°C'ta kaplı keseciklerin zardan koparak içe alımlarının bir kaç dakika içinde gerçekleşebildiğini göstermişlerdir. Aynı hücrelerde, protein sentezinin inhibe edildiği deneylerde ise LDL içealım hızı değişmemektedir. Bu sonuç reseptörlerin getirdikleri LDL'nin parçalanmasına karşın kendilerinin parçalanmadan, en azından daha uzun bir süre kaldığını ve lizozomla plazma zarı arasında dönüp dolaştığı biçiminde yorumlanmaktadır.

Yapılan hesaplamalar, 50 dakikalık bir sürede hücre yüzeyine eşit miktarda toplam yüzeye sahip olan kaplı keseciklerin oluştuğunu gösterdiğine ve LDL alımı saatlerce sürebildiğine göre reseptörlerin bir çok kez kullanılmaları kaçınılmaz görünmektedir (137).

Fare peritoneal makrofajlarının her dakika en azından 125 pinositik kesecik oluşturduğu, bunların, hücre yüzeyinin % 3,1'i kadar toplam yüzeye, hücre hacminin ise % 0,43'ü kadar toplam hacme sahip oldukları hesaplanmıştır. Bu hesaplara her 33 dakikada bir makrofaj yüzeyi kadar plazma zarı hücre içine akmaktadır. Fare fibroblastlarında (L hücresi) ise bu süre 125 dakika olarak bulunmuştur. Ancak uzun süre inkübasyon sonunda hücre hacmi ve yüzeyi değişmemektedir. Bu da kesecik zarlarının yeniden hücre yüzeyine dönmesini kaçınılmaz kılmaktadır(149).

RAP, sıvı faz pinositozu ile karşılaştırıldığında çok daha verimli çalışabilen bir olaydır. Bir örnek verilecek olursa;  $10^6$  makrofajın bir saatte ortamdaki çözünük maddenin 1/10 000'ini içeri alabildiğini varsayalım. Eğer hücre yüzeyinde özgül reseptörleri varsa ve reseptörler doyduğu zaman ortamda bulunan bu

maddenin % 1'ini bağlayabiliyorsa hücre bir saatte ortamdaki maddenin % 2'sini içeri alabilecektir, çünkü bu süre içinde plazma zarı iki kez hücre içine akarak değişecektir. Bu örnekte RAP, sıvı faz pinositozundan böylece 200 kez daha verimli çalışmaktadır(149).

Kaplı keseciklere, endositoz olayı dışında da sıklıkla rastlanmaktadır. Bir çok hücrede kaplı keseciklerin Golgi aygıtından tomurcuklanır görünmesi, bunların salgılama yolunu oluşturduklarını düşündürmektedir. Örnek olarak; pankreas ve tükürük bezi (parotis) parankim hücreleri(150,151) ile etkin durumdaki meme dokusunun süt salgılayan hücreleri(152) verilebilir. Franke v.d., kaplanmış keseciklerin bitki ve hayvan hücrelerinde sitokinezis sırasında,yeni plazma zarı oluşmasında da önemli rol oynadığını bildirmişlerdir(153,154)

### 1.3.5. Klatrin (Clathrin)

Son yıllarda hücre kesitlemesi ile, kaplanmış keseciklerce zenginleştirilmiş zar preparatları elde edilmiştir(155,156). Elektron mikroskobunda, ince kesitlerde kesecik yüzeyinde bir kafesi ya da futbol topunu andırır ağsı bir yapı oluşturan bir protein örtüsüyle karşılaşılmiştir. Pearse, molekül ağırlığı 180 000 olan temel bir protein ayırmayı başarmış ve buna "Clathrin" adını vermiştir(156,157). Onun düşüncesine göre; bu protein kalıfı, zarla çevrili hücre organelleri ve plazma zarı arasında keseciklerin mekik gibi gidip gelmelerine yardım etmektedir.

Elektron mikroskopik resimlerinden de yararlanılarak, iki klatrin molekülünün birleşerek polihedral yapılarda kenarları, üç klatrin molekülünün ise birlikte köşeleri oluşturduğu düşünül-

mektedir(Şekil 3). En küçük kaplı keseciğin 84 klatrin molekülünden oluşan bir örtüye sahip olabileceği, 200 nm çapındaki büyük bir kesecikte ise klatrin molekülü sayısının binlere vardığı hesaplanmıştır(138).

Pearse, ayrıca molekül ağırlıkları 100 000 ve 35 000 olan iki protein daha izole etmiş ve bunların her üç klatrin molekülüne birer tane olacak şekilde dağıldığını bildirmiştir. Ancak bunların işlevleri hakkında henüz yeterli bilginiz yoktur (138).

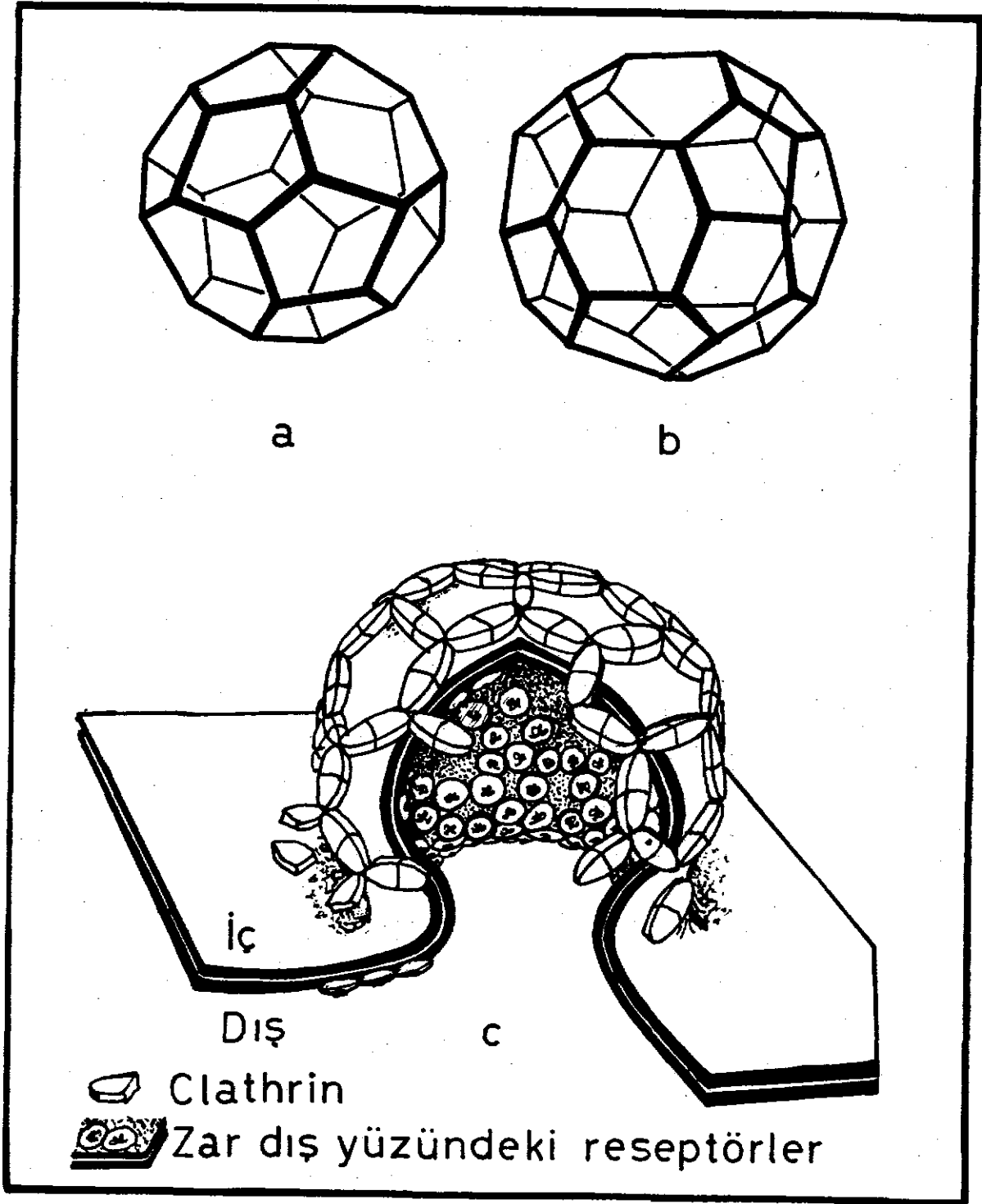
Eldeki bilgilerden yararlanılarak, RAP olayının şematik olarak çizilmiş bir özeti Şekil 4'te gösterilmiştir(138).

#### 1.3.6. Reseptörlerin Kümeleşme Özellikleri

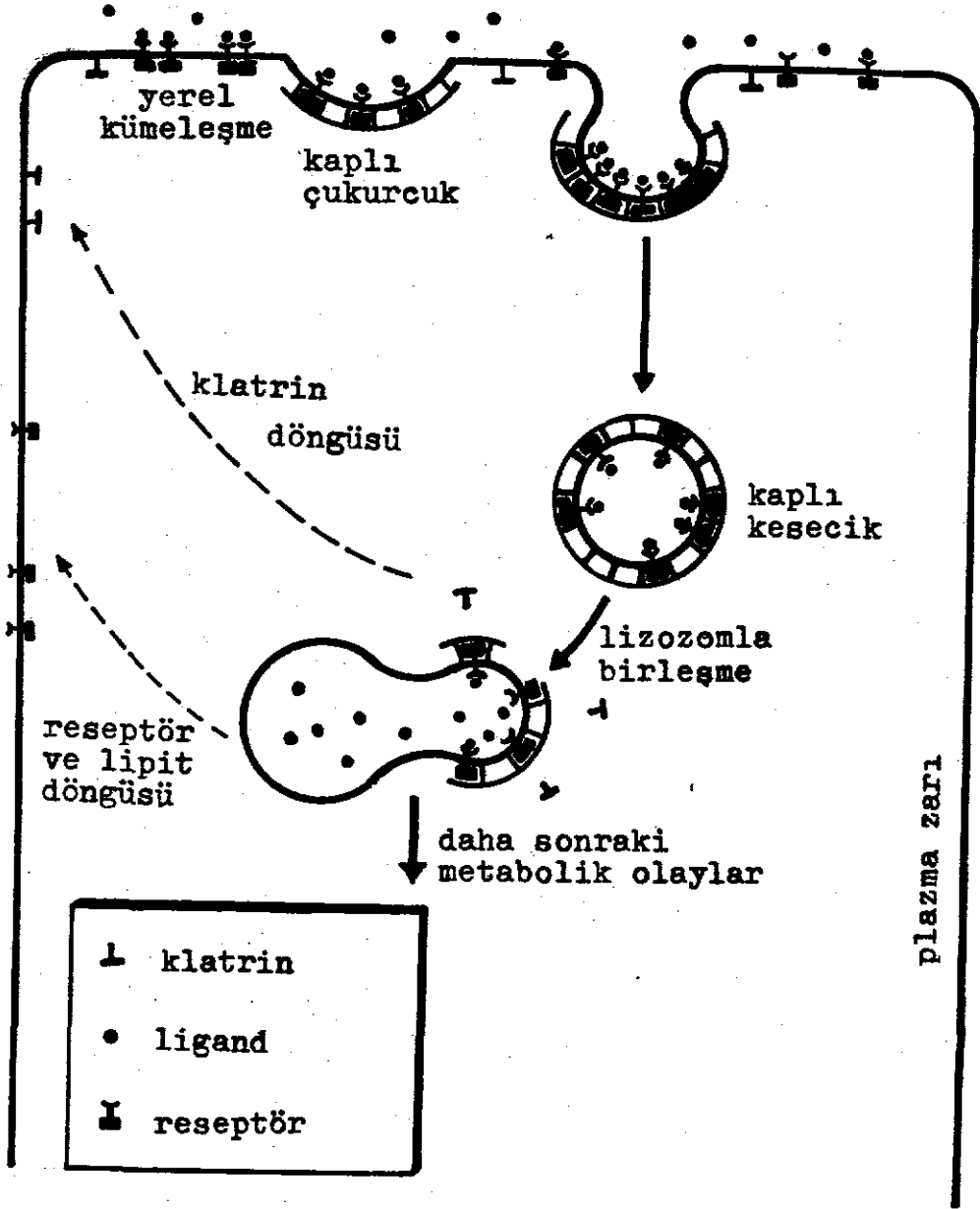
İki yeni yöntem, plazma zarının yapısı ve özellikleri, reseptörlerin etkileşmeleri ve hareketleri konusunda önemli aşamalar sağlamıştır. Bunlar FPR (fluorescence photobleaching recovery) ve VIM (video intensification)'dir ve bunlar canlı hücre üzerindeki fluoresan hormon türevlerinin yerleşimi, yüzeyel ve hücre içine hareketliliğini inceleme olanağını vermektedir.

FPR yönteminde hücre yüzeyinde bir mikronkare kadar küçük bir bölgede bulunan fluoresan hormon derişimindeki, değişiklik ölçülmektedir(86). Önce kuvvetli bir Lazer ışını demeti ile bir bölgedeki fluoresan hormon türevi parçalanarak fluoresans veremez hale getirilmektedir. Daha sonra aynı bölgeye plazma zarından yüzerek gelen fluoresan hormon-reseptör komplekslerinin zar yüzeyindeki diffüzyon katsayısı hesaplanabilmektedir(158-160).

VIM yönteminde ise, hücre yüzeyindeki fluoresan hormon



Şekil 3. Klatrin Moleküllerinin Varsayılan Yerleşim Biçimleri. a, b) Klatrin'lerin geometrik dizilişi, c) Oluşmakta olan bir Kaplı Keseciğin Üzerindeki Klatrin Moleküllerinin Yerleşimi (K. 138'den yararlanılarak çizilmiştir).



Şekil 4. Reseptör Aracılı Pinositoz (RAP) Mekanizması (138).



türevlerinin verdiği fluoresans binlerce kez şiddetlendirilerek ölçülebilmekte ve bu hormon türevlerinin yerleşimleri uzun bir süre gözlenebilmektedir. Bilindiği gibi, gözlenebilecek şiddette fluoresans verebilmesi için çok şiddetli olarak uygulanan ultraviyole eksitasyonu, fluoresan molekülün yapısının bozulmasına ve fluoresansın sönmeye yol açmaktadır. Hücre üzerindeki reseptör sayısı 5 000-10 000 arasında değiştiğinden çıplak gözle oldukça zor izlenebilen düzeyde fluoresans söz konusudur(160).

Bu iki yöntemin tek bir aygıtta birlikte kullanılması ile tek bir hücre üzerinde gözlem yapmak mümkün olmaktadır(160).

FPR yöntemi ve bir lipit faz işaretleyicisi olarak kullanılan 3,3'-dioktadesilindokarbosiyanin (diI) yardımıyla lipit zarın 37°C'de  $D = 8 \times 10^{-9} \text{ cm}^2 \text{ sn}^{-1}$  gibi yüksek bir hareketliliğe sahip olduğu görülmüştür(161). İnsülin ve EGF reseptör kompleksleri için  $5 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \text{ sn}^{-1}$  (23°C) (160) ve Con A reseptörü için ortamdaki Con A derişimiyle ters orantılı olarak değişen  $8 \times 10^{-12}$  -  $3 \times 10^{-11} \text{ cm}^2 \text{ sn}^{-1}$  değerleri bulunmuştur(162).

FPR ve VIM yöntemleriyle yapılan çalışmalarda yaygın olarak dağılım gösteren reseptör-ligand komplekslerinin hücre yüzeyinde mikroskopik yama biçiminde kümecikler yaptığı izlenmiştir. Ancak kümecikler oluşmadan önce bir kaç reseptörlük mikrokümeciklerin oluşmasının gerekli olduğu savunulmuştur. Schlessinger, reseptörlerin hormon varlığında oluşan kümelerini 'lokal' ve 'global' olmak üzere ikiye ayırmıştır. Bir kaç reseptörden oluşan lokal kümeleşmenin 50 milisaniye ile 1 sn arasında oluşabileceği beklenmektedir. Global kümeleşmede ise, reseptör kümecikleri mikronlarca yol aşarak bir kaç yüz reseptörlük kümeler oluşturmakta-

dır ve bu, bir kaç saniye ile 10 dakika arasında bir zaman almaktadır(160).

İnsülin-reseptör ve EGF-reseptör kompleksleri de kümeleşme ve oligomerler oluşturma eğilimi göstermektedirler. Bağlanan hormon tarafından tetiklenen bu mekanizma iyi bilinmemektedir. İnsülinin hücre yüzeyinde kendiliğinden kümeler yapması basit bir mekanizma olarak önerilebilir(162). İnsülinin,  $10^{-6}$  M dolayındaki derişimlerde kendiliğinden dimerler ve oligomerler yaptığı bilinmektedir(161). Mikronkare başına 50 reseptör düşen bir hücrede reseptörlerin insülinle doyurulduğu varsayılırsa yerel olarak insülin derişimi  $10^{-6}$  M dolayına ulaşmaktadır(162).

Başka bir olasılık ta bağlanan hormonun reseptörde, reseptörlerarası etkileşmeyi ve birleşmeyi arttıracak biçimde bir yapı değişikliğine yol açmasıdır(163).

Plazma zarının kaplı bölgelerinde hormon-reseptör komplekslerinin yama biçiminde kümeleşmesi, H-2 ve diğer yüzey antiijenlerinin antikor varlığında kümeleşmelerinden farklıdır(164).

Lokal kümelenme endositozda oldukça önemli bir aşamayı oluşturmaktadır. Reseptörlere karşı oluşmuş antikorlarla yapılan deneyler bunu kanıtlamaktadır(165). İnsüline dirençli olan bazı diabetli hastaların serumlarında insülin reseptörüne karşı otoantikorlar bulunmaktadır. Bu antikorlar reseptörlere bağlanmakta, insülin bağlanmasını inhibe etmekte ve insülinin bir çok metabolik etkisini taklit etmektedir(124). Hem monovalan Fab; hem de divalan (Fab')<sub>2</sub> antireseptör antikor parçaları insülinin bağlanmasını inhibisyonda aktiftirler ve insülin kadar yüksek afinite göstermektedirler. Ancak divalan (Fab')<sub>2</sub> , glukoz oksidasyonunu stimüle

edebilme yeteneğine sahip olduğu halde monovalan Fab' böyle bir etkiye sahip değildir. Monovalan Fab' insülin tarafından stimüle edilen glukoz oksidasyonunda da kompetitif bir inhibitör olarak etki yapmaktadır. Bu farklılık divalan antikor parçasının reseptör kümeleşmesine yol açarken monovalan'ın bunu yapamamasından kaynaklanmaktadır. Gerçekten de iki monovalan Fab' arasında bir köprü oluşturarak reseptör kümeleşmesine yol açan anti-Fab' antikor ortama eklendiğinde biyolojik aktivite sağlanmakta ve divalan (Fab')<sub>2</sub> ile elde edilen sonuçlar tekrarlanabilmektedir. Anti-insülin antikorlarının varlığında da submaksimal dozlarda insülin kontrolden daha fazla biyolojik aktivite gösterebilmektedir(124).

Epidermal büyüme faktörü ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir(166). Normalde aktivite gösterenden çok daha düşük dozlardaki EGF ile birlikte ortama anti-EGF konduğunda biyolojik etkide oldukça büyük bir artma söz konusu olmaktadır. Monovalan Fab' ise bu etkiyi gösterememektedir. EGF'ye bağlama hatası olmamakla birlikte duyarsız kalan bazı hücre türleri (line) anti-EGF ile duyarlı hale getirilebilmektedir. Bunlar hormon-reseptör bağlanmasının tek başına genellikle kısır bir işlem olduğunu, biyolojik etki ve endositoz için lokal kümeleşmenin gerektiğini göstermektedir.

Schlessinger, biyolojik aktiviteye giden olaylar zinciri içinde lokal kümeleşmenin sınırlayıcı bir kademe olmadığını söylemektedir. Araştırmacı, 50 000 reseptör içeren bir hücrede diffüzyon sonucu reseptörlerarası çarpışmanın saniyede otuzu bulunduğunu ve mikronkare başına 50 reseptör düştüğünü hesaplamıştır. Yalnızca 2 500 reseptör içeren bir hücrede bile her 0,8 saniyede bir çar-

pıasma olmaktadır(160). Reseptör kümeleşmesinde sitoplazmik bir bileşenin gerekli olduğunu ve hormonun reseptöre bağlanması ile oluşan lokal kümeleşmelerin bunu aktive ettiğini düşündürecek bulgular vardır(160).

Yarden, hücre içinde etkili sülfidrilli maddelerin alkilleyici gruplarının kümeleşmeyi inhibe ettiğini göstermiştir(160). Hücre dışına etkili olan alkilleyici maddeler inhibisyon yapmaktadır. Fakat ortama söz konusu maddenin içeri sızmasını sağlayan dimetilsülfoksit bulunduğu inhibisyon gözlenmektedir. Bu sonuçtan, reseptör kümeleşmesinin olması için hücreiçi bir alkillenmenin gerektiği anlaşılmaktadır(167).

### 1.3.7. Aminlerin RAP'a Etkileri

Çeşitli aminler ve transglutaminaz enziminin (R-glutaminil-peptitamin -glutamil transferaz, E.C. 2.2.3.2.13) özgül inhibitörleri rodamin-alfa-2-makroglobulin kompleksinin -VIM yöntemi ile-görülebilir yamalar yapmasını önlemektedir(160). Bu enzimin; reseptörle kaplı bölgelerdeki (coated pits) bir proteini birbirine E-(gama-glutaminil)lizin köprüleri yaparak kovalan olarak bağladığı varsayılmaktadır(160). Varsayıma göre, aminler ve inhibitörler, reseptörle protein arasındaki ve kovalan olmayabilen bir birleşmeyi inhibe etmektedir.

Kalsiyumsuz ortam (168), düşük sıcaklık ( $4^{\circ}\text{C}$ ) (169,170) gibi etmenler de inhibitör etkiye sahiptir.

Sando v.d.; fibroblast kültürlerinde, bir lizozomal enzim olan alfa-L-İduronidaz'ın içealımını, TEMED, procain, sikloheksilamin, amonyum klorür ve glukozaminin inhibe ettiğini gözlemişlerdir(171).

Davies grubu, fibroblastlarda EGF, insülin ve alfa-2-makroglobulin ile yaptıkları deneylerde; RAP'ın aminler tarafından inhibisyonunu, transglutaminaz enziminin inhibisyonu olarak yorumlamışlardır(167).

Aminlerin, mannoz uç grubuna sahip glukopeptitlerin RAP yoluyla alınmalarını inhibe ettikleri Tietze v.d. tarafından gösterilmiştir. Amonyum iyonu ve chloroquine varlığında 4°C'de mannozlu bileşiklerin (örneğin:mannoz-albumin) hücre ile inkübasyonu ve daha sonra 37°C'ye getirilmeleri sonucu bağlı ligandın hızla içeri alındığı gözlenmiştir. Fakat 37°C'de uzun süre inkübasyon içealımı inhibe etmektedir. Bu sonuçlar ligandın bağlanması sırasında aminlerin etkisiz olduğunu, aminlerin hücre içindeki reseptör havuzundan ligandın ayrılmasını inhibe edebileceğini düşündürmektedir(159).

Stahl v.d.; makrofajda, mannoza özgül RAP'a aminlerin etkisiz olduğunu göstermişlerdir. Onlarındüşüncelerine göre endositik yol boyunca bir zaraşırı (transmembran) proton gradyentinin reseptörlerin yeniden kullanılmasını sağlaması, bir seçenek olarak kabul edilmelidir. Böyle bir gradientin aminler tarafından ortadan kaldırılması reseptörün hücre içi hareketini inhibe edebilecektir(172).

"Lizozomotropik" olarak adlandırılan ve genellikle bir amin grubuna sahip olan hafif bazik karakterdeki bir grup maddenin en iyi bilinen örneğini Chloroquine oluşturmaktadır. Yeterince lipofilik oldukları için inkübasyon ortamında hücre zarlarını geçerek çeşitli organellere ulaşabilmektedir. Asit bir ortama sahip lizozoma ulaştıklarında proton alarak tutulmakta ve orada

birikime uğramaktadırlar. Yüksek derişimde (örn. 100 uM) kullanılan aminlerin birikim sonucu ozmotik etkileri o kadar fazla olmaktadır ki faz kontrast mikroskobunda açıkça görülebilen vakuoller oluşabilmektedir. Lipofilik özelliği daha fazla olanlar ise protone oldukları halde lizozom zarından dışarı kaçabilmekte, sitoplazmada protonunu geri vererek yeniden yüksüz hale geçmektedirler. Böylece lizozom-sitoplazma arasında bir mekik oluşturarak proton sızmasına ve lizozom içi pH'nın yükselmesine yol açmaktadırlar. Beklendiği gibi birikime yol açarak pH'yı düşüren aminler, mekik gibi proton kaçırarak aminlerden daha az özgül etkinliğe sahiptirler(173). Ligandın, lizozomda reseptörden ayrılmasınının pH'ya duyarlı bir olay olduğu düşünölmektedir(172).

3T3 fibroblast hücreleri ile yapılan deneylerde EGF tarafından indüklenen alfa-aminoizobütirat (AIB) içe alımı, reseptör kümeleşmesini engelleyecek düzeydeki metilamin tarafından inhibe edilmemektedir(160). AIB içe alımı doğrudan hormon derişimi ve zaman ile ilgilidir.

Aynı şekilde 3T3 hücreleri ve hepatositlerde, insülin aracılı AIB içe alım hızı yine aminlerin varlığında değişmemektedir(174).

Maxfield ve ark. 3T3 hücrelerinde EGF ile yaptıkları deneylerde ortama konan metilamin ya da bacitracin'in EGF'ye bağlı DNA sentezi hızını 2-7 kat arttırdığını, hormonun etkisinin hücre yüzeyine olduğunu ve reseptörlerin içe alınmasınının, hormonun etkisini düzenleyici bir mekanizma gibi çalışabileceğini bildirmişlerdir(175).

Amonyak ve çeşitli aminler,  $^{125}\text{I}$ -EGF'nin reseptöre bağlanmasını engellememekte, fakat parçalanmasını engelleyerek hormonun hücre içinde uzun süre depolanmasına neden olmaktadır(176). Hücrelerin aminlerle kısa süre(10 dak.) karşılaştırılmaları ferritin-EGF'nin içealımını inhibüsyona yeterli olmamakta, fakat hormonun parçalanmasını inhibe etmektedir. Uzun süreli inkübasyon ise içealımı da inhibe etmektedir(177).

RAP olayı ile ilgili bilgilerimizi şöyle özetlemek mümkündür(138, 144-147):

a) Pinositik kesecikleri oluşturmak üzere plazma zarının belirlenmiş (kaplanmış) bölgeleri bulunmaktadır.

b) Hormonun yaygın bir biçimde dağılmış olan ve yüzey zarsal reseptöre bağlanmaktadır.

c) Hormon-reseptör kompleksleri ısıya duyarlı bir olaylı plazma zarının kaplı bölgeleri üzerinde görülebilir hareketsiz kümecikler yapmaktadır. Kaplı bölgeler (bağlı liganta mutlaka gereksinme göstermeksizin) reseptörleri deriştirme yeteneğine sahiptir.

d) Görülülebilir bu bölgeler,, enerji gerektiren bir olayla içeri doğru çekilmekte ve kaplı kesecikleri oluşturmaktadır.

e) Kaplı kesecikler hücre içine doğru hareket etmektedirler.

f) Kaplı keseciklerin yeni bir zarla birleşebilmeleri için üzerindeki clathrin örtüsünün kısmen ya da tamamen ayrışması gerekmektedir.

g) Belirli bir keseciğin hangi organelle gideceğini be-

lirleyen, muhtemelen henüz bilinmeyen proteinlerle başarılan bir takım işaretlerin olması gerekmektedir. Belirli bir zarla birleşmeyi sağlayan kesecik üzerindeki örtünün ya da zarın kendi özellikleri olabilir.

h) Örtü elemanları (clathrin ve diğer bazı proteinler) ve reseptör molekülleri yinelenerek kullanılmaktadır.

i) Endositik kesecik ya da lizozomda hormon, reseptörden pH'ya bağımlı olarak ayrılmakta, bu basamakta etkili çeşitli aminler ayrışmayı engellemektedir.

#### 1.4. İNSÜLİN RESEPTÖRLERİYLE İLGİLİ ÇALIŞMALARI KISITLAYAN ETMENLER

İnsülin reseptörleriyle on yılı aşkın bir zamandan beri çok yoğun bir biçimde çalışılmaktadır. Çeşitli patolojik durumlarda, bu arada diabetes mellitus'ta reseptör sayı ve özelliklerinde olan değişiklikler araştırmacıları, tanı koymada bu değişiklikleri saptayarak kullanmaya itmiştir. Ancak insülin reseptörlerinin sayı ve özelliklerinin tanımlanmasında birçok sorunlarla karşılaşmıştır.

Çalışılacak dokunun kolayca sağlanamaması (örneğin karaciğer ve yağ dokusu için biyopsi alınması gereklidir), sağlanabilen doku hücrelerinde (örneğin kan hücreleri) reseptörlerin istenilen düzeyde olmayışı ya da beklenen özgün değişikliği o dokunun göstermeyebilişi karşılaşılan sorunlardan yalnızca birkaçıdır.

Kan hücreleri kolayca elde edilebilmeleri nedeniyle kullanılmaya başlanmış, ancak yine de bazı sorunlarla karşılaşmıştır.



Lenfositler dinlenme durumunda reseptör içermemektedirler (75,76). Bu hücreler mitojenlerle uyarıldıklarında insülin reseptörleri ortaya çıkmakta, ancak bunun için lenfosit kültürünü yapabilecek bir laboratuvarın olması gerekmektedir. Genellikle 25-50 milyon hücre/ml'lik derişimler kullanılmaktadır. Bir Scatchard grafiğı için en az 6 değışik derişim ve biri de kontrol olmak üzere 7 tüpün gerektiğı, her bir tüpten ikişer tane koşut 200 mikrolitrelik örneğın alındığı göz önünde tutulursa 100-150 milyon lenfosit gerekir. Bu ise çalışmalarını, büyük ve olanakları fazla olan laboratuvarlarla sınırlamaktadır.

Monositler; kan hücreleri içinde en fazla reseptöre sahip hücreler olmakla birlikte toplam akyuvarlara olan yüzdeleri çok düşüktür (% 4-8).

Granülositlerin ise oldukça fazla sayıda bulunmalarına karşın hücre başına içerdikleri reseptör sayısı monosit ve uyarılmış lenfositlere oranla daha düşüktür. Sonuç olarak her iki tip hücre ile de çalışmak için büyük hacimlerde (150-500 cc) kan almak gerekmektedir(81). Lökoforez bir çözüm olarak düşünülebilirse de, hücreleri kandan ayırıp, kalan kanı hücreleri yine hastaya vermek, oldukça deneyimli kişiler, steril araç, gereç ve yer gibi bazı koşulları gerektirmektedir. Bütün bu olumsuzluklar tarama-tanıkoyma biçimindeki bir çalışmayı kısıtlamaktadır.

Alyuvarların, akyuvarlardan yaklaşık 1 000 kez daha çok sayıda olmaları, bazı umut verici çalışmaların yapılabilceğini düşündürmüştür. Ancak burada da alyuvar reseptörlerinin insüline olan afinitelerinin mononükleer hücrelerinkine ( $10^{-9}$ -

$10^{-10}$  M)(26,95,101,102) göre çok daha düşük ( $10^{-8}$ - $10^{-7}$  M) olması bazı sorunlar yaratmaktadır. Ayrıca alyuvarların kan hücreleri içinde özel bir yeri vardır. Protein ve reseptör sentezinin olmadığı bu hücreler retikülosit döneminden kalma reseptörleri kullanmakta, yaşlanan hücrelerde yıkılan reseptörlerin yerini yenileri alamamaktadır (178). Hiper- ya da hipoinsülinemi gibi bir durum, ancak eritrosit havuzundaki ortalama reseptör derişimi ölçülebilir düzeyde değiştiği zaman saptanabilecektir. Bu hücrelerde reseptör düzenlenmesi(down regulation) söz konusu olmadığından reseptör derişiminde bir değişikliğin görülmesi uzun zaman almaktadır. Bir örnek verecek olursak:reseptörlerde % 50 oranında azalmaya yol açabilecek bir patolojik durum (ki bu oran oldukça abartmalıdır) bir ay gibi uzun bir süre sonunda ortalama reseptör sayısını yalnızca % 12 dolayında azaltabilecektir. Çünkü bu süre sonunda, alyuvarların ortalama 120 gün kadar yaşamaları nedeniyle, bu hücrelerin ancak dörtte birinde reseptör azalması olacaktır. Bu bize, alyuvarların insülin düzeyindeki hızlı değişmelere duyarsız kaldığını göstermektedir.

#### 1.5. AMAÇ

Endositozun, özellikle RAP'ın oldukça verimli çalışabilen bir hücre olayı olduğu bilinmektedir. RAP, reseptörlerle başarıldığına göre, reseptörlerdeki artma ya da azalmanın RAP üzerinde bir etkiye sahip olması beklenebilir. Ayrıca, eğer hormon sıvı faz pinositozunu da uyatabilecek nitelikte ise, bu olayın hızında da bir değişiklik yapması beklenmelidir.

RAP yoluyla içealım, eğer az sayıda hücre ile izlenebiliyorsa, bunun bize az sayıda hücre ile çalışarak reseptör hakkında bazı bilgiler verebileceği düşünülebilir. Ancak bunun için reseptör sayısı ile endositoz arasında nasıl bir ilişkinin bulunduğunun ortaya çıkarılması gerekmektedir.

Bu çalışmada; özgül bağlanma ile sıvı faz pinositozu ve RAP hızları arasındaki ilişkiler incelenmeye çalışılmış, özellikle RAP hızının ölçülerek reseptörlerin sayı ve nitelikleri hakkında bir bilgi edinme olanacağının olup olmadığı araştırılmıştır. Bu amaç için; granülositler, diğer akyuvarlara oranla daha çok bulunmaları, hızlı bir endositik etkinlik göstermeleri ve daha kolay elde edilmeleri nedeniyle denek hücre olarak seçilmiştir.

Granülositlerin, diğer kan hücrelerine göre olumsuz olan zarsal proteaz etkinlikleri sorunu, deneyler proteaz inhibitörleri bulunan ortamlarda yapılarak aşılmaya çalışılmıştır.

## G E R E Ç V E Y Ö N T E M L E R

Deneylerde kullanılan kan örnekleri; Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Psikiyatri Polikliniğine ve A.İ.T.İ.A. Tıp Fakültesi Kan Bankası'na başvuran gönüllü ve herhangi bir endokrin bozukluğu olmayan hastalardan ve Kızılay Kan Bankası'ndan sağlandı.

Domuz ve sığır insülini, PMSF, BSA, iyodoasetamid Sigma Chem.Co.A.B.D.'den; DNAaz, Boehringer Mannheim, Batı Almanya'dan; <sup>3</sup>H-sukroz, Radiochemical Centre, İngiltere'den; <sup>125</sup>I-insülin (domuz), Radiochemical Centre, İngiltere ve Ire-Sorin, İtalya'dan; Ficoll 400, Pharmacia Fine Chemical AB, İsveç'ten; Isopaque, Winthrop, A.B.D.'den, hücre kültürü ortamları (F-10) ve fötal dana serumu, GIBCO, A.B.D.'den, PPO, POPOP, Triton X-100 ve toluen, BDH, İngiltere'den, Hyamin hidroksit, Packard Instrument Co., A.B.D.'den, dibütilftalat ise Plastifay A.Ş., İstanbul'dan sağlandı. Kullanılan diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta idi.

Deneylerde; Beckman çok amaçlı santrifüj (TJ-6) ve MSE klinik santrifüj, sıvı sintillasyon sayacı (Packard Tricarb, Model

3004 ve 3380), gama sayacı(Packard Model 5105 ve Nuclear Chicago), mikrofüj(Fisher),metabolik çalkalayıcı(Dubnoff,Precision Scientific) ve mikroskop(Olympus) kullanıldı. Doku kültürü plakları ise Falcon,A.B.D.'den sağlandı.

## 2.1. Hücre suspansiyonlarının hazırlanması

2.1.1. Kanın alınması: Deneyde kullanılan kan örnekleri; önkol veninden hipodermik iğne ile, içinde alınacak kanın 1/10'u kadar % 2'lik EDTA içeren ve silikonize edilmiş 250 ml'lik cam santrfüj tüplerine alındı. Kanın EDTA ile karışması sağlanarak ayırma işlemine kadar 4°C'de saklandı.

## 2.1.2. Akyuvarların alyuvarlardan ayrılması

EDTA'lı kan içeren santrfüj tüplerine, alınan kanın 8 katı soğuk hemoliz çözeltisi(155 mM NH<sub>4</sub>Cl,10 mM NaHCO<sub>3</sub>,1 mM EDTA,pH:7,4) eklendi(179). Karıştırılarak 10 dakika 4°C'de bekletildikten sonra soğuk odada 400x g'de 10 dakika santrfüj-de çevrildi. Üstte kalan hemolitik kısım atıldı. İkinci kez yinelenen hemolizden sonra eğer alyuvar kalmışsa, aynı işlem bir kez daha yinelenildi. Üç kez soğuk PBS ile yıkanan hücreler aynı çözelti ile, alınan kanın 1/4'ü kadar hacimde suspansiyon haline getirildi.

## 2.1.3. Granülositlerin mononükleer hücrelerden ayrılması

Bu işlem için önce Böyum'un bulduğu yöntem (180) kullanıldı. Ancak; Ficoll'un yerli piyasada çok pahalı olması ve genellikle kişisel olanaklarla yetinilmesi nedeniyle yöntem değiştirildi ve aşağıda tanımlandığı biçimde kullanıldı:

a) Bøyum'un yöntemiyle granülositlerin elde edilmesi

5 kısım, % 5,7 gr Ficoll 400 ve % 9 gr Isopaque (3,5-Diasetamido-2,4,6-triiyodobenzoik asit, disodyum tuzu) içeren ayırma çözeltisi ( $d^{20}$ : 1,077) üzerine, PBS ile 1:2 oranında sulandırılmış 8 kısım kan, karışmayı engelleyecek ve üstte bir tabaka oluşturacak biçimde yavaş yavaş pipetlendi. Oda sıcaklığında 40 dakika ve 400x g'de klinik santrifüjde çevrildi. Ficoll tabakası ve üzerinde kalan mononükleer hücre tabakası bir Pastör pipeti yardımıyla çekilerek atıldı. Kalan hücreler iki kez PBS ile yıkandı. Hemoliz çözeltisi iki kez ve yukarıda anlatıldığı gibi uygulandı. Daha sonra üç kez PBS ile yıkanan hücreler uygun tamponda suspansiyon haline getirildi.

b) Urografin çözeltisiyle granülositlerin ayrılması

Urografin (3,5-Diasetamido-2,4,6-triiyodobenzoik asit, disodyum ve metilglukamin tuzu), hacminin 4,4 katı 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7,4) ile sulandırıldı. Bir yoğunlukölçer yardımıyla yoğunluğu 1,077 gr/ml'ye, aynı tampon çözelti kullanılarak ayarlandı. Genellikle 1 ml Urografin için 4.47 ml tampon gerekti.

Bøyum'un yöntemi, Ficoll-Isopaque yerine hazırlanan Urografin çözeltisi kullanılarak uygulandı. İki yöntemi karşılaştırma için PBS ile sulandırılan kan kullanıldı ve daha sonra hemolize edildi. İnkübasyonlar için ise önceden hemolize edilen ve yıkanan akyuvar suspansiyonu kullanıldı.

2.1.4. Hücrelerin canlılıklarınının saptanması(Boya dışlama testi)(181)

Bu test için Eozin Y'nin PBS içindeki % 0,05'lik çözeltisi kullanıldı. 50 mikrolitre hücre suspansiyonu 450 mikrolitre Eozin Y çözeltisi ile karıştırıldı. İki dakikalık beklemeden sonra mikroskop altında boyanmamış hücrelerin toplam hücrelere sayıca oranı en az 200 hücre sayılarak saptandı.

2.1.5. Akyuvar formülünün yapılması (182).

Kandan ve elde edilen hücre suspansiyonlarından yapılan yaymalar kurutularak Wright boyası ile boyandı. Mikroskopta immersiyon objektifi ile, en az 200 hücre sayılarak oranlar hesaplandı.

2.1.6. Hücrelerin kümeleşmelerinin önlenmesi

Bu amaçla Norrby v.d. tarafından önerilen DNAaz yöntemine başvuruldu(183). Ficoll-Isopaque ya da Urografin ile ayırma işleminden sonra başlayarak her ortamda, DNAaz I son derişimi 200 Ü/ml olacak şekilde kullanıldı.

2.2. İnsülinin parçalanmasının ölçülmesi

$10^{-10}$  M , taşıyıcı insülin kullanılarak hazırlanmış  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  ve  $10^{-5}$  M derişimdeki radyoaktif insülin; PMSF (son derişimi  $5 \times 10^{-4}$  M) içeren ve içermeyen F-10 doku kültürü ortamında, granülosit varlığında ( $6 \times 10^6$  h/ml) ve yokluğunda  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyon tüplerinden; 0, 30, 60, 120, 180 ve 240. dakikalarda 250 mikrolitrelik örnekler alınarak, 3 ml % 15'lik trikloroasetik asit (TCA) içeren polistiren tüplere pipetlendi. 250 mikrolitre % 5'lik sığır serum albümini

(BSA) eklenerek karıştırılan tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra klinik santrfüjde 1200x g'de 10 dakika çevrildi ve üstte kalan sıvı kısım bir aspiratör yardımıyla çekilerek atıldı ve tüplerin ağzı kapatılarak gama sayacında sayıldı. Kör değeri çıkarılan sayım sonuçları dakika başına sayım (dbs) olarak hesaplandı.

### 2.3. Sıvı faz endositozunun ölçülmesi

Sıvı faz endositozu Wagner v.d. tarafından tanımlanan yöntem(184) kullanılarak ölçüldü.

Bir kullanımlık (disposable) 24 kuyulu doku kültürü plaklarında(Falcon,3008) dörder kuyuya; kontrol değerini(bağlanma v.b.) bulmak üzere K, endositozu ölçmek üzere E ve insülinin neden olduğu endositozu ölçmek üzere I işaretleri kondu. Doku kültürü ortamında hazırlanan hücre suspansiyonunun pipetlenmesinden sonra, dokunduğu yüzeyle etkin hale geçebilecek hücrelerin yine istirahat haline geçmesi ve sonuçların etkilenmemesi için 30 dakikalık ön-inkübasyon uygulandı. K işaretli kuyulara son derişim 2 mM olacak şekilde iyodoasetamid eklenerek ikinci bir 30 dakikalık ön-inkübasyon uygulandı. Daha sonra sırasıyla; DNAaz(son derişimi 200 Ü/ml),PMSF(son derişimi  $5 \times 10^{-4}$  M),  $^3\text{H}$ -sukroz (son özgül etkinliği 0.5  $\mu\text{Ci/ml}$ ) ve insülin (son derişimi  $10^{-6}$  M) eklendi. Plakların kapakları kapatılarak  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübasyona kondu. Inkübasyon başlangıcında (0. dakika) ve 120. dakikada E ve I kuyularınının ikişer tanesine iyodoasetamid eklenerek endositoz durduruldu. Plaklar,kapakları kapalı olarak özel sepetlere sahip bir santrfüjde(Beckman TJ-6) 20 dakika sü-



reyle 1200x g'de çevrildi. Üstte kalan kısım bir aspiratör yardımıyla çekilerek atıldı. Plaklar üç kez 80 mM işaretsiz sukroz içeren PBS çözeltisi ile ve santrifüj yardımıyla yıkandı. İnkübasyon ortamından kurtarılan hücreler; önce 100 mikrolitre, ikinci kez 50 mikrolitre Hyamin hidroksitle 50°C'de homojen görünümlü bir sıvı oluşuncaya kadar inkübe edilerek (genellikle 1 saat) çözüldü. Çözüntü bir otomatik pipetle sayım şişelerine aktarıldı. Sıvı faz endositozunun deney şeması aşağıda verilmiştir:

Tablo 3: Sıvı Faz Endositozunun Ölçülmesi

	K	E	İ
Hücre suspansiyonu, $10^6$ h/ml	400 <sup>+</sup>	400	400
İyodoasetamid, 100 mM	10	-	-
DNAaz, 4000Ü/ml	25	25	25
PMSF, 25 mM	10	10	10
<sup>3</sup> H-Sukroz, 12,5 µCi/ml	40	40	40
İnsülin, $4 \times 10^{-5}$ M	-	-	25
F-10 doku kültürü ortamı	15	25	-

Sayılar, 500 mikrolitre inkübasyon karışımı için pipetlenen miktarları mikrolitre olarak göstermektedir.

2.4. Sayım çözeltilisinin seçimi ve radyoaktivitenin saptanması

Yaygın olarak kullanılan Bray sayım çözeltilisinin Hyamin hidroksitin rengi nedeniyle sayım verimini düşürmesi (quenching) ve sayımların genellikle düşük olması nedeniyle Turner tarafından tanımlanan sayım çözeltilisi kullanıldı (185). Sayım çözeltilisi; toluen-PPO-POPOP-Triton X-100 (sırasıyla 1000 ml, 5 gr, 0,1 gr ve 500 ml) içermekteydi.

Hyamin hidroksitli hücre çözüntüsü içeren sayım şişelerine 10'ar ml sayım çözeltilisi eklendi, karıştırılarak bir gece karanlıkta, soğuk odada bekletildi. Beş dakika süreyle sayılarak sonuçlar dba olarak hesaplandı.

2.5. İnsülinin granülositlere bağlanmasının ölçülmesi

Bu deneylerde inkübasyon karışımı;  $6 \times 10^6$  h/ml derişimde granülosit, değişik derişimlerde (bkz. Tablo 7) radyoaktif insülin,  $5 \times 10^{-4}$  M PMSF ve 200 Ü/ml DNAaz I içeriyordu.  $10^{-10}$  M ve daha düşük derişimlerdeki inkübasyon tüplerine taşıyıcı insülin katılmadı. Daha yüksek derişimler ise  $10^{-10}$  M radyoaktif insüline taşıyıcı insülin eklenerek elde edildi. 120 dakikalık inkübasyon ( $37^{\circ}\text{C}$ ) sonunda 1 ml'lik örnekler alınarak, hücreler serbest hormondan ayrıldı (bkz.2.6.). Gama sayacında sayılarak bağlanan ve serbest hormon miktarı ve birbirine oranları ( B, F ve B/F) saptandı. B/F değerlerinin B değerlerine karşı grafiği (Scatchard) çizilerek hücre başına düşen reseptör sayısı ve değişik derişimlerdeki afiniteler hesaplandı (186).

2.6. Hücrelere bağlanan hormonun serbest hormondan ayrılması

Inkübasyon tüpünden alınan 1 ml'lik örnekler, 250 mikrolitre dibütilftalat(DBF) içeren Eppendorf tipi plastik tüplere kondu.DBF, 1,055gr/ml yoğunluğa sahip hidrofobik bir bileşik - tir ve bu amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır(80,81). Mikro- fünde 7000x g'de 2 dakikalık santrifüjlemeden sonra bir aspira- tör yardımıyla üstte kalan sıvı ve fazla DBF çekilerek atıldı. Plastik tüplerin uç kısmı ısıtılmış bir bistüri ağzı ile kesi- lerek plastik sayım tüplerine kondu.

2.7. İnsülinin hücrelere bağlanma ve içeri alınmasının ölçülmesi

2.7.1. Zamana göre bağlanma ve RAP'ın ölçülmesi

Nonspesifik bağlanmayı ölçmek için soğuk insülin ve iyodoasetamid içeren NSB tüpü, bağlanmayı ölçmek için yalnız iyodoasetamid içeren B tüpü ve RAP'ı ölçmek için bu iki madde- yi de içermeyen E tüpü olmak üzere her denek için üç inkübas- yon tüpü hazırlandı. Tablo 4'teki gibi pipetlemeler yapıldı. Granülositlerin fagositoz yeteneklerinin olması nedeniyle, in- kübasyon tüplerinin yüzeyinin hücreleri etkinleştirerek yanlış sonuçlara yol açmaması için radyoaktif insülin konmadan önce hücreler 30 dakikalık bir ön-inkübasyona tabi tutuldu. İnsüli- nin eklenmesinden hemen sonra (0. dakika) ve 240. dakikada her üç tüpten birer örnek (250 mikrolitre) alındı ve doğrudan sayı- larak ortalamaları, ortalama toplam sayım(T) olarak kabul edil- di. Inkübasyonun 0., 30., 60., 120., 180. ve 240. dakikalarında her üç tüpten 1 ml'lik örnekler alındı, 2.6.'daki gibi bağlan-

mayan insülininden ayrıldı ve bir gama sayacında sayıldı.

Tablo 4: İnsülinin Zamana Göre Granülositlere Bağlanması ve RAP yoluyla İçeri Alınmasının Ölçülmesi

	NSB	B	E
İyodoasetamid, 50 mM	40 <sup>x</sup>	40	-
PMSF, 25 mM	20	20	20
DNAaz, 4000 Ü/ml	50	50	50
Hücre kültürü ortamı, F-10 %7,5 FCS	190	290	330
İnsülin, 10 <sup>-5</sup> M	100	-	-
Hücre suspansiyonu, 12x10 <sup>6</sup> h/ml	500	500	500
<sup>125</sup> I-İnsülin	100	100	100

<sup>x</sup> Sayılar, her ml inkübasyon karışımı için pipetlenen çözelti miktarlarını mikrolitre olarak göstermektedir.

#### 2.7.2. Hücre derişimine göre insülinin granülositlere bağlanma ve içeri alınmasının ölçülmesi

Her denek için değişik hücre derişimlerinde (2, 4, 6 ve 8 x 10<sup>6</sup> h/ml) olmak üzere NSB, B ve E tüpleri hazırlandı. İnkübasyon tüplerinin bileşimi hücre derişimleri dışında 2.7.1.'dekinin aynı idi. Ön-inkübasyon sonunda radyoaktif insülin eklendi. Sıfırıncı ve 120. dakikalarda her üç inkübasyon tüpünden 1 ml'lik örnekler alındı, bağlanmayan insülininden ayrılarak gama sayacında sayıldı. Ayrıca 0. ve 120. dakikalarda alınan birer örnek doğrudan sayılarak ortalamaları, ortalama toplam sayım olarak kabul edildi.

### 2.7.3. Sıcaklığın insülinin granüositlere bağlanmasına ve içeri alınmasına etkisinin ölçülmesi

Bu deneylerde inkübasyon karışımı 2.7.1.'de olduğu gibi hazırlandı ve hücreler, 4°C, 15°C, 22°C, 30°C ve 37°C'de 120 dakika inkübe edildi. Sıfırıncı ve 120. dakikalarda 1 ml'lik örnekler alınarak hücreleri serbest hormondan ayrıldı ve gama sayacında sayıldı. Ayrıca 0. ve 120. dakikalarda birer örnek alınarak doğrudan sayıldı ve ortalamaları, ortalama toplam sayım olarak kabul edildi.

### 2.8. Sonuçların değerlendirilmesi

#### 2.8.1. Sıvı faz pinositozu değerlerinin saptanması

Doku kültürü plaklarında K,E ve İ kuyularının yanı sıra toplam sayım için pipetleme yapılan ve bu kuyularla aynı bileşimde olan T kuyularındaki inkübasyon karışımı 120. dakika sonunda pipetle doğrudan sayım şişelerine aktarılarak gama sayacında sayıldı ve sayım ortalamaları (T) saptandı.

K,E ve İ kuyularından elde edilen sayımlarda, 120. dakika ile 0. dakika sonuçları arasındaki farklar (sırasıyla K, E ve İ) hesaplandı. İ ile E arasındaki fark, insüline bağlı olarak içeri alınan net sukroz, E ile K değerleri arasındaki fark ise hücrelerin insüliniz ortamda yaptıkları net sıvı faz pinositozu sonucu aldıkları sukroz olarak kabul edildi. Bu değerlerin ortalama toplam sayıma(T) bölünmeleri ile % oranları bulundu.

#### 2.8.2. İnsülin reseptör sayısının ve hormona olan afinitesinin hesaplanması

Bu amaçla önce bağlanan hormon miktarı (  $\frac{B}{T}$  x inkübas-

basyon ortamındaki hormon miktarı) ve serbest hormon miktarı(gr) (toplam hormon miktarı - bağlanan hormon miktarı) hesaplandı. Buradan çıkarılan B/F oranları, bağlanan hormon miktarına(B) karşı bir grafik kâğıdına çizildi. Elde edilen ve doğrusal olmayan eğrinin absisi kestiği yer maksimum bağlama kapasitesi olarak saptandı . Bulunan değer hücre sayısına bölünerek bir hücrenin bağlayabileceği insülin miktarı, bu değer de insülinin molekül ağırlığına bölünüp Avogadro sayısı( $6,02 \times 10^{23}$ ) ile çarpılarak bir hücrenin bağlayabileceği insülin molekülü sayısı hesaplandı.

Afinite ise;Scatchard grafiğindeki eğimden,ve aşağıdaki formülden hesaplandı:

Denge durumunda;  $I [H_f] \cdot [R_f] \cdot k_1 = [H_b] \cdot k_{-1}$  olacaktır.

Burada;  $H_f$ , serbest hormon derişimi,  $R_f$  serbest reseptör derişimi,  $H_b=R_b$  bağlanan hormon derişimi ve  $K_d = \frac{k_{-1}}{k_1}$  olduğuna göre eşitlik,  $\frac{F}{B} \times [R_f] = K_d$  olarak yazılabilir. Bu na göre her hormon derişiminde elde edilen sonuçlar kullanılarak değişik  $K_d$ 'ler saptandı.

2.8.3. İnsülinin zamana,hücre derişimine ve sıcaklığa göre hücrelere bağlanma ve içeri alınma sonuçlarının değerlendirilmesi

Burada da 2.8.1.'de olduğu gibi önce her serinin 120. ya da değişik dakikalarda alınan örneklerinin sayım sonuçlarından 0. dakika sonuçları çıkarılarak net sayımlar elde edildi. B değerinden NSB değerlerinin ortalaması çıkarılarak özgül bağlanma miktarı, E değerinden B değerlerinin ortalaması çıkarılarak endositoz miktarı hesaplandı. Bu değerlerin ortalama

toplam sayıma (T) bölünmeleri ile % B ve % E değerleri bulundu.

#### 2.8.4. Kullanılan istatistiksel yöntemler

Ficoll-Isopaque ve Urografin ile hücrelerin ayrılması sırasında elde edilen verim, canlılık ve akyuvar formülleri ile sıvı faz endositozu sonuçları t dağılım testi kullanılarak karşılaştırıldı (187). Değişik süreli inkübasyonlarda elde edilen bağlanma ve endositoz sonuçları arasındaki ilişki saptanırken korrelasyon katsayısı aynı kaynaktan yararlanılarak hesaplandı. Yine bağlanma ve endositoz arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile bulunarak grafik çizildi. Bu hesaplamalarda programlanabilir bir hesap makinesi (HP-25) kullanıldı.

## B U L G U L A R

### 3.1. Hücrelerin ayrılmasıyla ilgili bulgular

#### 3.1.1. Akyuvarların alyuvarlardan ayrılması

Amonyum klorürlü hemoliz çözeltisinin alyuvarların yanı sıra mononükleer hücreleri de parçaladığı, granülositlerin toplam akyuvarlara olan oranının hemoliz sonunda arttığı saptandı. Hemoliz öncesi, granülositlerin toplam akyuvarlara oranı % 63 iken, hemoliz sonrası bu oran % 82'ye yükseldi. Aminlerin endositoz üzerine olan olumsuz etkileri nedeniyle hücrelerin daha sonra tümüyle amonyum klorürden temizlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle ozmotik şoka göre daha uzun süren bu yöntem, granülositlerin oranca zenginleşmesine neden olduğu için tercih edildi.

#### 3.1.2. Granülositlerin mononükleer hücrelerden ayrılması

Böyum'un yöntemi ile, değiştirilerek kullanılan ve Ficoll içermeyen yöntemden elde edilen sonuçlar Tablo 5'te verilmiştir. Bu iki yöntemin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları sonucu aralarında önemli bir fark olmadığı ve birbirinin yerine kullanılabileceği anlaşıldı.



Tablo 5: Granülosit Ayırmakta Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

		Ficoll- Isopaque	Urografin
Akyuvar formülü (%)	Granülosit	94 ± 3	95 ± 2
	Lenfosit	4 ± 2	3 ± 2
	Monosit	3 ± 2	2 ± 1
Canlılık oranı (%)		98 ± 2	97 ± 3
Granülosit verimi (%)		51 ± 4	57 ± 6

Hazırlanan Urografin çözeltisinin ozmolalitesi 540 mOsm  $\text{kg}^{-1}$  olarak bulundu. Bu değerin izotonik çözeltilerinkinden (310 mOsm  $\text{kg}^{-1}$ ) daha yüksek olmasına karşın, Urografin çözeltisinde oda sıcaklığında 2 saat süreyle tutulan granülositlerin ve mononükleer hücrelerin canlılık oranlarında herhangi bir değişiklik gözlenmedi.

### 3.1.3. Granülositlerin Canlılık Oranı

Deneylerde kullanılan granülositlerin canlılık oranının daima % 95'in üstünde olmasına özen gösterildi. İnkübasyonların başında ortalama % 97 olan bu canlılık oranı ilk 120 dakika boyunca (37°C'de) % 95'in altına inmedi. Ancak; 3. saatin sonunda canlılık oranı % 92, 4. saatin sonunda ise % 87'ye indi.

Eozin Y yöntemi, aynı amaçla kullanılan tripan mavisi yöntemine oranla daha az zaman alması nedeniyle uygun bulunarak kullanıldı.

### 3.1.4. Hücrelerin kümeleşmesine DNAaz'ın etkisi

Norrby v.d. tarafından önerilen yöntemin oldukça etkin

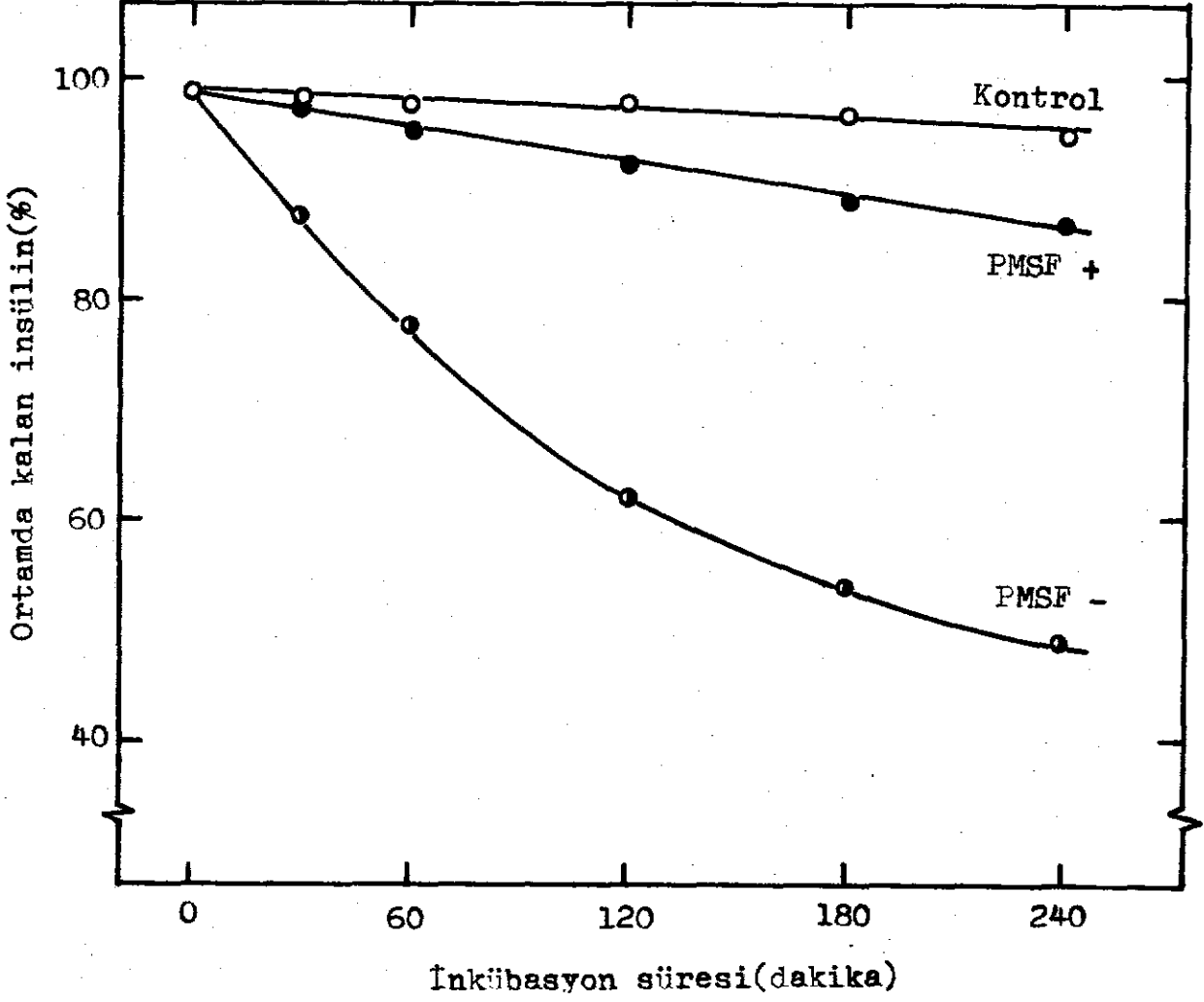
olduğu saptandı. DNAaz derişimi, özgül etkinliği 200 Ü/ml olacak şekilde ayarlandı. Bu,  $6 \times 10^6$  hücre/ml derişim için en uygun olanıydı. Mililitresinde 100 Ü DNAaz içeren inkübasyon karışı - mında hücrelerin kümeleşmesinin önlenemediği gözlemlendi. Hücre derişimini arttırdıkça DNAaz derişimini de arttırmak gerekti. İnkübasyonun 2. saatından sonra DNAaz'a karşın ufak kümeleşme - lerin olduğu saptandı.

### 3.2. İnsülinin Parçalanması

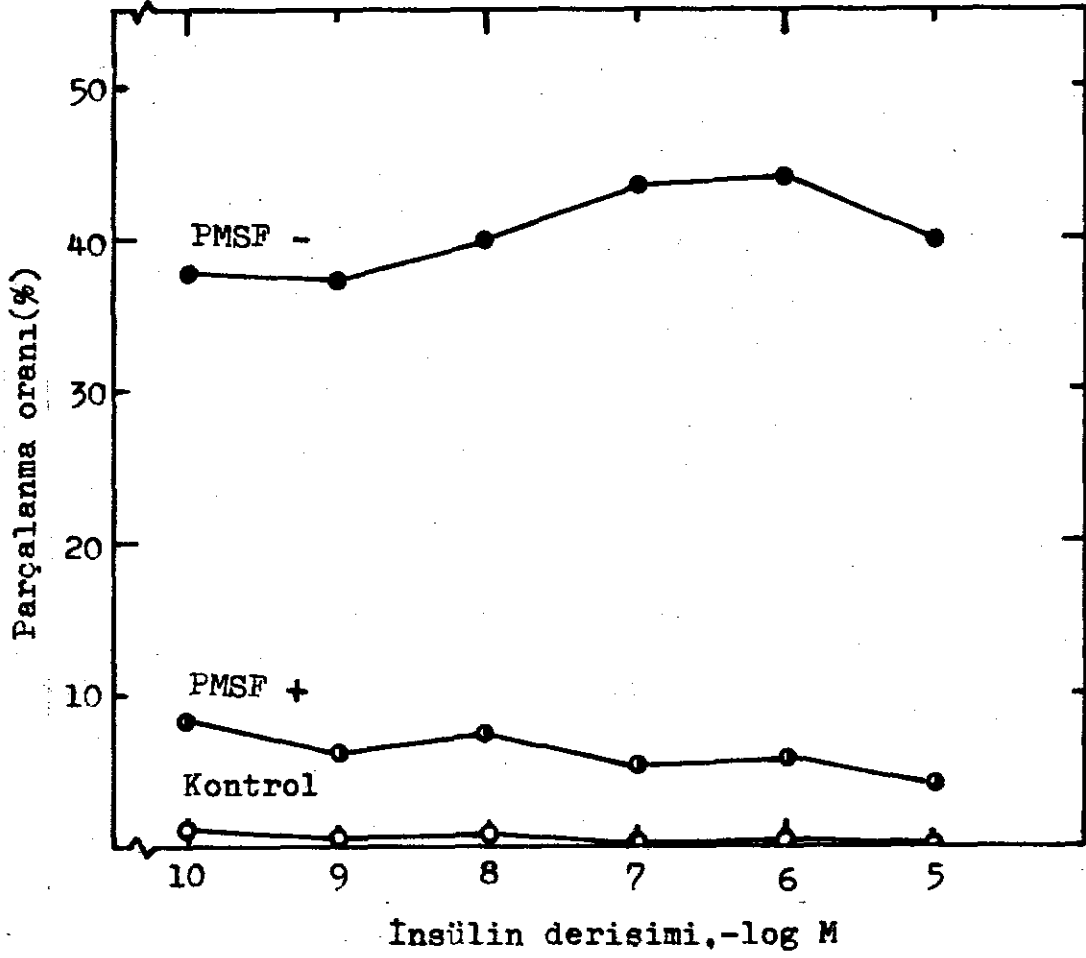
Granülositlerin önemli miktarda proteaza sahip oldukla - rı,  $10^{-10}$  M derişimdeki insülinin; 30 dakikada % 12'sinin, 2 saatte % 38'inin ve 4 saatte ise % 51'inin parçalandığı saptan - dı. İnsülin parçalanmasını önlemek için kullanılan PMSF'nin ( $5 \times 10^{-4}$  M) insülin yıkımını % 80 oranında engellediği bulundu. Sonuçlar Şekil 5'te verilmiştir. PMSF'nin 1 mM'lık derişimi hücrelerin canlılığı üzerinde herhangi bir değişiklik yamadı, fakat insülinin yıkımını önleme yönünden etkisi de olmadı. Parçalanmanın % 20 kadar bir kısmı PMSF ile inhibe edilemedi.

İnsülin derişiminin, insülinin granülositler tarafından parçalanmasına olan etkisi incelendi. Parçalanmanın en yüksek olduğu derişim,  $10^{-7}$  -  $10^{-6}$  M arasındaydı. Bu derişimlerdeki insülinin parçalanma oranının ,  $10^{-10}$  M derişimdeki insülinin yıkımından % 15 daha fazla olduğu saptandı(Şekil 6).

TCA yöntemiyle çöktürmede, hücre-siz tüplerde (kontrol) hormonun TCA üzerine pipetlenmesinden sonra, çökmenin tam ola - bilmesi için ayrıca BSA da eklenmesinin gerektiği(son derişimi % 0,3) gözlemlendi. Kontrollerde, insülin derişimi eğer  $10^{-8}$  M'dan daha düşük ise , BSA eklenmemesi halinde insülinin çökme -



Şekil 5. İnsülinin Granülositler Tarafından Parçalanması ve PMSF'nin Etkisi. Hormon derişimi,  $10^{-10}$  M.



Şekil 6. İnsülin Derişiminin İnsülinin Granülositler Tarafından Yıkılmasına Etkisi.

sinin tam olmadığı ve bunun yanlış sonuçlara götürdüğü anlaşıldı.

### 3.3. Sıvı Faz Pinositozunun Ölçülmesi

Sıvı faz pinositozu sonuçları Tablo 6'da verilmektedir.

Tablo 6: Sıvı Faz Pinositozu Ölçüm Sonuçları

İnsülin (-)		İnsülin (+)	
448 <sup>x</sup>		465	
325		332	
415		398	
396		410	
501		570	
469		548	
425 ± 62	$\bar{x} \pm s$	443 ± 83	
T = 195 800		K = 870	

<sup>x</sup> Sayımlar, dbs/ 0,5 ml olarak verilmiştir.

Tablo 6'dan görüldüğü gibi; granülositler radyoaktif sukroz ile 37°C'de 2 saat inkübe edildiğinde, ortama konan tüm sukrozun % 0,22'sinin sıvı faz pinositozu ile içeri alındığı bulundu. Ortama konan 10<sup>-6</sup> M insülin ise sıvı faz pinositozunu etkilemedi ( insülinli pinositoz oranı % 0.23). Bir sıvı faz pinositozu inhibitörü olan iyodoasetamid inkübasyon ortamına konulduğunda endositozla içeri alınan sukroz miktarının iki katı kadar sukrozun da hücre zarına bağlandığı saptandı.

### 3.4. Radyoaktivitenin Sayılması

Turner tarafından tanımlanan Toluen-Triton X-100 sayım çözeltisinin, Bray'in dioksan içeren sayım çözeltisine göre % 35 oranında daha fazla sayım sağladığı saptandı(185,188).

Bununla birlikte 0,25 mikroküri radyoaktif sukroz kullanılarak yapılan deneylerde, hücreleri çözmek için kullanılan hyamin hidroksitin sayımı % 25 oranında düşürdüğü bulundu.

### 3.5. İnsülinin Granülositlere Bağlanması

Mililitresinde  $6 \times 10^6$  granülosit içeren inkübasyon ortamları, değişik derişimlerde radyoaktif insülinle inkübe edildi. Elde edilen sayımların güvenilirliğini arttırmak için ortamdan çekilen örneğin hacmi 1 ml'ye çıkarıldı. Inkübasyon ortamından çekilen örnekteki hücreler santrifüj yardımıyla serbest hormondan ayrıldı. Elde edilen sayımlardan, bağlanan (B) ve serbest(B) insülin miktarları bulunarak bağlı/serbest oranı (B/F) hesaplandı(Tablo 7). Bu değerlerden yararlanılarak Scatchard eğrisi çizildiğinde  $6 \times 10^6$  hücre için maksimum insülin bağlama kapasitesinin 17.4 femtomol olduğu ve hücre başına ortalama 1750 insülin reseptörü bulunduğu saptandı(Şekil 7).

Deneylerde endositoz inhibitörü olarak kullanılan iyodoasetamidin, çalışılan insülin derişimi aralığında, insülinin granülositlere bağlanmasını değiştirmedeği gözlemlendi.

Değişik insülin derişimleri için ayrışma değişmezi( $K_d$ ); hem Scatchard eğrisindeki eğimlerden(185) hem de kısım 2.8.2.'de verilen eşitlikten yararlanılarak hesaplandığında her iki yöntemle de aynı sonuçlar bulundu ve Tablo 8'de verildi.

İnsülin derişimi değiştikçe ayrışma değişmezinin de aynı yönde değişmesi reseptör-insülin etkileşmesinin negatif kooperativite mekanizması ile olduğunu gösterdi(96,107).

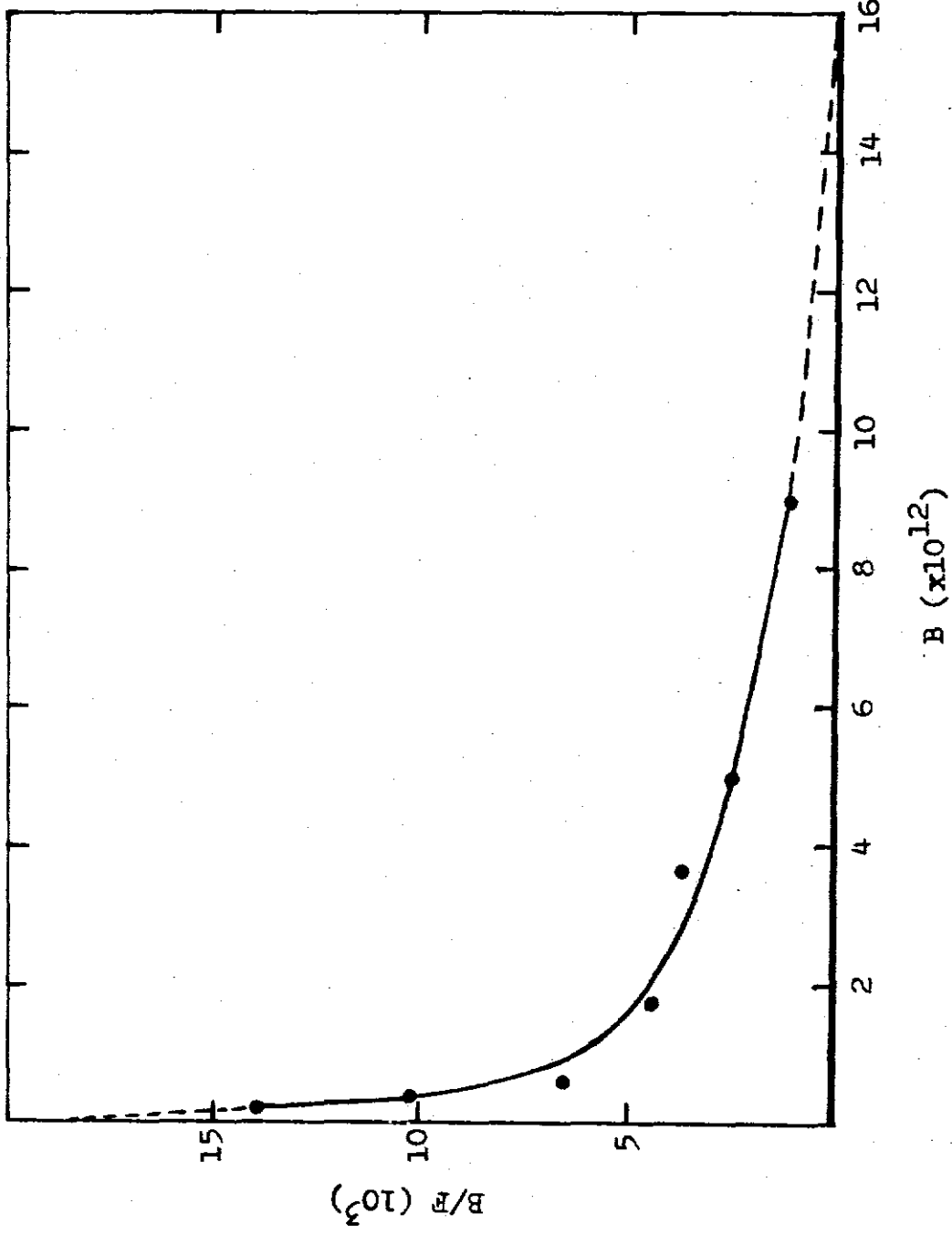
Tablo 7: İnsülinin Granülositlere Bağlanması

Hormon Derişimi (M)	Sayım (dbs)	Özgül Bağlanma (dbs/ml)	Toplam Sayım (dbs/ml)	%B ( $\times 10^3$ )	B ( $\times 10^{12}M$ )	B/F ( $\times 10^3$ )
$2 \times 10^{-11}$	615	305	26200	11,6	0,23	11,6
$5 \times 10^{-11}$	840	530	66380 <sup>a</sup>	8,0	0,40	8,1
$1 \times 10^{-10}$	1034	726	128040 <sup>b</sup>	5,7	0,54	5,4
$5 \times 10^{-10}$	785	475	(ort.)	3,7	1,77	3,6
$1 \times 10^{-9}$	710	400		3,1	3,00	3,0
$1 \times 10^{-8}$	432	122		1,0	9,1	0,9
$1 \times 10^{-5}$	310	0		Kör : 185		

a ve b; sırasıyla 0,5 ve 0,25 mililitrelik örneklerin sayım sonuçlarından hesaplanmıştır

Tablo 8: Değişik İnsülin Derişimleri İçin Hesaplanan Ayrışma Değişmezleri ( $K_d$ ).

İnsülin, M	$K_d$ , M
$2 \times 10^{-11}$	$1,7 \times 10^{-9}$
$5 \times 10^{-11}$	$2,4 \times 10^{-9}$
$1 \times 10^{-10}$	$3,6 \times 10^{-9}$
$5 \times 10^{-10}$	$5,1 \times 10^{-9}$
$1 \times 10^{-9}$	$5,7 \times 10^{-9}$
$1 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-8}$



Şekil 7. İnsülinin Granüositlere Bağlanması.  
 B/F; bağlanan hormon/serbest hormon oranı, B;  
 bağlanan hormon miktarı, mol/lt.



### 3.6. İnsülinin Hücrelere Bağlanması ve İçeri Alınması

Granülositlerde reseptör sayısının az olması nedeniyle beklenildiği gibi bağlanma ve pinositozun düşük düzeyde olduğu bulundu.

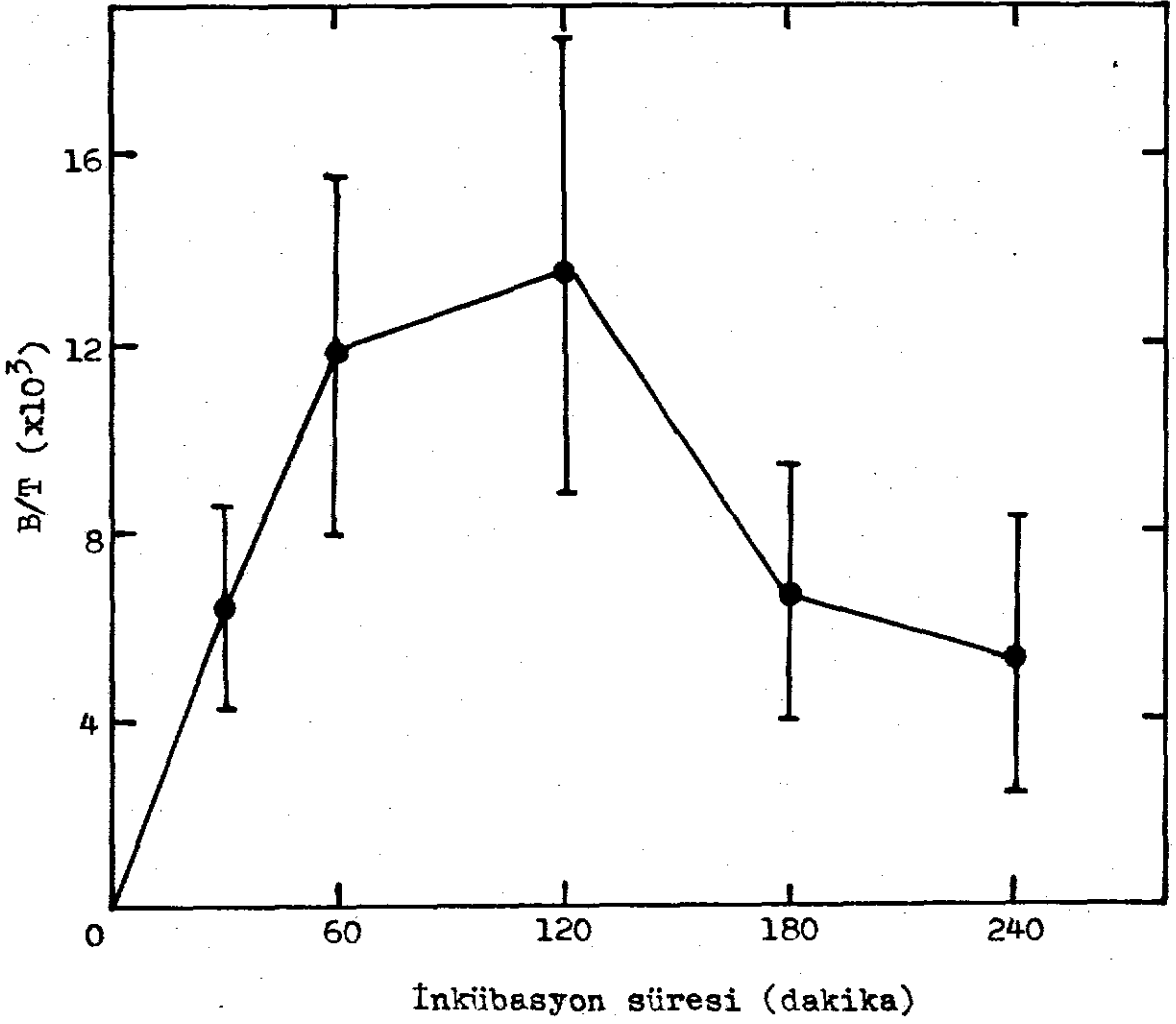
İnsülinin bağlanması zamana göre izlendiğinde; birinci saatta bağlanmanın geçen süre ile doğrusal bir biçimde arttığı, birinci saattan sonra bağlanma hızının düşmekle birlikte ikinci saatta en yüksek düzeyine ulaşan bağlanmanın, bundan sonra hızlı bir düşüş gösterdiği ve üçüncü saattaki bağlanma düzeyinin otuzuncu dakikadaki bağlanma düzeyine kadar düştüğü saptandı (Şekil 8). Dördüncü saatta bağlanma düşmeğe devam etmekle birlikte hızı azaldı.

Aynı hücrelerde bağlanmaya paralel olarak RAP ölçüldüğünde; ilk iki saatta zamana göre doğrusal olarak artan içealm hızının daha sonraki saatlarda düşerek bir platoya ulaştığı gözlemlendi. İnkübasyonun 30, 60, 120, 180 ve 240'inci dakikalarında RAP ortalama değerleri yüzde olarak ve sırasıyla; 0,28 , 0,51 , 0,78 , 0,90 ve 0,74 bulundu (Şekil 9).

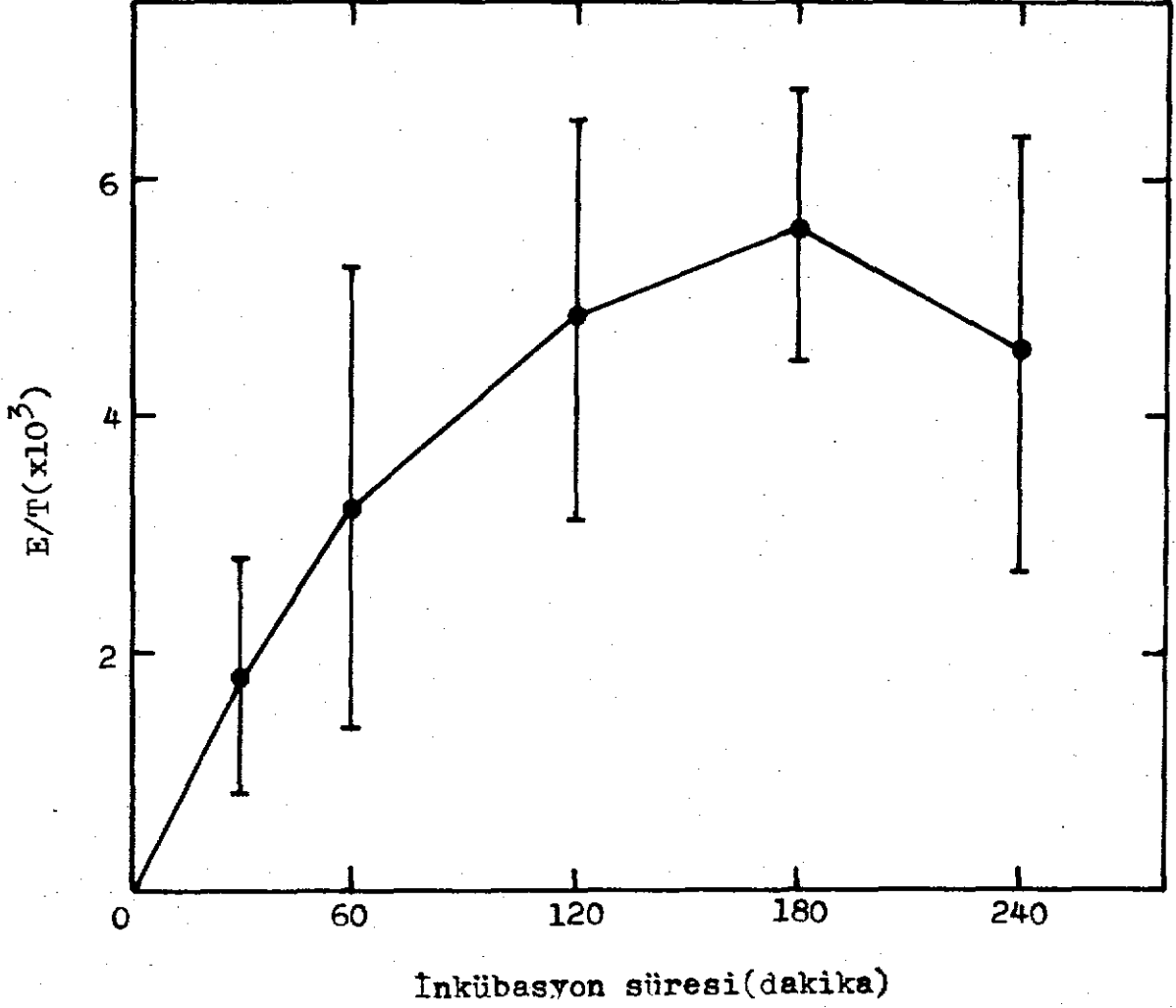
Hücre derişimine bağlı bağlanma ve RAP'ı ölçme deneylerinde ise; 2, 4, 6 ve 8 milyon/ml derişimlerdeki granülositlere ortama konan radyoaktif insülinin, sırasıyla ve yüzde olarak 0,44, 0,94 , 1,04 ve 1,30 oranlarında bağlandığı ve aynı örneklerin ortamdaki insülinin, yine aynı sırayla ve yüzde olarak 0,49 , 0,70 , 0,85 ve 1,04'ünü RAP yoluyla içeri aldıkları saptandı (Şekil 10 ve 11).

### 3.7. Sıcaklığın Pinositoz ve Bağlanmaya Etkisi

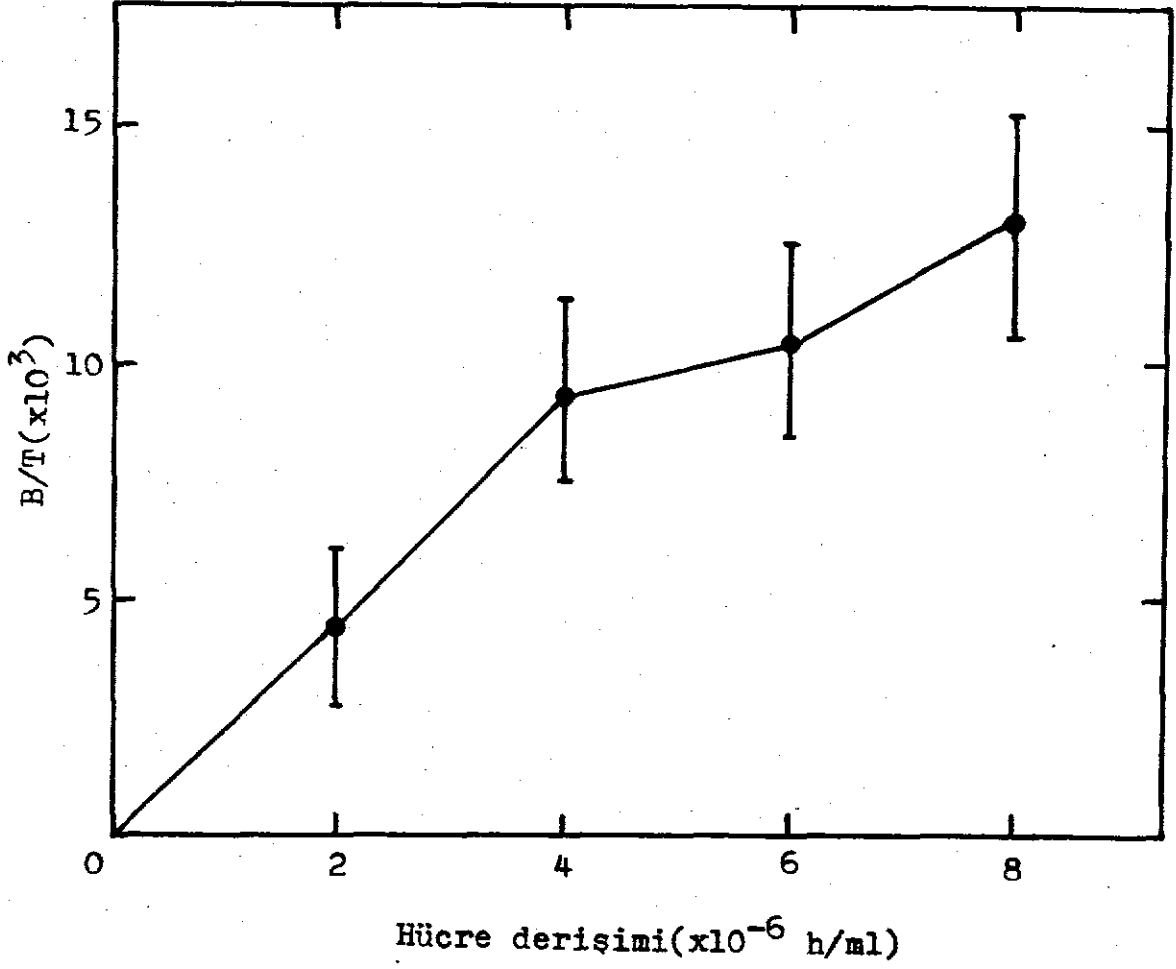
İnsülinin bağlanması üzerine sıcaklığın etkisi araştı-



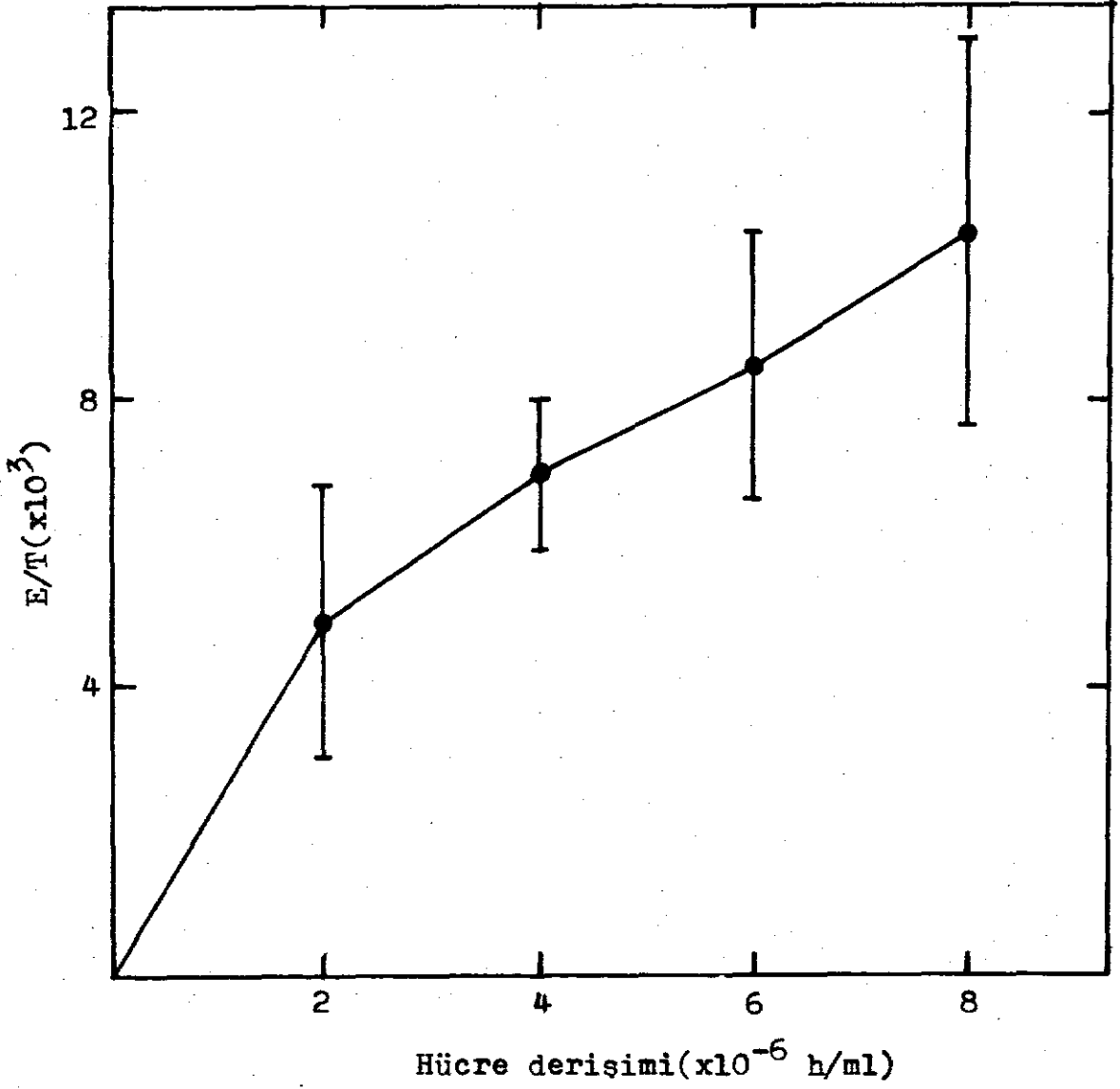
Şekil 8. İnsülinin Granülositlere Bağlanması'nın İnkübasyon Süresine Göre Değişimi. B/T; bağlanan insülinin ortama konan toplam insüline oranı.



Şekil 9. İnsülinin RAP Yoluyla İncealımının Inkübasyon Süresine Göre Değişimi. E/T; içealınan insülinin ortalama konan toplam insüline oranı.



Şekil 10. Granüositlere İnsülinin Bağlanması ile Hücre Derişimi Arasındaki İlişki. B/T; bağlanan insülinin ortama konan insüline oranı.



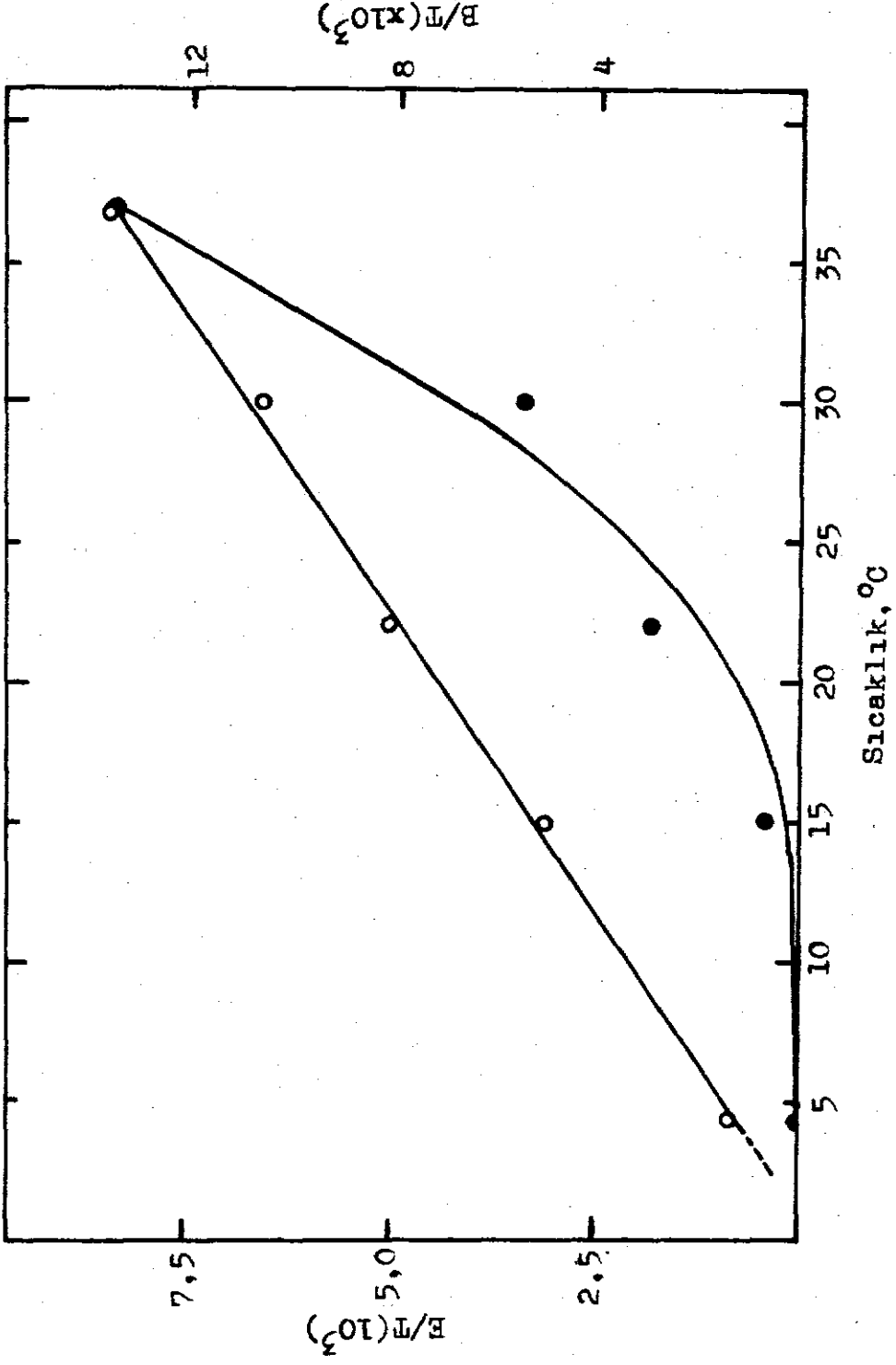
Şekil 11. Granüositlerde İnsülinin RAP Yolu ile İçalınmasının Hücre Derişimi ile İlişkisi. E/T; RAP yolu ile ıçalınan insülinin ortama konan toplam insüline oranı.

rıldığında artan sıcaklık ile bağlanma arasında 4°C'den başlayarak doğrusal bir artış gözlemlendi (Şekil 12). Değişik sıcaklıklarda; 4°C, 15°C, 22°C ve 30°C'de saptanan bağlanma düzeylerinin 37°C'deki bağlanma düzeyinin yüzdesi olarak sırasıyla, 0,10, 0,37 , 0,59 ve 0,78 olduğu bulundu.

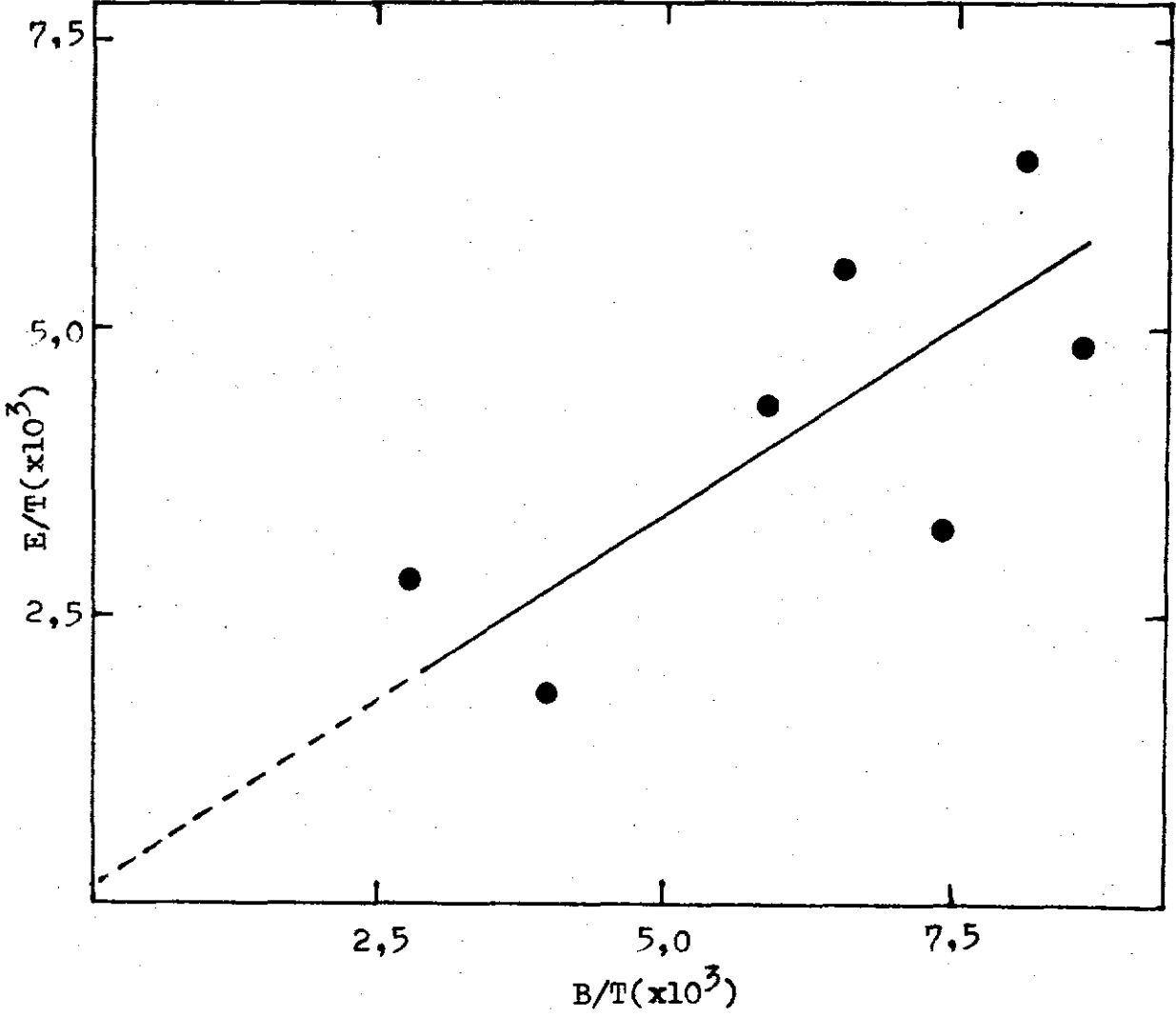
Pinositoz ölçümünde ise, 15°C'ye kadar ölçülebilir bir pinositoz olayı gözlemlenmedi. Bulunan değerlerin 37°C'deki değerlerin % 5'inden daha küçük olduğu saptandı. On beş derecenin üzerindeki sıcaklıklarda ise RAP düzeyinin üssel (exponential) olarak arttığı bulundu(Şekil 12).

### 3.8. İnsülinin Bağlanmasının RAP'la ilişkisi

İnsülinin granülositlere bağlanması ve RAP'la içeri alınması arasındaki ilişki incelendi. İlk 120. dakika için zamana göre bağlanma ve içeri alınma sonuçları ve hücre sayısına göre bağlanma ve içeri alınma sonuçları arasındaki ilişki, korrelasyon katsayısı (r) hesaplanarak incelendi. Korrelasyon katsayısı 0,85 olarak bulundu. Lineer regresyon analizi ile elde edilen  $y(\text{Endositoz}) = 0,63 \cdot x(\text{Bağlanma}) + 0,02$  doğru denkleminin sonuçlara uygunluk derecesi ( $r^2$ ) için 0,77 değeri bulundu. Buna göre bağlanma ile endositoz arasında çok yüksek olmamakla birlikte bir ilişkinin bulunduğu saptandı( Şekil 13).



Şekil 12. İnsülinin Granülositlere Bağlanması ve RAP Yolu ile İçeriliminin Sıcaklıkla İlişkisi. E/T (•-•-•); RAP'la içeri alınan insülinin ortama konan toplam insüline oranını, B/T (o-o-o) ise bağlanan insülinin ortama konan toplam insüline oranını göstermektedir.



Şekil 13. İnsülinin Granülositlere Bağlanması ile İçerilimi Arasındaki İlişki. E/T; RAP yoluyla içeri alınanın ortama konan toplam insüline oranını, B/T ise bağlanan insülinin ortama konan toplam insüline oranını göstermektedir.



## T A R T I Ő M A

Hücreleri ayırmada kullanılan amonyum klorürlü hemoliz çözeltisinin tam kandan akyuvarları doğrudan ayırabilme özelliğine sahip oluşu, diğer yöntemlere (ozmotik şok, saponin v.b.) göre bir üstünlüğünü oluşturmaktadır(181). Ayrıca, aynı hemoliz çözeltisinin mononükleer hücrelerin bir kısmını da parçalaması granülositlerin tüm akyuvarlara olan oranını arttırmaktadır. Bu nedenle amonyum klorürün ideal bir hemoliz aracı olduğu görüldü. Ancak, aminlerin, bu arada amonyum klorürün endositoz üzerine olan etkisi nedeniyle amonyum klorür içeren hemoliz çözeltisi artıklarının iyice temizlenmesi gerekmektedir. Deneylerde bu konu üzerinde dikkatle durulması nedeniyle amonyum klorürün ölçülen endositoz üzerinde böyle olumsuz bir etkisinin olmadığı düşünüldü.

Amonyum klorürün yanı sıra dekstran ve benzeri maddelerle akyuvarları çöktürme işlemleri denendi, ancak bu maddelerin

alyuvarların yanı sıra özellikle granülositleri de çöktürerek granülosit verimini azalttığı gözlemlendi. Söz konusu dekstran ve benzeri maddelerin hücre kümelenmesine neden olduğu değişik araştırmacılar tarafından da gösterilmiştir(181).

Ficoll'un pahalı olması ve kolay sağlanamaması nedeniyle bu maddeyi kullanmadan hücre ayırma yöntemi geliştirildi. Bu amaçla Urografin kullanıldı ve hemen hemen aynı sonuçlar elde edildi. Bu yeni yöntem, henüz diğer kan hücreleri açısından (örneğin lenfositlerin ayrılması) yeterince incelenememiş olmasına karşın granülosit ayrılması için çok uygun olduğu bulundu. Urografin'li granülosit ayırma yönteminin diğer bir üstünlüğü de Urografin'in çok kolay sağlanabilmesidir.

Ficoll'un alyuvarların aglütine olmasına yol açarak, Isopaque'ın ise ayırma için uygun yoğunluğu sağlayarak hücrelerin birbirinden ayrılmasını sağladıkları gösterilmiştir(180). Ficoll-Isopaque çözeltisi, sulandırılarak tabaka halinde üzerine konan tam kandaki lenfosit ve monositlerin diğer hücrelerden ayrılmasını sağlamakta, ancak alyuvarlardan başka granülositleri de yüksek yoğunluğa ( $d= 1.085$  gr/ml) sahip olmaları nedeniyle çöktürmektedir. Ficoll-Isopaque yönteminde, Ficoll ayrıca granülositlerin kümeleşme eğilimini de kamçılamaktadır. Oysa Urografin'li yöntem, hücrelerin ayrılmasında yalnızca yoğunluğu temel aldığı için granülositlerin ayırımı bakımından Ficoll-Isopaque yönteminden daha iyi olduğu görüldü.

Hücrelerin canlılıklarını ölçmek için kullanılan eozin Y yöntemi, kısa sürdüğü ve pratik olduğu için tercih edildi. Tripan mavisi ile yapılan testlerde en az 30 dakika süreyle hü-

relerin boya çözeltilisi içerisinde inkübe edilmesinin gerekmesi, koyu renkteki zemin içinde öldüğü için boyanmış hücrelerin zor seçilebilmesi nedeniyle granülositlerin ölçümünde daha uygun olan eozin Y yöntemi tercih edildi.

Hücrelerin inkübasyon başında daima % 95'ten daha yüksek bir canlılık oranına sahip olmasına özen gösterildi. Ancak 4. saatte granülositlerin % 13'ünün öldüğü ve ölen hücrelerin kümeleşmeye yol açtığı gözlemlendi.

Granülositlerin elde edilmesinde ve inkübasyonunda kümeleşmelerini önlemek amacıyla Norrby v.d. tarafından önerilen DNAaz kullanıldı(183). Kesin olarak bilinmemekle birlikte ölen hücrelerden açığa çıkan DNA moleküllerinin sağlam hücrelerin plazma zarlarına yapışarak hücre kümeleşmesine neden olduğu sanılmaktadır. Var sayıma göre DNAaz bu hücre kalıntılarındaki DNA'yı parçalamakta ve kümeleşmeyi önlemektedir(183). DNAaz'ın deneylerde kümeleşmeyi bir dereceye kadar önleyebildiği ve calkalanarak inkübe edilen hücrelerin ise bu enzime karşın kümeleşmeye daha çok eğilim gösterdiği saptandı. Inkübasyonun ikinci saatından sonra kümeleşmelerin görülmesi, bu enzimin proteazlar tarafından parçalanarak etkisiz hale getirilmesi ya da hücre tarafından endositozla içeri alınarak ortamdaki temizlenmesinden ileri geliyor olabilir. Ancak deneylerde kümeleşme bakımından proteaz inhibitörü içeren ve içermeyen tüpler arasında belirgin bir fark gözlemlenmedi. Bazı nukleotitlerin endositoz için olağanüstü bir uyarıcı oldukları bilinmektedir(128). DNA'nın, bu nedenle hücre topaklaşmasına yol açmış olabileceği düşünüldü.

İnsülinin parçalanması konusunda oldukça yoğun araştırmaların bulunmasına karşın henüz inkübasyon karışımlarındaki insülinin yıkımı tam olarak önlenememektedir. Yapılan deneylerde de bu sorunla karşılaşıldı. Proteaz inhibitörü (PMSF) kullanılarak yıkımın ancak % 80'i önlenebildi.(Şekil 5). Serin proteaz inhibitörü olan bu maddenin kısmen inhibisyon yapabilmesi, insülinin daha başka yollarla da yıkıldığı görüşlerini desteklemektedir. PMSF'in izopropil alkoldeki çözeltisi son derişim iki katı olarak yükseltildiğinde insülin yıkımını önleme oranında bir fark gözlenmedi. Fussganger v.d. de insülin yıkımını % 85 oranında engelleyebilmişlerdir.

İnsülin parçalanmasında en çok sözü edilen enzimlerden biri de glutatyon-insülin transhidrojenaz (GIT)dır. Özellikle Chandler v.d.(21,22) ile Fussganger v.d.(26) sırasıyla GIT'in etkilerini ve sülfhidrilli maddelerin etkilerini incelemişlerdir. N-etilmaleimid ve iyodoasetamid gibi GIT'in inhibitörü olan sülfhidril reaktifleri insülinin granülositler tarafından yıkılmasını kısmen önleyebilmekte ve insülinin hücreye bağlanma miktarını arttırabilmektedirler(26). Bu sonuçların, GIT ya da benzeri bir enzimin insülin yıkımında rol oynadığını göstermesi mümkündür. Yapılan deneylerde iyodoasetamidin bağlanma ve yıkım üzerinde belirgin bir etkisine rastlanamadı. Bunun nedeni, insülinin yıkımında granülositlerde bulunan bu enzimin serin proteazları kadar etkili olmaması olabilir.

İnsülinin derişimi arttırıldığı zaman yıkılma hızının büyük bir aralığa karşın fazla değişmemesi insülini yıkan sistemin  $K_m$ 'sinin kullanılan insülin derişimine göre oldukça büyük

olmasından ileri gelebilir. Çok düşük derişimlerdeki insülin, proteaz sistemini doyuramamakta, ancak yavaş bir hızla yıkıldığı sanılmaktadır. Bununla birlikte, enzimin yeterince hız kazanmamış olmasına karşın insülin çok düşük derişimde bulunduğu için yine de büyük oranlarda yıkılmaktadır. İnsülin derişimi arttırıldığında ise, proteazın insülini yıkım hızı artmakta, ancak insülinin derişimi de artmış olduğu için aynı yıkım oranı korunabilmektedir. Şekil 6'da görüldüğü gibi insülin derişimi 100 bin kez arttırılmasına karşın parçalanma oranının % 15'in altında bir artmaya neden olduğu bulundu.

TCA ile çöktürerek insülin parçalanmasının ölçülmesi deneylerinde, düşük insülin derişimlerinde çökmenin tam olmamasının nedeni insülin molekülünün küçük bir polipeptid olmasına bağlandı. Son derişimi % 0,3 gr olacak biçimde BSA'nın insülini takiben eklenmesi ile bu yetersiz çökme sorunu çözümlendi. Çöken BSA, insülini de birlikte sürüklemekte ve sağlam insülinin tümüyle çökmemesi durumunu ortadan kaldırmaktadır. Yapılan bir ön deneyde  $10^{-10}$  M insülinin TCA ile (% 15), BSA'sız ortamda ancak % 85'inin çöktürülebildiği, BSA'nın eklenmesi ile bu oranın %98'e yükseldiği gözlemlendi.

Sıvı faz pinositozunu ölçüm çalışmalarında elde edilen sonuçlar Tablo 6'da sergilendi. Kaynaklardan elde edilen bilgilere paralel olarak, bu sistemin RAP kadar etkin çalışmadığını ve hızının da kolaylıkla değişmediğini göstermektedir(125,131,149).

İnsülinin granüositlere bağlanmasının ölçülmesinde (Tablo 7), alınan örneklerin hacminin 1 ml'ye çıkarılmasına karşın, dakikada en çok 725 sayım elde edilebildi ( $1 \times 10^{-10}$  M derişimde).  $10^{-8}$  M daki sayım ise 122 db's idi. Bu sayımların güvenilir olabilmesi için tüpler 5 dakika süreyle sayılarak db's ortalaması alındı ve paralel değerlerin de ortalaması hesaplandı. Değişik araştırma grupları, yeterli düzeyde sayım alabilmek için özgül etkinliği çok yüksek ( $200 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  dolayında) olan radyoaktif insülinin yanı sıra 50-70 milyar hücre/ml gibi yüksek derişimlerde hücre kullanmaktadırlar (26, 96, 120). Bu ise büyük hacimlerde (150-500 cc) kan gerektirmektedir. Bu çalışmada, çok yüksek derişimlerdeki hücrelerin; ortamda metabolitlerin fazlaca artması, oksijen ve besin yetersizliği gibi olumsuz nedenlerle endositoz yeteneklerini yitirmeleri olasılığı (184) göz önünde tutularak 6 milyon hücre/ml gibi düşük bir derişim seçildi. Ancak sayımı arttırmak için hacmi de arttırmak gerekti. Kullanılan insülinin özgül etkinliği ise  $100 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  idi. En yüksek bağlanma oranı  $2 \times 10^{-11}$  M insülin derişiminde % 1.16 olarak gözlemlendi. B/F oranları hesaplanarak B/F nin B değerine karşı Scatchard grafiği çizildiğinde (Şekil 7) eğrinin eğiminin, insülin derişiminin artması ile aynı yönde arttığı, reseptörün hormona olan afinitesinin azaldığı gözlemlendi. Bu bulgular granüositlerde yüksek afiniteli fakat az sayıda reseptörlerin varlığını gösterdi. Gerek grafikten gerekse sayfa 62 de önerilen formülden yararlanılarak  $K_d$ 'ler hesaplandığında (Tablo 8)  $K_d$ 'nin insülin derişimiyle ilişkili olarak aynı yönde arttığı

açık bir şekilde negatif kooperatif etkileşmenin bulunduğu saptandı. Negatif kooperatif etki için, reseptörlerin %1-2 sinin işgal edilmiş olması yeterli görülmekte ve bu bulgu kaynaklardaki bilgilerle(96) uyusmaktadır.

Granülositler, yüksek bir endositik etkinlik göstermelerine karşın, düşük sayıda reseptöre sahip olmaları nedeniyle, uzun süren inkübasyon sonunda bile düşük düzeyde endositoz sonuçları verdiler. Bağlanmanın da yine aynı şekilde düşük olduğu saptandı(Sekil 8,9). Bu grafiklerdeki doğrusallıktan sapma aşağıdaki biçimde açıklanmaya çalışıldı: Granülositlerin zarlarında, diğer hücrelere göre(100000-250000 reseptör/karaciğer hücresi(95-98)) oldukça az sayıda insülin reseptörü bulunmaktadır(1000 reseptör/granülosit(26) ve 1750 reseptör/granülosit(bulgumuz)). Bunun sonucu olarak hücre içi pinositik kesecik havuzu da çok küçüktür. RAP olayı sırasında insülin molekülleriyle birlikte reseptörler de hücre içine girmekte, böylece geçici de olsa hücre dış yüzeyinde bir reseptör azlığı söz konusu olmaktadır. Bu durum ise insülinin hücreye bağlanmasını azalttığı gibi(Sekil 8, 3. ve 4. saatlar) pinositik etkinliğin de düşmesine yol açmaktadır(Sekil 9). Bir kısmının pinositozla içeri girmesi nedeni ile artık sayıları iyice azalmış olan reseptörlerin kümeleşerek kaplı çukurcularda(coated pits) toplanmaları giderek zorlaşmakta, hücre içine giren her pinositik kesecik bir sonrakinin oluşmasını güçleştirmektedir

Radyoaktif insülinin granülositlere bağlanmasında ve içeri alınmasındaki doğrusal artışın zamanla ve hücre

derişimindeki yükselmeye orantılı olarak bozulması(Şekil 8,9,10,11) ve bağlanmada,bir tepe noktasından sonra düşme görülmesi yukarıda önerilen mekanizma dışında;söz konusu deneylerde sıklıkla rastlanan insülinin PMSF ile tam olarak engellenemeyen yıkımından hücrelerin bir kısmının ölmesi ve böylece ufak kümeleşmelerin oluşmasından ileri gelebilir.

Bu bulgular granülositlerin insülin reseptörleri ile ilgili ve RAP ölçümüne yönelik bir çalışmada ideal denek hücre olmadığını ve sorunlar yarattığını ortaya koymaktadır.

Sıcaklığın,insülinin granülositlere bağlanması üzerindeki etkisi incelendiğinde(Şekil 12),artan sıcaklığın hormonun bağlanmasını doğrusal bir ilişki içerisinde arttırdığı(4-37° C)gözlendi.Oysa RAP olayının sıcaklık değişimine olan yanıtı üssel olarak bulundu.Rap'ın 15° C'ye kadar izlenebilir bir düzeyde olmamasına karşın,daha yüksek sıcaklıklarda üssel olarak hızını arttırmamasının,plazma zarlarının sıcaklığa bağlı olarak akışkanlığını değiştirmesi(15-20° C, birçok hücre için bu açıdan kritik sıcaklığı oluşturmaktadır). reseptörlerin diffüzyon katsayılarının artması ve hücre içine alınmalarının kolaylaşmasından ileri geldiği düşünöldü.Gercekten de 16° C'in altında bazı hücrelerde RAP'ın yavaş ta olsa oluştuğu ancak pinositik keseciklerin lizozom ile birleşemediği gösterilmiştir(125).

Insülin reseptörlerine bağlanmanın 15° C'ta en yüksek düzeyde olduğu Gavin v.d tarafından açıklanmıştır.Bu sıcaklıkta yukarıda belirtilen nedenlerle RAP hızının düşmesi insülinin reseptöre bağlanmasının yüksek düzeyde olmasını



sağlamaktadır. Daha yüksek sıcaklıklar RAP hızını arttırarak hem insülinin içeri alınımını hem de proteolitik parçalanmasını fazlalastırmaktadır. Daha düşük sıcaklıklar ise kinetik enerjilerinin düşmesi nedeniyle moleküller arası çarpışmaları azaltmaktadır.

İnsülinin granüositlere bağlanması ve RAP ile içeri alınması sonuçları kullanılarak korelasyon katsayısı saptanmış ( $r=0.85$ ) lineer regresyon analizi ile ise  $y=0.63x+0.02$  doğru denklemi bulunmuştur. Buna göre, bağlanma ile RAP arasında çok yüksek olmamakla birlikte bir korelasyonun bulunduğu saptandı. Ancak bu değer, reseptörlerin sayısı ya da nitelikleri hakkında bilgi edinmek üzere RAP hızından yararlanmaya olanak sağlayacak derecede yüksek görünmemektedir. Korelasyon katsayısının karesi alındığında elde edilen 0.72 değeri deney sonuçlarının, RAP-Bağlanma arasındaki ilişkinin ancak %72 sini açıklayabildiğini göstermektedir (187).

Sonuç olarak yüksek pinositik etkinlik göstermelerine karşın granüositlerin az sayıda insülin reseptörü içermeleri (1750 reseptör/hücre), olağanüstü proteaz etkinliğine sahip olmaları ve kümeleşme eğilimleri nedeniyle bu tip çalışmalarda ideal denek hücre olmadığı anlaşılmaktadır. Tartışılan bulgu ve sonuçların; reseptör sayısı çok daha fazla olan, proteaz etkinliği ve kümeleşme eğilimleri çok daha düşük olan karaciğer, uyarılmış lenfosit ve fibroblast gibi hücrelerde yapılacak çalışmalarla karşılaştırılarak irdelenmesi yararlı olacaktır.

## Ö Z E T

Sağlıklı ve herhangi bir endokrin bozukluğu olmayan kişilerden alınan kan örneklerinden, granülositler yalnız Urografin kullanılarak yeni bir yöntemle ayrıldı. Bu yöntem Ficoll-Isopaque yöntemi ile karşılaştırıldı.

İnsülin varlığında ve yokluğunda granülositlerin sıvı faz pinositozu yetenekleri ölçüldü. İnsülinin etkisiz olduğu gösterildi.

İnsülinin granülositlere; zaman, hücre derişimi ve sıcaklık değışikliklerinde bağlanma ve RAP ile içeriye alınma nitelik ve nicelikleri saptandı. Sonuçlar birbiriyle ve kaynakçadaki bulgularla karşılaştırıldı.

Bağlanma ve RAP arasındaki ilişki incelendi. RAP hızının reseptör sayısı ve nitelikleri hakkında güvenilir bir bilgi veremeyeceği tartışıldı.

Granülositlerin insülin reseptörleriyle ilgili çalışmalarda ideal denek hücre olamayacağına karar verildi.

RAP hızının, hormonların bağlanma düzeyleri ve reseptörlerin nitelikleri hakkında bilgi edinmek üzere kullanılabilmesi için; çalışmanın reseptör sayısı fazla, proteaz etkinliği ve kümeleşme eğilimi az olan hücrelerde de yinelenip sonuçların karşılaştırılması gerektiği savunuldu.

## K A Y N A K L A R

- 1- Mering, J. von ve Minkowski, O.: Z.klin.Med., 10; 393, 1889.  
(K.6'dan)
- 2- Banting, F.G. ve Best, C.H.: J.Lab.clin.Med., 7; 251, 1922.  
(K.6'dan).
- 3- Abel, J.J.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 12; 132, 1926.(K.6'dan)
- 4- Sanger, F.: Br.Med.Bull., 16; 183, 1960. (K.6'dan).
- 5- Katsoyannis, P.G.: Am.J.Med., 40; 652, 1966.(K.6'dan).
- 6- Goodman, L.S. ve Gilman, A. (Ed.): The Pharmacological Basis  
of Therapeutics. 4.Basım, s. 1582. The Macmillan Co.,  
London, England, 1970.
- 7- Windholz, M.(Ed.): The Merck Index. 9.Basım, s.659. The Merck  
and Co., Rahway, N.J., U.S.A., 1976.

- 8- Steiner, C., Cunningham, D., Spiegelman, L. ve Aten, B.: Science, N.Y., 157;697,1967.
- 9- Chance, R.E., Ellis, R.M. ve Bromer, W.W.: Science, N.Y., 161; 165,1986.
- 10- Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B. ve Fredrickson, S.D.(Ed.): The Metabolic Basis of Inherited Disease. 3.Basım, s.97. McGraw-Hill Book Co., New York, U.S.A., 1966.
- 11- Mahler, H.R. ve Cordes, E.H.: Biological Chemistry. 1.Basım, Harper and Row Publishers, New York, U.S.A., 1966.
- 12- Adams, M.G., Blundel, T.L., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Vijayan, M., Baker, E.N., Harding, D.C., Hodgkin, D.C., Rimmer, B ve Sheat, s.: Nature (London), 224;491,1969.
- 13- Blundel, T.L., Phil, D., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Hodgkin, D.C. ve Mercola, D.A.: Diabetes, 21 (Suppl 2);492,1972.
- 14- Carpenter, F.H.: Am.J.Med., 40; 750,1976.
- 15- Arquilla, E.R., Bromer, W.W., ve Mercola, D.: Diabetes, 18;193, 1969.
- 16- Lambert, A.E., Junod, A., Stauffacher, W., Jeanrenaud, B. ve Renold, A.E.: Biochim.Biophys.Acta, 84; 529,1969.
- 17- Grodsky, G.M., Bennett, L.L., Smith, D.F. ve Schmid, F.G.: Metabolism, 16;222, 1967.
- 18- Martin, J.M., ve Bammers, G.: Am.J.Physiol., 209; 797,1965.
- 19- Berson, S.A., Yalow, R.S., Bauman, A., Rothschild, M.A. ve Newerly, K.: J.Clin.Invest., 35; 170,1956.(Kaynak 6'dan naklen)
- 20- Katzen, H.M. ve Stetten, D.: Diabetes, 11; 271,1962.
- 21- Chandler, M.L. ve Varandani, P.T.: Diabetes, 23; 232, 1974.

- 22- Chandler, M.E. ve Varandani, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 286; 136, 1972.
- 23- Freychet, P., Khan, C.R., Roth, J. ve Neville, D. Jr.: *J. Biol. Chem.*, 247; 3953, 1972.
- 24- Gavin, J.R. III, Gordon, P., Roth, J., Archer, J.A. ve Buell, D.N.: *J. Biol. Chem.*, 248; 2202, 1973.
- 25- Weissmann, G., Zurier, R.B. ve Hoffstein, S.: *Am. J. Pathol.*, 68; 539, 1972.
- 26- Fussanger, R.D., Kahn, C.R., Roth, J. ve De Meyts, P.: *J. Biol. Chem.*, 251; 2761, 1976.
- 27- Krahl, M.D.: *Ann. Rev. Physiol.* 36; 331, 1974.
- 28- Pilkis, S.J ve Park, C.R.: *Ann. Rev. Pharmacol.* 14; 368, 1974.
- 29- Levine, R., Goldstein, M., Klein, S. ve Huddleston, B.: *J. Biol. Chem.* 179; 985, 1949 (K.67'den).
- 30- Kipnis, D.M. ve Noall, M.W.: *Biochim. Biophys. Acta* 28; 226; 1958.
- 31- Krahl, M.E.: Effects of Insulin on Synthesis of Specific Enzymes in various tissues. In *Symposium on Insulin Action*. Fritz, I.B., Ed. New York, Academic Press, 1972, s.461-486. (K.67'den).
- 32- Wool, I.G., Castles, J.J., Leader, D.P. ve Fox, A.: Insulin and the Function of Muscle Ribosomes. In *Handbook of Physiology*, Vol. 1. Greep, R.O., Eds. Baltimore, Williams and Wilkins, 1972, s. 385-394.
- 33- Manchester, K.L.: Insulin and Protein Synthesis. In *Biochemical Actions of Hormones*, Vol. 1. Litwack, G., Ed., New York, Academic Press, 1970, s. 267-320. (K.67'den).

- 34- Mortimore, G.E. ve Mondon, C.E.: J. Biol. Chem. 245; 2375, 1970.
- 35- Steiner, D.F.: Vitam. Horm. 24; 1, 1966.
- 36- Fain, J.N.: Mode of Action of Insulin. Biochemistry Series One, MTP International Review of Science, Vol. 8. Rickenberg, H.V., Ed. Baltimore, Md., Park Press, 1974, s. 1-23 (K.67'den).
- 37- Rechler, M.M., Podskalny, J.M., Goldfine, I.D. ve Wells, C.A.: J. Clin. Endocrinol. Metab. 39; 512, 1974.
- 38- Gey, G.O. ve Thalheimer, W.: J. A. M. A. 82; 1609, 1924. (K.67'den).
- 39- G.M.: J. Cell Biol. 61; 95, 1974.
- 40- Barnett, R.J. ve Ball, E.G.: J. Biophys. Biochem. Cytol. 8; 83, 1960. (K.67'den).
- 41- Krahl, M.E.: The Action of Insulin on Cells. 1961, Academic Press, New York. (K.67'den).
- 42- Butcher, R.W., Sneyd, J.G.T., Park, C.R. ve Sutherland, E.W.: J. Biol. Chem., 241; 1651, 1966.
- 43- Jungas, R.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 56; 757, 1966.
- 44- Senft, G., Schultz, G., Munzka, K. ve Hoffman, M.: Diabetologia, 4; 330, 1968.
- 45- Manganiello, V. ve Vaughan, M.: J. Biol. Chem., 248; 7164, 1973.
- 46- Loten, E.G. ve Sneyd, J.G.T.: Biochem. J. 120; 187, 1970.
- 47- House, P.D.R., Pouli, P. ve Weidemann, M.J.: Eur. J. Biochem. 24; 249, 1972.
- 48- Kono, T. ve Barham, F.W.: J. Biol. Chem. 248; 7417, 1973.
- 49- Illiano, G., Tell, G.I.E., Siegel, M.I. ve Cuatrecasas, P.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70; 2443, 1973.

- 50- Zierler, K.L.: *Am. J. Physiol.* 198;1066, 1960.
- 51- Krahl, M.E.: *Diabetes* 21 (Suppl.2); 695, 1972.
- 52- Kissebach, A.H., Hope-Gill, H., Vydellingum, N., Tulloch, B.R.,  
Clarke, P.V. ve Fraser, T.R.: *Lancet* 1;144, 1975.
- 53- McDonald, J.M., Bruns, D.E. ve Jarett, L.: *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 73;1542, 1976.
- 54- Hadden, J.W., Hadden, E.M., Wilson, E.E., Good, R.A. ve Coffy, R.G.: *Nateru (New Biol)* 235;174, 1972. (K.67'den).
- 55- Jarett, L. ve Smith, R.M.: *J. Biol. Chem.* 249;5195, 1974.
- 56- Krahl, M.E.: *Perspect. Biol. Med.* 1;69, 1957. (K.67'den).
- 57- Cuatrecasas, P.: *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 63;450, 1969.
- 58- Garwin, J.L. ve Gelehrter, T.D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 164;52, 1969.
- 59- Kolb, H.J., Renner, R., Hepp, K.D., Weiss, L. ve Wieland, O.H.: *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 72;248, 1975.
- 60- Davidson, M.B., Van Herle, A.J. ve Gerschenson, L.E.: *Endocrinology* 92;1442, 1973.
- 61- Oka, T. ve Topper, Y.J.: *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.* 71;1630, 1974.
- 62- Lee, D.D. ve Williams, R.H.: *Endocrinology*, 54;5, 1954 (K.67'den).
- 63- Stein, O. ve Gross, J.: *Endocrinology*, 65;707, 1959. (K.67'den).
- 64- Terris, S. ve Steiner, D.F.: *J. Clin. Invest.*, 57;885, 1976.
- 65- Arguilla, E.R.: 67th Annual Meeting of American Association of Pathology and Bacteriology, St. Louis, Mo., 1970. (Abst. No: 134, p.69a). (K.67'den).
- 66- Goldfine, I.D., Smith, G.J., Wong, K.Y. ve Jones, A.L.: *Proc.*

Natl.Acad.Sci. U.S.A., 1977 (Accepted for publication).

(K.67'den).

- 67- Goldfine, I.D.: Diabetes, 26;148,1977.
- 68- Wohltman, H.J ve Narahara, T.H.: J.Biol.Chem., 241;4931,1966.
- 69- Cuatrecasas, P.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 68; 1264,1971.
- 70- Kono, T. ve Barham, F.W.: J.Biol.Chem. 246;6210,1971.
- 71- House, P.D.R. ve Weidemann, M.J.: Biochem.Biophys.Res.Commun. 41;541,1970.
- 72- Freychet, P., Roth, J. ve Neville, D.M.: Biochem.Biophys.Res. Commun. 43;400,1971.
- 73- Cuatrecasas, P., Desbuquois, B. ve Krug, F.: Biochem.Biophys. Res.Commun. 43;333,1971.
- 74- Gavin, J.R.III, Roth, J., Jen, P. ve Freychet, P.: Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A. 69;747,1972.
- 75- Schwartz, R.H., Bianco, A.R., Handwerker, B.S. ve Kahn, R.C.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 72;474,1975.
- 76- Hollenberg, M. ve Cuatrecasas, P.: PAABS Revista. 3;679,1974.
- 77- Gavin, J.R.III, Gordon, P., Roth, J., Archer, J.A. ve Buell, D.N.: J.Biol.Chem., 248;2202,1973.
- 78- Haour, F. ve Bertrand, J.: J.Clin. Endocrinol.Metab., 38;334, 1974.
- 79- Marshall, R.N., Underwood, L.E., Voina, S.J., Foushee, D.B. ve Van Wyk, J.J.: J.Clin.Endocrinol.Metab., 39;283,1974.
- 80- Gambhir, K.K., Archer, J.A. ve Carted, L.: Clin.Chem., 23;1590, 1977.
- 81- Gambhir, K.K., Archer, J.A. ve Bradley, C.J.: Diabetes, 27;701, 1978.



- 82- Jarett, L. ve Smith, R.M.: J.Biol.Chem., 249;7024, 1974.
- 83- Bennett, V. ve Cuatrecasas, P.: Biochim.Biophys.Acta. 311;  
362, 1973.
- 84- Cuatrecasas, P.: Fed.Proc., 32;1838, 1973.
- 85- Krug, U., Krug, F ve Cuatrecasas, P.: Proc.Natl.Acad.Sci.,  
69;2604, 1972.
- 86- Cuatrecasas, P.: J.Biol.Chem., 246;6532, 1971.
- 87- Bergeron, J.J.M., Evans, W.H. ve Geschwind, H.: J.Cell Biol.  
59;771, 1973.
- 88- Cuatrecasas, P.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 69;318, 1972.
- 89- Cuatrecasas, P.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 69;1277, 1972.
- 90- Gavin, J.R.III. Mann, D.L., Buell, D.N. ve Roth, J.: Biochem.  
Biophys. Res.Comm., 49;870, 1972.
- 91- Gavin, J.R.III, Buell, D.N. ve Roth, J.: Science, 178;168,  
1972.
- 92- Cuatrecasas, P.: J.Biol.Chem., 247;1980, 1972.
- 93- Kono, T.: J.Biol.Chem., 244;5777, 1969.
- 94- Cuatrecasas, P.: Ann.Rev.Biochem., 43;169, 1974.
- 95- Kahn, C.R.: J.Cell Biol., 70;261, 1976.
- 96- De Meyts, P., Bianco, A.R. ve Roth, J.: J.Biol.Chem. 251;1877,  
1976.
- 97- Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J. ve Neville, R.M.: J.Biol.  
Chem., 249, 2249, 1974.
- 98- Soll, A., Kahn, C.R. ve Neville, D.M.Jr.: J.Biol.Chem., 250;  
7402, 1975.
- 99- Gammeltoft, S. ve Glieman, J.: Biochim.Biophys. Acta., 320;  
16, 1973.

- 100- Glieman, J., Gameltoft, S. ve Vinten, J.: J. Biol. Chem., 250; 3368, 1975.
- 101- Beck-Nielsen, H., Pedersen, O., Kragballe, K. ve Srensen, N.S.: Diabetologia, 13; 563, 1977.
- 102- Horecker, L.B. ve Stadtman, E.R. (Ed.): Current Topics in Cellular Regulation. 10; 42-43, 1976.
- 103- Pilch, P.F. ve Czech, M.P.: J. Biol. Chem., 254; 3375, 1979.
- 104- Yip, C.C., Yeung, C.W.T. ve Moule, M.L.: J. Biol. Chem., 253; 1743, 1978.
- 105- Mertz, W., Toepfer, E.E., Roginski, E. ve Polansky, M.M.: Fed. Proc., 33; 2274, 1974.
- 106- Mertz, W.: Fed. Proc., 20; 186, 1967.
- 107- De Meyts, P., Roth, J., Neville, D.M. Jr., Gavin, J.R. ve Lesniak, M.A.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 55; 154, 1973.
- 108- Cuatrecasas, P.: Criteria for and Pitfalls in the Identification of Receptors in Pre- and Postsynaptic Receptors, Ed., Usdin, E. ve Bunney, W.E., 1. Basım, 3. Cilt, s. 245-264. Marcel Dekker, Inc., New York, 1977.
- 109- Ginsberg, B.H.: Diabetes, 25 (Suppl. 1); 322, 1976.
- 110- Kahn, C.R., Neville, D.M. Jr., Gorden, P., Freychet, P. ve Roth, J.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 48; 135, 1972.
- 111- Kahn, C.R., Neville, D.M. Jr. ve Roth, J.: J. Biol. Chem., 248; 244, 1973.
- 112- Freychet, P., Laudat, M.H., Rosselin, G., Kahn, C.R., Gorden, P. ve Roth, J.: FEBS Lett., 25; 339, 1971.

- 113- Freychhet, P. ve Forgue, E.: Diabetes, 23(Suppl.1) 354;1974.
- 114- Soll, A.H., Goldfine, I.D., Roth, J. ve Kahn, C.R.: J.Biol. Chem., 249;4127,1974.
- 115- Archer, J.A., Gorden, P. ve Roth, J.: J.Clin Invest., 55;166; 1975.
- 116- Olefsky, J.M. ve Reaven, G.M.: J.Clin.Invest., 54;1323,1974.
- 117- Raff, M.: Nature (London), 259;265,1976.
- 118- Huang, D. ve Cuatrecasas, P.: J.Biol.Chem., 250;8251,1975.
- 119- Posner, B.I., Kelly, P.A. ve Friesen, H.G.: Proc.Natl.Acad. Sci. U.S.A., 71;2407,1974.
- 120- Gavin, J.R.III, Roth, J., Neville, D.M.Jr., De Meyts, P. ve Buell, D.N.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 71;84,1974.
- 121- Gorden, P., Carpertier, J.L., Obberghen, E.V., Barazzone, P., Roth, J. ve Orci, L.: Plasma Membrane. J.Cell Scie., 39;77,1979.
- 122- Flier, J.S., Kahn, C.R. ve Roth, J.: New Eng. J.Med., 300; 413,1979.
- 123- Maugh, T.H.II.: Science, 193;220,1976.
- 124- Kahn, C.R., Baird, K., Fliers, J.S. ve Jarett, D.B.: J.Clin. Invest., 60;1094,1977.
- 125- Silverstein, S.C., Steinman, R.M. ve Cohn, Z.A.: Ann.Rev. Biochem. 46;669,1977.
- 126- Cohn, Z.A. ve Parks, E.: J.Exp.Med., 125;1091,1967.
- 127- Cohn, Z.A. ve Parks, E.: J.Exp.Med. 125;213,1967.
- 128- Cohn, Z.A. ve Parks, E.: J.Exp.Med., 125;457,1967.
- 129- Holter, H.: Int.Rev.Cytol., 8;481,1959.(K.125'den).

- 130- Chapman-Andersen, C.: C.R.Trav.Lab.Carlsberg, 32;265,1961.  
(K.125'ten).
- 131- Gosselin, R.E.: Fed.Proc., 26; 987,1967.
- 132- Ryser, H.J.P.: Science, 159;390,1968.
- 133- Jacques, P.J.: Endocytosis. in "Lysosomes in Biology and Pathology". Ed.J.T.Dingle ve H.B.Fell, 2;395-420, Amsterdam, Nort Holland,1969 (K.149'dan).
- 134- Roth, T.F. ve Porter, K.R.: J.Cell Biol. 20;313,1964.
- 135- Fewcett, D.W.: J.Histochem.Cytochem., 13;75,1965.
- 136- Roth, T.F., Cutting, J.A ve Atlas, S.B.: J.Supramollec.Struct. 4;527,1976 (K.138'den).
- 137- Anderson, R.G., Goldstein, J.L. ve Brown, M.S.: Proc.Natl. Acad. Scie. U.S.A. 73;2434,1976.
- 138- Pearse, B.: Trends Biochem.Sci., 5;131,1980.
- 139- Heuser, J.E. ve Reese, T.S.: J.Cell Biol. 57;315,1973.
- 140- Goldstein, J.L., Anderson, R.G. ve Brown, M.S.: Nature (London), 279;679,1979.
- 141- Gordon, P., Carpentier, J., Cohen, S. ve Orci, L.: Proc.Natl. Acad.Sci. U.S.A., 75;5025,1978.
- 142- Willingham, M.C. ve Maxfield, F.R. ve Pastan, I.: J.Cell Biol., 82,614,1979.
- 143- Maxfield, F.R., Schlessinger, J., Shecter, Y., Pastan, I. ve Willingham, M.C.: Cell, 14;805,1978.
- 144- Ashwell, G. ve Morell, A.: Adv. Enzymol., 41;99,1974.
- 145- Prieals, J.-P., Pizzo, V., Glasgow, L.R., Paulson, J.C ve Hill, R.L.: Proc.Natl.Acad.Scie. U.S.A., 75;2215,1978.

- 146- Kaplan, A., Achord, D.T. ve Sly, W.: Proc.Natl.Acad.Scie. U.S.A., 75;2215,1978.
- 147- Kawasaki, T. ve Ashwell, G.: J.Biol.Chem. 252;6536,1977.
- 148- Anderson, R.G.W., Goldstein, J.L. ve Brown, M.S.: Nature (London), 270;695,1977.
- 149- Steinman, R.M., Scott, E.B. ve Cohn, Z.A.: J.Cell Biol. 68;665,1976.
- 150- Jamieson, J.D. ve Palade, G.E.: J.Cell Biol., 50;135,1971.
- 151- Castle, J.D., Jamieson, J.D. ve Palade, G.E.: J.Cell Biol., 53;290,1972.
- 152- Franke, W.W., Lüder, M.R., ve Kartenbeck, J.: J.Cell Biol., 69;173,1976.
- 153- Franke, W.W. ve Herth, W.: Exp.Cell Res. 89;447,1974.
- 154- Franke, W.W., Kartenbeck, J. ve Spring, H.: J.Cell Biol., 71;196,1976.
- 155- Kanaseki, T. ve Kadota, K.: J.Cell Biol., 42;202,1969.
- 156- Pearse, B.M.: J.Mol.Biol.; 97;93,1975.
- 157- Pearse, B.M.: Clathrin: Proc.Natl.Acad.Scie. U.S.A., 73;1255,1976.
- 158- Koppel, D., Axelrod, D., Schlessinger, J., Elson, E.L. ve Webb, W.W.: Abst.Biophys.Soc.(Seattle), 1976 (K.161'den).
- 159- Koppel, D.E., Axelrod, D. ve Schlessinger, J.: Biophysical Journal, 16;1315,1976.
- 160- Schlessinger, J.: Trend. Biochem.Sci., 5;210,1980.
- 161- Schlessinger, J., Koppel, D.E., Axelrod, D., Jacobson, K., Webb, W.W. ve Elson, E.L.: Proc.Natl.Acad.Scie. U.S.A., 73;2409,1976.

- 162- Schlessinger, J., Shechter, R.Y., Willingham, M.C. ve Pastan, I.:  
Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 75;2659,1978.
- 163- Blundel, T., Dodson, G., Hodgkin, D. ve Mercola, D.: Adv.  
Protein Chem., 26;279,1972.
- 164- Schlessinger, J.: Physical Chemical Aspects of Cell Surface  
Events in Cellular Regulation, s.89-111, Ed. De Lisi, C  
ve Blumenthal, R. 1979.(K.160'dan).
- 165- Kahn, C.R., Baird, K.L., Jarrett, D.B. ve Flier, J.S.: Proc.  
Natl.Acad.Sci. U.S.A., 75;4209,1978.
- 166- Shechter, Y., Hernaez, L., Schlessinger, J. ve Cuatrecasas,  
P.: Nature (London), 278;835,1979.
- 167- Hazum, E., Chang, K.J. ve Cuatrecasas, P.: Nature (London),  
282;626,1979 (K.160'tan).
- 168- Davies, P.J.A., Davies, D.R., Levitzki, A., Maxfield, F.R.,  
Milhaud, D., Willingham, M.C. ve Pastan, I.: Nature  
(London), 283;162,1980 (K.160'tan).
- 169- Levi, A.: Proc.Natl.Acad.Sci.(in press).(K.160'tan).
- 170- Schlessinger, J., Shechter, Y., Willingham, M.C. ve Pastan,  
I.: Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A., 75;2135,1978.
- 171- Sando, G.N., Titus-Dillon, P., Hall, C.W. ve Neufeld, E.F.:  
Exp. Cell Res., 119;359,1979.
- 172- Stahl, P.D. ve Schlessinger, P.H.: Trend.Biochem.Sci.,  
5;194,1980.
- 173- Wibo, M. ve Poole, B.: J.Cell Biol., 63;430,1974.
- 174- Le Cam, A. ve Maxfield, F.R.: Biochem.Biophys.Res.Commun.,  
88;873,1979.

- 175- Maxfield, F.R., Davies, P., Klemper, L., Willingham, M.C. ve Pastan, I.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76;5731, 1971.
- 176- Carpenter, G. ve Cohen, S.: J. Cell Biol., 71;159, 1976.
- 177- Mc Kanna, J.A., Haigler, H.T. ve Cohen, S.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 76;5689, 1979.
- 178- Ginsberg, B.H., Brown, T. ve Raizada, M.: Diabetes, 28;823, 1979.
- 179- Dioguardi, N., Agostoni, A., Fiorelli, G. ve Lomoto: J. Lab. Clin. Med., 61;711, 1963.
- 180- Byum, A.: Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21(Suppl. ); 97;1968. (Ficoll-paque, Teknik Broşür, Pharmacia, Fine Chemicals AB, İsveç, 1975'ten alınarak).
- 181- Cutts, J.H.: Cell Separation Methods in Hematology. 1. Basım, s.182, Academic Press, New York, A.B.D. 1972.
- 182- Erick Undritz: Sandoz Atlas of Hematology. 2. Basım, s.32. Sandoz Publications, Basel, 1973.
- 183- Norrby, K., Knutson, F., ve Lundin, P.M.: E. Cell Res., 44;421, 1966.
- 184- Wagner, R., Rosenberg, R. ve Estensen, R.: J. Cell Biol., 50;804, 1971.
- 185- Turner, J.C.: Int. J. Appl. Radiat. Isotopes, 19;557, 1968.
- 186- Scatchard, G.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 51;660, 1949. (Segel, I.H.: Enzyme Kinetics. 1. Basım, s.218. Wiley-Interscience Publications, New York, 1975'ten).
- 187- Edwards, A.L.: Statistical Analysis. 3. Basım, s.66-84. Holt, Rinehart ve Winston Co., New York, A.B.D., 1964.

188- Turner, J.C.: Sample Preparation for Liquid Scintillation  
Counting. Rev. 6, The Radiochemical Centre, Amersham,  
Ingiltere, 1967.