

NÖTROFİLLERİN EKSTRASELLÜLER GLUKOZ KULLANIMI

Uz. Ebubekir Bakan (x)

Uz. Zeki Arı (xx)

Dr. Al Bayram (xxx)

Arş.Gör. Nuri Bakan (x)

ÖZET:

Sağlam şahısların kanından izole edilen nötrofillerin glukoz kullanımını 3 saat süreyle bir saat aralıklarla tesbit edildi. Bu, glukoz ihtiva eden özel bir deney ortamında (Krebs-Ringer Bikarbonat çözeltisi) belirtilen aralıklarda glukoz tayin etmek suretiyle gerçekleştirildi. Nötrofillerin alkalin fosfataz aktivite seviyeleri tayin edilerek bu enzimin, glukozun hücre zarından geçişinde bir fonksiyonu olup olmadığı araştırıldı. Elde edilen sonuçlardan enzim aktivitesi seviyeleri ile hücre membranından geçen glukoz miktarı arasında bir ilişkinin olmadığı anlaşıldı.

GİRİŞ:

Polimorfonükler (PMN) lökositler (nötrofiller) fagositoz yapabilen kan hücrelerinden olduğu için spesifik bir metabolik özelliğe sahip olmaları (1) beklenir. Nötrofiller, bakterisidal ve mikrobisidal aktivitelerini bu metabolik karaktere ve sitoplazmalarında bulunan granullerin (2) taşıdığı proteolitik enzimlere borçludurlar (3).

PMN lökositlerin metabolizması, kimyasal bileşenleri ve diğer hücresel özellikleri bakımından diğer doku hücrelerine benzerler (4), ancak nükleoproteinler nötrofillerde oldukça fazla bulunur (4). Bu hücrelerin çekirdek ve mitokondrileri mükemmel olduğundan glikoliz enzimleri, solunum enzimleri, heksoz monofosfat (HMP) yolu enzimleri ve glikojen metabolizması ile ilgili enzimler bu hücrelerde mevcuttur (5). Olgun PMN lökositlerin mitokondri sayısı genç olanlara nazaran daha azdır. Buna bağlı olarak nötrofil olgunlaştıkça oksidatif yıkım azalır ve anaerobik glikoliz daha egemen olmağa başlar. Bu esnada bol miktarda glikojenin sentezlenerek depo edileceği kesindir (6,7).

(x) A.Ü. Tıp Fak. Biyokimya Anabilim Dalı

(xx) A.Ü. Diş Hek. Fak. Biyokimya Bilim Dalı

(xxx) A. Ü. Tıp Fak. Dahiliye Kliniği.

Nötrofillerin içindeki glikojen depolarının ne zaman ve nasıl hancandığı konusunda çok değişik görüşler vardır. Ancak glikojenin bir enerji kaynağı olarak kullanıldığı bir gerçektir (6). Kan dolaşımına geçen PMN lökositler glikojen metabolizması ile ilgili enzimler bakımından son derece zengindirler (8). Fagositozda hücre endojen glikojen depolarının yanında ekstrasellüler glukozu da kullanır (9,10). Diğer taraftan, glukozun ön palanda kullanılacağı ve glikojenin nisbeten korunarak membran yapılarının dayanıklı olmasını sağlamak için kullanılacağı savunulmuştur (10). Hücre içi glikojen depolarının fazlaca olması halinde, hücrenin ekstrasellüler glukozu kullanma ihtiyacı azalabilir (1).

PMN lökositlerde glikolitik karbonhidrat metabolizması egemen olduğundan istirahat halinde de fagositoz esnasında da anaerobik glikoliz cereyan eder. Yabancı partiküllerin hücreye alınmasından sonra glikoliz önemli derecede hızlanır. neticede hücre içindeki asit (laktik asit) miktarı artarak pH'nın düşmesine sebep olur. Düşük pH da sitoplazmik granuller içerisindeki parçalayıcı enzimler salıverilirler (12). Nötrofillerde HMP yolu da işler. İstirahat halindeki bir PMN lökosit anaerobik glikolizde kullandığı glukozun % 0,1-1 kadarını da değişen deney şartlarına bağlı olarak HMP yolundan geçirir. Bunun sebebi, lökosit içinde nikotinamidadenin dinükleotid fosfat (NADP⁺) miktarının çok düşük olmasıdır. Fagositoz esnasında HMP yolundan geçen glukoz miktarı 2,1-38 kat artmaktadır (13,14). Diğer taraftan, fagositozda lökositin oksijen kullanımının arttığı göz önüne alınırsa bu sırada enerjinin HMP yolundan daha çok glikolitik yoldan sağlandığı söylenebilir (15).

Normal insan nötrofillerinin, işaretli asetat ve glukozu hücre içi gliserit ve fisfolipidlerine çevirebildikleri tesbit edilmiştir. Glukozdan yağ asidi sentezi ise, düşük oranlarda da olsa, mümkündür (16).

PMN lökositlerde oldukça aktif bir lipid metabolizması vardır. Fagositoz esnasında lipid ve fosfolipid dönüşümü artmaktadır. Fagositozla yabancı partiküllerin hücre içine alınması PMN lökositlerin zar yapısının bozulmasına sebep olmaktadır. Hücre zarını tamir etmek için lipid ve fosfolipidlere ihtiyaç vardır (17,18).

MATERYAL VE METOD

Hiçbir klinik şikayeti ve bulgusu olmayan 156 sağlam şahsın (86 K, 70 E) venöz kanından izole edilen lökositler, glukoz tüketimi ve alkalen fosfataz (ALP) tayini için kullanıldı. Nötrofiller, daha önce kullandığımız dextran sedimentasyon metodu ile (19) izole edildi. Hazırlanan lökosit süspansiyonundan (2,5x10⁷ lök/ml) 1 ml alınarak homojenizat hazırlandı (19). Bu homojenizatta DeChatelet ve Cooper (20) in kullandıkları metoda göre lökosit ALP (LAP) aktivitesi tayin edildi.

Krebs-Ringer Bikarbonat (KRB) (10) çözeltisi (100 ml'sinde; 537,6 mg sodyum klörür 35,0 mg potasyum klörü, 27,7 mg kalsiyum klörür, 16,3 mg monobazik po-

tasyum fosfat, 32,1 mg magnezyum sulfat, 126,0 mg soryum bikarbonat, 200 mg sodyum asetat, 1 gr polivinilpirolidon ve 297,0 mg glukoz bulunur. pH = 7,4) ortamdaki glukozu lökosislerin hücre içine alma miktarları başlangıçta, 60, 120 ve 180 dakika sonra olmak üzere tayin (glukoz oksidaz) (21) edildi. Bunun için aşağıda gösterildiği gibi başlangıç, numune ve numune körü (NK) tüpleri hazırlandı.

	Başlangıç	60 / NK		120/NK		180/NK	
KRB çözeltisi (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Lökosit süspansiyonu (ml)	0,5	0,5	—	0,5	—	0,5	—
Serum fizyolojik (ml)	—	—	0,5	—	0,5	—	0,5

Başlangıç tüpü hemen santrifüj (1200 g 5 dak) edilerek lökositler çöktürüldü, üst kısımdan 0,2 ml alınarak içerisinde 2 ml triklorasetik asit (% 15) bulunan başka bir tüpe aktarıldı, karıştırıldı, santrifüj (1200 g 5 dak) edildi ve supernatanta glukoz tayin edildi. Bundan sonra süresi dolan her tüp NK tüpü ile birlikte aynı işleme tabi tutuldu.

Bu seyreltmelere göre deney ortamında 5×10^6 lök/ml lökosit bulunmaktadır. Her saat için NK deneyleri, lökositlerden başka glukoz kaybına sebep olan kaynaklardan ileri gelecek hatayı önlemek için yapıldı. Başlangıç tüpün % 100 glukoz ihtiva ettiği kabul edildi ve belirtilen saatler sonundaki glukozun başlangıçtaki % kaçını azaldığı tesbit edildi.

BULGULAR

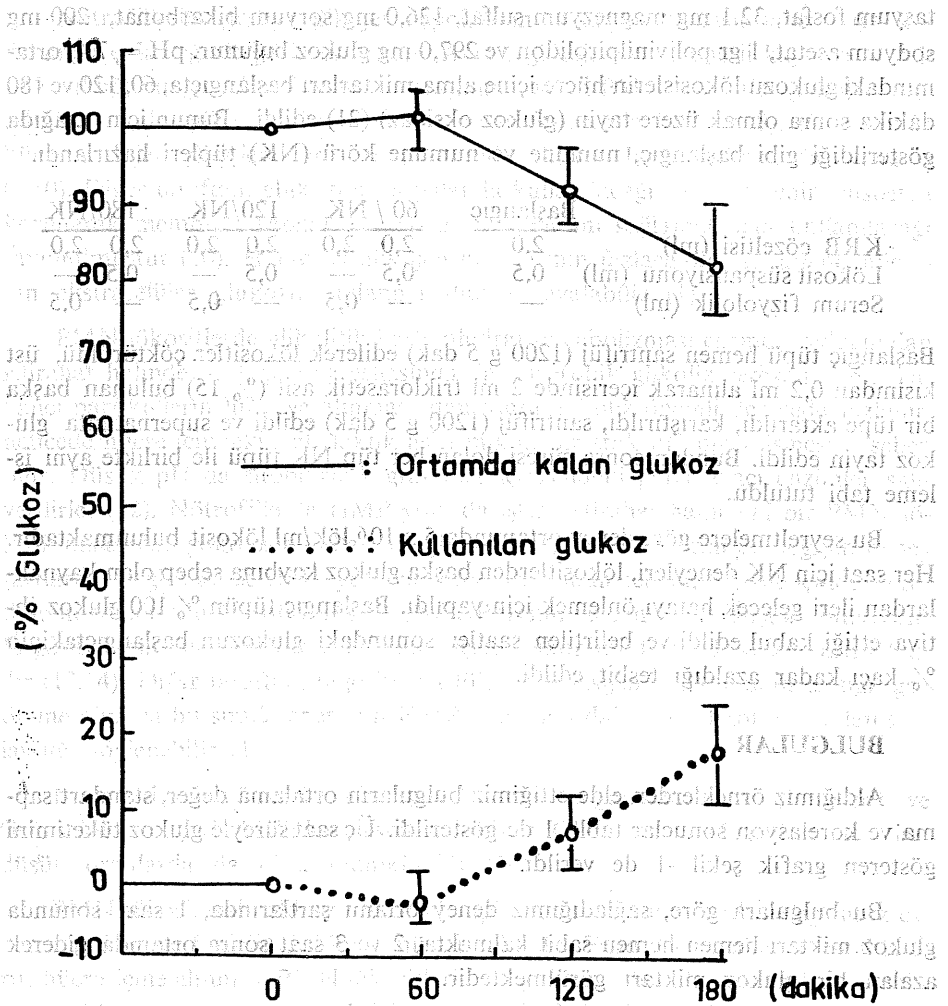
Aldığımız örneklerden elde ettiğimiz bulguların ortalama değer, standart sapma ve korelasyon sonuçları tablo 1 de gösterildi. Üç saat süreyle glukoz tüketimini gösteren grafik şekil -1 de verildi.

Bu bulgulara göre, sağladığımız deney ortamı şartlarında, 1 saat sonunda glukoz miktarı hemen hemen sabit kalmakta, 2 ve 3 saat sonra ortamda giderek azalan bir glukoz miktarı görülmektedir.

Bir nümunenin azalan glukoz miktarı ile aynı nümunenin LAP aktivitesi arasında istatistiki olarak önemli bir korelasyon tesbit edilemedi.

Tablo: 1- Bulgularımıza ait ortalama değer, standart sapma ve korelasyon sonuçları (n= 156).

	\bar{x}	\pm SD
LAP (mmol PNP/10 ¹⁰ lök/saat)	1,45	0,82
Başlangıçta ortamdaki glukoz (%)	100,0	0,00
1 saat sonra ortamdaki glukoz (%)	101,9	4,37
2 saat sonra ortamdaki glukoz (%)	93,2	5,10
3 saat sonra ortamdaki glukoz (%)	89,6	7,62
3. saat glukozu-LAP	n= 156 $\bar{x}=83,6$ $\bar{y}=1,45$ $P> 0,05$	



Şekil-1: Lokositlerin üç saat süreyle kullandıkları glukoz

TARTIŞMA

Nötrofillerin glukozu oksitlemeleri veya bununla ilgili metabolik olayları inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. Ksojen ve arkadaşları (1975) (11) lökositlerin glukoz oksidasyonunu incelemişler, latex parçacıkları ve serum ortamında, yahut sadece latex parçacıklarının bulunması halinde glukoz oksidasyonunun, başka bir deyişle karbondioksit üretiminin arttığını gözlemişlerdir. Glukoz ve glukoliz inhibitörlerinin insan lökositlerinden total protein ve enzimlerin saliverilmesinin lökositin metabolik seviyesi ile ilgili olduğu kabul edilmektedir (10). Diğer taraf-

tan, Burns ve arkadaşları (1975) (22), endojen hipertrigliseridemili hastaların lökositlerinde glukoz ve yağ asidi metabolizmasını incelemişler, bu hücrelerde glukozdan yağ asidi sentezlenebileceğini göstermişlerdir.

Bu glukoz tüketimi deneyinin yapılışındaki amaç, ekstrasellüler glukozun belli bir sürede lökositler tarafından ne oranda hücre içine alındığını incelemektir. Böylece PMN lökositlerin glikojen depolarını nasıl harcadıkları konusunda hem bilgi edinilmiş olur, hem de LAP in hücre membranındaki fonksiyonu düşünülerek enzim aktivitesi ile glukozun hücre zarından geçişi arasındaki ilişki rahatlıkla araştırılabilir.

Bizim çalışma şeklimize ve amacımıza uyan bir araştırmaya literatürde rastlayamadık. Ancak bu deneyi kurarken her bir kısmını, yakından veya uzaktan ilgili, literatür bilgilerine dayandırdık. Lökositlerden enzim ve total protein salınmasına, glukoz ve glikoliz inhibitörlerinin etkisini incelerken Lahrchi ve arkadaşları (1977) nın kullandıkları lökositleri besleyici ortamı (modifiye KRB çözeltisi) aynen kullandık. Bu ortama koyduğumuz lökosit sayısı $2-8 \times 10^6$ lök/ml dir. Ksojen ve arkadaşları (1975) lökositlerin glukoz oksidasyonunu tayin ederken KRB ortamında 1×10^7 lök/ml ihtiva eden süspansiyon kullanmışlardır. Bu hücrelerin % 85 inin PMN oldukları ve bu nötrofillerin % 95 inin canlılıklarını korudukları yine aynı araştırmacılar tarafından tesbit edilmiştir.

Ekstrasellüler glukoz konsantrasyonuna bağlı olarak lökositlerin hücre zarından giriş-çıkışında bir azalma veya artma olacağını bilmiyoruz. Başka bir ifadeyle, lökositlerin bulunduğu ortama yüksek konsantrasyonda glukoz koysak hücreye giriş artar mı? Yoksa az miktarda glukoz koyulması girişi azaltır mı? Metodumuzun hassasiyet sınırları içerisinde olacak şekilde ortama glukoz (31,8 μ mol/2,1 ml) koyduk. Bu miktar kan glukoz seviyesinin (0,389-0,555 mmol/100 ml kan) 3-4 katıdır (23).

Deney ortamında bulunması muhtemel mononükleer lökositlerin glukoz tüketerek pek önemli bir hata getirmeyeceği söylenebilir. Çünkü bu hücreler, nötrofillerin harcadığı glukozun ancak 1/8 ini kullanmaktadır (16). Kanın alınışı ile en son yapılan glukoz tayini (180 dak) arasındaki süre en fazla 4 saattir. Bu sürede lökositlerin yapı ve fonksiyonlarında önemli bir değişme meydana getirmediği gibi büyük bir çoğunluğunun canlılıklarını koruyacakları kaydedilmiştir (24).

Bulgularımıza göre bir saatlik sürenin sonunda ortamdaki glukoz hemen hemen sabit kalmıştır. Bu durum, ekstrasellüler glukoz miktarı kandaki seviyesinin yaklaşık 4 katı kadar bulunduğu halde bile hücrenin birinci saat içinde kendi glikojen depolarını kullanmakta olduğuna işaretir. Çünkü hücrenin yapı bütünlüğünü koruyabilmesi için ve maddelerin membrardan geçişi sırasında gerekli enerjiyi sağlamak üzere glikojen depolarının bir saate yaklaşık % 80 ini harcadığı bilinmektedir(10). Bir saatten sonra hücre dış ortamda bulunan glukozu kullan-

mağa başlar. İki saatlik inkübaşyonun sonunda kullanılan glukoz % 7, üç saat sonunda % 17 dir. Son iki saatte kullanılan glukoz bulduğumuz bu değerden daha fazla olabilir. Çünkü bu süre içerisinde bir miktar lökositin ölmüş olabileceği kesindir. Ancak bunun sonuçlara nasıl etki edeceğini bilemiyoruz.

THE UTILIZATION OF EXTRACELLULAR GLUCOSE BY NEUTROPHILS
SUMMARY

The glucose utilization of neutrophilic leukocytes from healthy subjects was detected in an interval of 1 hour for three hours. This was accomplished by measuring glucose in glucose-containing medium within the intervals. By determining the neutrophil alkaline phosphatase levels, it was investigated whether the enzyme has a role in entrance of glucose through the cell membrane. It was concluded that there was no correlation between glucose entering and enzyme activity.

KAYNAKLAR

1. Noyan, A., Fizioloji, Ankara Meteksan Baskı Tesisleri, 1980, s. 459-467.
2. Robinson, S. L., Pathologic Basis of Diseases, 1974 s. 72.
3. Spitznagel, J. K., Dalldorf, F. G., Leffel, M. S., Folds, J. D., Welsh, I. R. H., Cooney, M. H. ve Martin, L. E., Character of azurophil and specific granules purified from human polymorphonuclear leukocytes. Lab. Invest. 30: 774-785 (1974).
4. Mazur, A. ve Harrow, B., Textbook of Biochemistry, Philadelphia, WB Saunders Co. 1971 s. 518.
5. Danishefsky, I., Biochemistry for Medical Sciences, Boston, Little, Brown and Co. 1980, s. 468.
6. Torunoğlu, M., Dolaşım, Solunum ve kan hastalıkları Fizyopatolojisi, Ankara, Ank. Ü. Tıp Fak. Yayınları, 1981, C. I s. 325.
7. Terzioğlu, M., Fizioloji Ders kitabı, İstanbul, İ. Ü. Tıp Fak. Yayınları, 1962, C. I, s. 497.
8. Schlesinger, M. J., Reynolds, J. A. ve Schlesinger, S., Formation and localization of the alkaline phosphatase of Escherichia Coli, Ann, NY. Acad Sci. 166: 368 (1969).
9. Bainton, D. F., Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear granules during phagocytosis of microorganism, J. Cell. Biol. 58: 249-264 (1973).

10. Lahrichi, M., Tarallo, P., Hoipert, Y. ve Siest, G., Influence of glucose and inhibitors of glycolysis on release of total proteins and enzymes from human leukocytes, *Clin. Chim. Acta.* 79 (2): 479-487 (1977).
11. Ksöjen, B., Bassöe, H.H. ve Myking, O., The glucose oxidation in leukocytes from female patient suffering from overweight or anorexia nervosa, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 35 (5): 447-454 (1975).
12. Hirsch, G.J. ve Cohn, Z. A., Degranulation of polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis of microorganisms. *J. Exp. Med.* 112: 1005-1015 (1964).
13. Bhagavan, N. V., *Biochemistry*, Philadelphia, JB Lippincott Co, 1978, 1155, 1156, 1165.
14. Karan, A., İnsan polimorf nüveli lökositlerinden fagositoz esnasında ortama lizozomal enzimlerin salıverilmesinin kinetiği ve oksolaminin etkisi, Ankara, Hacettepe Ü. Ecz. Fak. Doçentlik tezi, 1976.
15. Cagar R.H. ve Karnowsky M.L., Enzymatic basis of the respiratory stimulation during phagocytosis, *Nature* 204: 255-257 (1964).
16. Eser, S., *Klinik Fizyopatoloji*, İstanbul, Formül Matbaası, 1980, s. 230.
17. Yenson, M., İnsan Biyokimyası, İstanbul, İst. Tıp Fak. Yayınları, 1981, s. 766.
18. Oser, B. L., *Hawk's Physiological Chemistry*, New York, McGraw Hill Book Co. 1965, s. 342-343.
19. Bakan, E., Lökosit alkalen fosfataz seviyeleri ve Serum alkalen fosfatazı ile ilgisinin araştırılması, Erzurum, A.Ü. Tıp Fak. İhtisas Tezi, 1983.
20. DeChatelet, L.R. ve Cooper, M.R., A modified procedure for the determination of leukocyte alkaline phosphatase. *Biochem. Med.* 4: 66-68 (1970).
21. Randina, G., *Experimental Methods in Modern Biochemistry*, London, WB Saunders Co. 1971, s. 243.
22. Burns, C.P., Welshman, I.R. ve Spector, A.A., Metabolism of glucose and fatty acid by leukocytes from patient with endogenous hypertriglyceridemia, *J. Lab. Clin. Med.* 85 (4): 598-609 (1975).
23. Boehringer, Mannheim GmbH Diagnostic Test combination glucose, GOD perid method 1979.
24. Bretz, U. ve Baggiolini, M., Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes, *J. Cell. Biol.* 63: 251-269 (1974).