

## **Asosiasi dan Disosiasi Insulin-Antibodi Insulin pada pasien Sindrom Autoimun Insulin.**

Yunus Tanggo

Bagian Ilmu Penyakit Dalam FK UKI

### **Abstrak**

Sindrom autoimun insulin (SAI) ditandai oleh pembentukan autoantibodi pada pasien yang sebelumnya tidak pernah menggunakan insulin. Pasien SAI biasanya mengalami hiperglikemia diikuti dengan hipoglikemia sesudah makan, yang terjadi karena asosiasi dan disosiasi insulin dari kompleks antibodi insulin-insulin. Studi ini dilakukan untuk mengevaluasi perubahan konsentrasi insulin imunoreaktif bebas (IIB), insulin imunoreaktif total (IIT), antibodi anti insulin dan gula darah pada saat uji toleransi glukosa oral 75 g (TTGO). Pada fase pertama, setelah dimulai uji toleransi, konsentrasi antibodi insulin turun dari 54% ke 45%, selama 120 menit. Hal itu menunjukkan terjadi ikatan insulin dengan antibodi hingga menyebabkan kenaikan insulin terikat (IIT) pada waktu bersamaan. Gula darah naik sampai 200 mg% dalam 60 menit karena IIB relatif tidak cukup untuk menekan kenaikan gula darah sesudah uji toleransi glukosa. Fase kedua, 120 menit sesudah TTGO, konsentrasi IIT dan antibodi insulin kembali ke tingkat basal. Perubahan itu menunjukkan disosiasi insulin dengan kompleks insulin-antibodi. Gula darah turun menjadi 33 mg% pada waktu 240 menit, mungkin karena eksekusi IIB yang dihasilkan kompleks insulin-insulin antibodi. Hal itu menunjukkan bahwa asosiasi insulin terhadap antibodi menyebabkan hiperglikemia 60 menit setelah TTGO dan disosiasi dari kompleks insulin-insulin antibodi menyebabkan hipoglikemia 240 menit setelah TTGO.

**Kata kunci:** antibodi insulin, glukosa darah, asosiasi, disosiasi.

## **Association and Dissociation of Insulin-Insulin Antibody in the Patient with Autoimmune Insulin Syndrome**

### **Abstract**

The insulin autoimmune syndrome (IAS) is characterized by the autoantibodies formation in patient without previous insulin usage. Patient affected by IAS usually developed hyperglycemia followed by hypoglycemia after meal due to association of insulin to its antibody and dissociation of insulin from insulin-insulin antibodies complexes. This study was carried out by evaluation of the changes of the free immunoreactive insulin (FIRI) concentration and the total immunoreactive insulin (TIRI) concentration. Insulin antibody and blood sugar during 75 g oral glucose tolerance test (75 g OGTT) also evaluated. There were two distinct time courses could be identified during the OGTT. The insulin antibody concentration gradually decreased from 54% to 45% at 120 minutes. That change indicates consumption of the antibody or association of the insulin to its antibody, results in the increase of bound insulin or TIRI at the same time. The blood sugar increased to 200 mg% in 60 minutes due to relativity insufficient of FIRI to suppress blood sugar elevation after OGTT. After 120 minutes of OGTT the concentrations of TIRI and the insulin antibodies were returned to the basal level and these changes were strongly indicated the dissociation of the insulin-insulin antibodies complexes. Blood sugar was decreased to 33 mg% at 240 minutes, may be due to the relativity excess of FIRI released from insulin-insulin antibodies complexes. These data indicated that association of the insulin to its antibody result in hyperglycemia 60 minutes after OGTT and dissociation of the insulin-insulin antibodies complexes result in hypoglycemia 240 minutes after OGTT.

**Keywords:** insulin antibody, blood glucose, association, dissociation.

## **Pendahuluan**

Sindroma autoimun insulin (SAI) pertama kali dilaporkan oleh Hirata *et al.*,<sup>1</sup> pada tahun 1970. SAI ditandai oleh pembentukan antibodi terhadap insulin endogen pada pasien yang tidak pernah mendapat suntikan insulin sebelumnya. Sindroma tersebut terutama dilaporkan pada penggunaan obat-obat yang mengandung gugusan sulfhidril (SH) seperti  $\alpha$  Lipoic acid,<sup>2,3</sup> neo-mercazole,<sup>4</sup> penicillin G<sup>5</sup> dan dihubungkan dengan penyakit autoimun lain seperti ANCA – *associated glomerulonephritis*.<sup>6</sup> Pasien dengan SAI biasanya mengalami hiperglikemia diikuti oleh hipoglikemia setelah makan dan ini diduga terjadi karena asosiasi insulin dengan antibodi anti-insulin dan disosiasi kompleks insulin-insulin antibodi. Bagaimana interaksi insulin dan antibodi insulin dalam menginduksi hiperglikemia dan hipoglikemia setelah makan belum begitu jelas. Laporan ini bertujuan menilai kinetik insulin, antibodi anti-insulin dan gula darah selama 75 g oral *glucose tolerance test* (OGTT) pada kasus SAI yang sebagian telah dilaporkan.<sup>7</sup>

## **Bahan dan Cara**

### ***Bahan :***

Bahan dan cara sesuai dengan yang dilaporkan sebelumnya.<sup>7</sup> Darah untuk pemeriksaan berasal dari penderita sindroma autoimun insulin dan orang normal diambil untuk analisis. Kit 125 *I-insulin immunoassay* untuk penentuan *free immunoreactive insuline* (FIRI), total immunoreactive insulin (TIRI) dan antibodi anti-insulin diperoleh dari Amersham International Ltd. Basa NaOH, HCl dan polyethylenglycol (PEG) dan bahan untuk membuat bufer G diperoleh dari Nakarai Chemical Ltd., Tokyo. Glukosa darah diperiksa dengan *glucose*

*analyzer* (YSI) *crystal porcine insulin/cold insulin* (Eli Lilly Company, USA).

### ***Cara :***

Sebanyak 10 ml darah diambil dari vena cubiti pada pagi hari setelah puasa paling sedikit 10 jam. Kemudian diambil lagi sebanyak 10 ml setiap 30, 60, 120, 240 dan 300 menit setelah pembebanan dengan 75 gram glukosa oral. Serum kemudian dipisahkan untuk penentuan FIRI, TIRI dan antibodi anti-insulin, sedang glukosa darah langsung diukur dengan *glucose analyzer*.

### ***Antibodi Anti Insulin***

Jumlah antibodi antiinsulin dalam serum dapat diketahui dengan menentukan jumlah  $I^{125}$ -insulin (*Iodinated insulin*) yang terikat pada antibodi dengan cara sebagai berikut: sebanyak 0,1 ml  $I^{125}$ -insulin ditambahkan pada 0,1 ml serum, kemudian ditambah 0,8 ml buffer G (pH 7,4). Setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 4<sup>0</sup>C, ditambahkan 1 ml PEG 25%. Selanjutnya larutan dikocok dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 G pada suhu -4<sup>0</sup>C, selama 30 menit dan selanjutnya supernatan diaspirasi. Radioaktivitas presipitat dihitung dengan menggunakan *gamma counter*.  $I^{125}$ -insulin binding (%) adalah radioaktivitas presipitat/*total count* x 100%. Hasilnya dipakai sebagai tolok ukur penentuan jumlah (%) antibodi antiinsulin bebas yang berada dalam serum.

### ***Ekstraksi FIRI dari Serum***

Ekstraksi FIRI (insulin imunoreaktif yang tak terikat pada antibodi antiinsulin) dilakukan dengan cara menambahkan 1 ml PEG 25% pada 1 ml serum, dikocok, dan kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 G, pada suhu -4<sup>0</sup>C, selama 30 menit. Antibodi anti-insulin dan kompleks insulin-antibodi anti-insulin akan mengalami presipitasi. Supernatan yang hanya mengandung FIRI dikumpulkan untuk

diukur dengan cara radioimmunoassay (RIA).

**Ekstraksi TIRI dari serum**

Ekstraksi TIRI (FIRI dan insulin yang terikat sebagai kompleks insulin antibodi anti-insulin) dimulai dengan menambahkan 0,2 ml HCl 1N kedalam 1 ml serum, selanjutnya campuran diinkubasi selama 60 menit pada suhu kamar. Dengan menurunkan pH larutan, akan terjadi disosiasi kompleks insulin-antibodi anti-insulin, sehingga semua insulin diharapkan akan berada dalam bentuk bebas. Antibodi anti-insulin kemudian dipresipitasi dengan menambahkan 1,2 ml PEG 25%. Setelah itu dinetralisir dengan 0,2 ml NaOH 1N. Larutan tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 G, pada suhu -4 °C. Supernatan, yang sekarang berisi FIRI dan insulin bebas merupakan TIRI, diambil untuk diukur dengan cara *radio immuno assay* (RIA).

**Pengukuran IRI (FIRI dan TIRI) dengan RIA**

Semua sampel diperiksa *triplicate* dan dilakukan sesuai dengan protokol Amersham yang dimodifikasi.<sup>8</sup> Larutan yang berisi TIRI diencerkan 4-10 kali. Dalam tabung reaksi ditambahkan 0,1 ml serum dengan 0,1 ml insulin-125I, larutan dapar 0,3 ml, kemudian larutan tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 4<sup>0</sup> C. Setelah inkubasi ditambahkan 0,1 ml antibodi anti insulin, diinkubasi kembali dengan cara seperti di atas. Setelah inkubasi yang kedua, ditambahkan 0,1 ml antibodi yang kedua (*second antibody*) dan PEG dengan konsentrasi akhir 12,5%, kemudian berturut-turut dilakukan sentrifugasi, aspirasi dan pengukuran radioaktivitas presipitat. Pemeriksaan yang sama juga dilakukan pada seorang sehat sebagai kontrol.

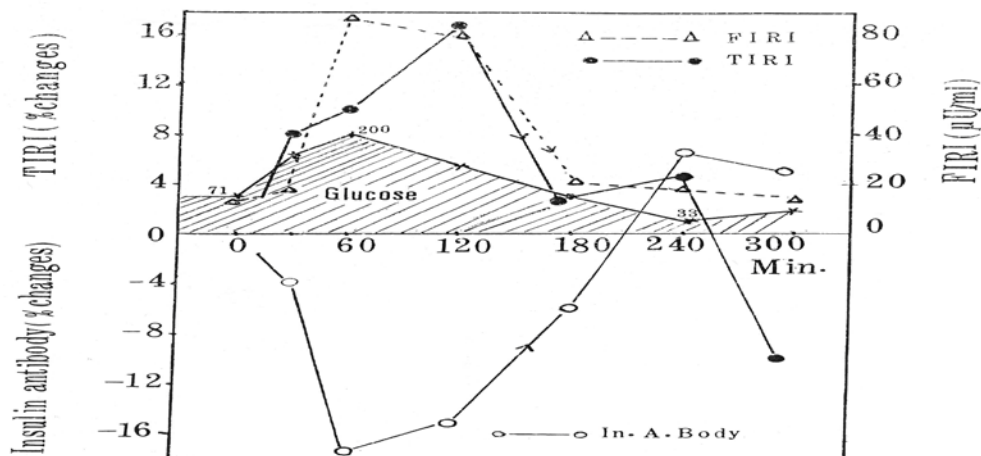
**Hasil**

Pada Tabel 1 terlihat konsentrasi rata-rata (%) antibodi anti-insulin pada orang normal 4,3% sedang SAI 51,9%. Dengan 75 g OGTT terlihat ada dua fase pergerakan antibodi insulin, FIRI, TIRI dan glukosa darah (Tabel 2, Gambar 1).

**Tabel 1. Antibodi Anti Insulin pada Sindroma Autoimun Insulin dan Orang Normal saat Puasa.**

Kasus	Jumah Pemeriksaan	Antibodi antiinsulin(%)
Sindrom autoimun insulin	5	51,9 ± 1,65 <sup>x</sup>
Kontrol	5	4,3 ± 0,15

pemeriksaan dilakukan terhadap penderita SAI dan kontrol. Masing-masing diperiksa sebanyak lima kali. Keduanya memperlihatkan perbedaan bermakna (p < 0,001)



Fase pertama: 0 sampai 120 menit, konsentrasi antibodi anti-insulin berkurang menjadi 5% pada 120 menit. Pada saat yang sama gula darah meningkat dari 71 mg% menjadi 200 mg% pada menit ke 60. Jumlah insulin bebas dan yang diekstraksi

dari kompleks insulin antibodi anti-insulin meningkat masing-masing 4 µU/ ml (FIRI) dan 858 µU/ml (TIRI) dan kemudian FIRI menjadi 80 µU/ml dan TIRI 1003 µU/ ml. (Gambar 1 & Tabel 2)

**Tabel 2. Konsentrasi FIRI, TIRI, Antibodi Antiinsulin dan Gula Darah sebelum dan selama 75 gr TTGO pada Sindrom Autoimun Insulin.**

Waktu (menit)	0	30	60	120	180	240	300
FIRI (µU/ ml)	14	17	90	80	20	18	14
TIRI (µU/ ml)	858	924	937	1003	884	898	765
Insulin Antibodi (%)	54	51	44	45	51	50	57
Glukosa Darah (mg/dL)	71	158	200	145	73	33	45

Semua sampel dikerjakan tiga kali (*triplicate assays*)

Fase kedua: 120 menit sampai 300 menit pasca 75 Gr OGTT terjadi hal yang sebaliknya, konsentrasi antibodi anti-insulin meningkat kembali dari 45% menjadi 57% pada 300 menit dan pada saat yang sama glukosa darah turun dari 145

mg% menjadi 33 mg% pada 240 menit. FIRI dan TIRI turun secara simultan ke arah nilai dasar pada 300 menit, FIRI menjadi 14 µU/ ml dan menjadi TIRI 765 µU/ml. (Gambar 1 dan Tabel 2)

## Diskusi

Pasien dengan sindroma autoimun insulin biasanya ditemukan pada penderita yang tidak memiliki riwayat penggunaan insulin. Sebagian besar kasus SAI ditemukan di negara Asia Timur terutama Jepang. Patogenesisnya belum jelas, meskipun terlihat pasien mengalami hiperglikemia dan hipoglikemia setelah makan dan ditemukan hiperinsulinemia.<sup>1-7,9-10</sup> Beberapa ahli menghubungkan penyakit itu dengan autoantibodi dan HLA.<sup>9,10</sup> Hiperglikemia pada fase awal dihubungkan dengan ikatan insulin- insulin antibodi yang menyebabkan penurunan jumlah insulin bebas. Dari laporan ini diketahui bahwa terjadi peningkatan gula darah pada fase pertama TTGO. Pada fase itu terjadi penurunan konsentrasi anti-insulin antibodi dalam serum, dan pada saat yang sama jumlah insulin yang diekstraksi dari kompleks insulin-insulin antibodi meningkat. Hal itu menunjukkan bahwa penurunan antibodi anti-insulin, karena terpakai untuk membentuk kompleks insulin-insulin antibodi. Pada saat yang sama glukosa darah meningkat sehingga terjadi hiperglikemia pada menit ke-60. Hal itu disebabkan karena peningkatan glukosa darah relatif lebih besar dibanding peningkatan FIRI yang sebagian dipakai membentuk kompleks dengan antibodi insulin. Perubahan diatas sesuai dengan asosiasi insulin dan insulin antibodi.

Pada pasien ini, setelah fase hiperglikemia terjadi pelepasan ikatan antibodi anti-insulin, sehingga insulin bebas meningkat dan menyebabkan hipoglikemia. Pada fase tersebut, mulai menit ke-120 terjadi peningkatan kembali antibodi anti-insulin disertai penurunan kembali TIRI. Peningkatan kembali antibodi anti-insulin akan diiringi oleh pembebasan insulin dari kompleks insulin-insulin antibodi. Hal itu menyebabkan glukosa darah menurun sehingga terjadi hipoglikemia pada menit ke-240 (33 mg

%). Fenomena pada fase kedua ini sesuai dengan disosiasi dari insulin-insulin antibodi kompleks.

## Kesimpulan

Asosiasi insulin dengan antibodi anti-insulin menyebabkan hiperglikemia dan disosiasi kompleks insulin-insulin antibodi yang menyebabkan hipoglikemia pada SAI pasca pemberian 75 g glukosa pada TTGO.

## Daftar Pustaka

1. Hirata Y, Ishizu H. Insulin and autoimmunity in a case of spontaneous hypoglycemia. *J Jap Diabetic Soc* 1970;13:312-20
2. Ishida Y, Ohara T, Okuno Y, Ito T, Hirota Y, Furukawa K, Sakaguchi K *et al.*  $\alpha$  - Lipoic Acid and insulin autoimmune syndrome. *Diabetes Care* 2007;30:2240 -1
3. Ka T, Moriwaki Y, Nakanishi T, Yamamoto T. Insulin autoimmune syndrome in a patient with ANCA - associated glomerulonephritis. *Diabetes, Metab Syndr Obes* 2008;1: 1-2
4. Moreira R.O, Lima G.A, Peixoto PC, Farias MLF, Vaisma M. Insulin autoimmune syndrome: case report. *Sao Paulo Med J* 2004;122(4):178-80
5. Virally ML, Timsit J, Chanson P, Warnet A, Guillausseau PJ. Insulin autoimmune syndrome: a rare cause of hypoglycaemia not to be overlooked. *Diabetes Metab* 1999;25(5):429-31.
6. Takeuchi Y, Miyamoto T, Kakizawa T, Shigematsu S, Hashizume K. Insulin Autoimmune Syndrome possibly caused by alpha lipoic acid. *Intern Med* 2007;46(5):237-9.
7. Tanggo Y. Mekanisme hipoglikemia pada sindroma autoimun insulin. *Medika* 1990;16:11-13.
8. Amersham Protocol Sheet for Firi and Tiri
9. Kato T, Itoh M, Hanashita J, Itoi T, Matsumoto T, Ono Y, *et al.* Severe hypoglycaemia in a person with insulin autoimmune syndrome accompanied by insulin receptor anomaly type B. *Diabetic Med* 2007;24:1279-81
10. Miyamura N, Murata Y, Taketa K, Ichihara Y, Matsumura T, Tokunaga H, et al. A case of insulin autoimmune syndrome with HLA DRB1\*0404: impact on the hypothesis for the molecular pathogenesis involving DRB1 molecules. *Diabetic Med* 2006;23:103-6