

بررسی کارآیی انسولین انسانی: استفاده از روش کلامپ با سطح ثابت قند خون برای مقایسه دو نوع مختلف تجاری انسولین انسانی

علیرضا استقامتی*^۱، مهرشاد عباسی^۱، عباس یوسفی زاده^۱

چکیده

مقدمه: هدف این مطالعه مقایسه کارآیی انسولین رگولار تولیدی شرکت دارویی اکسیر که در ایران استفاده می شود با اکتراپید محصول شرکت Novo Nordisk به روش کلامپ با قند خون ثابت است. این روش در ایران برای اولین بار در این مطالعه بکار گرفته شده است.

روش ها: آزمون کلامپ با قند خون ثابت با دو نوع انسولین مذکور در مطالعه ای تصادفی، دو سو کور و متقاطع روی ۶ داوطلب مرد سالم انجام شد. داده های میزان تبادلات گلوکز شامل میزان پاکسازی قند بدن و میزان پاکسازی انسولین بدن طی ۲ ساعت آزمایش با تزریق همزمان مقادیر ثابت از پیش تعیین شده انسولین و مقادیر متغیر گلوکز با هدف تثبیت قند خون، تعیین شد.

یافته ها: تفاوت بارزی بین تبادلات قند و عملکرد انسولین اکسیر و Novo Nordisk با توجه به میزان قند تزریق شده تام ($688/4 \text{ mg/kg}$ در مقابل $664/6 \text{ mg/kg}$ در طی ۱۲۰ دقیقه)، میزان پاکسازی گلوکز ($0/63 \pm 0/19 \text{ ml/kg}$ در مقابل $0/62 \pm 0/25$) و میزان پاکسازی انسولین (110% در برابر 110%) وجود نداشت. هر دو ترکیب انسولین بطور یکسانی سطح انسولین خون را افزایش و سطح پپتید C خون را کاهش دادند.

نتیجه گیری: کارآیی و فراهمی زیستی انسولین انسانی اکسیر و اکتراپید Novo Nordisk در طی ۲ ساعت مطالعه مشابه بود.

واژگان کلیدی: روش کلامپ با قند خون ثابت، نمودار کارآیی در طول زمان، فراهمی زیستی، انسولین انسانی رگولار

۱- مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، بیمارستان امام خمینی (ره)، دانشگاه علوم پزشکی تهران

***نشان:** تهران، انتهای بلوار کشاورز، مجتمع بیمارستانی امام خمینی (ره)، بیمارستان ولی عصر، مرکز تحقیقات غدد و متابولیسم، تلفن: ۰۹۱۲۱۱۵۴۵۷۷؛ پست الکترونیک: esteghamati@tums.ac.ir

مقدمه

روش کلامپ با سطح ثابت قند خون^۱ شیوه‌ای روزآمد و دقیق برای تخمین حساسیت بافتها به انسولین است [۱-۳]. در این شیوه اثر متقابل بافتها و انسولین بطور غیر مستقیم در بدن انسان اندازه گرفته می شود. بعلاوه نمودار عملکرد^۲ و فراهمی زیستی^۳ انسولین با تعیین مقدار قند مورد نیاز برای تعدیل اثر انسولین تجویز شده در طول زمان قابل ارزیابی است [۴، ۵]. با توجه به دقت و قابلیت تکرار این آزمایش در تعیین اثرات متقابل انسولین با بافت، کلامپ با سطح ثابت قند خون روشی کارآمد برای مقایسه حساسیت بافتها به ترکیبات مختلف انسولین و مطالعه کارآیی و دینامیک دارویی انسولین‌های مختلف است [۶-۹]. ما برای اولین بار در این مطالعه از این شیوه در ایران برای مقایسه ترکیب انسولین انسانی رگولار محصول شرکت دارویی اکسیر که مصرف آن در ایران رایج است و اکتراپید® نوئوردیسک^۴ که در این مقاله به ترتیب ترکیبات انسولین الف و ب نامیده می‌شوند، استفاده نمودیم. ما عملکرد و فراهمی زیستی این ترکیب انسولین را نیز بواسطه میزان توان آن در بالابردن نیاز به قند تزریقی، سطوح خونی پپتید C و انسولین ارزیابی نمودیم.

روش‌ها

داوطلبین و طرح مطالعه: این مطالعه تصادفی دوسوکور متقاطع در یک بیمارستان عمومی تهران که مجهز به تجهیزات اورژانس و بخش مراقبت‌های ویژه می‌باشد انجام شد. شش داوطلب مرد سالم با سن $35/5 \pm 9/7$ در مطالعه شرکت نمودند. آنها سیگاری، الکلی و دیابتی نبوده و فشار و چربی خون طبیعی داشتند. بعلاوه سابقه مصرف داروی خاص و سابقه خانوادگی دیابت نداشتند. از داوطلبان خواسته شد که از یک هفته قبل از آزمایش برنامه غذایی حاوی حداقل ۲۰۰ گرم کربوهیدرات در روز داشته و از انجام فعالیت‌های بدنی شدید و غیر معمول بپرهیزند. از تمام داوطلبان رضایت نامه و آگاهی نامه کتبی اخذ

گردید. طرح مطالعه منطبق با قواعد بیانیه هلسینکی برنامه‌ریزی شد. زمان انقضای مصرف ترکیبات انسولین الف و ب به ترتیب فروردین ۲۰۰۷ و اسفند ۲۰۰۶ بود. آزمایش با دو نوع انسولین مورد مطالعه در هر داوطلب به فاصله یک هفته انجام شد. برای تصادفی نمودن از ناظر بی اطلاعی استفاده شد. وی موظف بود تا در هر نوبت آزمایش، بدون اطلاع محققین یا داوطلب از بین دو کارت که هر یک معرف یک نوع انسولین بود یکی را به طور تصادفی بکشد و محلول انسولین را با استفاده از آن نوع انسولین تهیه نموده در اختیار گروه تحقیق قرار دهد. بدیهی است در نوبت بعد انسولینی را که بار اول استفاده نکرده بود بکار می برد. تمام آزمایش‌ها ساعت ۸ صبح، پس از ۱۲ ساعت ناشتایی شروع شدند. کلامپ با سطح ثابت قند خون منطبق با روش دی فرونزو و همکارانش انجام شد [۱۰]. بطور خلاصه راههای وریدی با کاترهای منعطف شماره ۱۸ از وریدهای آنتی کویبتال^۵ دو بازوی داوطلبان گرفته می‌شد. از یکی برای تزریق قند و انسولین بوسیله پمپ‌های اتوماتیک^۶ متعدد (مدل SP500 از شرکت JMS) استفاده می شد و ورید طرف مقابل برای اخذ نمونه های خون متناوب بکار می رفت. یک چراغ گرمایشی^۷ (۱۰۰ وات با حباب قرمز) بمنظور شریانی کردن خون وریدی این دست را گرم می کرد. سطح قند خون هر ۵ دقیقه بوسیله گلوکومتر One Touch Ultra (Life Scan) تعیین می شد. انسولین ایمونوراکتیو سرم^۸ به شیوه IRMA با کیت IM 3210 Immunotech از شرکت Beckman coulter و پپتید C به شیوه RIA با کیت تجاری Biosource Europe S.A. در آغاز، پایان و در دقایق ۳۰، ۶۰ و ۹۰ مطالعه اندازه گیری شدند. محلول انسولین محتوی ۱۰۰ میلی واحد انسولین و ۲ میلی گرم آلبومین انسانی در هر میلی‌لیتر نرمال سالین بود. آلبومین انسانی بمنظور ممانعت از جذب انسولین در ست سرم پلاستیکی مورد استفاده، اضافه گردید. میزان تجویز انسولین بر اساس مقادیر ثابت از قبل تعیین شده پس از ۱۰ دقیقه به مقدار ۴۰ میلی واحد در دقیقه برای هر متر مربع

⁵ Antecubital veins

⁶ Syringe pumps

⁷ Heat lamp

⁸ Serum immuno-reactive insulin (IRI)

¹ Euglycemic clamp technique

² Action profile

³ Bioavailability

⁴ Actrapid HM® produced by Novo Nordisk

Gn-1 و Gn (میلی گرم در دسی لیتر) معرف قند خون آغاز و پایان دوره مورد نظر و t، مدت دوره مورد نظر (دقیقه) است.

برای تصحیح تغییرات طبیعی قند خون پایه بین دو آزمایش هر داوطلب میزان پاکسازی گلوکز بدن^۵ (MCRg) بصورت نسبت مصرف قند بدن (M) بر قند خون پایه هر آزمایش (دسی لیتر در دقیقه به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) محاسبه گردید.

برای بررسی فراهمی زیستی انسولین، شاخص بدون واحد میزان پاکسازی انسولین بدن^۶ (MCRi) معادل نسبت میزان متوسط انسولین (میکرو واحد در میلی لیتر) پس از شروع تجویز انسولین به نسبت میزان افزایش انسولین پلاسما در طول مطالعه محاسبه گردید.

روش تحلیل آماری: با استفاده از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۳ متغیرهای کمی هر داوطلب (شامل اعداد خام یا محاسبه شده) در آزمایش با دو نوع انسولین با آزمون آماری T جفت^۷ و داده های جمع شده مربوط به دو نوع انسولین در طول مطالعات با آزمون آماری T با نمونه مستقل^۸ یا تحلیل واریانس^۹ مقایسه شدند. از مدل رگرسیون خطی برای بررسی وجود تداخل بین نوع انسولین و دقیقه مطالعه در پیشگویی میزان MCRg و سایر متغیرها استفاده گردید.

یافته‌ها

میزان قند تام تزریق شده از نظر آماری برای دو نوع انسولین الف و ب یکسان بود (به ترتیب ۶۸۸/۴ mg/kg در مقابل ۶۶۴/۶ mg/kg در طول ۱۲۰ دقیقه). میزان قند مصرفی (M) در خلال بازه‌های زمانی ۵، ۱۰ و ۲۰ دقیقه‌ای یکسان بود. به‌طور مثال میزان قند تجویز شده در هر دوره ۱۰ دقیقه‌ای در آزمایش‌های با انسولین الف ۶۱/۹±۲۰ mg/kg و در آزمایش‌های با انسولین ب

سطح بدن داوطلب رسانده و تا پایان مطالعه ادامه داده شد. محلول قندی محتوی ۱ میلی گرم گلوکز در میلی لیتر بود و ما برای ممانعت از کاهش پتاسیم سرم^۱ به هر لیتر آن ۴۰ میلی اکی‌والان پتاسیم از محلول KCL افزودیم. تزریق قند ۴ دقیقه پس از آغاز تجویز انسولین به میزان ۲ میلی گرم در دقیقه به ازای هر کیلوگرم وزن داوطلب شروع می شد. پس از آن هر ۵ دقیقه میزان قند تجویز شده بر اساس فرمول دی فرونزو و همکارانش برای تثبیت قند خون داوطلب تعدیل می گشت. داده ها بوسیله نرم افزاری که برای این مطالعه طراحی نمودیم پردازش می شدند (شکل ۱). مدت هر آزمایش ۲ ساعت بود، بعلاوه ۴۵ تا ۶۰ دقیقه قبل از آغاز آزمایش داوطلب در شرایط آزمایش تحت نظر بود. پس از انجام آزمایش داوطلبین حداقل به مدت ۲ ساعت دیگر نیز تحت مراقبت پزشکی بودند.

کینتیک قند^۲: میزان قند تجویزی بطور متناوب بر اساس فرمول زیر تعدیل می شد:

$$Si = (BW \times PF) / Gc [(Gb - Gi) / 7.5 + (Gb / Gi \times Fmi - 1 \times Smi - 2)]$$

که در آن Si سرعت تجویز قند با در نظر گرفتن تنظیمات پمپ، BW، وزن داوطلب (کیلوگرم)، PF، ثابتی که میزان قند را از میلی لیتر در دقیقه به تنظیمات پمپ (مثلا میلی لیتر در ساعت) تبدیل می کند، Gc، غلظت گلوکز در محلول قند (میلی گرم در میلی لیتر)، Gb، قند پایه داوطلب (میلی گرم در دسی لیتر)، Gi، قند خون هر لحظه از آزمایش (میلی گرم در دسی لیتر)، Fmi-1، نسبت Gb به Gi ۵ دقیقه قبل و Smi-2 برای دو محاسبه اول، ثابت از پیش تعیین شده و پس از آن معادل حاصل ضرب Gb/Gi \times Fmi-1 \times Smi-2 مربوط به ۱۰ دقیقه قبل است. میزان قند تام تزریق شده^۳ معادل سطح زیر منحنی قند تجویز شده در واحد زمان محاسبه شد و مصرف قند با سوخت و ساز^۴ بصورت زیر محاسبه گردید:

$$M = S - 0.19 (Gn - Gn - 1) / t$$

که در آن M، بر آوردی از مصرف قند بدن (میلی گرم در دقیقه به ازای هر کیلو گرم وزن بدن)، S قند تام تزریق شده (میلی گرم در دقیقه به ازای هر کیلو گرم وزن بدن)،

⁵ The metabolic clearance rate of glucose (MCRg)

⁶ Metabolic clearance rate of insulin (MCRi)

⁷ Paired T Test

⁸ Independent Sample T Test

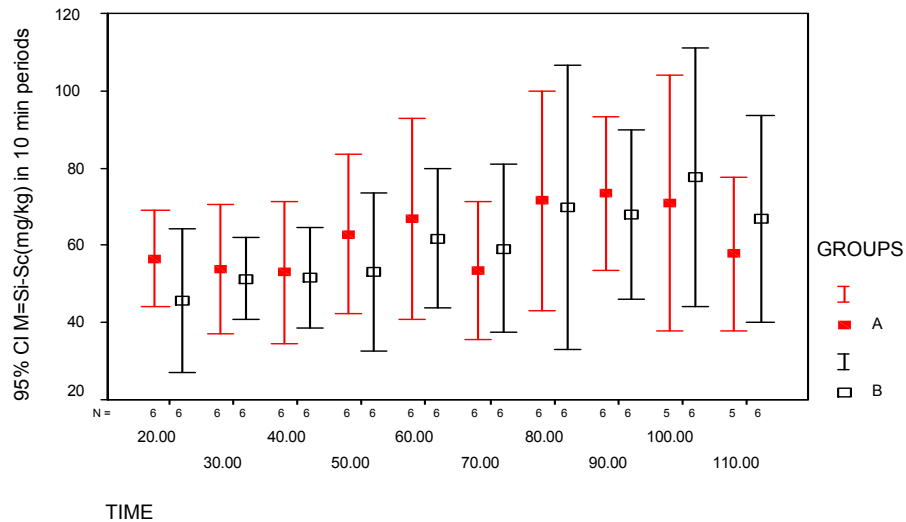
⁹ ANOVA

¹ Hypokalemia

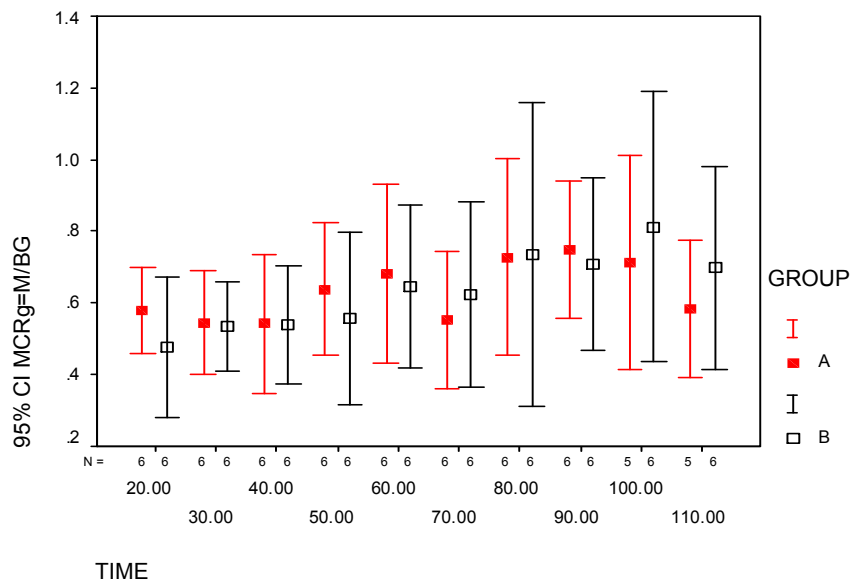
² Glucose kinetics

³ Total glucose disposal

⁴ Metabolic glucose consumption (M)



نمودار ۱- متوسط میزان تزریق قند در هر دوره ۱۰ دقیقه ای



نمودار ۲- میزان پاکسازی قند بدن

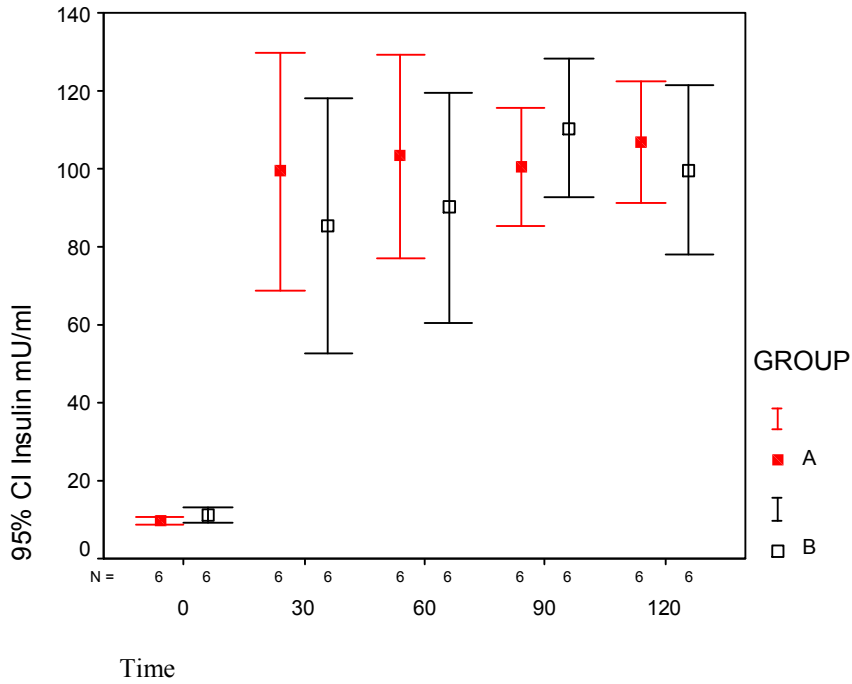
طی آزمایش با هر دو نوع انسولین نسبت به سطوح پایه افزایش یافت (۱۰/۴μIU/ml در مقابل ۹۵/۴μIU/ml برای داده‌های تجمعی هر دو نوع انسولین با $p < 0/001$) اما تفاوت معنی‌داری در این افزایش بین دو نوع انسولین مختلف بکار رفته وجود نداشت. مقدار MCRi نیز برای دو نوع انسولین یکسان بود (۱/۱±۰/۰۲ در مقابل ۱/۱±۰/۰۴ در طول آزمایش) (نمودار ۳). سطوح پپتید C در طول آزمایش در مقایسه با مقادیر پایه سرکوب شد (pmol/lit) ۶۷۹/۱±۲۱۳ در مقابل ۴۷۵/۸±۱۴۸/۵pmol/lit برای داده

۵۹/۶±۲۲/۵mg/kg بود (نمودار ۱) MCRg مربوط به آزمایش‌های دو انسولین مختلف یکسان بود (۰/۶۲±۰/۲۵ml/kg در مقابل ۰/۶۳±۰/۱۹ml/kg) (نمودار ۲). با استفاده از مدل رگرسیون خطی عمومی^۱ نوع انسولین مورد آزمایش و پیشرفت زمان آزمایش به عنوان عامل ثابت در پیش بینی میزان MCRg و سایر شاخص های کیتیک گلوکز موثر نبودند^۲. غلظت انسولین خون بطور معنی داری

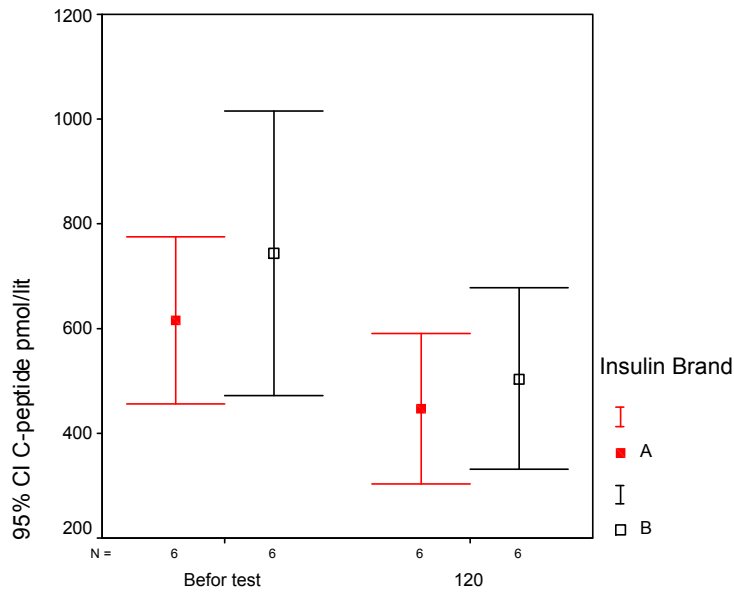
¹ General linear Modle

² no interaction effect

های تجمعی هر دو نوع انسولین (اما تفاوت معنی داری نداشت (نمودار ۴).
در میزان این افت بین دو نوع انسولین مورد آزمایش وجود



نمودار ۳- سطح انسولین در طول مطالعه سطح انسولین خون واضحاً به نسبت مقادیر پایه با هر دو نوع انسولین بطور مشابه بطور معنی دار افزایش یافت



نمودار ۴- سطح پپتید C در آغاز و پایان مطالعه. سطح پپتید C بطور یکسانی با هر دو نوع انسولین بطور معنی دار کاهش یافت

Sampling Time	GI	SI	S (mg/kg/min)	Sv	Sm	Fm	Infusion Time
11:7	88	61.13333	1.86767	-1.86666	3.434243	0.89598	687
14:56	88	112.7227	3.917253	0.4	3.317253	0.925309	812
19:59	87	115.98917	2.974373	-0.26666	3.2410046	0.9770114	1577
25:26	76	108.89780	4.024077	1.2	3.624077	1.194210	1544
30:4	71	242.04278	6.308252	1.86666	4.339598	1.197183	1826
35:2	74	251.6048	6.451248	1.46666	4.984521	1.148648	2119
39:49	74	230.8796	7.152250	1.46666	5.229283	1.168468	2284
45:2	77	238.08764	7.387191	1.06666	6.304525	1.103981	2726
49:58	78	326.0153	7.621069	0.53333	6.897925	1.093428	3059
55:20	80	311.40733	7.984188	0.66666	7.3181521	1.0625	3352
61:0	82	311.44368	7.959884	0.4	7.959884	1.086882	3634
66:19	81	321.2564	6.483645	0.53333	7.9605012	1.095927	4012
70:57	78	374.72130	9.682285	0.53333	8.6743651	1.0897426	4286
74:54	75	295.21659	10.13378	0.9	9.33333	1.075943	4520
80:46	84	273.95012	9.576282	0.13333	9.4448749	1.0119047	4520
85:34	80	417.37200	10.701846	0.66666	10.325179	1.0625	4899
90:14	87	371.97434	9.5278191	-0.26666	9.8044958	0.9770114	5434
95:20	89	344.38895	8.836514	0.53333	9.3638247	0.959361	5744
99:56	82	301.00339	7.7180357	-0.33333	8.6213638	0.922128	6025
105:21	82	365.34742	9.3578525	0.4	8.9678925	1.036983	6373
110:4	86	340.80959	8.702715	0.13333	8.9638048	0.986728	6536
115:10	88	318.28602	8.1614365	0.4	8.9514365	0.985930	6934
119:35	84	343.07097	8.7969917	0.13333	8.6633583	1.0119047	

شکل ۱- صفحه اصلی نرم افزار مورد استفاده: این نرم افزار بطور اختصاصی برای محاسبه میزان انفوزیون گلوکز طراحی شد

بحث

انسولین را تا ۳۵٪ کاهش دادند. نشان داده شده است این مطلب در سطوح پلاسمایی انسولین در حد ۱۰۰ میکرو واحد در میلی لیتر صادق است. سطح پلاسمایی هر دو ترکیب انسولین بکار رفته در ۳۰ دقیقه اول آزمایش به اوج رسید (نمودار ۳) و تا پایان مطالعه با تثبیت میزان تزریق انسولین ثابت ماند. این یافته نشانه عدم تجمع انسولین تزریقی در بدن و یا از سوی دیگر پدیدار نشدن مقاومت به انسولین در مدت دو ساعته مطالعه است، هرچند امکان چنین پدیده هایی در مواجه طولانی بافت با انسولین وجود دارد.

از نقاط ضعف این مطالعه عدم در اختیار بودن دستگاه های مدرن کلامپ بود که خون گیری متناوب، تعیین پارامترهای خونی، محاسبه میزان قند مورد نیاز و تزریق آن و نهایتاً ارائه شاخصهای نهایی و آنالیز آنها را با هم انجام می دهند. ما این ضعف را با بکار گیری نیروی انسانی و پمپ های متعدد و نرم افزاری^{*} که بوسیله نویسندگان بدین منظور نوشته شد، جبران نمودیم. در مجموع می توان گفت اکنون ساز و کار روش کلامپ که آزمون معیار طلایی برای اندازه گیری مقاومت به انسولین است در ایران راه اندازی شده و دانش آن در دسترس است.

* این نرم افزار با مکاتبه با نویسندگان برایگان قابل تهیه است

در روش کلامپ با قند خون ثابت، از آنجا که تولید درونی گلوکز بواسطه سطوح بالای انسولین خارجی مهار می شود، میزان نیاز به تزریق قند برابر با میزان قند منتقل شده به بافتها از طریق مسیرهای وابسته و غیر وابسته به انسولین است [۱۱]. در حالی که سرکوب میزان پپتید C نیز حاکی از مهار ترشح داخلی انسولین است، میزان پاکسازی قند و میزان پاکسازی انسولین بدن که می توان آنرا میزان پاکسازی انسولین خارجی در نظر گرفت، در بردارنده اطلاعاتی درباره فراهمی زیستی و واکنش متقابل بافتها با انسولین خارجی است که بر اساس آن می توان نمودار فعالیت انسولین خارجی تجویز شده در واحد زمان را تعیین نمود [۱۲]. در این مطالعه انسولین انسانی شرکت دارویی اکسیر نمودار فعالیت-زمان مشابه ترکیب انسولین دیگر استاندارد بکارگرفته شده داشت و تفاوت بارزی بین کینتیک قند شامل میزان قند تام تزریق شده، میزان پاکسازی قند، غلظت پلاسمایی انسولین، غلظت پلاسمایی پپتید C و میزان پاکسازی انسولین بین این دو ترکیب انسولین وجود نداشت. مقدار غلظت انسولین پلاسمای و میزان تام تزریقات قند در این مطالعه مشابه مطالعات دیگر است که نشان از دقت این روش دارد. بر اساس مقدار افت پپتید C هر دو ترکیب انسولین مورد مطالعه میزان ترشح داخلی

سپاسگزاری

با تشکر فراوان از همکاران اورژانس و ریاست بیمارستان بانک ملی تهران و همکاران آزمایشگاه غدد بیمارستان ولیعصر. این مطالعه با حمایت مالی شرکت دارویی اکسیر انجام شد

نتیجه گیری

روش کلامپ با قند خون ثابت در ایران در این مطالعه برای اولین بار راه اندازی شد. میزان مصرف مشابه قند در آزمایش با انسولین اکسیر و انسولین معیار اکتراپید نشان دهنده فراهمی زیستی مشابه و کارایی یکسان آنها حداقل در طول مدت مطالعه است.

مآخذ

1. Catalano PM, Tyzbir ED, Roman NM, Amini SB, Sims EA. Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *Am J Obstet Gynecol.* 1991; 165: 1667-72.
2. Sowell MO, Mukhopadhyay N, Cavazoni P, Shankar S, Steinberg HO, Breier A. Hyperglycemic clamp assessment of insulin secretory responses in normal subjects treated with olanzapine, resperidone, or placebo. *J Clin Endocrinology and Metabolism* 2002; 87: 2918-2923.
3. Stumvoll M; Wahl HG; Loblein K; Becker R; Volk A; Renn W; Jacob S; Haring H. A novel use of the hyperinsulinemic-euglycemic clamp technique to estimate insulin sensitivity of systemic lipolysis. *Horm Metab Res* 2001; 33: 89-95.
4. Ahren B, Larsson H. Quantification of Insulin Secretion in Relation to Insulin Sensitivity in Nondiabetic Postmenopausal Women. *Diabetes* 2002; 52: s202-11
5. Kraegen E W, James DE, Jenkins A B, Chisholm D J. Dose-response curves for in vivo insulin sensitivity in individual tissues in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1985; 248: E353-E362.
6. Heinemann L, Anderson JH. Measurement of insulin absorption and insulin action. *Diabetes Technol Ther* 2004; 6: 698-718.
7. Mudaliar S, Mohideen P, Deutsch R. Intravenous glargine and regular insulin have similar effects on endogenous glucose output and peripheral activation/deactivation kinetic profiles. *Diabetes Care* 2002; 25: 1597-602.
8. Mudaliar SR; Mohideen P; Baxi SC; Joyce M; Armstrong DA; Strange P; Henry RR. Pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of a premixed 85/15 human insulin preparation. *Clin Ther* 2001; 23: 404-12.
9. Mudaliar S, Mohideen P, Deutsch R, Ciaraldi TP, Armstrong D, Kim B, Sha X, Henry R. Intravenous glargine and regular insulin have similar effects on endogenous glucose output and peripheral activation/deactivation kinetic profiles. *Diabetes Care* 2002; 25: 1597-602
10. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 1979; 237: E214-E223.
11. Nishimura H, Kuzuya H, Okamoto M, Yoshimasa Y, Yamada K, Ida T, Kakehi T, Imura H. Change of insulin action with aging in conscious rats determined by euglycemic clamp. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1988; 254: E92-E98.
12. Starke AAR, Heinemann L, Hohmann A, Berger M. The action profiles of human NPH insulin preparations. *Diabetic Medicine* 1989; 6: 239-244.