

Fariba Shojaee-Moradie, James K. Powrie, Erik Sundermann, Mark W. Spring, Achim Schüttler, Dietrich Brandenburg, Peter H. Sönksen, Richard H. Jones

Nowy hepatoselektywny analog insuliny

Badania kowalencyjnego kompleksu tyroksyna-insulina u ludzi

Novel hepatoselective insulin analog
Studies with a covalently linked thyroxyl-insulin complex in humans

STRESZCZENIE

CEL PRACY. Zbadanie, czy tyroksylowy analog insuliny z ograniczonym dostępem do receptora w tkankach obwodowych wykazuje względnie wybiórcze powinowactwo do wątroby u ludzi.

MATERIAŁ I METODY. Pięć zdrowych osób otrzymywało podskórną $N\alpha$ B^1 L-tyroksyl-insulinę (B1-T4-Ins) lub insulinę NPH w przypadkowej kolejności. Posługując się metodą klamry euglikemicznej i rozcieńczenia znacznika izotopowego ($[D-6,6-^2H_2]$ glukozy), badano kinetykę insuliny oraz jej względny wpływ na wątrobową produkcję i obwodowy wychwyt glukozy. Pobierano próbki krwi w celu oznaczenia całkowitego stężenia insuliny immunoreaktywnej (bądź jej analogu) oraz w celu określenia stopnia wiązania analogu insuliny z białkami krwi, który badano metodą chromatografii cieczowej.

WYNIKI. Po podskórnym podaniu B1-T4-Ins była dobrze tolerowana i szybko wchłaniana. Analog cechował się długim czasem półtrwania w surowicy oraz wysokim stopniem wiązania (ok. 86%) z białkami. Jego czas działania, mierzony czasem wlewu glukozy niezbędnym do utrzymania euglikemii, był podobny do czasu działania insuliny NPH. Wpływ analogu na wątrobową produkcję glukozy był podobny do wpływu insuliny NPH, co wskazuje na podobny stopień oddziaływania. Analog w mniejszym stopniu działał na obwodowy wychwyt insuliny w porównaniu z insuliną NPH ($p = 0,025$), nie wpływał na szybkość przemian metabolicznych glukozy oraz wykazywał zmniejszoną zdolność do hamowania lipolizy ($p < 0,05$).

WNIOSKI. U osób zdrowych B1-T4-Ins po podaniu podskórnym jest dobrze tolerowana, szybko się wchłania i ma wysoki stopień związania z białkami krwi, co odpowiada za długi czas połowicznego zaniku w surowicy. Analog ten wydaje się bardziej wybiórczy w oddziaływaniu na komórki wątroby, a zatem potencjalnie ma bardziej fizjologiczny profil działania w porównaniu z dotychczas stosowanymi preparatami insuliny.

Słowa kluczowe: insulina B1-T4-Ins, insulina NPH, cukrzyca typu 1

ABSTRACT

OBJECTIVE. To test whether a thyroxyl-insulin analog with restricted access to receptor sites in peripheral tissues displays relative hepatoselectivity in humans.

RESEARCH DESIGN AND METHODS. Five normal human subjects received a subcutaneous bolus injection of either N^B1 L-thyroxyl-insulin (B1-T4-Ins) or NPH insulin in random order. Insulin kinetics, relative effects on hepatic glucose production, and peripheral glucose uptake were studied using euglycemic clamp and stable isotope $[D-6,6-^2H_2]$ glucose) dilution techniques. Blood samples were taken for the determination of total immunoreactive insulin/analog concentrations and for liquid chromatography to assess the protein binding of the analog in the circulation.

RESULTS. After subcutaneous administration, B1-T4-Ins was well tolerated and rapidly absorbed. The analog had a long serum half-life and was highly protein bound (~86%). Its duration of action, as judged by the duration of infusion of exogenous glucose to maintain euglycemia, was similar to that of NPH insulin. The effect of the analogs on hepatic glucose production was similar to that of NPH insulin, indicating equivalent hepatic potency. The analog demonstrated less effect on periph-

Przedrukowano za zgodą z: *Diabetes Care*, 2000, 23; 8, 1124-1129
Copyright © 1999 by American Diabetes Association, Inc.
American Diabetes Association nie odpowiada za poprawność tłumaczenia z języka angielskiego

Diabetologia Praktyczna 2001, tom 2, nr 2, 151-158
Tłumaczenie: dr med. Anna Korzon-Burakowska
Wydanie polskie: Via Medica

ral glucose uptake than NPH insulin ($P = 0,025$), had no effect on metabolic clearance rate of glucose, and exhibited a reduced capacity to inhibit lipolysis ($P < 0,05$). **CONCLUSIONS.** When injected subcutaneously into normal human subjects, B1-T4-Ins is well tolerated, quickly absorbed, and highly protein bound, resulting in a long plasma half-life. This analog appears to have a hepatoselective action, and, therefore, has the potential to provide more physiological insulin action than the insulin preparations currently used.

Key word: B1-T4-Ins insulin, NPH insulin, type 1 diabetes

Większość chorych na cukrzycę typu 1 stosuje metodę wielokrotnych podskórnych wstrzyknięć insuliny. Taki sposób dawkowania nie jest zgodny z fizjologicznym rytmem wydzielania insuliny. Pacjenci nie są w stanie utrzymać prawidłowego stężenia glukozy i są narażeni na występowanie hipoglikemii.

Prawidłowo trzustka uwalnia insulinę do żyły wrotnej wątroby. Z tego względu stosunkowo duża ilość insuliny dociera do wątroby, gdzie w zależności od potrzeb około 60% ulega związaniu [1]. W wypadku podskórnej drogi podawania insuliny u chorych na cukrzycę typu 1 nie powstaje różnica stężenia insuliny pomiędzy żyłami wrotnymi i obwodowymi, a zatem w wątrobie występuje względny niedobór insuliny. Powoduje to względną hiperinsulinemię obwodową oraz oporność insulinową całej masy ciała [2–4]. U chorych leczonych w taki sposób, nawet tych, którzy są bliscy normoglikemii, występują różnorodne zaburzenia metaboliczne obejmujące duże wahania stężenia glukozy, zaburzenia lipidowe, zmniejszenie stężenia osoczowego IGF-1 z podwyższeniem stężenia hormonu wzrostu w osoczu. Te zaburzenia metaboliczne są zwykle tłem etiologicznym odległych powikłań cukrzycy w zakresie mikro- i makroangiopatii [5] i zmniejszają się przy stosowaniu leczenia pompą podającą insulinę do otrzewnej, dzięki której większość insuliny dostaje się do krążenia wrotnego [6].

Istnieją zatem podstawy teoretyczne, aby insulinę podawać do krążenia wrotnego, a nie do obwodowego. Jedynymi metodami leczenia, które obecnie umożliwiają wprowadzenie insuliny do krążenia wrotnego, są pompy dootrzewnowe [6], przeszczepienie trzustki połączonej z krążeniem trzewnym lub przeszczep komórek β wysp Langerhansa [7, 8]. Wciąż jeszcze powyższe metody wywołują znaczne działania niepożądane, które nie pozwalają na ich zastosowanie u większości chorych na cukrzycę typu 1.

Innym potencjalnym rozwiązaniem powyższych problemów jest opracowanie analogu insuliny wyka-

zującego większą wybiórczość w stosunku do wątroby niż do tkanek obwodowych. Z dotychczasowych badań analogów insuliny wynika, że wielkość cząsteczkowa kowalencyjnych dimerów insuliny lub proinsuliny, która znacznie różni się od wielkości insuliny, może wpływać na zdolność wiązania tych związków z tkankami obwodowymi [9, 10]. Z kolei otwarte zatoki wątrobowe umożliwiają kontakt wszystkich składników osocza z powierzchnią komórek wątrobowych [11]. Autorzy sugerują, że wykorzystanie wiedzy na temat bariery obwodowego krążenia włosniczki może pomóc w opracowaniu takiego analogu insuliny, który pozwoli zachować fizjologiczną różnicę oddziaływania na tkanki nawet po podaniu obwodowym [12]. W niniejszej pracy po raz pierwszy opisano zastosowanie takiego analogu u ludzi. Omówiona została jego kinetyka oraz potencjalna wybiórczość w stosunku do wątroby u osób bez cukrzycy.

Materiał i metody

Materiał

Autorzy opracowali i zsyntetyzowali białko insulinopodobne składające się z insuliny związanej kowalencyjnie z tyroksyną: $N\alpha^{\text{B1}}$ L-thyrosyl-insulina (B1-T4-Ins). Ten analog posiada zdolność wiązania z receptorem insuliny oraz dzięki obecności tyroksyny z białkami wiążącymi hormony tarczycy (THBP, *Thyroid hormone binding protein*), do których należą obecne w surowicy: białko wiążące tyroksynę (TBP, *thyroxine binding protein*), transtyretyna, osoczo- wa albumina ludzka. Wielkość związanego kompleksu może warunkować względną selektywność wątrobową w porównaniu z insuliną poprzez blokanie dostępu do tkanek obwodowych, a nie do bardziej odsłoniętych hepatocytów. B1-T4-Ins została zsyntetyzowana według metody opisanej wcześniej [12], a następnie liofilizowany proszek został rozpuszczony (0,688 nmol/l) w aseptycznych warunkach w izotonicznym roztworze NaHCO_3 (1,5% wag/obj.) w pracowniach farmakologii szpitali *Guy's*, *King's* i *St. Thomas*.

Grupa badana

Grupę badaną stanowiło 5 zdrowych mężczyzn w wieku $31,6 \pm 7,2$ roku z BMI wynoszącym $25,4 \pm 3,3$, którzy byli pracownikami londyńskich szpitali *Guy's*, *King's* and *St. Thomas* lub *King's College*. Żaden z nich nie wymagał regularnego stosowania leków oraz nie wykazywał objawów choroby, która mogłaby wpływać na przebieg badania.

Protokół badania

Porównywano wpływ jednorazowego, podskórnego wstrzyknięcia B1-T4-Ins i insuliny NPH. Kinetykę insuliny oraz jej wpływ na wątrobową produkcję glukozy (R_a) oraz obwodowe zużycie glukozy (R_d) badano metodą klamry euglikemicznej i techniką rozcieńczenia znacznika izotopowego ([D-6,6- 2 H $_2$] glukozy) [13]. Protokół został zaakceptowany przez komitet etyczny *West Lambeth Health Authority*, a wszyscy chorzy wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu.

Pacjenci zgłaszali się na czczo na oddział dzienny o godzinie 7.00. Badano ich w pozycji na wznak, pozwalając pić jedynie wodę. Po pobraniu próbki krwi w celu przeprowadzenia wyjściowych badań izotopowych rozpoczynano stały wlew (1,7 mg/min) gotowego roztworu (170 mg) [D-6,6- 2 H $_2$] glukozy (*Mass Trace, Sommerville, MA*) przez 17,5 godziny lub krócej, jeżeli zapotrzebowanie na glukozę egzogenną spadało do 0 [13]. U każdej osoby badanie przeprowadzono 2-krotnie, podając insulinę NPH lub B1-T4-Ins w przypadkowej kolejności. Przerwa pomiędzy każdym z badań wynosiła 2 tygodnie. Po rozpoczęciu wlewu [D-6,6- 2 H $_2$] glukozy przez 2 godziny ustalał się stan równowagi, po czym w okresie 30 minut pobierano co 10 minut próbki krwi, które stanowiły materiał do pomiarów wyjściowych w stanie równowagi. Następnie, po upływie 2,5 godziny trwania wlewu z D-[6,6- 2 H $_2$] glukozy, podawano podskórną na przedniej powierzchni jamy brzusznej jednorazowe wstrzyknięcie insuliny NPH (2,06 nmol/kg [0,3 U/(kg)] albo B1-T4-Ins 3,44 nmol/kg).

Po wstrzyknięciu insuliny lub jej analogu pobierano próbki krwi w odstępach 15-minutowych w celu oznaczenia stężenia glukozy we krwi, który wyrównywano do wartości wyjściowej, dostosowując szybkość wlewu 20-procentowego roztworu dekstrozy indywidualnie u każdej osoby. Protokół zakładał, że maksymalny czas badania może wynosić 15 godzin.

Dekstrozę (20%) mieszało wcześniej z D-[6,6- 2 H $_2$] w odpowiedniej proporcji (4 mg D-[6,6- 2 H $_2$] glukozy na 1 g dekstrozy), aby uniknąć spadku znacznika i w konsekwencji błędów w obliczaniu szybkości przemiany metabolicznej, co pomimo to się zdarza [13, 14]. Badanie przerywano z chwilą ustania zapotrzebowania na egzogenną glukozę lub po 15 godzinach od chwili podania insuliny.

Pobierano 4 próbki krwi w celu oznaczenia wyjściowych stężeń insuliny, C-peptydu, stężenia glukozy oraz zawartości glukozy znakowanej, a także oznaczenia stężenia IGF-I, glukagonu, hormonów tarczycy, hormonu stymulującego tarczycę (TSH, *thyroid-stimulating hormone*) oraz niezestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA, *nonesterified*

free fatty acid). Po podaniu insuliny NPH lub B1-T4-Ins pobierano próbki krwi co 30 minut w celu oznaczenia stężenia insuliny lub analogu, C-peptydu, stężenia glukozy oraz zawartości glukozy znakowanej. Co 3 godziny pobierano krew do badania stężenia NEFA i glukagonu, a co 5 godzin w celu określenia stężenia IGF-I, wolnej T4, wolnej T3 i TSH. Również po 24 godzinach pobierano (po śniadaniu) krew w celu określenia stężenia insuliny lub analogu oraz poziomów hormonów tarczycy.

Pobierano również próbki krwi na początku oraz po 3, 8, i 24 godzinach, aby przeprowadzić szybką chromatografię cieczową białek krwi (FPLC, *fast protein liquid chromatography*). Próbkę osocza i surowicy rozdzielano bezpośrednio po pobraniu i zamrażano w temperaturze -20°C do dalszych oznaczeń.

Procedury analityczne

Stężenia insuliny immunoreaktywnej (IRI, *immunoreactive insulin*) oraz IGF-I w próbkach surowicy, a C-peptydu w osoczu oznaczano metodą radioimmunologiczną (RIA, *radioimmunoassay*) z podwójnymi przeciwciałami. Zagadnienie to opisywano już wcześniej [15]. Współczynniki wariancji (CV, *coefficient of variation*) oznaczeń w obrębie jednego badania wyniosły odpowiednio 7,7 i 6%. Stężenia analogu tyroksyny-insuliny (IRI) w próbkach surowicy oraz we frakcjach FPLC oznaczano metodą radioimmunologiczną podwójnych przeciwciał (RIA) z pewnymi modyfikacjami opisywanymi poprzednio (CV 8%) [12]. Stężenie glukagonu w próbkach osocza oznaczano metodą RIA z zastosowaniem dostępnych w handlu zestawów firmy *Linco Research* (St. Louis, MO).

Stężenie glukozy w osoczu oznaczano metodą oksydazy glukozy na analizatorze *Clandon Scientific Glukose Analyzer* (*Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, OH*).

Stężenie NEFA w próbkach surowicy określano z zastosowaniem zestawu firmy *Wako Chemicals* (*Neuss, Niemcy*).

Zawartość glukozy znakowanej oceniano metodą chromatografii gazowej na spektrometrze masowym na VG Trio-2 5890 (VG *Micromas, Manchester, Wielka Brytania*) z zastosowaniem monitorowania wybranych jonów pochodnych pięciooctanu glukozy [16]. Monitorowane jony miały masę cząsteczkową 242 odpowiadającą $[\text{M}-\text{C}_5\text{O}_5\text{H}_8]^+$ i 244 odpowiadającą fragmentowi wzbogaconemu 2 atomami deuteru. W zakresie tego samego badania CV wyniosło $< 2\%$.

W celu określenia stanu B1-T4-Ins (związana lub wolna) w próbkach surowicy, poddano ją rozdzieleniu wcześniej opisaną metodą FPLC [12].

Obliczenia

W każdym oznaczeniu R_a i R_d obliczano, opierając się na zaproponowanym przez Mariego [17] modelu 2-kompartментowym, który zmodyfikowano w sposób uwzględniający dodanie $[D-6,6-^2H_2]$ glukozy do wlewu z dekstrozy. Przed dokonaniem oceny szybkości obrotu glukozy, zastosowano technikę „wygładzenia” przebiegów stężeń glukozy w osoczu oraz wykresów wzbogacenia glukozy w zależności od czasu, z wykorzystaniem techniki analizy optymalnych wartości (*Optimal Segments Technique Analysis*) [18]. Obliczenia szybkości zaniku glukozy (MCR, *metabolic clearance rate*) (ml/min/kg) są niezależne od modelu (szybkość wlewu znakowanej glukozy/stężenie znakowanej glukozy).

Redukcję masy wytwarzanej glukozy endogennej ($AUCR_a$) oraz przyrost masy glukozy wychwytywanej ($AUCR_d$) w każdym badaniu obliczano na podstawie przebiegu czasowego wartości R_a i R_d .

Analiza statystyczna

Wartości oznaczeń MCR, R_d , R_a i podawanej we wlewie glukozy egzogennej (GINF, *glucose infusion*) uzyskiwane po podaniu insuliny NPH lub analogu zostały przekształcone w pola pod krzywą osobno dla poszczególnych uczestników w czasie każdego z badań. Średnie różnice pomiędzy badaniami, skorygowane pod względem kolejności podawania, oceniano metodą regresji wielokrotnej. Dzięki zastosowaniu mocnego estymatora wariancji dopuszczalne były wyniki powtarzające się u danego pacjenta [19, 20]. Statystyczną znamienność zmian w odniesieniu do badania po podaniu insuliny NPH i analogu insuliny oceniano dwukierunkową analizą wariancji. Znamienność różnic pomiędzy dwiema średnimi badano testem najmniejszych kwadratów Fishera z użyciem oprogramowania *Number Cruncher Statistical System* (Hintze, Kaysville, UT) oraz *Stata* (Stata, College Station, TX).

Dane opisowe wyrażono jako wartości średnie z 95-procentowym przedziałem ufności i wartością $p < 0,05$ jako znamiennej statystycznie.

Wyniki

Tolerancja

Insulina B1-T4-Ins była niezwykle dobrze tolerowana. U żadnego z chorych nie wystąpiły działania niepożądane.

Po szybkim wstrzyknięciu B1-T4-Ins całkowity stosunek stężeń IRI/analog w surowicy wzrósł z wyjściowego 0,08 nmol/l (95% CI, 0,06–1,01) do 0,97 nmol/l

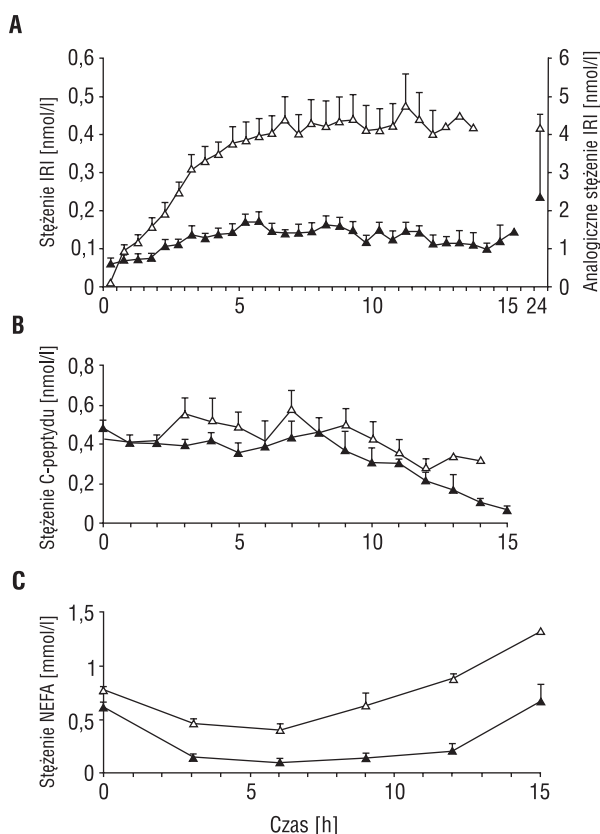
(0,61–1,33) w 30 minucie i 4,02 nmol/l (2,84–5,20) w 6 godzinie ($p < 0,01$). Podwyższone stężenia IRI utrzymywało się w czasie całego badania (ryc. 1.A).

Po wstrzyknięciu insuliny NPH stężenie IRI wzrosło z wyjściowego 0,06 nmol/l (0,03–0,09) do 0,07 nmol/l (0,02–0,09) w 30. minucie oraz 0,15 nmol/l (0,1–0,2) po 6 godzinach ($p < 0,01$).

Wzrost stosunku stężenia IRI/analog z wartości wyjściowych po podaniu B1-T4-Ins (0,89 nmol/l [1,22–0,76]) znamienne różnił się od wzrostu po podaniu insuliny NPH (0,014 nmol/l [0,01–0,03]).

Stężenie IRI po śniadaniu w 24. godzinie badania i po podaniu B1-T4-Ins wyniosło 4,18 nmol/l (3,31–5,05), czyli osiągnęło wartości znamienne wyższe niż wartości po insuliny NPH (0,24 nmol/l [0,02–0,48]) ($p < 0,05$).

Stężenie C-peptydu po podaniu B1-T4-Ins nie zmieniło się w odniesieniu do wartości wyjściowych — 0,44 nmol/l (0,38–0,50), natomiast znamienne spadło z wartości wyjściowych 0,40 nmol/l (0,28–0,54) do 0,30 nmol/l (0,27–0,33) po wstrzyknięciu insuliny NPH (11 h, $p < 0,05$) (ryc. 1.B).



Rycina 1. Stężenia immunoreaktywnej insuliny i analogu w surowicy (A), stężenia C-peptydu (B), stężenie NEFA (C) po podaniu podskórnym insuliny NPH (▲) i B1-T4-Ins (△) w okresie utrzymywania klamry euglikemicznej ($n = 5$). Wartości średnie \pm SEM

Po wstrzyknięciu insuliny NPH jej postać immunoreaktywna pojawiła się we frakcji 15–20 ml, co odpowiada szczytowi insuliny endogennej (tj. masie < 12 000 Da). W próbkach krwi pobranych 3, 8 i 24 godziny po wstrzyknięciu B1-T4-Ins większość immunoreaktywnego analogu (86, 86 i 86%) pojawiała się we frakcjach 5 i 15 ml, co odpowiada IRI o dużej masie cząsteczkowej (ok. 60 000 Da, tj. postaci związanej). Pozostała część IRI z każdej próbki pojawiała się we frakcji 15 i 20 ml (co odpowiada masie < 12 000 Da, tj. postaci wolnej).

Po wstrzyknięciu B1-T4-Ins w 6. godzinie jej całkowite stężenie wynosiło 4,02 nmol/l (co odpowiada stężeniu wolnej postaci ok. 0,56 nmol/l, czyli około 3,8 razy więcej niż po wstrzyknięciu insuliny NPH).

Stężenie glukozy na czczo wynosiło 5,3 mmol/l (5,0 i 5,6), a w okresie stosowania klamry euglikemicznej utrzymywano stężenie 5,2 mmol/l (4,5 i 5,9).

Ilość glukozy zużywanej w czasie całego badania niezbędnej do utrzymania euglikemii obliczano na podstawie zapisu szybkości wlewu glukozy (pole pod krzywą [AUC] GINF). AUC GINF po podaniu in-

suliny NPH (10,73 mmol/kg [5,77 i 15,69]) były znacznie wyższe niż AUC GINF obliczone po podaniu B1-T4-Ins (4,04 mmol/kg [1,73 i 6,35]) ($p = 0,027$) (ryc. 2.A). Czas działania B1-T4-Ins (672 min [579 i 765]) nie różnił się istotnie od czasu działania insuliny NPH (765 min [631 i 899]). Czas rozpoczęcia wlewu z glukozy egzogennej był również podobny, odpowiednio 45. (28 i 62) i 67. minuta (19 i 115).

Wartości AUC_{R_a} dla glukozy po wstrzyknięciu zarówno insuliny NPH (-5,63 mmol/kg [-7,3 i -3,96]), jak i B1-T4-Ins (-3,32 mmol/kg [-5,89 i -0,75]), nie różniły się istotnie (ryc. 2.C), wskazując na podobny wpływ zastosowanych dawek na wątrobę.

Szybkość zużywania glukozy znacząco wzrastała od wartości wyjściowych 11,07 $\mu\text{mol/kg/min}$ (8,64 i 13,50) po wstrzyknięciu insuliny NPH ($p = 0,01$), natomiast nie wzrastała po B1-T4-Ins. AUC_{R_d} po insulinie NPH (4,95 mmol/kg [1,17 i 8,73]) było większe niż AUC_{R_d} po B1-T4-Ins (0,49 mmol/kg [-0,97 i 1,95], $p = 0,025$) (ryc. 2.B).

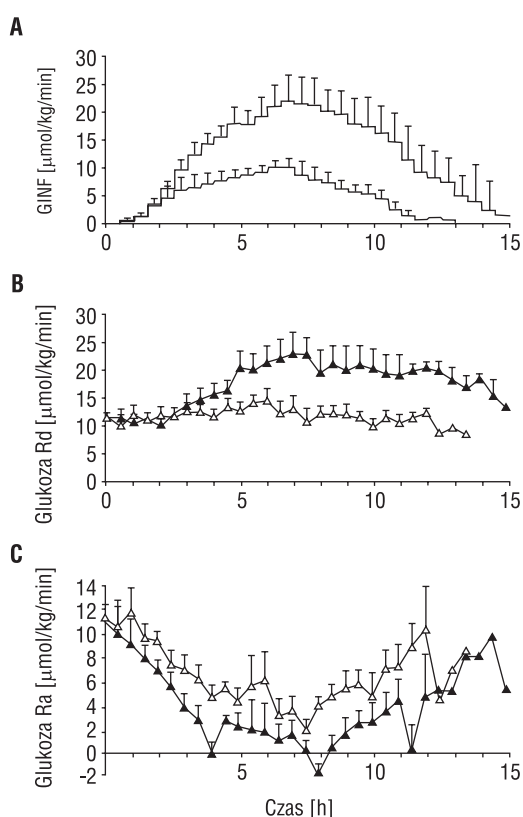
Szybkość zaniku glukozy znacznie wzrastała od poziomu wyjściowego po wstrzyknięciu insuliny NPH ($p = 0,01$), natomiast nie wzrastała po podaniu B1-T4-Ins. AUC dla MCR glukozy po wstrzyknięciu insuliny NPH (1,03 ml/kg [0,41 i 1,65]) różniło się znacznie od AUC dla MCR glukozy po wstrzyknięciu B1-T4-Ins (0,15 ml/kg [0 i 1,95], $p = 0,002$).

Stężenie NEFA znacząco się zmniejszyło w stosunku do wartości wyjściowych (0,69 $\mu\text{mol/l}$ [0,56 i 0,82]) zarówno po B1-T4-Ins, jak i po insulinie NPH w 3 godzinie odpowiednio do 0,46 $\mu\text{mol/l}$ (0,36 i 0,56) oraz 0,15 $\mu\text{mol/l}$ (0,07 i 0,22). Zmniejszenie stężenia NEFA po podaniu insuliny NPH było większe w każdym momencie badania niż po wstrzyknięciu B1-T4-Ins ($p < 0,05$) (ryc. 1.C). Stężenia IGF-I, glukagonu, TSH, wolnej T3 i T4 nie różniły się w obu zastosowanych protokołach badania.

Wnioski

Badanie po raz pierwszy przedstawia podanie ludziom powiązanego kowalencyjnie kompleksu insuliny z tyroksyną. Autorzy wykazali, że B1-T4-Ins jest dobrze tolerowana, dobrze przyswajana po podaniu podskórnym, posiada długi czas działania i w odróżnieniu od insuliny NPH wykazuje hepatoselektywność.

Podczas badań *in vitro* oraz *in vivo* wykazano, że B1-T4-Ins wiąże się z osoczym THBP [12, 21], a także że przy braku ThBp B1-T4-Ins przyłącza się do wyizolowanych z wątroby szczurów błon komórkowych hepatocytów z takim samym powinowactwem jak insulina naturalna [21]. Jednak w obecności THBP zdolność wiązania analogu insuliny była



Rycina 2. Szybkości wlewu glukozy egzogennej (A), niezbędne do utrzymania stałego stężenia glukozy, oraz R_d (B), R_a (C), osiągnięte po podskórnym podaniu insuliny NPH (gruba linia; \square) i B1-T4-Ins (cienka linia; \triangle), ($n = 5$). Wartości średnie \pm SEM

zmniejszona w porównaniu z insuliną, co sugeruje, że miejsce na receptory odpowiedzialne za działanie insuliny może częściowo zajmować białko wiążące. Powyższe wnioski są zgodne z wynikami poprzednich badań autorów tej pracy, przeprowadzonych metodą klamry hiperinsulinemiczno/insuliniczo-euglikemicznej u zdrowych psów [12], w czasie których MCR z B1-T4-Ins było niższe niż w przypadku insuliny ludzkiej i spadało dodatkowo po rozpoczęciu wlewu ludzkiej TBG. W badaniach prowadzonych w ostatnim czasie u ludzi, z zastosowaniem acylowanego analogu insuliny (NN304) i [N^ε-Palmitylo Lys (B29)] insuliny ludzkiej, wiążącym się z albuminami krwi, wykazano również wyższe stężenia w porównaniu z insuliną NPH po podaniu podskórnym [22, 23].

Opracowanie analogu insuliny podawanego drogą podskórną, który wiąże się wybiórczo z receptorami wątroby, jest nowym kierunkiem leczenia mającym na celu odzwierciedlenie działania insuliny uwalnianej bezpośrednio do krążenia wrotnego. Autorzy wykazali, że chociaż obie insuliny B1-T4-Ins i NPH podobnie oddziałują na wątrobę (hamowanie R_a), efekt działania obwodowego B1-T4-Ins na metabolizm glukozy (czyli R_d, MCR) oraz wpływ na stężenie NEFA są znacząco mniejsze w porównaniu z insuliną NPH. Wyniki te są zgodne z wynikami wcześniejszych badań prowadzonych na psach [12], w czasie których autorzy wykazali względnie wybiórczy profil działania na wątrobę tyroksylowych analogów insuliny w porównaniu z insuliną ludzką po podaniu dożylnym. Potwierdza to hipotezę, że cząsteczki insulino pochodne związane z białkami osocza mogą być powstrzymywane przed reakcją z receptorem błonowym tkanek obwodowych dzięki obecności bariery śródbłonkowej.

Również wyniki badań dożylnego wlewu NN304 u psów są zgodne z tym wnioskiem [24], dostarczając kolejnych dowodów, że bariera śródbłonkowa włóścinek obwodowych ogranicza szybkość oddziaływania na tkanki insuliny związanej z białkami. Wykazano zmianę zależności w czasie pomiędzy stężeniem analogu insuliny a szybkością wlewu glukozy. Szczególnie zwraca uwagę utrzymywanie się wysokich poziomów immunoreaktywnego analogu insuliny pomimo braku działania biologicznego po 24 godzinach (ok. 10 godzin po zakończeniu wlewu glukozy). TBG wykazuje bardzo wysokie powinowactwo do B1-T4-Ins w warunkach *in vivo* i jest bardzo prawdopodobne, że utrzymujące się długo podwyższenie stężenia jest spowodowane związaniem B1-T4-Ins z TBG. Potwierdzają to wyniki badania FPLC. Ponadto, fakt dłuższej obecności we krwi B1-T4-Ins niż czas

jej biologicznego oddziaływania na metabolizm glukozy można przynajmniej w części wytłumaczyć brakiem zależnego od receptorów rozpadu frakcji związanej z białkami. W konsekwencji istnieje duże prawdopodobieństwo, że czas działania takich analogów jest częściowo zależny od wybiórczości wiązania z konkretnymi białkami krwi oraz od pojemności tych białek. Wyniki badań na psach po podskórnym podaniu [N^ε-Palmitylo Lys (B29)] insuliny ludzkiej (3,15 nmol/kg) w porównaniu z insuliną o pośrednim czasie działania Humulin L (1,8 nmol/kg) również wykazywały wyższe stężenia analogu i wydłużony czas działania w porównaniu z Humuliną L [25].

Przebiegi zależności siły działania od czasu obu insulin NPH i B1-T4-Ins były podobne i charakteryzowały się stopniowym narastaniem przez około 6 godzin po wstrzyknięciu i postępującym spadkiem po tym okresie.

Można by sądzić, że hipoglikemia jest mniejsza przy braku nadmiernej stymulacji zużycia glukozy (czyli jeżeli wcześniej została zapoczątkowana poprzez zmniejszenie R_a). Mechanizmy wyrównawcze w odpowiedzi na hipoglikemię przeciwdziałają wpływowi insuliny na R_a. Normoglikemię można by przywrócić i skutecznie utrzymać po uruchomieniu dowolnego mechanizmu wyrównawczego pod warunkiem, że zużywanie glukozy przez mięśnie szkieletowe i tkankę tłuszczową nie podlegałoby nadmiernej stymulacji przez insulinę.

Mimo że w niniejszym badaniu nie obserwowano zmiany poziomu TSH, w badaniach prowadzonych na szczurach wywoływano hipotyreozę poprzez tygodniowe podawanie politouracylu [26], po B1-T4-Ins podawanej dootrzewnowo obserwowano zależne od dawki zmniejszenie stężenia TSH (Farila Schojace-Moradies, dane niepublikowane).

Syntezy w odpowiednich ilościach analog B1-T4-Ins został wybrany jako pierwszy z grupy w celu zastosowania u ludzi z powodu znanego, wysokiego powinowactwa T4 do THBP, które pozwalało na potwierdzenie założeń teoretycznych w eksperymencie. Inne analogi tyroksyny (np. rT3-Ins [21]) wykazują zmienny stopień wiązania z THBP zależnego od braku aktywności hormonalnej tarczycy. Wiązanie insuliny z grupami pochodnymi tyroksyny może stanowić potencjalnie użyteczną klinicznie nową generację analogów insuliny, z których część znalazłaby zastosowanie w leczeniu cukrzycy. Podstawowym wskazaniem do stosowania tego typu leków będzie cukrzyca typu 1, ponieważ w wypadku chorych na cukrzycę typu 2 leczonych dietą lub lekami doustnymi insulina jest wydzielana endogennie bezpośrednio do krążenia wrotnego. Wprawdzie istnieją dowody,

że w cukrzycy typu 2 występuje wątrobowa oporność na insulinę, która jest przyczyną hiperinsulinemii obwodowej z niekorzystnymi konsekwencjami metabolicznymi [27]. Z tego powodu może się okazać korzystne podanie wybiórczych wątrobowo analogów insuliny także w cukrzycy typu 2.

Autorzy wykazali, że podanie ludziom zdrowym analogu insuliny B1-T4-Ins jest bezpieczne i dobrze tolerowane. Analog wchłania się szybko z miejsca podskórnego podania oraz osiąga wysoki poziom stężenia w surowicy, w której jego większość wiąże się z białkami. Analog cechuje się długim czasem działania i porównywalnym z insuliną NPH wpływem na R_a , natomiast efekt działania obwodowego jest znacznie bardziej zmniejszony. Z tego powodu wydaje się, że działa w sposób wątrobowowybiórczy. Cecha ta wymaga dalszych ukierunkowanych badań, które pozwolą na opracowanie wielu analogów insuliny o różnym czasie działania. Tego typu analogi insuliny mogą w przyszłości pomóc unikać niekorzystnych działań metabolicznych związanych z aktualnie stosowanymi insulinami podawanymi obwodowo.

PIŚMIENNICTWO

1. Chap Z., Ishida T., Chou J., Hartley C.J., Entman M.L., Brandenburg D., Jones R.H., Field J.B.: First pass hepatic extraction and metabolic effects of insulin and insulin analogues. *Am. J. Physiol.* 1987; 252: E209–E217.
2. Yki-Jarvinen H., Koivisto V.A.: Natural course of insulin resistance in type 1 diabetes. *N. Engl. J. Med.* 1986; 315: 224–230.
3. Pickup J.C., Collins A.C., Walker J.D., Viberti G.C., Pasic J.: Patterns of hyperinsulinaemia in type 1 diabetic patients with and without nephropathy. *Diabet. Med.* 1989; 6: 685–691.
4. Reaven G.M.: Insulin resistance and compensatory hyperinsulinemia: role in hypertension, dyslipidemia and coronary heart disease. *Am. Heart. J.* 1991; 4: 1283–1288.
5. Sönksen P.H., Russell-Jones D., Jones R.H.: Growth hormone and diabetes mellitus. *Horm. Res.* 1993; 40: 68–79.
6. Ruotolo G., Micossi P., Galimberti G., Librenti M.C., Petrella G., Marcovina S., Pozza G., Howard B.V.: Effects of intraperitoneal versus subcutaneous insulin administration on lipoprotein metabolism in type 1 diabetes. *Metabolism* 1990; 38: 598–604.
7. Stratta R.J., Taylor R.J., Larsen J.L., Cushing K.: Pancreas transplantation (Review). *Ren. Fail.* 1995; 17: 323–337.
8. Stratta R.J., Taylor R.J., Sudan D., Sindhi R., Castaldo P., Cushing K., Frisbie K., Radio S.: Solitary pancreas transplantation: experience with 50 consecutive cases. *Transplant. Proc.* 1995; 27: 3022–3023.
9. Shojaee-Moradie F., Jackson N.C., Brandenburg D., Sönksen P.H., Jones R.H.: Demonstration of a relatively hepatoselective effect of covalent insulin dimers on glucose metabolism in dogs. *Diabetologia* 1995; 38: 1007–1013.
10. Glaubler H.S., Revers R., Henry R., Schmeiser L., Wallace P., Kolterman O., Cohen R.M., Rubenstein A.H., Galloway J.A., Frank B.H., Olefsky J.M.: In vivo inactivation of proinsulin action on glucose disposal and hepatic glucose production in normal man. *Diabetes* 1986; 35: 311–317.
11. Reichen J.: The role of the sinusoidal endothelium in liver function. *News. Physiol. Sci.* 1999; 14: 117–121.
12. Shojaee-Moradie F., Eckey H., Jackson N.C., Schüttler A., Brandenburg D., Sönksen P.H., Jones R.H.: Novel hepatoselective insulin analogues: studies with covalently linked thyroxyl insulin complexes. *Diabet. Med.* 1998; 15: 928–936.
13. Powrie J.K., Smith G.D., Shojaee-Moradie F., Sönksen P.H., Jones R.H.: Mode of action of chloroquine in patients with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Am. J. Physiol.* 1991; 260: E897–E904.
14. Finegood D.T., Bergman R.N., Vranic M.: Estimation of endogenous glucose production during hyperinsulinemic-euglycemic glucose clamps: comparison of unlabeled and labeled exogenous glucose infusates. *Diabetes* 1987; 36: 914–924.
15. Sönksen P.H.: Double antibody technique for the simultaneous assay of insulin and growth hormone. In *Hormones in Human Blood: Detection and Assay*. Antoniadis HN, Wyd. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1976, s. 176–199.
16. Wolf R.R.: *Radioactive and Stable Isotope Tracers in Biomedicine*. New York, Wiley, 1992.
17. Mari A.: Estimation of the rate of appearance in the non-steady state with a two-compartment model. *Am. J. Physiol.* 1992; 263: E400–E415.
18. Finegood D.T., Thomaseth K., Pacini G., Bergman R.N.: OPSEG: a general routine for smoothing and interpolating discrete biological data. *Comput. Methods Programs Biomed.* 1988; 26: 289–300.
19. Binder D.A.: On the variances of asymptotically normal estimators from complex surveys. *International Statistical Review* 1983; 51: 279–292.
20. Huber P.J.: The behaviour of maximum likelihood estimates under non-standard conditions. In *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium in Mathematical Statistics and Probability*. Berkeley, CA, University of California Press, 1967, s. 221–233.
21. Telfer M.J., Shojaee-Moradie F., Sundermann E., Schüttler A., Brandenburg D., Jones R.H.: The effects of thyroid hormone binding proteins on insulin receptor binding of thyroxyl-insulin analogues in vitro. *Diabet. Med.* 1998; 15 (supl. 2): 55.
22. Raziuk J., Pye S., Bradley B., Braaten L., Vignati L., Roach P., Bowsher R., DiMarchi R., Chance R.: Basal activity profiles of NPH insulin and [N^ε-palmitoyl Lys (B29)] human insulins in subjects with IDDM. *Diabetologia* 1998; 41: 116–120.
23. Heinemann L., Sinha K., Werer C., Loftager M., Hirschberger S., Heise T.: Time-action profile of the soluble, fatty acid acylated, long-acting insulin analogue NN304. *Diabet. Med.* 1999; 16: 332–338.
24. Myers S.R., Yakubu-Madus F., Johnson T., Baker J.E., Cusick T.S., Williams V.K., Tinsley F.C., Kriaciunas A., Manetta J., Chen V.J.: Acylation of human insulin with palmitic acid extends the time action of human insulin in diabetic dogs. *Diabetes* 1997; 46: 637–642.
25. Hamilton-Wessler M., Ader M., Dea M., Moore D., Markussen J., Bergman R.N.: Long-acting insulin analog NN304 is transported independent of native insulin (Abstract). *Diabetes* 1997; 46 (supl. 1): 164A.
26. Lemarchand-Beraud T., Berthier C.: Effects of graded doses of triiodothyronine on TSH synthesis and secretion rates in hypothyroid rats. *Acta Endocrinol.* 1981; 97: 74–84.
27. Lewis G.F., Carpentier A., Vranic M., Giacca A.: Resistance to insulin's acute direct hepatic effect in suppressing steady-state glucose production in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 1999; 48: 570–576.