

Claus B. Juhl, Niels Pørksen, Steven M. Pincus, Åge P. Hansen, Johannes D. Veldhuis, Ole Schmitz

# Wzrost pulsacyjnego wydzielania insuliny w cukrzycy typu 2 po pojedynczej dawce oraz krótkotrwałym podawaniu pochodnej sulfonilomocznika — gliklazylu

Acute and short-term administration of a sulfonilurea (gliclazide) increases pulsatile insulin secretion in type 2 diabetes

Przedrukowano za zgodą z: *Diabetes* 2001, 50, 1778–1784

## STRESZCZENIE

W cukrzycy typu 2 występują zaburzenia rytmu wydzielania insuliny, który w warunkach prawidłowych ma charakter pulsacji o wysokiej częstotliwości. W leczeniu cukrzycy powszechnie stosuje się pochodne sulfonilomocznika, jednak dotychczas nie ustalono ostatecznie ich wpływu na sposób uwalniania hormonu. Celem przedstawionego badania było określenie efektu jednorazowej dawki i 5-tygodniowego podawania pochodnej sulfonilomocznika (gliklazylu) na dynamikę wydzielania insuliny u chorych na cukrzycę typu 2. Badania było podwójnie ślepe, kontrolowaną placebo, skrzyżowaną próbą prospektywną, do której włączono 10 chorych na cukrzycę typu 2 (wiek  $53 \pm 2$  lata, BMI  $27,5 \pm 1,1$  kg/m<sup>2</sup>, glikemia na czczo  $9,8 \pm 0,8$  mmol/l, HbA<sub>1c</sub>  $7,5 \pm 0,3\%$ ). Otrzymywali oni 40–80 mg gliklazylu lub placebo 2 razy dziennie przez 5 tygodni, po 6-tygodniowym okresie przerwy w podawaniu leków. Pomiar insuliny wykonywano w odstępach minutowych przez 75 minut: 1) w warunkach wyjściowych; 2) 3 godziny po podaniu pierwszej dawki leku (80 mg glikla-

zylu), przy utrzymaniu glikemii na poziomie wyjściowym; 3) po 5 tygodniach podawania leku i 4) po 5 tygodniach podawania leku, przy utrzymaniu glikemii jak w warunkach wyjściowych (wzrost 5-tygodniowy). W celu oceny ilościowej charakteru pulsacji i regularności wydzielania insuliny stężenia insuliny w przedziałach czasowych poddano analizie metodą spektralną, autokorelacji, dekonwolucji oraz entropii przybliżonej (ApEn, *approximate entropy*). Podane wartości p dotyczą porównania działania gliklazylu i placebo; wyniki przedstawiono jako średnie  $\pm$  SE. Glikemia na czczo obniżyła się po leczeniu gliklazylem (poziom wyjściowy vs. 5 tygodni: gliklazyl  $10,0 \pm 0,9$  vs.  $7,8 \pm 0,6$  mmol/l; placebo  $10,0 \pm 0,8$  vs.  $11,0 \pm 0,9$  mmol/l,  $p = 0,001$ ). Stężenia wydzielanej insuliny zwiększyły się (wyjściowe vs. jednorazowe podanie: gliklazyl  $43,0 \pm 12,0$  vs.  $61,0 \pm 17,0$  pmol/l/puls; placebo  $36,1 \pm 8,4$  vs.  $30,3 \pm 7,4$  pmol/l/puls,  $p = 0,047$ ; wzrost 5-tygodniowy: gliklazyl vs. placebo  $49,7 \pm 13,3$  vs.  $37,1 \pm 9,5$  pmol/l/puls,  $p < 0,05$ ) z podobnym wzrostem amplitudy wydzielania. Podstawowe (niepulsacyjne) wydzielanie insuliny również było podwyższone (wyjściowo vs. jednorazowe podanie: gliklazyl  $8,5 \pm 2,2$  vs.  $16,7 \pm 4,3$  pmol/l/puls; placebo  $5,9 \pm 0,9$  vs.  $7,2 \pm 0,9$  pmol/l/puls,  $p = 0,03$ ; wzrost 5-tygodniowy: gliklazyl vs. placebo  $12,2 \pm 2,5$  vs.  $9,4 \pm 2,1$  pmol/l/puls,  $p = 0,016$ ). Częstotliwość i regularność pulsów wydzielania insuliny nie zmieniły się istotnie po

Copyright © 2001 by American Diabetes Association, Inc. American Diabetes Association nie odpowiada za poprawność tłumaczenia z języka angielskiego.

Diabetologia Praktyczna 2002, tom 3, nr 3, 139–148  
Tłumaczenie: lek. med. Monika Łukaszewicz  
Wydanie polskie: Via Medica

zastosowaniu terapii. Zaobserwowano jednak poprawę regularności pulsów po jednorazowym podaniu leku przy badaniu poszczególnych chorych, co oznaczano metodą ApEn, oraz zmniejszenie glikemii na czczo w czasie krótkoterminowego, 5-tygodniowego leczenia gliklazidem ( $r = 0,74$ ,  $p = 0,014$ ;  $r = 0,77$ ,  $p = 0,009$ , odpowiednio dla szczegółowej i ogólnej ApEn). Podsumowując, należy stwierdzić, że pochodna sulfonilomocznika — gliklazyd — zwiększa wydzielanie insuliny, nasilając zarówno pulsacyjną, jak i podstawową sekrecję insuliny bez wpływu na częstotliwość i regularność pulsów. Dane uzyskane w badaniu sugerują, że może istnieć związek między krótkoterminową poprawą glikemii i poprawą regularności procesu wydzielania insuliny *in vivo*.

Słowa kluczowe: gliklazyd, pulsacyjne wydzielanie insuliny, cukrzyca typu 2

#### ABSTRACT

The high-frequency oscillatory pattern of insulin release is disturbed in type 2 diabetes. Although sulfonylurea drugs are widely used for the treatment of this disease, their effect on insulin release patterns is not well established. The aim of the present study was to assess the impact of acute treatment and 5 weeks of sulfonylurea (gliclazide) treatment on insulin secretory dynamics in type 2 diabetic patients. To this end, 10 patients with type 2 diabetes (age  $53 \pm 2$  years, BMI  $27.5 \pm 1.1$  kg/m<sup>2</sup>, fasting plasma glucose  $9.8 \pm 0.8$  mmol/l, HbA<sub>1c</sub>  $7.5 \pm 0.3\%$ ) were studied in a double-blind placebo-controlled prospective crossover design. Patients received 40–80 mg gliclazide/placebo twice daily for 5 weeks with a 6-week washout period intervening. Insulin pulsatility was assessed by 1-min interval blood sampling for 75 min 1) under baseline conditions (baseline), 2) 3 h after the first dose (80 mg) of gliclazide (acute) with the plasma glucose concentration clamped at the baseline value, 3) after 5 weeks of treatment (5 weeks), and 4) after 5 weeks of treatment with the plasma glucose concentration clamped during the sampling at the value of the baseline assessment (5 weeks-elevated). Serum insulin concentration time series were analyzed by deconvolution, approximate entropy (ApEn), and spectral and autocorrelation methods to quantitate pulsatility and regularity. The *P* values given are gliclazide versus placebo; results are means  $\pm$  SE. Fasting plasma glucose was reduced after gliclazide treatment (baseline vs. 5 weeks: gliclazide,  $10.0 \pm 0.9$  vs.  $7.8 \pm$

$\pm 0.6$  mmol/l; placebo,  $10.0 \pm 0.8$  vs.  $11.0 \pm 0.9$  mmol/l,  $P = 0.001$ ). Insulin secretory burst mass was increased (baseline vs. acute: gliclazide,  $43.0 \pm 12.0$  vs.  $61.0 \pm 17.0$  pmol  $\times$  l<sup>-1</sup>  $\times$  pulse<sup>-1</sup>; placebo,  $36.1 \pm 8.4$  vs.  $30.3 \pm 7.4$  pmol  $\times$  l<sup>-1</sup>  $\times$  pulse<sup>-1</sup>,  $P = 0.047$ ; 5 weeks-elevated: gliclazide vs. placebo,  $49.7 \pm 13.3$  vs.  $37.1 \pm 9.5$  pmol  $\times$  l<sup>-1</sup>  $\times$  pulse<sup>-1</sup>,  $P < 0.05$ ) with a similar rise in burst amplitude. Basal (i.e., non-oscillatory) insulin secretion also increased (baseline vs. acute: gliclazide,  $8.5 \pm 2.2$  vs.  $16.7 \pm 4.3$  pmol  $\times$  l<sup>-1</sup>  $\times$  pulse<sup>-1</sup>; placebo,  $5.9 \pm 0.9$  vs.  $7.2 \pm 0.9$  pmol  $\times$  l<sup>-1</sup>  $\times$  pulse<sup>-1</sup>,  $P = 0.03$ ; 5 weeks-elevated: gliclazide vs. placebo,  $12.2 \pm 2.5$  vs.  $9.4 \pm 2.1$  pmol  $\times$  l<sup>-1</sup>  $\times$  pulse<sup>-1</sup>,  $P = 0.016$ ). The frequency and regularity of insulin pulses were not modified significantly by the antidiabetic therapy. There was, however, a correlation between individual values for the acute improvement of regularity, as measured by ApEn, and the decrease in fasting plasma glucose during short-term (5-week) gliclazide treatment ( $r = 0.74$ ,  $P = 0.014$ , and  $r = 0.77$ ,  $P = 0.009$ , for fine and coarse ApEn, respectively). In conclusion, the sulfonylurea agent gliclazide augments insulin secretion by concurrently increasing pulse mass and basal insulin secretion without changing secretory burst frequency or regularity. The data suggest a possible relationship between the improvement in short-term glycemic control and the acute improvement of regularity of the *in vivo* insulin release process.

Key words: gliclazide, pulsatile insulin secretion, type 2 diabetes mellitus

U osób zdrowych wydzielanie insuliny ma charakter pulsacyjny, z przerwami co 5–15 minut. W wyniku tego stężenie insuliny na obwodzie podlega regularnym wahaniom [1, 2]. Znaczenie pulsacyjnego sposobu wydzielania insuliny określono w badaniach *in vivo* i *in vitro* w odniesieniu do działania hipoglikemizującego, wątrobowej produkcji glukozy i metabolizmu lipidów [3–6]. Zaburzenia w pulsacyjnym wydzielaniu insuliny wykazano nie tylko u chorych na cukrzycę typu 2, ale również u ich krewnych, co wskazuje, że może być to pierwotna patologia, wyprzedzająca rozwój jawnej cukrzycy [7–10].

Regulacja wydzielania insuliny przez stężenie glukozy, peptydu glukagonopodobnego ([GLP]-1, *glucagon-like peptide*), somatostatyny, insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1, *insulinlike growth factor-1*) i niektórych leków odbywa się przede wszystkim przez wpływ na ilość uwolnionego hormonu, a nie na częstość pulsów wydzielniczych

[11–19]. Mimo powszechnego stosowania preparatów zwiększających sekrecję insuliny, ich wpływ na profil jej wydzielania poznano w niewielkim stopniu [12].

Zakłada się, że przywrócenie fizjologicznego rytmu wydzielania insuliny i poprawa względnego niedoboru insuliny mają istotne znaczenie dla jej obwodowego efektu oraz krótko- i długoterminowej funkcji komórek  $\beta$ . Hipoteza autorów przewiduje zatem, że leki zwiększające sekrecję insuliny działają na rytm jej wydzielania zarówno pod względem ilościowym, jak i jakościowym.

Niniejsze badanie jest pierwszym, które opisuje wpływ takiego leku na pulsacyjne wydzielanie insuliny po podaniu jednorazowym i w obserwacji krótkoterminowej u chorych na cukrzycę typu 2. W badaniu zastosowano gliklazyd, pochodną sulfonilomocznika działającą wysokoselektywnie na ATP-zależne kanały potasowe w komórkach  $\beta$  trzustki [20] — określając jego działanie na rytm wydzielania insuliny o charakterze pulsacji wysokiej częstotliwości. W tym celu przeprowadzono analizę serii przedziałów czasowych insulinemii w osoczu. Założeniem pracy była ocena potencjalnych możliwości przywrócenia fizjologicznego sposobu sekrecji insuliny u ludzi w wyniku interwencji farmakologicznej.

## Material i metody

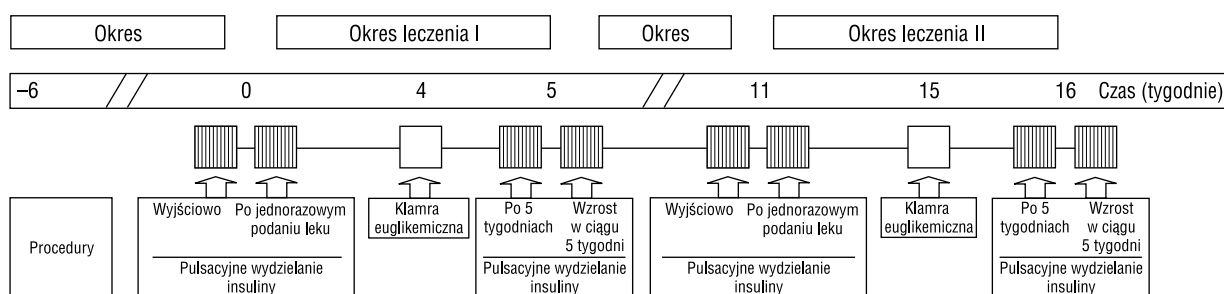
Protokół badania opracowano zgodnie z zaleceniami Deklaracji Helsińskiej. Badanie zaakceptowała lokalna Komisja Etyczna Hrabstw *Aarhus* i *Vejde*.

**Badana grupa.** Do badania włączono 10 chorych na cukrzycę typu 2 rozpoznaną zgodnie z kryteriami Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) (wiek  $53 \pm 2$  lata, BMI  $27,5 \pm 1,1$  kg/m<sup>2</sup>, glikemia na czczo  $9,8 \pm 0,8$  mmol/l, HbA<sub>1c</sub>  $7,5 \pm 0,3\%$ ). Średni czas trwania cukrzycy wynosił 1,5 roku (od 2 miesięcy do 8 lat). U żadnego z chorych nie stwierdzono albuminurii, u jednego

pacjenta wykryto wczesną postać retinopatii cukrzycowej. Przed włączeniem do badania chorzy otrzymywali doustny lek przeciw cukrzycowy w dawce nieprzekraczającej 50% dawki maksymalnej (5 osób — pochodną sulfonilomocznika; 2 osoby — metforminę) lub leczono ich tylko dietą ( $n = 3$ ). Sześciu chorych otrzymywało leki z powodu nadciśnienia samoistnego (5 — inhibitory ACE; 1 — diuretyki tiazydowe), a 4 chorych przyjmowało inhibitory reduktazy HMG-CoA z powodu hipercholesterolemii.

**Protokół.** Badanie, którego schemat przedstawiono na rycinie 1, miało charakter podwójnie ślepej, kontrolowanej placebo, randomizowanej, skrzyżowanej próby. Przed włączeniem chorzy leczeni doustnym lekiem hipoglikemizującym odstawiali go na okres 6 tygodni. Po włączeniu do badania osoby leczone wcześniej jedynie dietą otrzymywały 40 mg gliklazynu lub placebo 2 razy dziennie przez pierwszy tydzień, a następnie 80 mg 2 razy dziennie. Pacjenci leczeni poprzednio preparatem doustnym otrzymywali 80 mg gliklazynu lub placebo 2 razy dziennie. Ostatnią dawkę leku/placebo przyjmowano 12–14 godzin przed pobraniem krwi w celu określenia pulsacyjnego wydzielania insuliny i wrażliwości na insulinę.

W dniu pobrania krwi chorzy zgłaszali się do ośrodka o godzinie 8.00. Zakładano im cewnik do żył przedramienia, który służył do pobierania krwi i podawania dożylnego. W okresie oceny pulsacyjnego wydzielania insuliny pacjenci pozostawali na czczo. W momencie rozpoczęcia każdego okresu leczenia określano wpływ jednorazowego przyjęcia leku/placebo na pulsacyjne wydzielanie insuliny. Po 30 minutach spoczynku ( $t = 0$ ) rozpoczynano pobieranie krwi — co minutę przez 75 minut — w celu późniejszego oznaczenia insulinemii (okres wyjściowy). W 75 minucie chory otrzymywał doustnie 80 mg gliklazynu/placebo (ze szklanką wody). Przez następne 180 minut co 5–15 minut pobierano krew w celu



**Rycina 1.** Schemat badania. Celem badania przeprowadzonego metodą podwójnie ślepej, kontrolowanej placebo, skrzyżowanej próby było określenie wpływu gliklazynu na pulsacyjne wydzielanie insuliny. Badanie obejmowało 2 okresy leczenia każdorazowo poprzedzone okresem nieprzyjmowania leku. Pulsacyjne wydzielanie insuliny określano na początku i na końcu każdego etapu leczenia. Tydzień przed zakończeniem każdego okresu leczenia przeprowadzano pomiar insulinoporności metodą klamry hiperinsulinemiczno-euglikemicznej

oznaczenia glikemii, utrzymując glikemię wyjściową za pomocą dożylnego wlewu glukozy o zmiennej szybkości. Szybkość infuzji glukozy, jeżeli było to konieczne, zwiększano, ale nigdy nie zmniejszano. Od 255 do 330 minuty ponownie pobierano krew co minutę w celu oznaczenia insulinemii. Szczegóły procedury opisano wcześniej [17].

Po 5 tygodniach leczenia ponownie przeprowadzano pomiary pulsacyjnego wydzielania insuliny. Podobnie jak w pierwszym dniu przyjęcia leku, pacjenci zgłaszali się na czczo i — nie regulując stężenia glukozy w osoczu — wykonywano u nich pomiary insulinemii przez 75 minut (wartości 5-tygodniowe). Następnie, utrzymując glikemię metodą klamry metabolicznej na poziomie jak w dniu pierwszym, po okresie 60–180 minut stabilizacji ponownie pobierano krew przez 75 minut w celu oznaczenia insulinemii (wzrost 5-tygodniowy). Dodatkowo przy wszystkich pobraniach co 15 minut oznaczano stężenia C-peptydu, wolnych kwasów tłuszczowych (FFA, *free fatty acid*) i glukagonu.

W 4 tygodniu każdego okresu leczenia określano wrażliwość na insulinę metodą 180-minutowej klamry hiperinsulinowo-euglikemicznej przy zastosowaniu wlewu insuliny (Insulin Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) z szybkością 1,2 mJ./kg/min. Stężenie glukozy stopniowo obniżyło się do 5,5 mmol/l i utrzymywało się na tym poziomie. Średnią szybkość wlewu glukozy obliczano w tak zwanym okresie stabilizacji, trwającym 150–180 minut.

**Oznaczenia.** Wszystkie oznaczenia wykonywano 2-krotnie. Glikemię określano za pomocą analizatora Beckman, Palo Alto, CA (technika oksydacji glukozy). Wszystkie pozostałe próbki krwi zamrażano w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i oznaczano w okresie miesiąca. Stężenie insuliny określano, stosując test immunoenzymatyczny ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (2 miejsca wiązania dla insuliny). Współczynniki wariacji wewnątrz prób i między próbkami wynosiły odpowiednio 3 i 5%. Przeciwciała ulegały reakcji krzyżowej w 30 i 63%, odpowiednio z *split*-65,66 i *des*-64,65 proinsuliną; nie stwierdzano natomiast reakcji krzyżowych z proinsuliną, *split*-32,33 proinsuliną, *des*-31,32 proinsuliną, C-peptydem, IGF-1, IGF-2 i glukagonem. Próbkę do oznaczenia glukagonu pobierano do próbek z roztworem aprotyniny/EDTA w kąpielii lodowej i natychmiast zamrażano. Pomiary wykonywano metodą radioimmunologiczną [21]. Wolne kwasy tłuszczowe oznaczano metodą kalorymetryczną (Wako, Neuss, Germany). Do określenia stężeń C-peptydu wykorzystano test 2-miejscowy monoklonalny ELISA (K6218; Dako Diagnostics, Cambridgeshire, U.K.). Współczyn-

niki wariacji wewnątrz prób i między próbkami wynosiły odpowiednio 2 i 3%.

## Analiza danych

**Analiza dekonwolucji.** Seryjne oznaczenia stężenia insuliny w przedziałach czasowych poddano analizie w sposób ślepy w celu określenia ilościowego podstawowego wydzielania insuliny, odstępów między pulsami, ilości insuliny wydzielanej w pulsie i amplitudy pulsów. Dekonwolucję przeprowadzono, używając uprzednio sprawdzonej wielokrotnej techniki wieloparametrycznej, uwzględniając następujące założenia: 1) hormon jest wydzielany w pulsach o skończonej liczbie, 2) i indywidualnej amplitudzie, 3) w średnim czasie półtrwania nałożonym na podstawowy niezależny od czasu rytm wydzielnicy i 4) wykładniczym zaniku, opisanym wcześniej [23]. Czas półtrwania insuliny określono na 2,8–5 minut, z 28-procentowym udziałem wolnego kompartmentu. Frakcję insuliny wydzielonej w pulsach obliczono według wzoru:

$$\frac{\text{Ilość insuliny wydzielonej w pulsie/przedział czasowy między pulsami}}{\text{Ilość insuliny wydzielonej w pulsie/przedział czasowy między pulsami} + \text{wydzielanie podstawowe}}$$

**Jednokierunkowość danych.** Aby wyeliminować efekt niestacjonarności danych, przeprowadzono analizę metodą przybliżonej entropii, analizę spektralną i analizę autokorelacji danych pozostałych po odjęciu 7-punktowej średniej ruchomej [18, 19, 24].

**ApEn.** Regularność seryjnych insulinemii poddano analizie za pomocą entropii przybliżonej (ApEn, *approximate entropy*) [25], dzięki której można określić prawdopodobieństwo logarytmiczne w ciągach skończonych (bez  $r$ ) dla  $m$  kolejnych obserwacji i o wartościach zbliżonych (w zakresie  $r$ ) przy porównaniach kolejnych wartości wzrastających. Precyzyjną definicję matematyczną ApEn sformułował Pincus [25]. ApEn obejmuje całą rodzinę parametrów zależnych od wyboru parametru wejścia  $m$  oraz  $r$  i ma zastosowanie tylko dla zdarzeń w ciągach czasowych o równej długości, jak w omawianym przez autorów badaniu. Przy zastosowaniu małej wartości  $r$  (np.  $r = 0,2 \times \text{SD}$ ), ApEn służy określeniu drobnych (sub)profilu w ciągach czasowych; większa wartość  $r$  (np.  $r = 1,0 \times \text{SD}$ ) jest stosowana do oceny profili o dużym zakresie. Większe wartości bezwzględne ApEn odpowiadają wyższemu stopniowi przypadkowości procesu. ApEn jest raczej stabilne względem zakłóceń znajdujących się w przedziale tolerancji  $r$ . Aby określić obydwa rodzaje profili (wą-

ski i szeroki) w ciągach czasowych, ApEn obliczono dla  $r = 0,2 \times SD$  i  $r = 1,0 \times SD$ .

**Analiza spektralna.** Autorzy przeprowadzili analizę spektralną, używając oprogramowania niekomercyjnego. Zastosowano okno Tukeya z 25 punktami danych, spektra znormalizowano przy założeniu, że całkowita wariancja w każdej serii czasowej wyniosła 100%. Umożliwiło to porównanie wyliczonych spektrów, mimo różnic w bezwzględnych wartościach insulinemii. Amplitudy pików dominujących w spektrum podczas przyjmowania placebo i gliklazu porównano statystycznie.

**Analiza autokorelacji.** W celu analizy pulsów wysokiej częstotliwości analizę autokorelacji przeprowadzono bez wcześniejszej modyfikacji danych. Współczynniki korelacji pierwszego nieujemnego pikau autokorelogramu porównano statystycznie [24]. Analizę autokorelacji przeprowadzono za pomocą programu SPSS w wersji 9.0.

Analizę autokorelacji i analizę spektralną przeprowadzono także dla danych dotyczących sekrecji w przedziałach czasowych uzyskanych w analizie dekonwolucji. Użyta metoda była podobna do metody zastosowanej w analizie danych skoncentrowanych, ale do przeprowadzenia analizy spektralnej ograniczono liczbę danych do 150 punktów z powodu większej liczby szacowanych danych (300 pkt).

**Analiza regresji.** Aby ustalić związek między indukowanymi zmianami regularności i zmianami parametrów metabolicznych, autorzy użyli korelacji parametrycznych Pearsona do oceny: 1) efektu ilościowego wywieranego na komórki  $\beta$  przez oznaczenie  $\Delta$  średnich stężeń insuliny, 2) zmiany wrażliwości na insulinę mierzonej  $\Delta$  ilości podawanej w infuzji dożylnego glukozy w stosunku do średniej insulinemii i 3) wpływu na kontrolę glikemii mierzonego  $\Delta$  wartości glikemii na czczo; ponadto zmianę regularności mierzone jako: 1)  $\Delta$  ApEn ( $m = 1, r = 0,2 \times SD$  i  $m = 1, r = 1,0 \times SD$ ), 2)  $\Delta$  normalizowanej mocy spektralnej oraz 3)  $\Delta$  współczynników autokorelacji. Analiza korelacji dotyczyła danych uzyskanych w okresie po jednorazowym podaniu leku/placebo i po 5 tygodniach.

**Analiza statystyczna.** Analizę statystyczną przeprowadzono, stosując oprogramowanie SAS wersji 6.12 (SAS Institute, Cary, NC). Przed rozpoczęciem obliczeń zweryfikowano dane, analizując różnice wartości wyjściowych, efektu przeniesienia (*carryover*), efektu okresowości i sekwencji. Żaden z nich nie okazał się istotny statystycznie. Skuteczność leczenia gliklazedem oceniono metodą analizy wariancji, biorąc pod uwagę pacjenta, okres leczenia, sekwencję i czynniki dotyczące terapii. Aby ocenić efekt podania jednorazowej dawki, wzięto pod

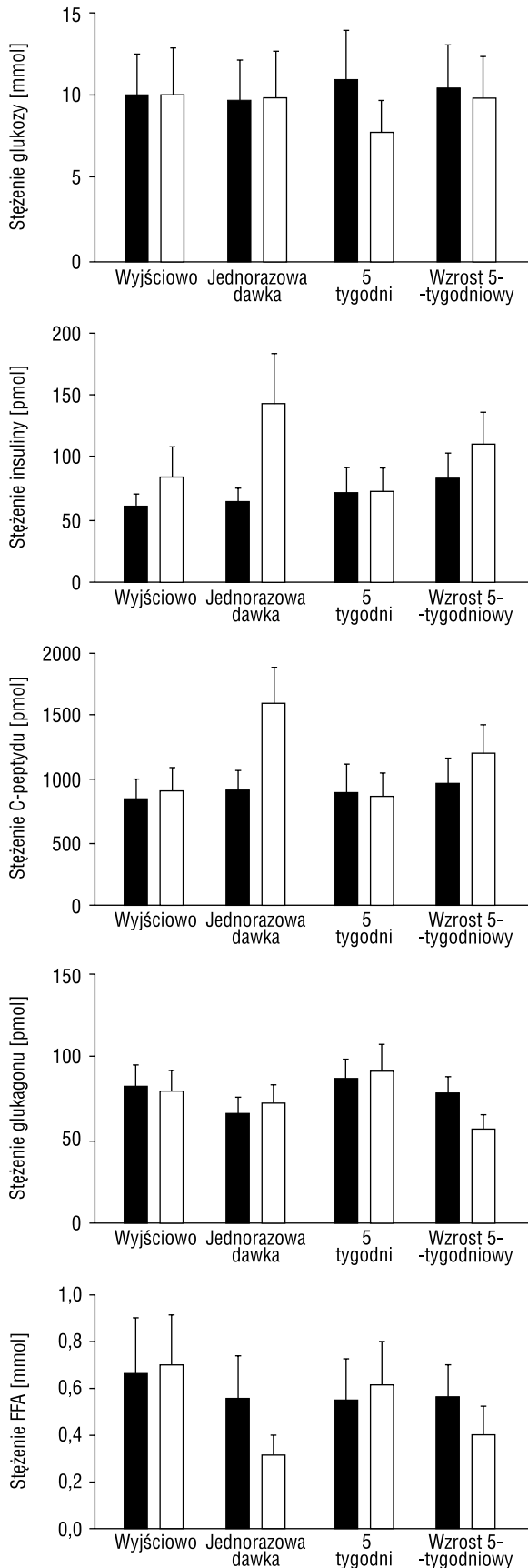
uwagę wartości wyjściowe. Wartości  $p$  dotyczą różnic między leczeniem gliklazedem a stosowaniem placebo. Poziom istotności statystycznej wyniósł 5%.

## Wyniki

### Stężenia badanych substancji

Stężenia glukozy w surowicy krwi na czczo obniżyły się o 20% po 5 tygodniach leczenia gliklazedem (gliklazed 10,0  $\pm$  0,9 vs. 7,8  $\pm$  0,6 mmol/l; placebo 10,0  $\pm$  0,8 vs. 11,0  $\pm$  0,9 mmol/l,  $p = 0,001$ ) z jednoczesnym obniżeniem wartości hemoglobiny glikowanej (gliklazed 7,8  $\pm$  0,3 vs. 7,1  $\pm$  0,3%; placebo 7,5  $\pm$  0,2 vs. 7,9  $\pm$  0,3%,  $p < 0,001$ ). Średnie stężenia glukozy, insuliny, C-peptydu, glukagonu i FFA, które uzyskano podczas badania pulsacyjności, przedstawiono na rycinie 2. W oznaczeniach po jednorazowym podaniu leku i po 5-tygodniach, przy glikemii odpowiadającej wartości wyjściowej, glikemia w okresie leczenia gliklazedem i placebo była porównywalna z powodu uważnie dostosowywanego wlewu dożylnego glukozy. Insulinemia po pojedynczej dawce gliklazu była znamienne podwyższona (wyjściowo vs. jednorazowa dawka: gliklazed 84  $\pm$  24 vs. 142  $\pm$  40 pmol/l; placebo 60  $\pm$  11 vs. 64  $\pm$  12 pmol/l,  $p = 0,038$ ), podobnie po 5-tygodniach przy glikemii odpowiadającej wartości wyjściowej (gliklazed vs. placebo: 110  $\pm$  25 vs. 83  $\pm$  20 pmol/l,  $p = 0,006$ ). Stężenie insuliny w okresie 5-tygodniowym było porównywalne z wartościami wyjściowymi, prawdopodobnie odzwierciedlało glukozo-zależne działanie gliklazu. Stężenia C-peptydu odpowiadały osoczym insulinom (stężeniom insuliny w osoczu). Stężenie glukagonu obniżyło się znamienne po 5-tygodniach przy glikemii odpowiadającej wartości wyjściowej (gliklazed vs. placebo: 57  $\pm$  8 vs. 79  $\pm$  10 pmol/l,  $p = 0,011$ ). Osoczone stężenie FFA było obniżone przy jednorazowym podaniu leku (44-procentowy spadek vs. placebo,  $p = 0,006$ ) oraz po 5-tygodniach przy glikemii odpowiadającej wartości wyjściowej (29-procentowa redukcja,  $p = 0,006$ ) (ryc. 2).

**Wydzielanie insuliny.** Sekrecję insuliny mającą charakter pulsacji o wysokiej częstotliwości oceniono ilościowo metodą analizy dekonwolucji. Otrzymane dane przedstawiono w tabeli 1. Pulsacyjne wydzielanie insuliny mierzone wielkością ładunku wydzielniczego zwiększało się o około 40% po jednorazowej dawce gliklazu (wyjściowo vs. jednorazowa dawka: gliklazed 43,0  $\pm$  12,0 vs. 61,0  $\pm$  17,0 pmol/l/puls; placebo 36,1  $\pm$  8,4 vs. 30,3  $\pm$  7,4 pmol/l/puls,  $p < 0,047$ ), jednocześnie w podobny sposób wzrosła amplituda pulsu. Podstawowe wydzielanie insuliny zwiększyło się (wyjściowo vs. jednorazowa



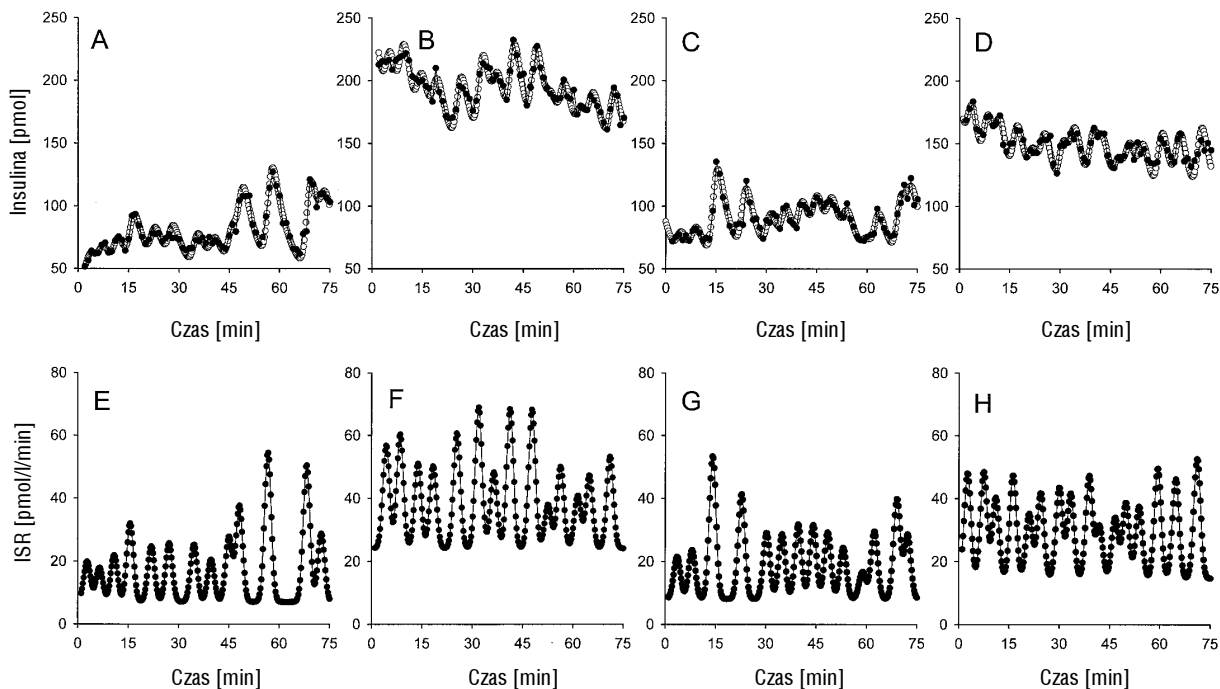
Rycina 2. Średnie ( $\pm$  SE) wartości stężeń glukozy, insuliny, C-peptydu, glukagonu i FFA w każdej z 4 sesji czasowych (□ gliklazyd; ■ placebo)

dawka: gliklazyd  $8,5 \pm 2,2$  vs.  $16,7 \pm 4,3$  pmol//l/min; placebo  $5,9 \pm 0,9$  vs.  $7,2 \pm 0,9$  pmol//l/min,  $p = 0,03$ ), podczas gdy przerwa czasowa między poszczególnymi pulsami pozostała bez zmian. Po 5 tygodniach leczenia ładunek sekrecyjny nie różnił się od wartości wyjściowych. Podstawowe wydzielanie insuliny zwiększyło się o około 40% po leczeniu gliklazidem ( $p < 0,047$ ). Przy podniesieniu wartości glikemii do poziomu wyjściowego (wzrost 5-tygodniowy) zarówno sekrecja pulsacyjna, jak i podstawowa zwiększały się pod wpływem leczenia gliklazidem. Przerwy czasowe między pulsami, określone metodą analizy dekonwolucji, uległy skróceniu po 5 tygodniach leczenia przy podwyższonym stężeniu glukozy ( $p = 0,024$ ), ale nie potwierdzono tej obserwacji w analizie spektralnej. Na rycinie 3 przedstawiono reprezentatywny przykład oznaczanych insulinemii w seryjnych przedziałach czasowych i obliczonej szybkości wydzielania insuliny w czasie leczenia gliklazidem. Zwiększona amplituda pulsów i zwiększone podstawowe wydzielanie insuliny są wyraźnie widoczne po jednorazowym (ryc. 3F) i po 5-tygodniowym (ryc. 3H) podawaniu gliklazidu, przy glikemii odpowiadającej wyjściowej. Frakcja insuliny podawanej w pulsach wyniosła około 50% i nie zmieniła się pod wpływem jednorazowego ani 5-tygodniowego podawania gliklazidu.

**Wrażliwość na insulinę.** Wrażliwość na insulinę oznaczano metodą klamry hiperinsulinowo-euglikemicznej po 4 tygodniach leczenia. Ilość dożylnie podawanej glukozy wzrastała podczas leczenia gliklazidem, jednak znamienność statystyczna była niewielka ( $5,1 \pm 0,8$  vs.  $4,2 \pm 1,0$  mg/kg/min,  $p = 0,14$ ).

**Analiza regularności.** Regularność serii insulinemii badano uzupełniającymi się metodami. Nie podlegała ona zmianom po podaniu jednorazowym gliklazidu. Po 5 tygodniach leczenia moc spektralna obniżyła się ( $p < 0,047$ ). Jednak dwie inne metody analizy regularności nie potwierdziły tej zmiany. Po podniesieniu glikemii do wartości wyjściowej nadal nie wykazano różnic w parametrach regularności między podawaniem gliklazidu i placebo. Analizy regularności seryjnych insulinemii potwierdziły brak wpływu leczenia gliklazidem ( $p > 0,05$  dla wszystkich analiz) (tab. 1).

Analiza regresji liniowej wykazała, że początkowa poprawa regularności w trakcie leczenia gliklazidem (np. obniżona ApEn) korelowała dodatnio ( $r = 0,74$  i  $r = 0,77$  oraz  $p = 0,014$  i  $p = 0,009$  odpowiednio dla szczegółowej i ogólnej analizy ApEn) z opóźnioną (5-tygodniową) poprawą glikemii na czczo (ryc. 4). Funkcja autokorelacji i moc spektralna również wskazywały na związek między zmianami w regularności i kontroli glikemii, chociaż wyniki

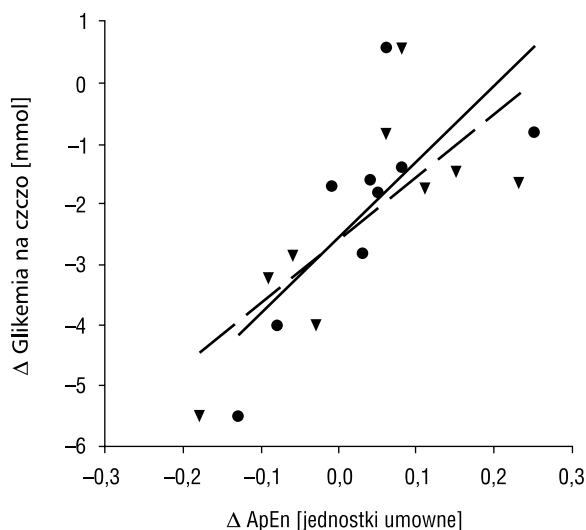


**Rycina 3.** Reprezentatywny przykład analizy dekonwolucji stężeń insuliny w przedziałach czasowych. A i D. Zmierzone stężenia insuliny (●●●) przedstawione razem z insulinami oszacowanymi metodą analizy dekonwolucji (○○○); E i H. Obliczone wielkości pulsów insuliny; A i E. Wartości wyjściowe; B i F. Wartości po jednorazowym podaniu leku; C i G. Wartości 5-tygodniowe; D i H. Wartości po 5-tygodniach przy glikemii odpowiadającej wartości wyjściowej. Pokazano również amplitudę pulsów insulinemii oraz podwyższone wyjściowe insulinemie (F i H); ISR — szybkość sekrecji insuliny

nie były istotne statystycznie (odpowiednio  $r = -0,466$  i  $r = -0,478$ ,  $p = 0,18$  i  $p = 0,16$ ). Różnice te odzwierciedlały wysoką czułość metody ApEn dla względnie krótkich serii czasowych. Zmiany we wrażliwości na insulinę i zmiany stężenia insuliny nie miały wpływu na pomiary regularności.

## Dyskusja

Poprawa wydzielania insuliny po podaniu pochodnych sulfonilomocznika jest powszechnie stosowaną metodą leczenia cukrzycy typu 2. We wczesnych etapach choroby leki te (np. gliklazyd) normalizują, przynajmniej częściowo, zaburzoną pierwszą fazę sekrecji insuliny [27, 28], która jest skoordynowaną odpowiedzią na stymulację egzogenną glukozą. Pochodne sulfonilomocznika stymulują uwalnianie insuliny w sposób zależny od stężenia glukozy [29], powodując, że jest ono dostosowane do względnego zapotrzebowania metabolicznego na ten hormon. Wykazano również, że gliklazyd zwiększa wrażliwość komórek  $\beta$  trzustki. Eksperymenty przeprowadzane metodą klamry hiperglikemicznej dostarczyły dowodów na to zjawisko [27]. Oscylacyjne (pulsacyjne) uwalnianie insuliny może być częściowo utrzymywane przez pętlę metabolicznego sprzężenia zwrotnego z wahającymi się stężeniami glukozy — a pochodne sulfonilomocznika korzyst-



**Rycina 4.** Związek między zmianami ApEn po jednorazowym podaniu leku i zmianami glikemii na czczo po podaniu krótkoterminowym (5-tygodniowym); ● szeroka ApEn ( $m = 1$ ,  $r = 1,0 \times SD$ ),  $r = 0,77$ ,  $p = 0,009$ ; ▲ wąska ApEn ( $m = 1$ ,  $r = 0,2 \times SD$ ),  $r = 0,74$ ,  $p = 0,014$

nie wzmacniają to sprzężenie. Prawdopodobnie zwiększoną regularność wydzielania insuliny w postaci pulsów o wysokiej częstotliwości można uzyskać zarówno na drodze poprawy kontroli glikemii (np. przez zmniejszenie toksyczności hiperglikemii

Tabela 1. Charakterystyka wydzielania insuliny oparta na analizie dekonwolucji oraz analizie regularności w warunkach wyjściowych, po jednorazowej dawce leku oraz po 5-tygodniowym podawaniu placebo lub gliklazdu

	Placebo			Gliklazdu		
	Wyjściowo	Jednorazowa dawka	Wzrost 5-tygodniowy	Wyjściowo	Jednorazowa dawka	Wzrost 5-tygodniowy
<b>Analiza dekonwolucji</b>						
Ładunek wydzielonej insuliny [pmol//puls]	36,1 ± 8,4	30,3 ± 7,4	42,4 ± 12,8	43,0 ± 12,0	61,0 ± 17,0*	34,8 ± 9,7
Amplituda pulsów [pmol//min]	14,4 ± 3,3	12,1 ± 2,9	16,8 ± 5,0	17,1 ± 4,8	24,3 ± 6,8*	13,9 ± 3,9
Wydzielanie podstawowe [pmol//min]	5,9 ± 0,9	7,2 ± 1,1	6,8 ± 1,5	8,5 ± 2,2	16,7 ± 4,3*	8,8 ± 2,1*
Przerwa między pulsami [min/puls]	6,7 ± 0,5	6,9 ± 0,7	7,1 ± 1,2	5,9 ± 0,5	5,9 ± 0,4	6,5 ± 0,4
<b>Analiza regularności</b>						
Składowe autokorelacji	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,25 ± 0,04	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,03
Moc spektralna	8,5 ± 0,7	7,5 ± 0,9	10,2 ± 0,9	9,2 ± 1,0	9,6 ± 1,1	7,6 ± 0,8*
Częstotliwość [min/puls]	6,9 ± 0,5	5,7 ± 0,4	6,7 ± 0,4	7,0 ± 0,5	6,7 ± 0,3	7,1 ± 0,4
ApEn ( $r = 0,2 \times SD, m = 1$ )	1,496 ± 0,033	1,464 ± 0,016	1,505 ± 0,028	1,482 ± 0,029	1,514 ± 0,027	1,483 ± 0,018
ApEn ( $r = 1,0 \times SD, m = 1$ )	0,642 ± 0,026	0,638 ± 0,027	0,662 ± 0,023	0,639 ± 0,043	0,662 ± 0,025	0,631 ± 0,026

Dane przedstawiono jako średnie ± SE, \*p < 0,05, badanie efektu leczenia (gliklazdu vs. placebo) w modelu skrzyżowanym

i hiperlipidemii), jak i przez bezpośrednie działanie gliklazdu na komórki  $\beta$  trzustki.

Niniejsze badanie jest pierwszym, które dotyczy oceny wpływu jednorazowego podania gliklazdu i krótkoterminowej (5 tygodniowej) terapii tym lekiem na oscylacyjne, o wysokiej częstotliwości, wydzielanie insuliny u chorych na cukrzycę. Stymulacja wydzielania osiągnięta dzięki pochodnej sulfonilomocznika prawdopodobnie wynika zarówno ze zwiększenia pulsacji (przez zwiększenie ładunku wydzielniczego lub częstotliwości pulsacji), jak i z nasilenia podstawowego wydzielania insuliny. Rezultaty eksperymentu wskazują, że zwiększenie sekrecji insuliny wynika ze zwiększenia pulsacji i wydzielania podstawowego, bez wpływu na frakcję insuliny wydzielonej w pulsach. Nie obserwowano natomiast stałego wpływu na częstość pulsacji. Opisane zjawiska są zgodne z poprzednimi obserwacjami dotyczącymi doświadczeń z tolbutamidem, w których podanie tego leku w infuzji u osób zdrowych mogło nasilić amplitudę insulinemii bez wpływu na oscylacje wysokich częstotliwości [11]. Podobne wyniki uzyskano w doświadczeniach z gliburidem: w obserwacji 24-godzinnej zwiększał on amplitudę oscylacji wydzielania insuliny [12]. W doświadczeniach przeprowadzanych na psach bez cukrzycy zarówno infuzja, jak i doustne podanie tolbutamidu stymulowało wydzielanie insuliny przez wpływ na sekrecję pulsacyjną, a także podstawową. Nie obserwowano natomiast wpływu leku na frakcję insuliny wydzielanej w pulsach ani na częstotliwość pulsów [13]. W niedawno przeprowadzonym badaniu z udziałem chorych na cukrzycę typu 2 [19] wykazano, że po krótkotrwałej infuzji dożylną GLP-1 — naturalnej substancji peptydylowej stymulującej wydzielanie insuliny, zwiększa się wydzielanie insuliny przez wyspy trzustkowe poprzez zwiększenie sekrecji pulsacyjnej oraz podstawowej. Inny lek o podobnym mechanizmie działania — repaglinid, również nasila wydzielanie insuliny poprzez wpływ na ładunek wydzielonego hormonu i amplitudę pulsów, bez zmiany częstotliwości pulsacji (badanie po podaniu pojedynczej dawki) [18]. Repaglinid zmniejsza regularność procesu wydzielania insuliny u osób bez cukrzycy, co wykazano metodą ApEn. Wyników tych nie można oczywiście odnieść do danych dotyczących chorych na cukrzycę typu 2, u których istnieje pierwotne zaburzenie sekrecji insuliny.

W przedstawionym badaniu regularność uwalniania insuliny nie zmieniła się po podaniu gliklazdu, zarówno po dawce jednorazowej, jak i po krótkoterminowym leczeniu, co potwierdzono ilościowo za pomocą trzech odrębnych, uzupełniających się analiz matematycznych.



Efekt podawania krótkoterminowego ocenia-  
no, dokonując pomiaru stężenia glukozy w surowi-  
cy krwi na czczo oraz metodą klamry hiperglikemicz-  
nej w celu porównania okresu leczenia gliklasydem  
i placebo. Wyniki insulinemii po 5-tygodniach, przy  
glikemii odpowiadającej wartości wyjściowej, mogły  
zmienić się przez podanie dożylnie wlewu glukozy,  
choć stabilizację stanu metabolicznego uzyskiwa-  
no, zanim rozpoczęto pomiary regularności sekrecji  
insuliny. Zmiany stężeń glukagonu i FFA również mo-  
gły mieć wpływ na uzyskane wyniki.

Nowością pracy jest zastosowanie analiz regu-  
larności rytmu wydzielania insuliny przez komórki  
 $\beta$  trzustki na podstawie danych otrzymanych  
z analizy dekonwolucji przedziałów czasowych stę-  
żeń insuliny. Wyniki tych analiz potwierdzają obser-  
wacje uzyskane w analizach danych skoncentrowa-  
nych. Wykazano, że infuzja GLP-1 zwiększa wrażli-  
wość komórek  $\beta$  wysp trzustkowych na podawaną  
glukozę u osób z nieprawidłową tolerancją glikemii,  
ale nie u chorych z jawną cukrzycą typu 2 [30]. Może  
to wskazywać na konieczność wczesnej interwencji  
terapeutycznej u osób z nietolerancją glukozy, co ma  
na celu poprawę sekrecji insuliny na tym etapie. Aby  
ustalić takie zalecenia, wskazane jest długotermino-  
we badanie interwencyjne pacjentów z upośledzoną  
tolerancją glukozy. Zachęcające są wyniki badań  
z użyciem perfundowanych izolowanych wysp trzust-  
kowych, w których wczesne zastosowanie prepara-  
tów z grupy tiazolidinedionów powodowało części-  
we odwrócenie zaburzeń pulsacyjnego wydzielania  
insuliny. Wyniki podobnych badań przeprowadzo-  
nych na szczurach ze stanem przedcukrzycowym są  
analogiczne, u szczurów ZDF z cukrzycą to zjawisko  
nie występuje [31]. Dotychczas nie wyjaśniono, jak  
dane dotyczące ładunku wydzielniczego odnoszą się  
do spontanicznej sekrecji insuliny. Autorzy próbo-  
wali wyjaśnić ten temat w swojej pracy. Badania  
dotyczące sekrecji insuliny mogą dokładniej wyjaśnić  
mechanizm pulsacji regulowanej oscylacjami stęże-  
nia glukozy [32, 33].

Dane z wcześniej opublikowanych opracowań  
wskazują, że gliklasyd wywiera swoje działanie pier-  
wotnie na komórki  $\beta$  wysp trzustkowych, jego dzia-  
łanie zwiększające obwodową wrażliwość na insuli-  
nę jest raczej słabe i wtórne do poprawy możliwości  
wydzielania insuliny [34]. Jednak badania *in vivo*  
wykazują wyraźniejsze zwiększenie wrażliwości na  
insulinę podczas pulsacyjnego podawania insuliny  
w porównaniu z wlewem ciągłym [5]. Autorzy  
niniejszego badania po leczeniu gliklasydem zaob-  
serwowali jedynie tendencję do zwiększenia wrażli-

wości na insulinę, mimo zwiększenia pulsacyjnego  
wydzielania insuliny. Jednak pomiary wrażliwości na  
insulinę wykonywano w okresie niepulsacyjnej hiper-  
insulinemii, a otrzymane wyniki nie przeczą wcze-  
śniejszym результатам.

Potencjalnie istotnym wynikiem badania jest  
korelacja między poprawą ApEn po jednorazowej  
dawce leku (3 h po podaniu, przy szczytowym stę-  
żeniu gliklasydu w surowicy krwi) oraz obniżeniu  
się glikemii po 5 tygodniach leczenia. Może to wska-  
zywać, że hipoglikemizujące działanie pochodnych  
sulfonylomocznika zależy w pewnym stopniu od  
zdolności poprawy fizjologicznego pulsacyjnego  
uwalniania insuliny przez leki z tej grupy, co jest  
zgodne z wcześniejszymi obserwacjami wyprzedza-  
nia jawnej cukrzycy przez defekt koordynacji funk-  
cji komórek  $\beta$  [9, 10] — zatem wczesna interwencja  
może umożliwić zachowanie optymalnej funkcji  
komórek  $\beta$  trzustki. Redukcja toksyczności hiper-  
glikemii po 5-tygodniowej terapii gliklasydem nie tłu-  
maczy jeszcze opisanych wyżej zależności, ponieważ  
zmiany regularności wydzielania insuliny występo-  
wały tylko po jednorazowej dawce leku, w warun-  
kach stabilnej glikemii. Aby określić te związki, na-  
leży wykonać dalsze badania.

Badana grupa była nieliczna, a korelacje zna-  
mienne statystycznie tylko dla jednej z zastosowa-  
nych metod obliczeniowych (ApEn), chociaż w in-  
nych analizach obserwacje były podobne.

Podsumowując, leczenie gliklasydem zwiększa  
ładunek wydzielonej insuliny bez wpływu na czę-  
stotliwość pulsów lub koordynację funkcji komórek  $\beta$ .  
Zależność między poprawą profilu sekrecji po jed-  
norazowym podaniu leku oraz poprawa kontroli gli-  
kemii po krótkoterminowym (5-tygodniowym) lecze-  
niu wskazuje na skuteczność gliklasydu w przywraca-  
niu prawidłowej pulsacji wydzielania insuliny.  
U chorych na cukrzycę typu 2 nie można uzyskać  
stałej poprawy koordynacji procesów sekrecji insuli-  
ny — może to wskazywać na celowość wczesnej in-  
terwencji hamującej rozwój zaburzeń prowadzących  
do wystąpienia cukrzycy typu 2.

## Podziękowania

Badanie było finansowane przez *Danish Research Council, the Danish Diabetes Association, the Foundation for Medical Research, Vejle County, the Institute for Experimental Clinical Research, University of Århus* oraz *Servier International, Paris*.

Autorzy pragną podziękować Anette Mengel, Lene Trudsø i Elsebeth Horneman za cenną pomoc techniczną.

## PIŚMIENICTWO

1. Goodner C.J., Walike B.C., Koerker D.J. i wsp.: Insulin, glucagon and glucose exhibit synchronous, sustained oscillations in fasting monkeys. *Science* 1977; 195: 177–179.
2. Lang D.A., Matthews D.R., Peto J., Turner R.C.: Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *N. Engl. J. Med.* 1979; 301: 1023–1027.
3. Matthews D.R., Naylor B.A., Jones R.G., Ward G.M., Turner R.C.: Pulsatile insulin has greater hypoglycemic effect than continuous delivery. *Diabetes* 1983; 32: 617–621.
4. Komjati M., Bratusch Marrain P., Waldhausl W.: Superior efficacy of pulsatile versus continuous hormone exposure on hepatic glucose production in vitro. *Endocrinology* 1986; 118: 312–319.
5. Bratusch Marrain P.R., Komjati M., Waldhausl W.K.: Efficacy of pulsatile versus continuous insulin administration on hepatic glucose production and glucose utilization in type I diabetic humans. *Diabetes* 1986; 35: 922–926.
6. Schmitz O., Pedersen S.B., Mengel A. i wsp.: Augmented effect of short-term pulsatile versus continuous insulin delivery on lipid metabolism but similar effect on whole-body glucose metabolism in obese subjects. *Metabolism* 1994; 43: 842–846.
7. Lang D.A., Matthews D.R., Burnett M., Turner R.C.: Brief, irregular oscillations of basal plasma insulin and glucose concentrations in diabetic man. *Diabetes* 1981; 30: 435–439.
8. Polonsky K.S., Given B.D., Hirsch L.J. i wsp.: Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 1231–1239.
9. O'Rahilly S., Turner R.C., Matthews D.R.: Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *N. Engl. J. Med.* 1988; 318: 1225–1230.
10. Schmitz O., Porksen N., Nyholm B. i wsp.: Disorderly and non-stationary insulin secretion in relatives of patients with NIDDM. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: E218–E226.
11. Matthews D.R., Lang D.A., Burnett M.A., Turner R.C.: Control of pulsatile insulin secretion in man. *Diabetologia* 1983; 24: 231–237.
12. Shapiro E.T., Van Cauter E., Tillil H. i wsp.: Glyburide enhances the responsiveness of the beta-cell to glucose but does not correct the abnormal patterns of insulin secretion in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1989; 69: 571–576.
13. Porksen N.K., Munn S.R., Steers J.L., Schmitz O., Veldhuis J.D., Butler P.C.: Mechanisms of sulfonylurea's stimulation of insulin secretion in vivo: selective amplification of insulin secretory burst mass. *Diabetes* 1996; 45: 1792–1797.
14. Porksen N., Munn S., Steers J., Veldhuis J.D., Butler P.C.: Effects of glucose ingestion versus infusion on pulsatile insulin secretion: the incretin effect is achieved by amplification of insulin secretory burst mass. *Diabetes* 1996; 45: 1317–1323.
15. Porksen N., Munn S.R., Steers J.L., Veldhuis J.D., Butler P.C.: Effects of somatostatin on pulsatile insulin secretion: elective inhibition of insulin burst mass. *Am. J. Physiol.* 1996; 270: E1043–E1049.
16. Porksen N., Hussain M.A., Bianda T.L. i wsp.: IGF-I inhibits burst mass of pulsatile insulin secretion at supraphysiological and low IGF-I infusion rates. *Am. J. Physiol.* 1997; 272: E352–E358.
17. Porksen N.K., Grøfte T., Nyholm B. i wsp.: Glucagon-like peptide 1 increases mass but not frequency or orderliness of pulsatile insulin secretion. *Diabetes* 1998; 47: 45–49.
18. Juhl C.B., Porksen N., Hollingdal M. i wsp.: Repaglinide acutely amplifies pulsatile insulin secretion by augmentation of burst mass with no effect on burst frequency. *Diabetes Care* 2000; 23: 675–681.
19. Juhl C.B., Schmitz O., Pincus S.M., Holst J.J., Veldhuis J.D., Porksen N.K.: Short-term treatment with GLP-1 increases pulsatile insulin secretion in type II diabetes with no effect on orderliness. *Diabetologia* 2000; 43: 583–588.
20. Ashcroft F.M., Gribble F.M.: ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels and insulin secretion: their role in health and disease. *Diabetologia* 1999; 42: 903–919.
21. Orskov H., Thomsen H.G., Yde H.: Wick chromatography for rapid and reliable immunoassay of insulin, glucagon and growth hormone. *Nature* 1968; 219: 193–195.
22. Veldhuis J.D., Carlson M.L., Johnson M.L.: The pituitary gland secretes in bursts: appraising the nature of glandular secretory impulses by simultaneous multiple-parameter deconvolution of plasma hormone concentrations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 7686–7690.
23. Porksen N.K., Nyholm B., Veldhuis J.D., Butler P.C., Schmitz O.: In humans at least 75% of insulin secretion arises from punctuated secretory bursts. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: E908–E914.
24. Chatfield C.: *The Analysis of Time Series: An Introduction*. London: Chapman and Hall: 1996.
25. Pincus S.M.: Approximate entropy as a measure of system complexity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88: 2297–2301.
26. Pincus S.M., Hartman M.L., Roelfsema F., Thorner M.O., Veldhuis J.D.: Hormone pulsatility discrimination via coarse and short time-sampling. *Am. J. Physiol.* 1999; 277: E948–E957.
27. Hosker J.P., Rudenski A.S., Burnett M.A., Matthews D.R., Turner R.C.: Similar reduction of first- and second-phase  $\beta$ -cell responses at three different glucose levels in type II diabetes and the effect of gliclazide therapy. *Metabolism* 1989; 38: 767–772.
28. Matthews D.R., Boland O.: The stimulation of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetic patients by amino acids and gliclazide in the basal and hyperglycemic state. *Metabolism* 1997; 46: 5–9.
29. Gregorio F., Ambrosi F., Cristallini S., Pedetti M., Filipponi P., Santeusano F.: Therapeutic concentrations of tolbutamide, glibenclamide, gliclazide and gliquidone at different glucose levels: in vitro effects on pancreatic  $\alpha$ - and  $\beta$ -cell function. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1992; 18: 197–206.
30. Byrne M.M., Gliem K., Wank U. i wsp.: Glucagon-like peptide 1 improves the ability of the beta-cell to sense and respond to glucose in subjects with impaired glucose tolerance. *Diabetes* 1998; 47: 1259–1265.
31. Sturis J., Pugh W.L., Tang J., Polonsky K.S.: Prevention of diabetes does not completely prevent insulin secretory defects in the ZDF rat. *Am. J. Physiol.* 1995; 269: E786–E792.
32. Mao C.S., Berman N., Roberts K., Ipp E.: Glucose entrainment of high-frequency plasma insulin oscillations in control and type 2 diabetic subjects. *Diabetes* 1999; 48: 714–721.
33. Porksen N., Juhl C.B., Hollingdal M. i wsp.: Concordant induction of rapid in vivo pulsatile insulin secretion by recurrent punctuated glucose infusions. *Am. J. Physiol.* 2000; 278: E162–E170.
34. Matthews D.R., Hosker J.P., Stratton I.: The physiological action of gliclazide: beta-cell function and insulin resistance. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 1991; 14 (supl. 2): S53–S59.