

## " بررسی روش اولترافیلتراسیون برای انسولین آزاد سرم "

دکتر اسماعیل علمی اخونی\* - دکتر محمود دوستی\* - دکتر ناصر خواجوی\*\*

### خلاصه:

### مقدمه:

از آنجائی که انسولین های مورد استفاده در کنترل قندخون (دیابت قندی) وابسته به انسولین اکثراً از نوع خوکی یا گاوی میباشند بدن بیماران در مقابل آنها به تولید آنتی-بادی پرداخته که این آنتی بادیها به انسولین متصل شده و باممانعت از عمل آن باعث کاهش مقدار انسولین فعال در بدن بیماران می شوند (۶۰) بنابراین اندازه گیری میزان انسولین آزاد و فعال ضروری بوده و چون به علت وجود آنتی-بادیها اندازه گیری انسولین تام در سرم این بیماران به روش رادیوایمونواسی (RIA) میزان دقیق انسولین فعال را مشخص نمی کند. بنابراین ابتداء انسولین فعال از آنتی بادیها به روش اولترافیلتراسیون جدا شده و حاصل فیلتراسیون به روش (RIA) اندازه گیری گردید. جهت کنترل C-Peptide نیز اندازه گیری شده و نتایج نشان داد که ملکولهای کوچک مثل C-Peptide براحتی از غشاء عبور کرده و دچار هیچ مشکلی نشدند، ولی انسولین در عبور از غشاء دچار تغییراتی شده که آنها به علت اشکال فضائی گوناگونی است که بخود میگیرد و یا عواملی مانند حرارت و کیسه دیالیزه زمان سانتریفوژ و ترکیبات یونی محیط، pH محیط و غیره، در ایجاد این مشکل مؤثر می باشند. تصور می شود با رفع اشکالات مزبور این روش با ارزش بوده و کمکی در حل مشکلات باشد.

با ورود انسولین در سال ۱۹۲۱ به کلینیک و استفاده وسیع جهانی از آن در درمان بیماری دیابت، اهمیت حیاتی آن آشکار گردیده است. بیماری دیابت به دو نوع وابسته به انسولین و غیر وابسته به انسولین تقسیم می شود. در نوع وابسته به انسولین بیماران برای کنترل قند خون احتیاج به تزریق انسولین دارند (۹) از آنجائی که انسولین هائی که فعلاً مورد استفاده قرار میگیرد اکثراً از نوع خوکی یا گاوی می باشند و با توجه به اینکه در ردیف اسیدهای آمینه با انسولین انسانی متفاوت هستند بدن این بیماران بر علیه این انسولین ها به تولید آنتی بادی می پردازد که این آنتی-بادیها اکثراً از نوع IGA می باشند. این آنتی بادی ها به انسولین متصل شده و مانع از عمل آن بر روی رسپتورها می شود. بنابراین میزان انسولین فعال در بدن این بیماران کاسته می شود. البته این کاهش میزان انسولین فعال در کلیه بیماران قابل ملاحظه نیست ولی آنچه که مسلم است هیپوگلیسمی مشاهده شده در این بیماران به آزاد شدن انسولین از این مخازن نسبت داده میشود (۱۱).

و امادر مواردی میزان آنتی بادی در بدن بیماران افزایش یافته و در نتیجه هیپوگلیسمی در این افراد به وجود می آید (۱۱). بنابراین نیازمند اندازه گیری میزان انسولین فعال

\* - استادیاران گروه بیوشیمی دانشکده علوم پزشکی تهران.

\*\* - فارغ التحصیل دانشکده داروسازی

آزاد می‌باشد تا شاید بتوان از طریق تعویض نوع انسولین از بروز چنین اشکالاتی جلوگیری بعمل آورد. این آنتی بادی‌ها در اندازه گیری دقیق انسولین تام سرم بیماران مزبور به روش رادیوایمونواسی (RIA)، (۲ و ۷) ایجاد مانع می‌نماید. در نتیجه میزان انسولین که واقعا "در سرم آنها بطور فعال وجود دارد مشخص نمی‌گردد، در سالهای اخیر روشهای متعددی برای جدا کردن آنتی بادیهای انسولین و کمپلکس آنتی بادی - انسولین پیشنهاد شده که عبارتند از استفاده از ستون سفادکس - عمل اولتراسانتریفیکاسیون و روشهای دیگر و اما روشی که در این مقاله ارائه میشود روش اولترافیلتراسیون میباشد. این روش برای جدا کردن ملکولهای کوچک از ماکروملکولها انجام می‌شود و همچنین روش بسیار ساده و ارزانی است و تاکنون در مورد انسولین انجام نشده است. مبنای کار براساس عبور ملکولهای کوچک انسولین از غشاء لوله های دیالیزی (سلوفان) می‌باشد که ملکولهای غشایی وزن ۱۵/۰۰۰ از آن عبور می‌نماید. بنابراین ملکول انسولین با وزن ۵۷۳۴ از آن عبور کرده و کمپلکس آنتی بادی - انسولین و یا آنتی بادیهای انسولینی که وزن ملکولی بالاتری را دارند از آن خارج نمی‌شوند، در نتیجه انسولینی که فیلتره خواهد شد بعنوان انسولین آزاد خواهد بود. ابتداء این روش بر روی اشخاص سالم انجام گرفت تا معلوم شود که آیا ملکول انسولین در عبور از کیسه دیالیز دچار مشکلاتی میشود یا خیر.

روش های مورد استفاده برای اندازه گیری انسولین آزاد، تاکنون روش های متفاوتی برای اندازه گیری انسولین آزاد ابداع شده است، اما این روش ها بطور کامل جوابگوی نیازها نبوده و هر کدام بنوبه خود دارای معایبی می‌باشند. این روش ها عبارتند از استفاده از ستون سفادکس و رسوب دادن با پلی اتیلن گلیکول، روشی که در این مقاله از آن مورد استفاده قرار گرفته است عبارت است از اولترافیلتراسیون که به شرح کامل آن می‌پردازیم.

#### اساس روش اولترافیلتراسیون:

در سالهای اخیر روشهای متعددی برای جدا کردن آنتی بادی های انسولین و آنتی بادی‌های متصل به انسولین پیشنهاد و ابداع شده است روش جدیدی که معرفی میشود براساس جدا ساختن ملکول انسولین از ماکروملکولها و پروتئین های

حجم خون بوده که این بمنظور، یکارگیری اولترافیلتراسیون با کیسه دیالیز به‌انجام میرسد (۴)، در این روش از لوله سلوفان (کیسه دیالیز) استفاده شده است. کیسه سلوفان دارای منافذی است که می‌تواند ملکولهای با وزن کمتر از ۱۵/۰۰۰ را از خود عبور دهد. بنابراین ملکول انسولین با وزن ملکولی ۵۷۳۴ براحتی از این غشاء عبور کرده و در مایع فیلتره وارد میشود. اما کمپلکس انسولین - آنتی بادی (Ins-IgG) که وزن ملکولی بالاتری دارد از غشاء عبور نمی‌نماید. بنابراین توسط این روش انسولین فعال یا آزاد از آن جدا خواهد شد (۸، ۱۰، ۱۱ و ۱۲) در افراد سالم چون انسولین در حالت ناشتا حدود ۱۰ واحد در میلی لیتر بوده و اگر در این بررسی پس از صرف غذا انجام گیرد یقیناً "میزان انسولین مستقیماً" تحت تأثیر نوع غذا تغییراتی حاصل می‌نماید، لذا آزمایش تحمل گلوکز نیز انجام میگرفت تا یک نمودار برای انسولین و نمودار دیگری برای گلوکز خون تهیه گردد. به این ترتیب غلظت های متفاوتی از انسولین حاصل میگردد که انجام اولترافیلتراسیون را در غلظت های متفاوت انسولین میسر می‌سازد. با توجه باینکه احتمالاً "انسولین در شخص سالم به شکل مونومر بوده اولترافیلتراسیون انجام گرفت و سپس مقدار انسولین در سرم و مایع حاصل از اولترافیلتراسیون به روش رادیوایمونواسی (RIA) اندازه گیری شدند بمنظور کنترل و همزمان با اندازه گیری انسولین مقدار C-Peptide نیز در نمونه های مذکور تعیین گردید. بطور کلی روش کار در چندین مرحله بشرح زیر انجام میگرفت:

لوله های دیالیز (۱) را که در یخچال و در حرارت ۴ و در داخل کیسه پلاستیکی نگهداری شده‌اند بطول های ۱۲ سانتی متری بریده و در داخل آب مقطر بمدت یک شب یا بیشتر خیسانده میشوند، سپس فرد مورد آزمایش بمنظور انجام آزمایش تحمل گلوکز انتخاب نموده و به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن یک گرم گلوکز خالص (۳) را وزن و آنرا در آب خنک حل کرده و در صورت امکان برای مطبوع نمودن آن چند قطره آبلیمو به آن اضافه و به بیمار خورانده میشود و برای برداشتن گلیسیرین که بعنوان مرطوب کننده در روی لوله ها قرار داده شده است لوله های دیالیز را چندین بار با آب مقطر شسته و برای برداشتن ریشه های سولفور ابتداء کیسه ها را با محلول (۷/۳٪) بیکرینات بمدت یک دقیقه در داخل آب جوش قرار داده سپس با آب داغ بمدت دودقیقه شسته و بلافاصله

عبور دهد، تحت فشار حاصل از سانتریفوژ با دور ۲۵۰۰ بایستی از غشاء عبور نماید.

با انجام آزمایش تحمل گلوکز در مورد اشخاص سالم منحنی و جدول مربوطه نشان میدهد که همزمان با افزایش قند خون، سیر صعودی برای انسولین نیز ملاحظه می‌شود که این افزایش نسبی انسولین طبیعی است (شکل ۱).

با انجام اولترافیلتراسیون در مورد هر کدام از سرمهای اخذ شده در زمانهای مربوطه، جدول حاصل (جدول شماره ۱) نشان میدهد که مطابق با نتایج باتئوری (اینکه بایستی مولکولهای با وزن  $10/000$  از منافذ عبور نمایند) و پیش فرض اساسی این روش، مقادیر انسولینی که فیلتره میشود متناسب با افزایش غلظت انسولین موجود در سرم نبوده و ناهماهنگی را نشان میدهد.

اما اینکه انتظار در مورد فیلتراسیون کامل انسولین برآورده نمیشود سئوالی را پیش می‌آورد بدین عنوان که آیا انسولین در سرم بشکل منومر یا پلیمر است؟ مطابق باتئوری اساسی روش، بایستی قسمتی از انسولین که بشکل منومر می‌باشد، از کیسه دیالیز عبور نموده و در این صورت می‌بایستی یک نسبت معقول و مشخصی بین انسولین سرم و مایع فیلتره

با محلول  $0/2\%$  اسید سولفوریک اسیدی نموده و آنگاه با آب داغ لوله‌ها را شستشو داده تا اسید ذایل شود.

بمنظور انتقال سرمها بداخل لوله‌های دیالیزابتداء لوله‌های دیالیز خیس شده را با دستمال کاغذی با دقت از آب عاری نموده و سپس یک انتهای آن گره زده می‌شوند. برای جمع آوری مایع فیلتره از لوله‌های شیشه‌ای استوانه‌ای شکل به حجم ۱۲ سانتی متر مکعب استفاده می‌گردیدند داخل لوله‌های دیالیز  $1/5$  تا ۲ سانتی متر مکعب از سرمهای آماده ریخته سپس لوله‌های دیالیز را بشکلی داخل سرم آزمایش قرار میدهیم که دو انتهای گره خورده آن در خارج لوله قرار گرفته و لوله مزبور بوسیله درپوش لاستیکی مسدود می‌گردیدند. در آخرین لوله‌های حاوی کیسه دیالیز را بمدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ سانتریفوژ کرده و مایع فیلتره را در منهای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری میشود.

نتیجه:

همانطور که در اساس روش اولترافیلتراسیون گفته شد مولکول انسولین بدلیل کوچکی و کمی وزن مولکولی از غشاء سلوفان که میتواند مولکولهای با وزن  $10/000$  را از خود

جدول شماره ۱-۱

زمانهای نمونه گیری با مبداء صفر (ناشتا)

۱۸۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	۰	
۶/۵۲	۱۴/۹	۲۳	۵۲/۶	۵/۲۸	انسولین سرم
۰	۰/۸۳	۴/۰۶	۷/۵۰	—	انسولین فیلتره سرم
—	۵/۹	۱۷/۶	۱۳/۹	—	درصد فیلتراسیون
۸۰	۶۷	۶۲	۹۳	۸۰	قند خون

نتایج بدست آمده نشان می‌دهد فیلتراسیونی که از غدد بزاقی بدست آمده میزان انسولین افزایش یافته اما در فیلتراسیونی که از گلو مریولها تهیه شده میزان انسولین کاهش یافته است که این کاهش با نظم مرتبی انجام نمی‌گیرد. و نسبت معقولی بین درصدهای فیلتره شده برای ادرار و فیلتره شده از وره سلوفان دیده نمی‌شود. بنابراین مسئله پلیمریزاسیون در حین عبور مطرح نبوده و نمی‌تواند بیانگر تغییرات نامتعادل موجود در نتایج شود.

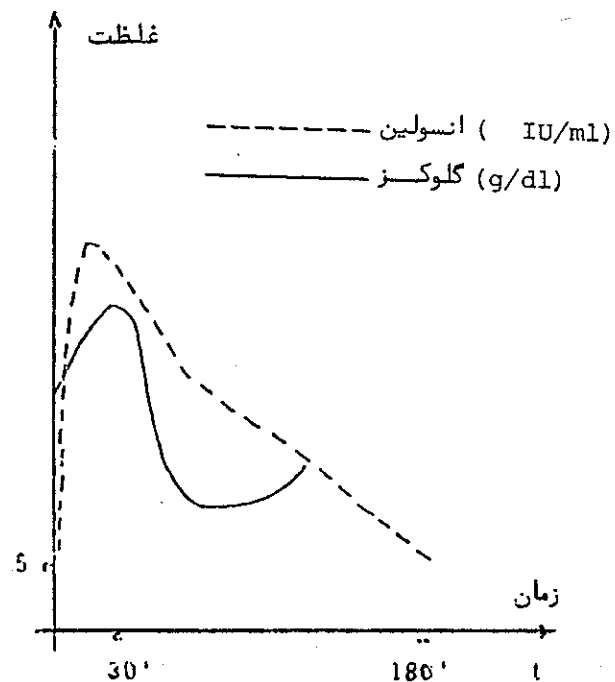
جهت کنترل و بررسی اینکه آیا مولکولهای کوچک دیگری که از غشاء عبور نمایند تغییراتی را متحمل میشوند یا خیر؟ از C-Peptide نیز در مایع فیلتره اندازه‌گیری بعمل آمد این مولکول تغییرات متعادل خود را که متناسب با مقادیر C-Peptide موجود در سرم می‌باشد دنبال مینماید. بنابراین، این مولکول با داشتن ۳۱ اسید آمینه در عبور از کیسه دیالیز دچار تغییراتی نمی‌شود، ولیکن میزان مقادیر فیلتره شده در حدود مقادیری است که در سرم بوده. و البته در این مورد برخلاف انتظار است چرا که با توجه به اینکه در سرم، پروتئین‌های پلاسمائی حجم زیادی را اشغال می‌نمایند، بنابراین مولکولهای کوچکی مانند C-Peptide

که از غشاء سلوفان عبور نمایند منطقاً "بایستی غلظت آنها در اولترافیلتره بالاتر از غلظت این مولکول هادر سرم بوده باشد.

بعبارت دیگر بایستی شاهد یک حالت تغلیظ شدن در مورد C-Peptide بوده و علت اینکه چنین تغلیظ شدنی را در این مورد مشاهده نمی‌کنیم شاید به این علت باشد که کیسه های دیالیز بخوبی خشک نشده و مقداری از آبی که به کیسه ها چسبیده است در اولترافیلتره وارد شده و موجب رقیق شدن آن شده است. بنابراین بنظر میرسد مولکول C-Peptide در عبور از غشاء تغییراتی را متحمل نمیشود و تقریباً "به همان صورت در اولترافیلتره وارد میشود. بنابراین مولکولهای شبیه به انسولین که وزن مولکولی کمتری را دارند در عبور از غشاء مشکلی نداشته باشند. لذا احتمال پلیمریزاسیون در این موارد برای مولکولهای کوچک در عبور از غشاء بعید بنظر میرسد و احتمالاً "مقداری از انسولین بشکل پلیمر و مقداری بشکل منومر وجود داشته باشد، که منومر آن بسادگی از غدد بزاقی و گلو مریولها و کیسه دیالیز عبور نموده، برای توجیه و ارزیابی این مطلب در مورد نمونه‌های

وجود داشته باشد، که در غیر این صورت این عمل پلیمریزاسیون در حین انجام تکنیک ایجاد شده، بدین معنی که تصور میشود مولکولهای انسولین در حین انجام اولترافیلتراسیون پلیمریزه شده باشد. با توجه به نتایج بدست آمده از جدول شماره (۱) بنظر رسید که شاید اگر انسولین از یک صافی عبور نماید ممکن است این عبور باعث تغییر ساختمان آن گردد. که این تغییر بصورت پلیمریزاسیون در هنگام عبور ظاهر شود و اگر این تغییر بوجود نیاید بایستی صد درصد از این صافی عبور نماید. در این صورت صافی های طبیعی بدن را در نظر گرفته واز مایعات بیولوژیکی نمونه تهیه می‌شود. برای ارزیابی و توجیه مطلب فوق در تست های جدید تحمل گلوکز که درباره اشخاص انجام میشود، بزاق حاصل از غدد مترشحه خارجی که یک صافی طبیعی است و مایع فیلتره طبیعی بدن (ادرار) در نظر گرفته می‌شود.

بنابراین در نمونه گیری های بعدی، همزمان با زمانهای نمونه گیری خون، از بزاق و ادرار نیز نمونه‌گیری بعمل آمد.



و در نهایت این نتیجه گیری را در مورد افراد دیابتی نیز می توان تعمیم داد .

با وجود این امید است که در آینده پژوهشگران ، بیماران دیابتی را با توجه به شرایط فیزیولوژیکی آنها و کنترل شرایط آزمایشگاهی مستقلاً " مورد آزمایش قرار داده و حالت دینامیکی انسولین را در این بیماران بیشتر آشکار سازند تا از این رهنورد کنترل قند خون این بیماران با شرایط سهلتری صورت گیرد .

همانطوریکه ذکر شد مسئله پلیمرایزاسیون در حین عبور برای مولکولهای کوچک مانند C-Peptide مطرح نیست بنابراین با توجه به این مسئله و نیز پیش فرض اساسی روش اولترافیلتراسیون انتظار می رود که غلظت انسولین در سرم در میزان فیلتراسیون تأثیری نگذارد . اگر مقادیر غلظتهای متفاوت انسولین که در زمانهای گوناگون تست G.T.T بدست می آید بر روی محور افقی ( X ها ) منتقل کنیم و در مقابل درصد فیلتراسیون را بر روی محور عمودی ( Y ها ) انتقال دهیم ، پراکنندگی نقطایی به شکل ۲ ظاهر میشود . همانطورکه در شکل دیده میشود میزان فیلتراسیون در غلظت های پائین انسولین از نسبت بالایی برخوردار هست ( ۷۸ - ۳۵ % ) و با پیشرفت غلظت انسولین از میزان فیلتراسیون کاسته میشود ( ۱۰ - ۳ % ) با توجه به مطالب عنوان شده در قسمتهای قبل تصور میشود که در غلظتهای پائین انسولینی که از گرانولهای آماده در جزایر بتاترشح میشود و یا مقادیری که پس از تجزیه بافتی انسولین در خون جهت حفظ حالت نرمال آن باقی می ماند بصورت منومر هست و به همین دلیل میزان بازیابی در غلظتهای پائین بیشتر است و اما با بالا رفتن غلظت انسولین در سرم احتمالاً " اتفاقی که می افتد پلیمریزاسیون انسولین بصورت دایمر و هگزامرها با یون روی ( Zn ) میباشد . یعنی احتمالاً " در غلظتهای بالا قسمتی از انسولین بصورت پلیمر و قسمت دیگر بصورت منومر هست و طبق این احتمال همانگونه که ذکر شد منومر آن بایستی صد درصد از غشاء لوله دیالیز عبور کند و در این صورت بایستی در فیلتراسیون مجدد بطور کامل بازیابی شود که این امر همانطوریکه نتایج نشان داد با عدم موفقیت همراه بود که بهیائنگر نقض تکنیکی متداولترافیلتراسیون و شرایط مؤثر در آزمایش ( کیسه دیالیز ، حرارت ، زمان ، تغییرات و محیط یونی و . . . ) بود بنابراین احتمالاً " هم عامل پلیمریزاسیون فیزیولوژیکی

بعدی ادرار و فیلتره حاصل از سرم را فیلتراسیون مجدد انجام گرفت که انتظار میرفت مطابق با پیش فرض عنوان شده بایستی تمام مقادیر انسولین موجود در فیلتر اول از کیسه دیالیز عبور نماید و در فیلتراسیون دوم بازیابی شود . ولی باز ملاحظه میشود که در اولترافیلتراسیون دوم میزان انسولین باز هم کاهش یافته است . بنابراین عوامل دیگری در ارتباط با تکنیک آزمایش روی انسولین اثر می گذارد مثلاً " ممکن است حرارت حاصل از چرخش با دور زیاد و مدت طولانی سانتریفیوژ در نتیجه آزمایش موثر باشد . عامل دیگر خود کیسه دیالیز می تواند باشد به این ترتیب که گلیسیرینی که بعنوان مرطوب کننده در آن بکار برده شده است عاملی در ممانعت از عبور انسولین از غشاء باشد و یا اینکه ریشه های سولفوریک که بر روی کیسه دیالیز قرار دارد بطور کامل با جوشاندن در بیکربنات از آن جدا شده و در نتیجه با انسولین پیوند حاصل می نماید و موجب میشود که انسولین بر روی غشاء باقی مانده و قابل عبور از آن نباشد . بیماران دیابتی نیز مشاهده بشوند برای اینکه نتایج حاصل از اولترافیلتراسیون را در مورد اینکه آیا مقادیری از انسولین که فیلتراسیون نمایند مربوط به انسولین فعال در بدن این بیماران بوده و بالتیجه از روی درصد فیلتراسیون ارزیابی در مورد شکل مولکولی انسولین در بیماران دیابتی و نیز شکل فعال آنرا بدست آورده و اینکه همچنین شرایط فیزیولوژیکی لازم که برای این بیماران حکمفرما است آیا در میزان فیلتراسیون دخالت دارد یا خیر مورد مطالعه قرار گیرد برای این منظور ۳ بیمار دیابتی را مورد آزمایش قرار داده شد در زمانهای صفر ، نیم و یک ساعت و یک ساعت و نیم پس از ناشتا از بیماران خون و ادرار گرفته شد . میزان قند خون و ادرار ، گرفته شد میزان قند خون این بیماران در مقایسه با افراد طبیعی بسیار افزایش یافته است . و نیز با مقایسه مقادیر انسولین این بیماران و افراد سالم ملاحظه می شود که میزان انسولین ترشح شده در زمانهای مختلف G.T.T در بیماران مقادیر کمتری را دارا هستند . اولترافیلتراسیون در مورد سرمهای این بیماران نیز انجام گرفت و مشاهده شد که میزان فیلتراسیون در مورد این بیماران نیز تغییرات نامتعادل و غیر منطقی دارد و فیلتراسیون کلیوی نیز همین وضع را دارا می باشد . بنابراین با توجه باینکه نتایج مذکور شبیه به حالت افراد طبیعی بوده بطور کلی نتیجه گیری نهایی را در مورد افراد طبیعی عنوان می شود

شکل شماره ۲ بدست می‌آید، تغییری که برای منحنی می‌توان گذاشت بدین ترتیب است که مقادیر موجود در فیلتره بسیار کمتر از انسولین تام بوده که می‌تواند بدلائل ذکر شده، باشد.

به هر حال حالت ایده آل و طبیعی این خواهد بود که نقاط به سمت خطی که از مبدأ می‌گذرد تمایل پیدا کنند و در این صورت می‌توان گفت که تکنیک قابل عرضه برای اندازه‌گیری انسولین آزاد در سرم اشخاص و بیماران دیابتی که از انسولین برای درمان استفاده میکنند باشد.

همانطور که ملاحظه میشود این روش فعلاً " برای اندازه‌گیری انسولین آزاد متناسب، نمیباشد و پیچیدگی مولکول را از نظر ساختمانی و خصوصیات معلوم نمی‌کند. در صورتیکه این مولکول بصورت ساده در کتابها ملاحظه میشود ولی این مولکول تحت شرایط مختلف آزمایشی میتواند از لحاظ شکل تغییر نماید. احتمالاً " باین صورت که در هنگام اولترافیلتراسیون تحت اثر فشار، حرارت، ترکیبات یونی محیط، pH محیط، شکل های مختلف بخود بگردد که با تغییر شکل فضایی سه بعدی مولکول همراه است که این تغییر شکل بصورت گسترش و انبساط مولکولی (Expanded) همراه باشد و یا اینکه بصورت پلیمرهای گوناگون و اشکال

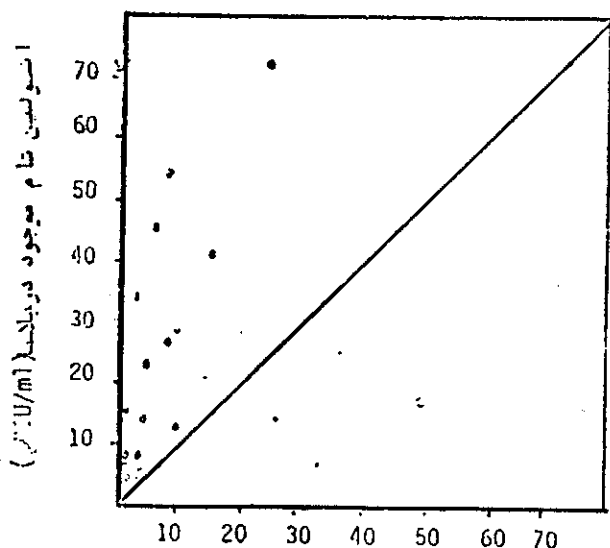
انسولین در خون و هم نقص تکنیکی متد عواملی هستند که موجب میشود میزان درصد فیلتراسیون در غلظتهای بالا کمتر شود.

اما برای ارزیابی دقیق اثر غلظت در میزان فیلتراسیون پیشنهاد میشود که گامهای معینی با غلظتهای متفاوتی از انسولین که حاوی هیچ حامل دیگر نبوده و کاملاً " آمورف میباشند ( انسولین تهیه شود، اولترافیلتراسیون در طی این گامها انجام گیرد ).

امید است پژوهش های بعد اثر عوامل تکنیکی موثر در عدم دقت روش اولترافیلتراسیون در اندازه گیری انسولین آزاد را آشکار ساخته و یا مرتفع ساختن آنها گام با ارزشی در عرضه این متد ساده و مهم به انجام رساند.

#### بحث:

بنابراین در نهایت برای ارزیابی روش ارائه شده برای اندازه گیری انسولین آزاد موجود در سرم که تکنیک بسیار ساده و ارزانی است اگر انسولینی که فیلتره میشود بعنوان انسولین آزاد و فعال در نظر گرفته شود و مقادیر حاصل از اندازه گیری آنرا در مقابل انسولین تام موجود در سرم رسم شود.



شکل ۲ - انسولین آزاد یا فیلتره شده ( IU/ml )

به آن صورتی که واقعا " در خون وجود دارد جلوگیری کرد؟  
 لذا اگر اشکالات برطرف شده و شرایط مطلوب بدست آید  
 کار بسیار با ارزشی خواهد بود.  
 نتیجتاً " تحقیقات بیشتر و وسیعتری لازم هست تا  
 قبل از اینکه روشهای مختلف اندازه گیری انسولین آزاد ابداع  
 شود حالت دینامیکی انسولین در خون را بررسی کرده و با  
 مطالعه بیشتر شرایط لازم برای تثبیت نمودن مولکول انسولین  
 انجام پذیرد.

پیوندی واسط و متفاوت بصورت کمپلکس با پروتئینهای داخل  
 سرم و یا وسایل مربوطه ( کیسه دیالیز و ... ) در آید .  
 همانطور که ملاحظه میشود روش عرضه شده بسیار  
 ساده و ارزان است و برای مولکولهای کوچک مورد استفاده  
 است . بنابراین با توجه به پیچیدگی مولکول انسولین آیا  
 می توان با تغییر غلظت یونی ، یونهای موثر در پلیمریزاسیون  
 انسولین و پارامترهای آزمایشگاهی ، بخصوص شرایط انجام  
 یافته در مورد اولترافیلتراسیون از تغییر شکل مولکولی انسولین

## REFERENCES

1. Asplin CM., Goldie, D.J; Hartog, M.: The Measurement of Serum free Insulin by Steady-State gelifiltration. Clin. Chim. Acta, 1966, 75: 393-399.
2. Desbuquoio B., Aurbach G.D., Use of Polyethylene Glycol to Separate Free and antibody Bound Peptide hormones in Radio Immuno Assays. J. Clin. Endocrinol, 1961, 33: 139-8.
3. Nakagawa, S., Nakayama H.Sasaki T. et al. A simple method fot the determination of Serum free insulin levels in Insulin-Treated Patients. Diabetes 1973; 22: 590-600.
4. Peluso, U, Dean B., Harrison LC. Separation of Free and Antibody-Bound Insulin in Plasma Using a bench Ultracentrifuge (Bekman Airfuge). Clin. Chim. Acta. 1984, 139: 317-370.
5. Luis J. Escobar, Neil H. White, Julio V. Santiago and Ronald L. Ginerich. Clinica. Chimica Acta, 1985; 152: 11-15.
6. Heding L.G. Horm. Netab. Res., 1969; k:154-6.
7. Jonsson S., Kronwall G. The use of Protein A-Containing Staphylococcus aureus as a Solid phase anti-IgG reagent in radio immuno assays. Eur. J. Immunol. 1974; 4: 29-33.
8. Martin FR, Russell J. A simple method for determining Plasma insulin in the presence of endogenous insulin antibodies. Diabetologia 1974; 10: 93-96.
9. Harper's Review of Biochemistry", 1985.
10. Fanlk MR., Karam, JH, Funderberg HN. Human anti-insulin antibodies. J. Immunol 1971; 106:1112-6.
11. Harwood R. Insulin-Binding antibodies and Spontaneous hypoglycemia, N. Engl J. Med, 1960; 262: 978-978-9.
12. Walford S. Allison Sp., Reves WG. The effect of Insulin antibodies on Insulin dose and diabetic control. Diabetologia, 1982 : 22: 106-110.