



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTA' DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**Descrizione della cinetica degli aminoacidi
attraverso modelli matematici**

**Description of amino acid kinetics through
mathematical models**

Relatore:

Dott. Micaela Morettini

Correlatore:

Prof.ssa Laura Burattini

Dott. Andrea Tura

Tesi di Laurea di:

Giada Mengoni

A.A. 2020/2021

ABSTRACT

L'elaborazione di modelli matematici è una tipologia d'analisi molto utile per lo studio e la descrizione dei processi biologici poiché consente di riprodurre in maniera semplificata le complesse dinamiche interne dell'organismo.

Questo lavoro di tesi si concentra in particolare sulla fisiopatologia del diabete e di come questa possa essere analizzata attraverso tecniche di modellazione matematica basate sulla cinetica di specifiche specie aminoacidiche correlate alla pre-diagnosi e alla diagnosi di tale patologia. Attraverso lo studio dei modelli è stato dimostrato che le interazioni e le variazioni delle concentrazioni di questi metaboliti sono collegabili a modificazioni del metabolismo glucidico ponendo enfasi in particolare sul ruolo assunto dagli aminoacidi a catena ramificata. Questi infatti sono risultati essere fortemente coinvolti nella secrezione insulinica e per questo particolarmente rilevanti nella predizione e nel monitoraggio del diabete di tipo 1 e 2.

Al fine di sviluppare un nuovo modello per la descrizione del comportamento di tali metaboliti nell'omeostasi glicemica, è stato prodotto un set di dati sintetici relativi alle variazioni di concentrazione degli aminoacidi a catena ramificata presi nell'insieme e singolarmente come isoleucina, leucina e valina, in determinati istanti temporali e per specifiche popolazioni. L'impiego di dati sintetici realistici è infatti un approccio innovativo ed efficace per l'elaborazione di modelli in quanto esente da norme sulla privacy dei pazienti e quindi più accessibile oltre che più semplice da poter riprodurre per una prima analisi metabolica.

INDICE

INTRODUZIONE.....I

CAPITOLO 1. Sistema di regolazione insulina-glucosio.....1

- 1.1. Glucosio.....1
- 1.2. Insulina.....3
- 1.3. Meccanismi di regolazione insulina-glucosio.....5
- 1.4. Glucagone.....7
- 1.5. Omeostasi glicemica.....8

CAPITOLO 2. Cinetica degli aminoacidi e relazioni con le alterazioni del metabolismo del glucosio.....13

- 2.1. Aminoacidi.....13
- 2.2. Diabete.....14
- 2.3. Possibili relazioni tra aminoacidi e diabete.....16
- 2.4. Aminoacidi a catena ramificata: metabolismo e resistenza all'insulina...17

CAPITOLO 3. Modelli matematici basati sulla cinetica degli aminoacidi coinvolti nella secrezione insulinica.....21

- 3.1. Analisi interattiva della rete di aminoacidi plasmatici in un modello murino in stato iperglicemico.....21
- 3.2. Modello matematico del metabolismo degli aminoacidi e del glucosio in relazione alla secrezione di insulina.....27

**CAPITOLO 4. Generazione di un data-set sintetico per lo studio della cinetica degli
Aminoacidi con modelli matematici durante test di tolleranza al glucosio
con pasto misto.....35**

4.1 Tecniche di generazione di data set sintetici.....35

4.2 Metodi.....36

4.3 Risultati.....37

CONCLUSIONE.....II

BIBLIOGRAFIA.....IV

INTRODUZIONE

Il diabete mellito è una famiglia di disordini metabolici caratterizzati da instabilità del livello glicemico nel sangue che va dall'iperglicemia a condizioni di ipoglicemia a causa di un'inadeguata secrezione d'insulina e/o da un'alterata risposta delle cellule bersaglio nei confronti di tale ormone. Ciò contribuisce anche ad una maggiore propensione da parte dei pazienti diabetici a contrarre ulteriori malattie legate a disfunzioni ed insufficienza di vari organi rispetto ai soggetti sani.

Dato il numero sempre crescente di diagnosi di prediabete e diabete nella popolazione mondiale, tale patologia ha assunto negli ultimi decenni un grande rilievo sociale il che ha contribuito allo sviluppo di nuove tecniche di analisi e monitoraggio.

In particolare si è visto come la variazione della concentrazione di alcuni aminoacidi fosse fortemente coinvolta nell'insorgere del diabete in quanto andava ad evidenziare malfunzionamenti nella secrezione d'insulina, ormone primariamente coinvolto nel metabolismo glicemico, e nella ricezione della stessa da parte dei tessuti bersaglio.

Nello specifico sono stati rilevati dei legami tra il rischio di sviluppare, o se già diagnosticato, peggiorare il diabete mellito di tipo 1 e l'aumento della concentrazione di fenilalanina e di aminoacidi a catena ramificata. Mentre per quanto riguarda il diabete di tipo 2, si è osservato che la presenza di un eccesso di aminoacidi a catena ramificata può contribuire allo sviluppo di disfunzioni delle cellule β che guidano la transizione ad uno stato di insulino-resistenza da parte di adipociti, epatociti e cellule muscolari bersagli di tale ormone.

Attraverso l'impiego di modelli matematici è stato quindi possibile andare ad emulare i processi interni all'organismo consentendo uno studio più approfondito e semplificato delle dinamiche che intercorrono allo sviluppo di malattie quali il diabete che altrimenti non sarebbero di facile comprensione.

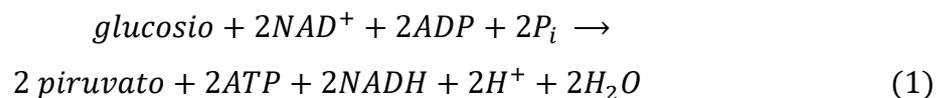
Capitolo 1

Sistema di regolazione insulina-glucosio

1.1 Glucosio

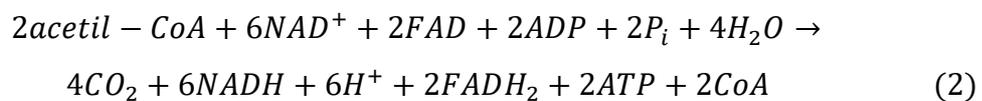
Il glucosio è una molecola organica appartenente alla classe fondamentale dei carboidrati, in particolare è un monosaccaride avente formula molecolare $C_6H_{12}O_6$. Questo svolge un ruolo essenziale nell'organismo umano in quanto fonte primaria di energia e può essere assunto tramite dieta, in quanto tale, oppure ricavato dalla demolizione di carboidrati più complessi.

L'energia contenuta nei legami chimici viene estratta attraverso tre processi catabolici che avvengono all'interno delle cellule dell'organismo. La prima via è la glicolisi, dal greco *glykys*, <<dolce>>, e *lysis*, <<scissione>>, a indicare proprio la demolizione dello zucchero, che può avvenire sia in condizioni aerobiche che anaerobiche [1]. In questa prima fase del metabolismo, una molecola di glucosio viene convertita in due molecole di piruvato attraverso una serie di reazioni catalizzate da enzimi, durante le quali viene anche liberata energia impiegata per la sintesi di ATP e la riduzione di NAD^+ . Si ottiene così la seguente reazione (1) [1]:



In seguito, in presenza di un adeguato apporto di ossigeno alla cellula, ciascun piruvato, costituito da tre atomi di carbonio, viene trasportato all'interno del mitocondrio dove viene a reagire con il coenzima A (CoA) per produrre acetil-CoA, una molecola di NADH e una di CO_2 . L'unità acetilica a 2 atomi di carbonio dell'acetil-CoA entra quindi nella via del ciclo dell'acido citrico (o ciclo di Krebs) combinandosi con una molecola di ossalacetato a 4 atomi di carbonio, restituendo così una molecola di citrato a 6 atomi di

carbonio. Quest'ultima passando attraverso una serie di reazioni, completa il ciclo trasformandosi di nuovo in una molecola di ossalacetato essendo stati rimossi due atomi di carbonio per la liberazione di CO₂. L'energia rilasciata durante il ciclo è catturata primariamente sotto forma di elettroni ad alta energia su 3 molecole di NADH e una di FADH₂, una parte più esigua passa nel legame fosfato ad alta energia dell'ATP ed infine la rimanente viene dispersa come calore. Il bilancio complessivo del ciclo di Krebs sarà quindi (2) [1]:



Il potenziale massimo calcolato per il catabolismo di una molecola di glucosio attraverso la via aerobica è stimato intorno alle 30-32 molecole di ATP (*Figura 1*).

Invece, nel caso in cui l'apporto di ossigeno non sia adeguato alle richieste di ATP da parte dell'organismo, il metabolismo del glucosio passa attraverso la via anaerobica, partendo dal piruvato che viene convertito in lattato invece che essere trasportato all'interno dei mitocondri.

Tale conversione, riporta nuovamente il NADH a NAD⁺ quando un atomo di idrogeno e un elettrone vengono trasferiti alla molecola di lattato. Di conseguenza, l'energia netta prodotta dal metabolismo anaerobico del glucosio, è di sole due molecole di ATP, molto inferiore rispetto alla via aerobica e per questo utilizzata solamente dalle cellule muscolari in caso di intenso esercizio fisico.

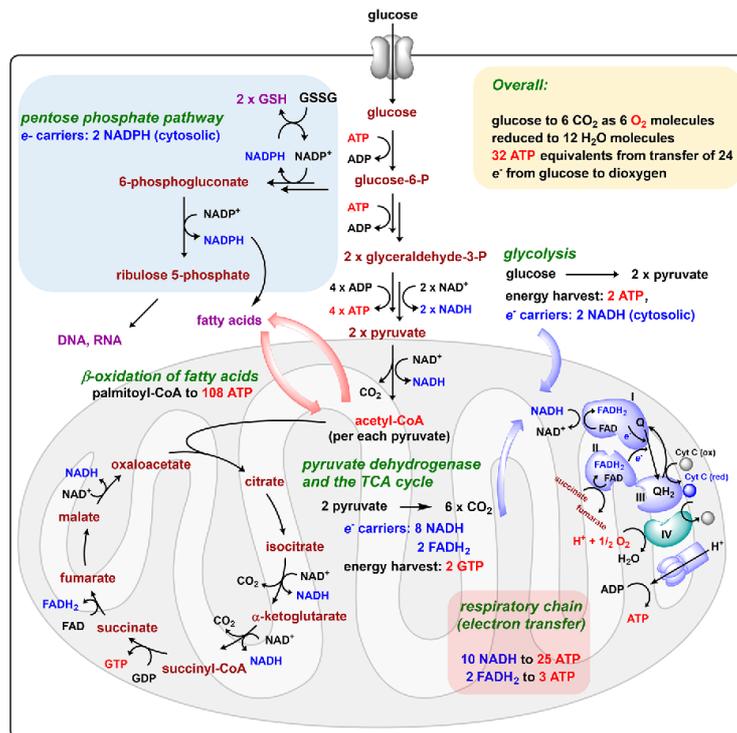


Figura 1. Metabolismo del glucosio

1.2 Insulina

L'insulina è un ormone peptidico secreto dalle cellule β del parenchima pancreatico in risposta ad esigenze di regolazione metabolica dell'organismo. Lo stimolo principale per la secrezione d'insulina è dato da concentrazioni plasmatiche di glucosio superiori a 100 mg/dl [2].

Questo viene assorbito a livello dell'intestino tenue giungendo così alle β cellule pancreatiche che lo captano mediante trasportatori GLUT-2 (Figura 2).

L'aumento di glucosio intracellulare determina un incremento della sintesi di ATP che causa la chiusura dei canali del K^+ controllati e la conseguente depolarizzazione della cellula. Si aprono quindi i canali voltaggio-dipendenti del Ca^{2+} che favoriscono l'ingresso

dello ione nel citoplasma, il quale, legandosi con le proteine, promuove l'esocitosi d'insulina contenuta nelle vescicole secretorie.

Tuttavia, vi sono anche altri fattori che inducono la secrezione di questo ormone, come ad esempio l'aumento della concentrazione plasmatica di aminoacidi oppure l'azione anticipatoria degli ormoni gastrointestinali GLP-1 (peptide glucagone-simile) e GIP (peptide gastrico inibitorio). Questi ultimi sono degli ormoni definiti *incretine*, che vengono prodotti dall'ileo e dal digiuno in seguito all'ingestione di cibo e raggiungono, attraverso il circolo sanguigno, le β cellule ancor prima che il glucosio sia stato assorbito. Il rilascio anticipato d'insulina in risposta a tali ormoni, impedisce che la glicemia aumenti improvvisamente durante la fase di assorbimento dei nutrienti.

Infine bisogna considerare anche il controllo svolto dal sistema nervoso attraverso l'attività parasimpatica, diretta al tratto gastrointestinale ed al pancreas prima e dopo i pasti, e l'attività simpatica che con gli ormoni adrenalina e noradrenalina va ad inibire il rilascio d'insulina ed a favorire la gluconeogenesi.

Il ruolo fondamentale dell'insulina è quello di andare ad incrementare il metabolismo del glucosio nelle cellule del fegato, del tessuto adiposo e dei muscoli scheletrici, al fine di abbassarne la concentrazione nel sangue. Tale azione viene espletata attraverso diversi meccanismi quali: aumentare l'ingresso di glucosio nelle cellule insulino-sensibili, incrementare l'utilizzo e l'accumulo cellulare del glucosio, incrementare l'utilizzo degli aminoacidi e favorire la sintesi dei grassi.

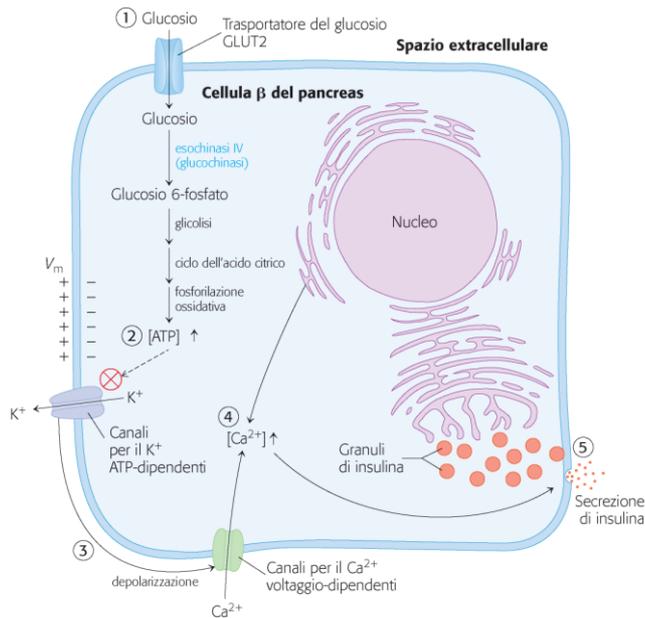


Figura 2. Meccanismo di sintesi insulinica

1.3 Meccanismi di regolazione insulina-glucosio

Per svolgere la propria azione sulle cellule bersaglio, l'insulina si lega con un recettore di membrana dotato di attività *tirosina-chinasica* che innesca delle complesse reazioni intracellulari a cascata. Il recettore, una volta attivato, fosforila delle proteine tra le quali l'IRS (*Inulin-Receptor Substrates*) che andranno ad influenzare a loro volta il trasporto ed il metabolismo cellulare.

Nel caso delle cellule del tessuto adiposo e del muscolo scheletrico, il legame tra insulina e recettore innesca una cascata trasduttiva che promuove il movimento delle vescicole contenenti GLUT-4 verso la membrana cellulare, dove tali trasportatori verranno inseriti per esocitosi consentendo la diffusione facilitata del glucosio nel citoplasma.

Invece, per quanto riguarda il trasporto di glucosio nelle cellule epatiche, non vi è una diretta dipendenza dall'insulina in quanto gli epatociti sono dotati di trasportatori GLUT-2 costantemente presenti nella membrana cellulare. Tuttavia la presenza o assenza d'insulina influenza l'attività svolta all'interno di queste cellule. Durante lo stato post-assimilativo infatti, quando i livelli dell'ormone peptidico sono bassi, gli epatociti convertono i depositi di glicogeno (glicogenolisi) e gli aminoacidi (gluconeogenesi) in glucosio, che si riverserà all'esterno secondo il proprio gradiente di concentrazione attraverso i trasportatori GLUT-2. Contrariamente, nello stato assimilativo l'insulina attiva l'esochinasi causando la fosforilazione del glucosio a glucosio 6-fosfato e provocandone così l'inversione nella diffusione intra-extra cellulare.

Un altro meccanismo di regolazione svolto dall'insulina è quello di andare ad incrementare l'utilizzo e l'accumulo di glucosio a livello cellulare attivando gli enzimi per il metabolismo (glicolisi) e per la sintesi di glicogeno (glicogenosintesi) e di grassi (lipogenesi), inibendo altresì quelli coinvolti nelle reazioni inverse.

Un ruolo simile è svolto anche nei confronti degli aminoacidi, attivando gli enzimi coinvolti nella sintesi proteica ed inibendo invece quelli che ne promuovono il catabolismo.

Infine per quanto riguarda la sintesi dei grassi, l'insulina va ad inibire la β -ossidazione ed a favorire la conversione dell'eccesso di glucosio o di aminoacidi in trigliceridi (lipogenesi) che possono venire a loro volta accumulati sotto forma di goccioline lipidiche nel tessuto adiposo (*Figura 3*).

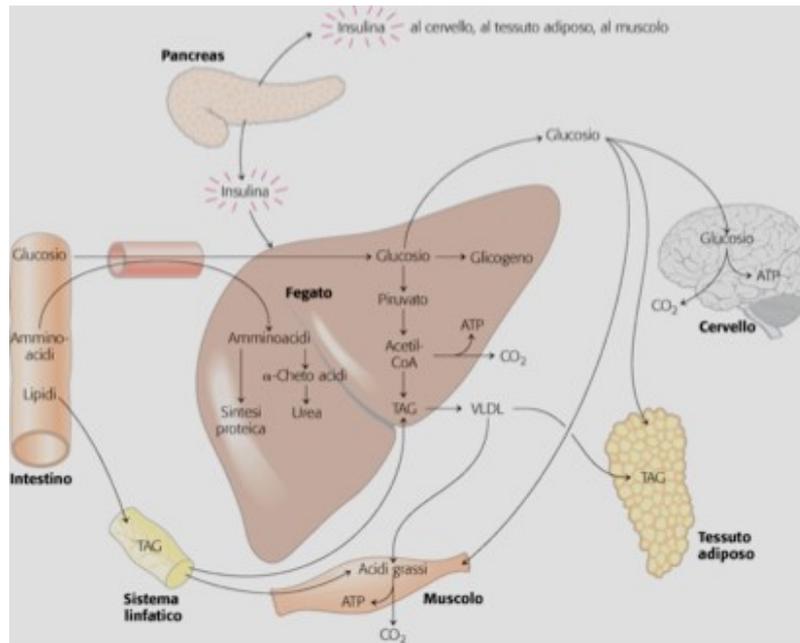


Figura 3. Principio d'azione dell'insulina sui tessuti bersaglio.

1.4 Glucagone

Il glucagone è un ormone peptidico secreto dalle cellule α del pancreas il cui effetto sul metabolismo è opposto a quello dell'insulina. Questo viene infatti rilasciato al fine di prevenire lo stato ipoglicemico a cui si può incorrere durante la fase post-assimilativa, quando la concentrazione di glucosio nel plasma scende al di sotto dei 100 mg/dl. La sua secrezione è strettamente legata a quella dell'insulina, da qui l'ipotesi che le cellule α siano regolate da alcuni fattori correlati all'insulina invece che direttamente dalle concentrazioni plasmatiche del glucosio [2]. Un ulteriore stimolo alla sua produzione è dato anche dall'aumento della concentrazione plasmatica di aminoacidi in seguito all'ingestione di un pasto esclusivamente proteico.

La principale azione svolta dal glucagone è quella di andare a stimolare la glicogenolisi e la gluconeogenesi a livello delle cellule epatiche, favorendo l'aumento del rilascio di glucosio nel sangue (Figura 4).

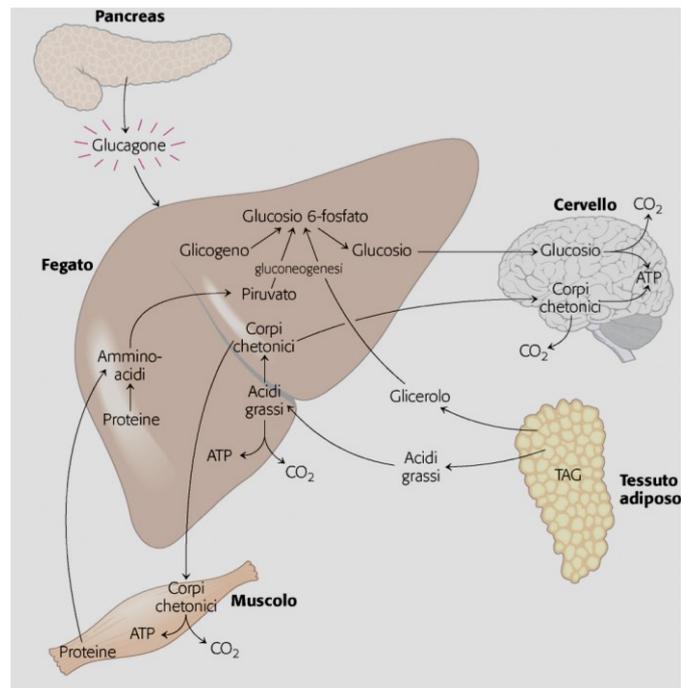


Figura 4. Principio d'azione del glucagone sui tessuti bersaglio.

1.5 Omeostasi glicemica

Il mantenimento costante della glicemia (90/100 mg/dl) è reso possibile dall'elevato grado di interconnessioni ed integrazioni dei processi metabolici, dall'elevata sensibilità del pancreas endocrino ai livelli circolanti di glucosio e dallo stretto controllo dei flussi metabolici esercitato principalmente dagli ormoni pancreatici.

I livelli di glucosio sono infatti determinati dalla quantità ingerita ed assorbita dalla glicogenolisi, dalla neoglucoresi e dalla captazione da parte dei tessuti con conseguente utilizzo per la glicolisi, la glicogenosintesi e la lipogenesi. Il contributo relativo di ciascuna di queste vie dipende dallo stato metabolico dell'individuo ma garantisce un approvvigionamento energetico ininterrotto a tutte le cellule. Fra i tessuti in grado di gestire le scorte energetiche, solo il fegato è capace di immettere o captare glucosio in circolo in maniera efficace al fine di mantenerne costanti i valori nel plasma. Le fasi principali dell'omeostasi glicemica sono la post-prandiale, il post-assorbimento ed il digiuno, a cui si legano l'attivazione di precise vie metaboliche indotte dalla presenza in circolo di specifici ormoni (*Figura 5*).

Nella fase post-prandiale avviene la digestione e l'assorbimento dei nutrienti a cui corrisponde un aumento della glicemia (iperglicemia) ed un parallelo incremento della secrezione d'insulina (iperinsulinemia). In tali condizioni i tessuti insulino-resistivi, ed in particolare il cervello, utilizzano circa $\frac{1}{4}$ del glucosio esogeno per i loro processi, è qui infatti che avviene la glicogenosintesi epatica e muscolare e la sintesi degli acidi grassi per l'attivazione rispettivamente della glicogenosintetasi e della glicerolo-aciltransferasi indotta dall'insulina.

Il picco glicemico registrato è determinato principalmente da fattori correlati alla quantità di carboidrati ingeriti e alla velocità di digestione ed assorbimento di questi nel tratto gastrointestinale. Infatti, assumendo carboidrati complessi, si osserva che la curva tende a salire più lentamente in quanto si ha una minore stimolazione della secrezione insulinica e quindi minori effetti di tale ormone sulla lipogenesi. D'altra parte, assumendo carboidrati ad alto indice glicemico, si verifica un aumento rapido dell'insulinemia a cui può seguire una lieve e transitoria ipoglicemia che costituisce un potente segnale ossigeno per il cervello [3] (*Figura 6*).

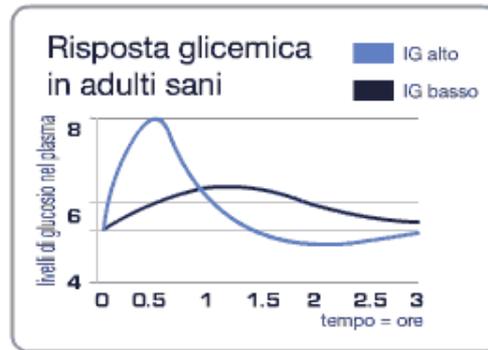


Figura 6. Risposta glicemica all'assunzione di carboidrati a differente indice glicemico (IG) in un soggetto adulto.

Concluso l'assorbimento intestinale e terminata la secrezione d'insulina, che ora viene rilasciata in quantità basali per impedire un'eccessiva mobilizzazione delle riserve che riporterebbero all'iperglicemia, si entra nella fase successiva in cui la quantità di glucosio circolante viene mantenuta costante attraverso la glicogenolisi epatica indotta dai livelli basali di glucagone.

Tuttavia con il passare delle ore tale via metabolica si riduce a scapito della neoglucogenesi epatica che induce un aumento progressivo dei livelli di glucagone nel sangue e quindi l'attivazione degli enzimi da esso dipendenti e del glucosio-6 fosfatasi. Contemporaneamente avviene anche la lipolisi, che conferisce al fegato ed al tessuto muscolare i precursori per la produzione di energia.

Quando le ore di digiuno si protraggono, si entra nell'ultima fase, in cui l'organismo dipende principalmente dalle riserve energetiche lipidiche, da cui si ottengono corpi chetonici utilizzati come fonte diretta di energia, e proteiche, da cui si ricavano gli aminoacidi per la neoglucogenesi, unica via metabolica funzionante per la produzione di glucosio.

Nel caso in cui la glicemia scenda a valori inferiori a 5mM, viene stimolata al massimo la secrezione di glucagone per mantenere attivi i processi catabolici e la corrispondente bassa insulinemia riduce l'ingresso di glucosio nei tessuti adiposo e muscolare. Se questa fase continua nel tempo, si attiva anche un adattamento metabolico che comporta la

riduzione del 10/20% del metabolismo basale e l'utilizzo di corpi chetonici come fonte di energia da parte del cervello al fine di risparmiare glucosio [3].

Infine, bisogna tenere in considerazione che oltre all'azione concertata di insulina e glucagone, esistono altri ormoni che contribuiscono alla regolazione del metabolismo glucidico in senso iperglicemizzante, i quali vengono definiti complessivamente ormoni della controregolazione e comprendono adrenalina, cortisolo, ormone della crescita (GH) e grelina.

L'adrenalina è importante per la risposta acuta all'ipoglicemia, soprattutto quando la secrezione di glucagone è deficitaria, mentre il cortisolo e il GH intervengono quando l'ipoglicemia si protrae nel tempo.

La soglia per l'attivazione dei meccanismi della controregolazione può variare in base all'individuo e generalmente è più bassa per i pazienti diabetici in terapia insulinica. In particolare, l'attivazione ortosimpatica blocca la secrezione di insulina e stimola rapidamente la secrezione sia di glucagone dal pancreas, sia di adrenalina dalla midollare del surrene. Dai neuroni ipotalamici vengono inoltre rilasciati nel sistema portale ipotalamico, i *releasing hormones* che stimolano la secrezione di GH e di ACTH (ormone che stimola la produzione di cortisolo dalla corticale del surrene).

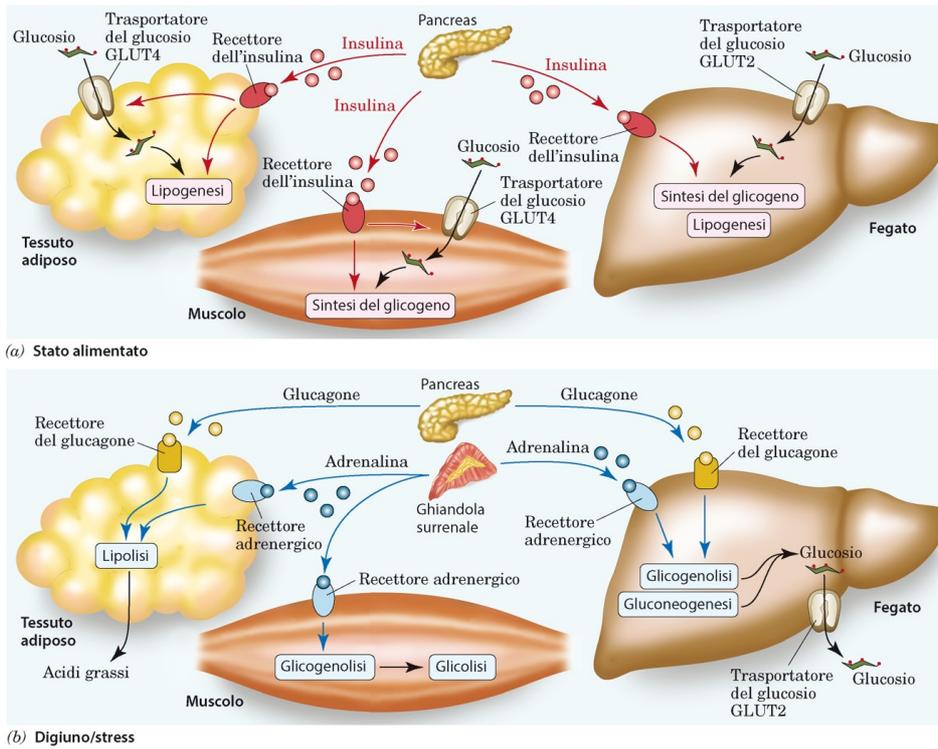


Figura 5. Attivazione dei flussi metabolici tra fegato, tessuto adiposo e muscolo in fase post-prandiale (a) e a digiuno (b).

Capitolo 2

Cinetica degli aminoacidi e relazioni con le alterazioni del metabolismo del glucosio

2.1 Aminoacidi

Gli aminoacidi sono molecole organiche bifunzionali contenenti un gruppo carbossilico (-COOH), un gruppo amminico (-NH₂) ed un gruppo specifico R differente per ciascuna delle 20 tipologie amminoacidiche fin ora individuate [1]. La particolare conformazione chimica di anfotero favorisce la formazione di legami peptidici tra i vari monomeri che si uniscono per creare catene lineari di diversa lunghezza e sequenza in stretta relazione alla funzionalità svolta dalla proteina di cui andranno a comporre la struttura primaria. Il pool amminoacidico circolante nell'organismo umano può essere captato dalle cellule e dai tessuti per la sintesi proteica, oppure può subire deamminazione diventando così substrato di altre vie metaboliche tra cui la formazione di corpi chetonici (aminoacidi chetogenetici) e la ricostruzione di molecole di glucosio (aminoacidi neoglucogenetici). Gli ioni NH₄⁺ prodotti durante la deamminazione, sono altamente tossici e per questo convertiti in urea attraverso un ciclo multisteppe a livello del fegato che causa il consumo di energia, ed escreti infine attraverso i reni. D'altro canto invece, alcuni aminoacidi come l'alanina, la glicina e l'arginina, svolgono un importante ruolo nel metabolismo glicemico favorendo l'ingresso di calcio nel citoplasma delle cellule β, causandone la depolarizzazione e il conseguente rilascio d'insulina.

Lo scheletro carbonioso di ciascun aminoacido può quindi subire diversi destini metabolici come la conversione in acetil-CoA o in un altro prodotto intermedio del ciclo di Krebs, può essere usato per formare corpi chetonici, oppure essere convertito in piruvato o in un altro intermedio della glicolisi [3] (*Figura 7*).

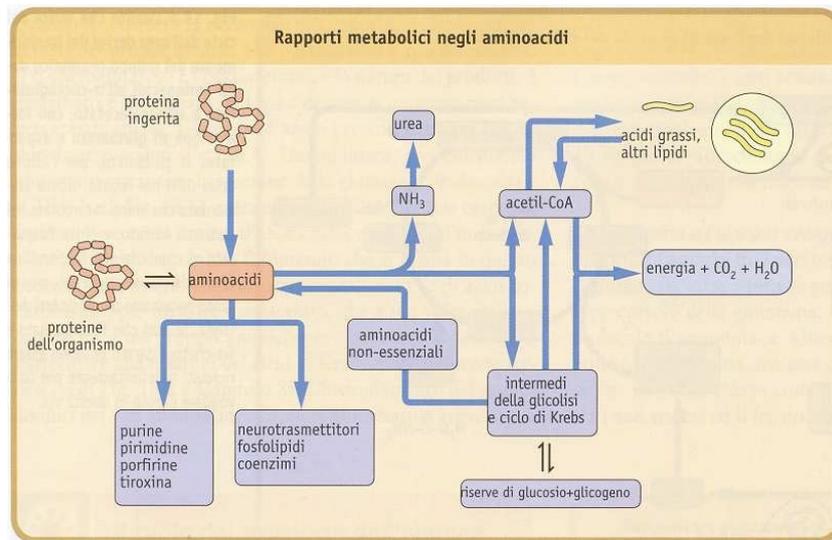


Figura 7. Metabolismo degli aminoacidi.

2.2 Diabete

Il termine diabete mellito racchiude una famiglia di disordini metabolici caratterizzati da iperglicemia dovuta a un'inadeguata secrezione d'insulina, ad un'alterata risposta delle cellule bersaglio nei confronti dell'insulina o ad entrambe le cause. Tale condizione di iperglicemia cronica può provocare nel tempo danni, disfunzioni ed insufficienza di diversi organi, in particolar modo reni, nervi, cuore e vasi sanguigni. I pazienti diabetici presentano un maggior rischio nel contrarre malattie cardiovascolari ed arteriopatia periferica, nonché di anomalie nel metabolismo delle lipoproteine, retinopatia, nefropatia e neuropatia periferica. In base ai tempi ed alla modalità con cui si presenta, è possibile distinguere tre principali categorie eziopatogenetiche: diabete mellito di tipo 1 (DM1), diabete mellito di tipo 2 (DM2) e diabete gestazionale (GDM) [4].

Il DM1 è una patologia su base autoimmune, definita "giovanile" in quanto la comparsa dei primi sintomi si ha solitamente nei primi anni di vita durante l'infanzia o

l'adolescenza, questa porta alla distruzione delle cellule β pancreatiche con conseguente deficit d'insulina ed eccesso di glucosio nel sangue. Fattori concomitanti nell'insorgere di tale malattia sono stati riscontrati sia a livello genetico, legati a particolari aplotipi HLA, sia a livello ambientale, dovuto ad esempio a specifiche infezioni virali. L'unico trattamento fin ora possibile per evitare gravi conseguenze quali chetoacidosi, coma o morte, consiste nell'iniezione d'insulina.

D'altro canto invece, circa il 90% di tutte le diagnosi di diabete ricade nel DM2, definito come gruppo eterogeneo di patologie caratterizzate da una resistenza dei tessuti periferici all'azione dell'insulina, la cui manifestazione riguarda primariamente la fascia adulta della popolazione.

L'eziologia della malattia è complessa, multigenica e multifattoriale e solo in rari casi si è riusciti a risalire alla proteina mutata, i fattori ipotizzabili sono quindi molteplici e vanno dalla mutazione del recettore insulinico, alla mutazione in uno o più geni che codificano per le proteine coinvolte nel meccanismo di trasduzione del segnale, i traslocatori del glucosio e gli enzimi del metabolismo energetico. Tuttavia, a questi, si aggiungono anche fattori ambientali quali sedentarietà, eccessivo apporto calorico ed obesità, il cui stretto legame con la malattia si pensa dovuto all'eccessiva produzione da parte degli adipociti di alcuni fattori che oltre a controllare il peso corporeo, modulano l'azione dell'insulina su di esso.

Nelle prime fasi della malattia le cellule β pancreatiche rispondono all'iperglicemia aumentando la secrezione d'insulina, ma nel tempo tale capacità tende inevitabilmente a diminuire causando iperglicemia e conseguente ipoinsulinemia, a cui si aggiunge anche l'elevata sintesi di glucagone da parte delle cellule α che non riuscendo a captare glucosio, favoriscono la gluconeogenesi e la glicogenolisi.

Per riuscire a prevenire o controllare la malattia, bisogna in primo luogo cambiare stile di vita diminuendo il peso corporeo ed incrementando l'esercizio fisico così che le fibre muscolari scheletriche riescano ad aumentare il numero di trasportatori di glucosio ed i recettori per l'insulina sulla loro membrana. Ciò fa sì che le fibre diventino più sensibili all'ormone e favoriscano una risposta metabolica anche per basse concentrazioni, diminuendo lo stress indotto sul pancreas e quindi la probabilità d'insorgenza della malattia.

Nel caso in cui ciò non bastasse, è necessario ricorrere inevitabilmente all'apporto farmacologico che può stimolare la secrezione d'insulina da parte delle cellule β , rallentare la digestione e l'assorbimento intestinale dei carboidrati, inibire il rilascio epatico di glucosio, aumentare la risposta dei tessuti bersaglio dell'insulina o promuovere l'escrezione di glucosio nelle urine.

Il diabete gestazionale invece, dovuto alla presenza in circolo degli ormoni della gravidanza che si oppongono all'azione dell'insulina, scompare dopo il parto. Tuttavia esso viene valutato come primo sintomo di una futura intolleranza al glucosio e deve essere necessariamente controllato e curato in quanto l'iperglicemia, presente anche nel feto, stimola la produzione di insulina fetale provocando effetti dannosi sullo sviluppo del bimbo avendo effetto proliferativo sui tessuti che si stanno differenziando.

2.3 Possibili relazioni tra aminoacidi e diabete

Negli ultimi decenni, grazie all'utilizzo di tecniche innovative quali la spettrometria di massa, la cromatografia in fase gas o liquida e la risonanza magnetica protonica nucleare, sono state analizzate le possibili correlazioni tra la variazione di concentrazione di alcuni metaboliti come glucosio, fruttosio, aminoacidi e lipidi, e l'insorgere della fisiopatologia del diabete.

In particolare si è notato il legame tra il rischio di sviluppare, o se già diagnosticato, peggiorare il diabete mellito di tipo 1 e l'aumento della concentrazione di fenilalanina e di aminoacidi a catena ramificata (BCAA).

Inoltre si è visto che una dieta ricca di grassi ed alti livelli di valina, leucina ed isoleucina, può aumentare la probabilità di riscontrare una forte insulino-resistenza da parte delle cellule dell'organismo, compromettendo la capacità fisiologica dell'ormone nella gestione e nella degradazione di tali aminoacidi nell'uomo [5].

Diversi studi svolti hanno cercato di dimostrare le relazioni che intercorrono tra BCAA e lipidi in eccesso nello sviluppo della disfunzione delle cellule β che guida la transizione dallo stato-obeso, insulino-resistente, al diabete di tipo 2. Tale meccanismo tuttavia, non è stato ancora del tutto compreso in quanto sono difficili da decifrare gli effetti che i metaboliti hanno sui complessi processi interni alle cellule pancreatiche secernenti insulina [6].

In seguito saranno riportati alcuni modelli matematici che cercano di spiegare tali processi.

Un ulteriore studio che ha coinvolto specificatamente una popolazione di giovani adulti, ha invece dimostrato il ruolo predittivo dei BCAA ed aromatici nella futura diagnosi di diabete negli anni, anticipando le sensibili variazioni dei livelli di glucosio. Tale risultato ha evidenziato ancor più il ruolo che questi metaboliti hanno come biomarcatori nell'azione di resistenza all'insulina da parte dei tessuti bersaglio, ma non è ancora stato dimostrato se abbiano anche un ruolo funzionale nel processo [7].

Ad oggi non è chiaro se i cambiamenti metabolici osservati siano conseguenza degli alti livelli di glucosio e quindi del diabete, oppure causa e quindi inducano lo sviluppo di tali patologie, è stata solamente evidenziata la co-occorrenza di entrambi gli eventi.

2.4 Aminoacidi a catena ramificata: metabolismo e resistenza all'insulina

Gli aminoacidi a catena ramificata sono particolarmente sensibili all'azione inibitoria dell'insulina sul muscolo scheletrico ed il loro metabolismo risulta essere profondamente alterato in condizioni patologiche d'insulino-resistenza, carenza d'insulina o entrambe, come avviene nel caso del diabete mellito, in presenza del quale si nota un aumento più marcato della concentrazione plasmatica di BCAA.

La struttura specifica dei tre aminoacidi leucina, isoleucina e valina, è caratterizzata dalla presenza di un gruppo isobutile rispettivamente su carbonio b e c dei primi due, e da un gruppo isopropilico ramificato sul carbonio b della valina (Figura 8).

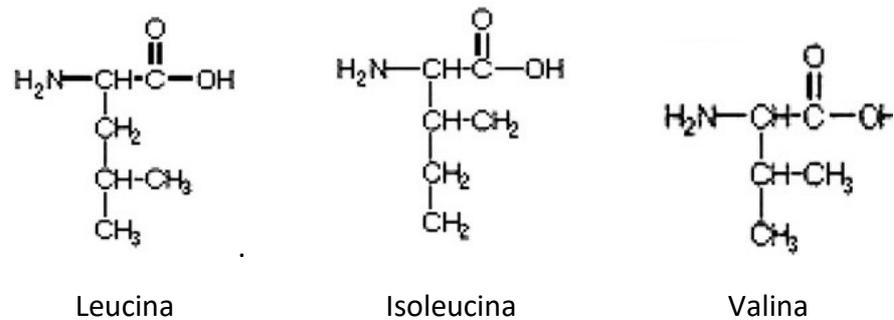


Figura 8. Aminoacidi a catena ramificata

Il metabolismo dei BCAA può essere suddiviso in due fasi principali, di cui la prima consiste in una reazione di transaminazione reversibile catalizzata dall'enzima aminotransferasi a catena ramificata (BCAT) che porta alla formazione dei rispettivi α -chetoacidi a catena ramificata (BCKA).

La reversibilità di questo passaggio implica che i BCAA possono essere trasformati nei loro BCKA affini o sintetizzati da essi grazie alla presenza della coppia α -chetoglutarato/glutammato durante la reazione. La direzione della reazione propende verso la formazione dei BCKA, l' α -chetoglutarato riceve il gruppo amminico dei BCAA e si forma il glutammato. Allo stesso tempo, L-leucina produce α -chetoisocaproato (KIC), mentre L-isoleucina l' α -cheto- β -metilglutarato (KIM) e la valina l' α -chetoisovalerato (KIV). La reazione inversa invece, è catalizzata da BCAT e porta alla formazione dei BCAA e α -chetoglutarato che ricevono il gruppo amminico del glutammato.

Nella seconda fase, avviene la decarbossilazione ossidativa dei BCKA da parte del complesso chetoacido deidrogenasi a catena ramificata (BCKD), un enzima della membrana mitocondriale interna. Questo passaggio è irreversibile ed impegna i BCKA all'ossidazione, producendo NADH, CO₂ e diversi prodotti finali a seconda dei BCKA

ossidati. La leucina produce acetoacetato e acetil-CoA, l'isoleucina produce propinil-CoA ed acetil-CoA, ed il prodotto finale del catabolismo della valina è propinil-CoA che viene successivamente convertito in metilmalonil-CoA e succinil-CoA (Figura 9).

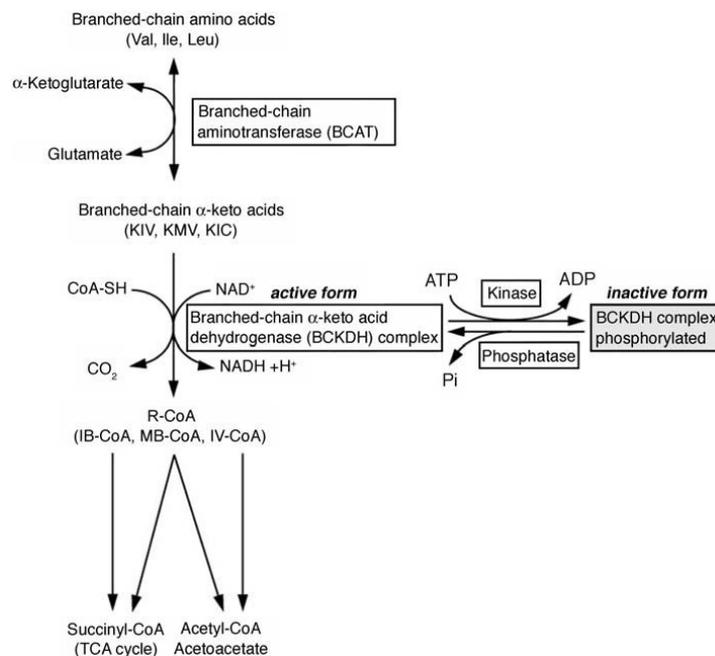


Figura 9. Metabolismo dei BCAA [8].

BCAT ed il complesso BCKD sono ampiamente espressi nei tessuti umani, indicando un'ampia capacità di quest'ultimi per la transaminazione e l'ossidazione dei BCAA.

Nei soggetti sani, l'insulina sopprime l'ossidazione della leucina, effetto che si ottiene anche in condizioni di diabete mellito, mentre al contrario, viene attivata dal glucagone, dalla terapia con glucocorticosteroidi e dall'acidosi metabolica indotta dal cloruro di ammonio.

In risposta ad un pasto ricco di proteine animali, i livelli ematici di BCAA aumentano significativamente più dei BCKA, quindi vengono rimossi dal tessuto muscolare.

Al contrario, nello stato di post-assorbimento, si ha un netto rilascio di aminoacidi dal muscolo scheletrico, con il maggior contributo dato da alanina e glutammina, la cui sintesi è ottenuta grazie all'azoto proveniente dalla deaminazione dei BCAA.

Inoltre, il metabolismo dei BCAA è stato costantemente osservato alterato in associazione alla carenza di insulina o alla resistenza dei tessuti all'azione dell'ormone, come avviene in disturbi quali obesità, diabete mellito ed in altri stati insulino-resistenti come la disfunzione renale ed epatica. In soggetti sani, l'ingestione di un pasto a base di carne o la somministrazione orale di leucina aumentano i livelli sierici di insulina, forse attraverso l'azione della L-leucina come modulatore allosterico positivo del glutammato deidrogenasi. A sua volta l'insulina abbassa il contenuto di glucosio e aminoacidi nel plasma, in particolare BCAA, tirosina, fenilalanina e metionina, nel periodo postprandiale, facilitando il loro ingresso nei tessuti periferici, muscoli compresi.

Nello stato di post-assorbimento, l'insulina inibisce la degradazione delle proteine muscolari in quanto il tasso di proteolisi netta è inversamente proporzionale al livello dell'ormone stesso, e ciò favorisce la liberazione di solo una piccola quantità di BCAA. Stessa cosa si verifica durante l'infusione di insulina esogena ad individui sani nello stesso stato, che causa consistenti cali nel rilascio muscolare di BCAA, tirosina, fenilalanina, treonina e glicina, mentre quello di alanina non viene significativamente influenzato.

Nel diabete mellito vi è un aumento marcato della concentrazione plasmatica di BCAA rispetto agli individui sani, in particolare modo nei pazienti con un controllo carente della malattia, tuttavia tale condizione può essere prontamente migliorata intraprendendo una terapia insulinica che ne porta alla normalizzazione dei livelli plasmatici.

Infine, uno studio caso-controllo annidato eseguito nel Framingham Offspring Study mostra che i BCAA e due aminoacidi aromatici (tirosina e fenilalanina) hanno un'associazione altamente significativa con il futuro diabete, mostrando un valore predittivo per lo sviluppo del diabete di nuova insorgenza fino a 12 anni dopo l'esame di riferimento (Wang et al. 2011) [9].

Capitolo 3

Modelli matematici basati sulla cinetica degli aminoacidi coinvolti nella secrezione insulinica

3.1 Analisi interattiva della rete di aminoacidi plasmatici in un modello murino in stato iperglicemico

Gli aminoacidi svolgono diversi ruoli all'interno dell'organismo umano tali da renderli dei veri e propri centri metabolici altamente collegati e ciò ha favorito quindi lo sviluppo di studi interattivi utili alla comprensione della patogenesi ed alla diagnosi precoce del diabete mellito.

Nello studio di seguito riportato, sono stati utilizzati i dati del decorso temporale dei campioni di plasma dei topi AKITA che sviluppano l'iperglicemia.

Prima di tutto, sono stati analizzati i profili degli aminoacidi più coinvolti nella patologia diabetica che sono risultati essere l'alanina, la glicina, la leucina, l'isoleucina e la valina. Successivamente è stata dedotta la struttura della rete interattiva che riproduce l'andamento temporale effettivo entro un margine di errore del 10%, utilizzando un modello S-system che consiste in un modello matematico concettuale per l'analisi e la simulazione delle reti.

Viene quindi posta l'attenzione sulle interazioni alterate degli aminoacidi plasmatici che mostrano caratteristiche stabilizzanti e destabilizzanti in una varietà di contesti clinici.

In seguito, eseguendo un'analisi di sensibilità, sono state selezionate le relazioni più dominanti della rete le quali sono risultate essere il percorso dalla glicina all'isoleucina nel controllo sano, ed il percorso dall'alanina alla glicina nello stato iperglicemico. Tuttavia, le quantità dei metaboliti nei fluidi biologici e nei tessuti variano in coordinazione con le condizioni fisiologiche dei soggetti.

Questo approccio di modellazione interattiva propone vari modelli di analisi di rete il cui vantaggio consiste nella comprensione delle interazioni tra componenti del sistema e nella deduzione della struttura di rete e della direzione dei componenti del sistema, senza considerare alcuna informazione topologica preliminare.

Sono stati sviluppati due modelli murini, uno in condizioni di iperglicemia Ins2 +/- ed uno in condizioni di salute Ins2 +/+.

Facendo un confronto tra i due, è emerso che le concentrazioni di isoleucina, leucina, valina, alanina, citrullina, fenilalanina, prolina ed istidina erano significativamente più elevate nello stato iperglicemico, mentre le concentrazioni di glicina, glutammina, glutammato ed asparagina erano significativamente inferiori. In particolare, isoleucina, leucina, valina, alanina e glicina, hanno mostrato correlazioni di prim'ordine con la glicemia.

In Ins2 +/+ le concentrazioni di alanina, leucina, isoleucina e valina sono oscillate leggermente durante il periodo sperimentale, in particolare, nella terza settimana è stata osservata una diminuzione della concentrazione di glicina, ed entro la nona settimana la concentrazione era diminuita di 1/3 rispetto al periodo antecedente l'esperimento (*Figura 10 A*).

In Ins2 +/- le concentrazioni di alanina, leucina, isoleucina e valina sono oscillate leggermente e gradualmente sono aumentate più di quelle in Ins2 +/+ durante il percorso sperimentale. Nella terza settimana si è verificata la diminuzione della concentrazione di glicina, ed entro la nona settimana la concentrazione era diminuita di circa la metà rispetto a quella antecedente l'esperimento (*Figura 10 B*).

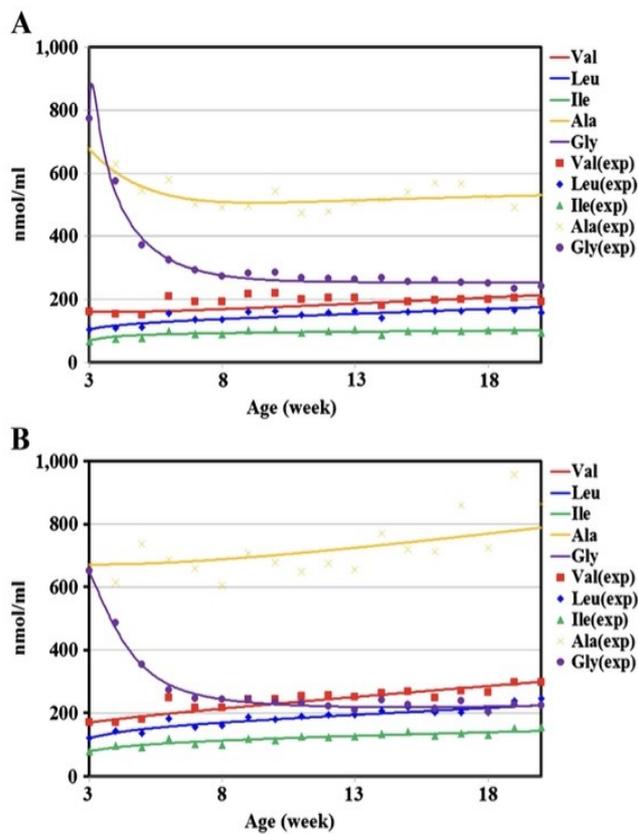


Figura 10. A) Indica Ins2 +/+ (sano); B) indica Ins2 +/- (iperglicemico).

Il modello S-system stima i meccanismi di interazione tra i componenti del sistema e permette di ricostruire le architetture di rete con gli andamenti temporali osservati sperimentalmente (3). Nella valutazione della struttura di rete viene preso in considerazione l'errore relativo medio tra il valore calcolato e quello sperimentale, e viene scelto il modello che presenta l'errore minore.

Per ogni componente della rete che è un aminoacido X_i , i parametri non negativi α_i e β_i determinano l'afflusso ed il deflusso relativi di X_i . I termini g_{ij} determinano l'effettività interattiva dell'aminoacido X_j all'aminoacido X_i g_{ij} rappresenta il coefficiente correlato di X_j alla sintesi di X_i . I termini h_{ii} determinano l'effettività interattiva dell'aminoacido X_i sull'aminoacido X_i ; h_{ii} rappresenta il coefficiente correlato di X_i alla degradazione di X_i . Il valore di altri h_{ii} ($i \neq j$) è stato assunto pari a 0 (3).

$$\frac{dx_i}{dt} = \alpha_i \prod_{j=1}^n x_j^{g_{ij}} - \beta_i \prod_{j=1}^n x_j^{h_{ij}} \quad (3)$$

Il numero di parametri stimato è $n \times (n+3)$, dove n è il numero di variabili di stato X_i corrispondenti ad ogni aminoacido della rete. La sensibilità di ciascun parametro viene valutata aggiungendo un errore del 5% al valore stimato dal parametro e quantificando la differenza che si genera nel tempo. Poiché l'errore medio per il modello di rete è inferiore all'errore analitico, si è ipotizzato che il modello riproducesse l'andamento temporale sperimentale all'interno dell'intervallo di errore consentito. È stato dimostrato che la concentrazione di isoleucina, leucina, valina, alanina e glicina è diversa in termini di variazioni longitudinali tra Ins2 +/+ e Ins2 +/-, il che porta a concludere che vi è una correlazione di prim'ordine tra glicemia e aminoacidi plasmatici.

Inoltre, dall'analisi è emerso che le interazioni dominanti sono state l'effetto positivo della glicina sull'isoleucina nell'Ins2 +/+ e l'effetto positivo dell'alanina sulla glicina nell'Ins2 +/- (Figura 11).

La prima si spiega in quanto un aumento dei BCAA, tra cui anche l'isoleucina, contribuisce ad aumentare la gluconeogenesi e quindi l'intolleranza al glucosio attraverso la transaminazione del piruvato in alanina che attiva il legame metabolico glicina-piruvato. Mentre l'effetto dell'alanina sulla glicina può essere spiegato dalla gluconeogenesi sovraregolata. La glicina infatti, viene sintetizzata dagli intermedi glicolitici tramite l'enzima 3-fosfoglicerato deidrogenasi, ed i cambiamenti nella gliceroneogenesi a causa di un aumento della domanda di glicerolo e gliceride per la sintesi dei trigliceridi, favorita dalla presenza di alanina, possono influenzare i livelli di glicina nella circolazione periferica e favorire l'attivazione del legame metabolico glicina-piruvato.

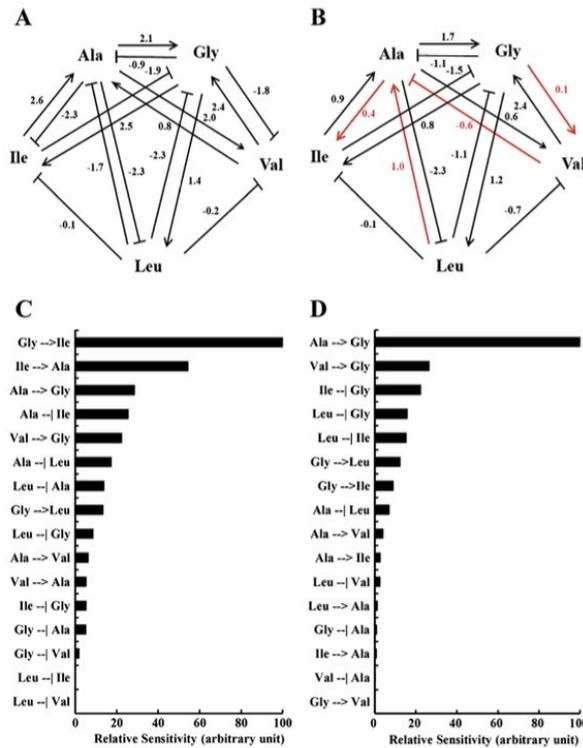


Figura 11. Modello della rete: A) Ins2 +/+; B) Ins2 +/- .

I cambiamenti degli aminoacidi possono essere quindi compresi come uno spostamento nel metabolismo proteico ed una gluconeogenesi sovraregolata indotta dalla risposta secretoria dell'insulina. Le interazioni determinate come dominanti dall'analisi dei sistemi e dall'analisi di sensibilità sono ben note relazioni interattive nella gliconeogenesi dunque, grazie a questo metodo analitico, si è riusciti a trovare gli importanti legami tra gli aminoacidi coinvolti nella patologia diabetica.

Nello studio, le variabili vengono espresse come media \pm errore standard della media. Per confrontare la variazione longitudinale, è stata eseguita un'analisi statistica utilizzando l'ANOVA a due vie e la correzione di Bonferroni è stata utilizzata per il test post hoc. Per valutare le correlazioni tra la glicemia e gli aminoacidi plasmatici, sono stati calcolati i coefficienti di Pearson. Per confrontare l'assunzione di cibo tra Ins2 +/+ e Ins2 +/-, è stata eseguita un'analisi statistica utilizzando il test t di Student. Nell'analisi interattiva della rete sono stati determinati prima i coefficienti interrelati tra gli aminoacidi e poi ogni percorso è stato sottoposto ad analisi di sensibilità per il suo

predominio nel mantenimento della struttura di rete. Per analizzare l'importanza di ciascun percorso interrelato nella rete stimata, è stata valutata la sensibilità di ciascun parametro nella rete. Se la sensibilità di un certo parametro è alta, allora il percorso corrispondente deve essere essenziale o rigido per realizzare i tempi osservati sperimentalmente.

Viene quindi aggiunta una perturbazione del 5% a ciascun coefficiente interrelato, g_{ij} o h_{ij} , nella rete e viene valutato l'errore quadratico relativo tra i dati dell'andamento temporale calcolato prima dell'aggiunta della perturbazione ed il risultato dopo l'aggiunta delle perturbazioni. La sensibilità viene quindi calcolata utilizzando (4):

$$S_{g_{ij}}(h_{ij}) = \sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^N \sum_{t=1}^T \left(\frac{PER_{d,i,t} - CAL_{d,i,t}}{CAL_{d,i,t}} \right)^2 \quad (4)$$

$CAL_{d,i,t}$ corrisponde all'andamento temporale prima di aggiungere una perturbazione del 5% al tempo t della variabile di stato X_i nel d -esimo set di dati, e $PER_{d,i,t}$ mostra i risultati dopo aver aggiunto la perturbazione. D è la quantità dei dati dell'andamento temporale, N è il numero di variabili e T è il numero di punti di campionamento in ogni andamento temporale [10].

3.2 Modello matematico del metabolismo degli aminoacidi e del glucosio in relazione alla secrezione di insulina

Nello studio di seguito proposto, vengono integrati dati sperimentali biologici con un modello matematico al fine di ottenere nuove informazioni sul ruolo svolto dalla L-alanina nella secrezione di insulina stimolata da aminoacidi e D-glucosio.

Viene presentato un modello cinetico semplificato basato su equazioni differenziali lineari dei principali processi metabolici che conducono alla produzione di ATP nelle β cellule pancreatiche, il tutto messo in relazione con la secrezione di insulina.

Per compiere tale analisi, è stata utilizzata una linea cellulare clonale di ratto secernente insulina (BRIN-BD11) con l'intento di misurare il consumo o la produzione di una serie di parametri biochimici. La modellazione matematica è stata utilizzata per prevedere la concentrazione di L-lattato ed L-glutammato in seguito a stimolazione con D-glucosio/L-alanina.

I dati sperimentali rilevati e la simulazione del modello, suggeriscono che la L-alanina produce un potente effetto insulintropico attraverso un impatto stimolatore sul metabolismo delle cellule β .

Gli aminoacidi sono infatti una classe significativa di modulatori della secrezione di insulina in quanto ottenuti da proteine alimentari e rilasciati dalle cellule epiteliali intestinali. Le cellule β pancreatiche esprimono una gamma di trasportatori di aminoacidi specifici, come i sistemi A, ASC ed L, che ne consentono un rapido assorbimento.

In particolare, una miscela di concentrazioni fisiologiche di aminoacidi (0.1-0.2 mmol/l) o alte concentrazioni di singoli aminoacidi (10-20 mmol/l), modulano in modo acuto o cronico la secrezione di insulina sia in vivo che in vitro mediante diverse vie. Una prima via, consiste nella depolarizzazione diretta della membrana plasmatica tramite il trasporto di aminoacidi carichi positivamente. Poi si ha il metabolismo attraverso l'attivazione e l'amplificazione delle vie legate al ciclo dell'acido tricarbossilico TCA (L-glutammina, L-leucina ed L-alanina). Infine la depolarizzazione della membrana plasmatica indotta dal co-trasporto di Na^+ (L-alanina e L-prolina).

Il modello proposto riguarda la rete metabolica centrale che porta alla produzione di ATP (*Figura 12*).

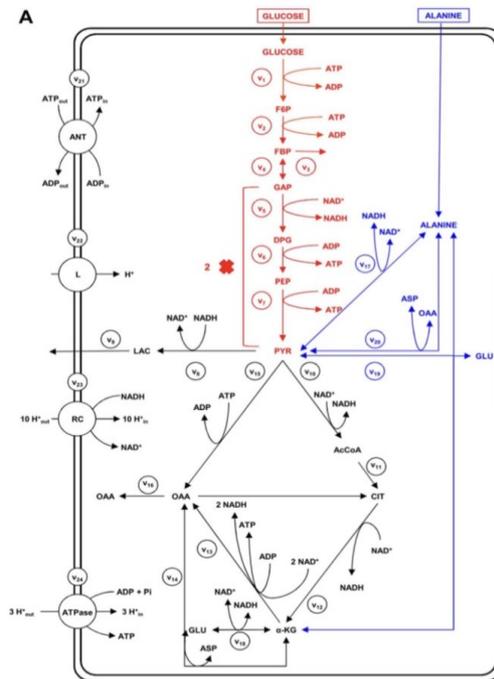


Figura 12. Diagramma schematico del processo metabolico del modello

Attraverso un'accurata procedura sperimentale sono state trovate curve dose-risposta di stimolo acuto sia singole (D-glucosio o L-alanina) che combinate (D-glucosio + L-alanina).

Le simulazioni sono state eseguite fino al raggiungimento dello stato stazionario e tutti i risultati sperimentali presentati sono stati registrati dopo 20 minuti di incubazione con i dovuti stimoli d'interesse riguardanti i possibili effetti di accoppiamento stimolo metabolico.

L'effetto del D-glucosio e della L-alanina sull'integrità delle cellule BRIN-BD11 è stata studiata mediante saggio del rosso neutro dopo 1h di incubazione in Krebs Ringer Bicarbonate Buffer (KRBB) integrato con varie concentrazioni di D-glucosio (0-30 mmol/l) in presenza o assenza di 10 mmol/l L-alanina o diverse concentrazioni di L-alanina (0-10 mmol/l) con o senza integrazione di 16,7 mmol/l di D-glucosio. La concentrazione di insulina era dipendente dal solo D-glucosio, aumentando

nell'intervallo da 1,1 mmol/l a 30 mmol/l da 0.48 ± 0.09 ng/(mg proteine 20 min) a 0.83 ± 0.08 ng/(mg proteine 20 min)($P < 0.01$). La somministrazione di L-alanina ha mostrato solo una robusta secrezione di insulina dose-dipendente, aumentando da 1.18 ± 0.11 ng/(mg proteina 20 min) a 2.43 ± 0.09 ng/(mg proteina 20 min)($P < 0.001$) nell'intervallo 0.5 mmol/l a 10 mmol/l. Gli effetti insulinotropici combinati di L-alanina e D-glucosio non sono banali: l'aggiunta di 10 mmol/l di L-alanina a 1,1-30 mmol/l di D-glucosio non ha comportato solo una secrezione di insulina additiva, ma piuttosto un aumento sinergico ($P < 0.001$) in GSIS (meccanismo di secrezione di insulina stimolata dal D-glucosio) (2.99 ± 0.13 ng/(mg proteina 20 min) e 3.47 ± 0.09 ng/(mg proteina 20 min) a 1.1 e 30 mmol/l rispettivamente. Allo stesso modo l'aggiunta di D-glucosio sia a concentrazioni basali (1,1 mmol/l) che stimolatori (16,7mmol/l) a 0,5-10 mmol/l di L-alanina ha portato ad un aumento significativo ($P < 0.001$) della secrezione di insulina (Figura 13).

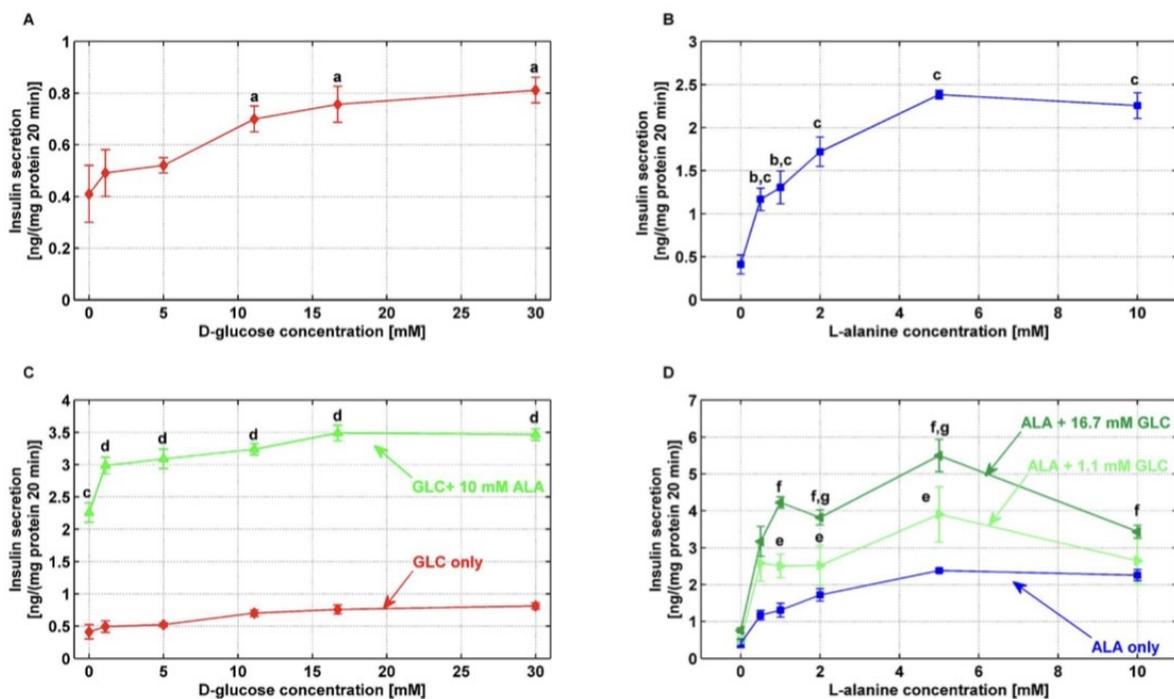


Figura 13. Effetti del D-glucosio e L-alanina nella secrezione acuta di insulina.

Essendo l'aumento della concentrazione di ATP il principale evento scatenante nella via K⁺ATP-dipendente della secrezione di insulina indotta da nutrienti, è stato costruito un modello matematico semplificato per la produzione di essa, che ne possa riprodurre i dati sperimentali in seguito alla stimolazione con D-glucosio e/o L-alanina.

Il consumo di D-glucosio è aumentato in modo dose-dipendente rispetto al D-glucosio nell'intervallo (1.1-30 mmol/l) da $0.17 \pm 0.29 \mu\text{mol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$ a $3.10 \pm 0.49 \mu\text{mol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$. Analogamente, il consumo di L-alanina ha mostrato un aumento dose-risposta da $0.18 \pm 0.13 \mu\text{mol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$ a $1.33 \pm 0.09 \mu\text{mol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$ nell'intervallo 0.5-10 mmol/l L-alanina. L'aggiunta di 10 mmol/l di L-alanina al D-glucosio ha aumentato il consumo di D-glucosio ($P < 0.001$) mentre il consumo di L-alanina è stato trovato non influenzato dalla presenza di D-glucosio sia a livello basale (1.1 mmol/l) che stimolante (16.7 mmol/l). Le variazioni sperimentali della concentrazione di ATP ottenute in un periodo di incubazione di 20 minuti sono state trovate dose-dipendenti rispetto al D-glucosio: aumentando il D-glucosio nell'intervallo da 1.1 mmol/l a 30 mmol/l aumenta il contenuto di ATP da $2.02 \pm 0.19 \text{ nmol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$ a $(2.52 \pm 0.09) \text{ nmol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$. L'aggiunta di 10 mmol/l di alanina ha leggermente aumentato la produzione di ATP rispetto al solo D-glucosio. La L-alanina somministrata da sola ha portato ad una produzione di ATP di $2.23 \pm 0.13 \text{ nmol}/(\text{mg proteine } 20 \text{ min})$, paragonabile al valore raggiunto con concentrazioni stimolanti di D-glucosio [11](Figura 14) .

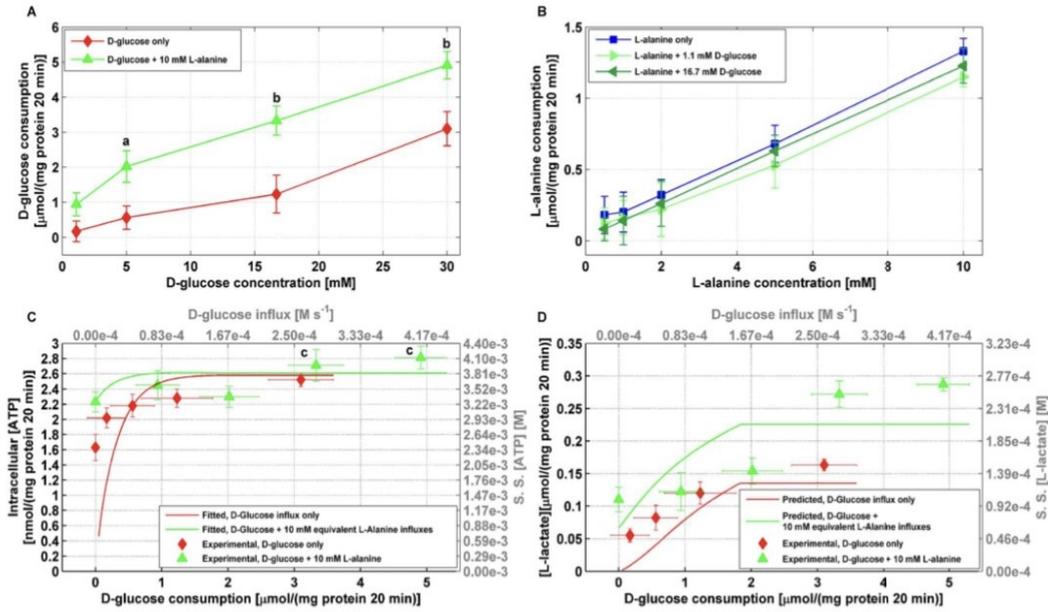


Figura 14. Effetti del D-glucosio e del L-alanina nella produzione di ATP e L-lattato.

Per stimare i flussi in ingresso al modello, corrispondenti all'intervallo di concentrazioni di D-glucosio ed L-alanina somministrati negli esperimenti, sono stati eseguiti saggi di consumo di stimoli. Al fine di adattare le concentrazioni di ATP allo stato stazionario computazionale alle osservazioni sperimentali, è stato utilizzato un criterio di ottimizzazione dei minimi quadrati per regolare un sottoinsieme di parametri cinetici. La procedura di ottimizzazione è stata impostata per ridurre al minimo la funzione obiettivo data dalla somma sulle n osservazioni di ATP della differenza normalizzata al quadrato su dati sperimentali di ATP (y_{exp_i}) e concentrazioni di ATP simulate allo stato stazionario (y_{sim_i}) (5).

$$\text{cost}_{\text{model}_1} = \sum_{i=1}^n \left(\frac{y_{exp_i} - y_{sim_i}}{y_{exp_i}} \right)^2 \quad (5)$$

I modelli sono stati convalidati rispetto alle osservazioni in vitro sulla linea cellulare BRIN-BD11 utilizzando il flusso illustrato. Le osservazioni di ATP intracellulare totale hanno mostrato una risposta dose-dipendente rispetto al D-glucosio che è stata ulteriormente potenziata dall'aggiunta di 10 mmol/l di L-alanina. I parametri cinetici chiave (V_{1max} , K_{1ATP} , V_{5max} , K_{5GAP} , k_{8f} , k_{10f} , k_{ANT} , b e K) sono stati adattati utilizzando un criterio dei minimi quadrati per far corrispondere il modello ai risultati sperimentali dell'ATP. Le simulazioni eseguite sul modello parametrizzato hanno dimostrato un sostanziale aumento della concentrazione allo stato stazionario di L-glutammato quando è stato applicato l'afflusso di L-alanina e ancor di più se è stato applicato in combinazione con l'afflusso di D-glucosio. L-glutammato è quindi stato proposto come fattore di accoppiamento stimolazione-secrezione nella via di amplificazione della secrezione di insulina.

L-alanina è risultata essere particolarmente efficace nell'indurre la secrezione di insulina attraverso tre meccanismi d'azione indipendenti e complementari. Inoltre, essa viene metabolizzata ad alti tassi e, quindi, può portare una cospicua produzione di ATP con conseguente secrezione di insulina attraverso la via di attivazione dipendente da K^+ ATP. Le simulazioni effettuate sul modello suggeriscono che la L-alanina è anche la fonte di putativi messaggeri stimolo-secrezione di derivazione metabolica nella secrezione di insulina, come L-glutammato e citrato. In sintesi, la L-alanina potrebbe essere sfruttata per futuri studi sui meccanismi di potenti agenti insulintropici, poiché la sua azione è robusta, affidabile e controllabile.

Il modello metabolico di base utilizzato nello studio include la glicolisi, il ciclo TCA, le reazioni correlate alla L-alanina, la catena respiratoria ed il meccanismo di sintesi dell'ATP basato sul lavoro di Nielsen per la via glicolitica e Mazat per il metabolismo mitocondriale. Le reazioni enzimatiche sono modellate utilizzando l'azione di massa o la cinetica di Michaelis-Menten e sono basate sugli studi originali e adottate con piccole modifiche per rappresentare le cellule β pancreatiche.

Sono state incluse cinque reazioni aggiuntive per tener conto della L-alanina e sono (6):



- 3) α - chetoglutarato + L - alanina = Piruvato + L - glutammato
 4) Ossalacetato + L - glutammato = α - chetoglutarato + L - aspartato
 5) Piruvato + L - aspartato = L - alanina + Ossalacetato
- (6)

Le reazioni specifiche dell'L-alanina possono essere modellate come cinetica di massa reversibile (7),(8):



$$\frac{d[Z]}{dt} = k_f \left(XY - \frac{ZW}{K_{eq}} \right) \quad \text{con} \quad K_{eq} = \frac{Z_{eq}W_{eq}}{X_{eq}Y_{eq}} \quad (8)$$

Dove k_f rappresenta la velocità di reazione diretta, K_{eq} la costante di equilibrio della reazione, mentre $Z_{eq}W_{eq}$ e $X_{eq}Y_{eq}$ sono le concentrazioni di equilibrio rispettivamente dei prodotti e dei reagenti.

È stato preso in considerazione che le specie citosoliche sono trasportate istantaneamente attraverso la membrana mitocondriale e si presume che i loro relativi trasportatori operino in una ragione lontana dalla saturazione.

Il modello descrive la dinamica di 18 variabili di stato per il glucosio GLC, fruttosio 6-fosfato F6P, fruttosio 1,6-fosfato FBP, gliceraldeide 3-fosfato GAP, 1,3-bifosfoglicerato DPG, fosfoenolo piruvato PEP, piruvato PYR, L-lattato LAC, acetil coenzima A AcCoA, ossalacetato OAA, citrato CIT, α -chetoglutarato α KG, L-glutammato GLU, L-aspartato ASP, L-alanina ALA ed il potenziale di membrana mitocondriale (DW) [11].

Il sistema di equazioni ordinarie risultante è (9):

1. $\frac{d[GLC]}{dt} = GLC_{in} - v_1$
2. $\frac{d[F6P]}{dt} = v_1 - v_2$

3. $\frac{d[FBP]}{dt} = v_2 - v_3 - v_4$
4. $\frac{d[GAP]}{dt} = 2v_4 - v_5$
5. $\frac{d[DPG]}{dt} = v_5 - v_6$
6. $\frac{d[PEP]}{dt} = v_6 - v_7$
7. $\frac{d[PYR]}{dt} = v_7 - v_8 - v_{10} - v_{15} + v_{17} + v_{19} - v_{20}$
8. $\frac{d[LAC]}{dt} = v_8 - v_9$
9. $\frac{d[AcCoA]}{dt} = v_{11} - v_{12}$
10. $\frac{d[OAA]}{dt} = -v_{11} + v_{13} - v_{14} + v_{15} - v_{16} + v_{20}$
11. $\frac{d[\alpha-KG]}{dt} = v_{12} - v_{13} + v_{14} - v_{18} - v_{19}$
12. $\frac{d[GLU]}{dt} = -v_{14} + v_{18} + v_{19}$
13. $\frac{d[ASP]}{dt} = v_{14} - v_{20}$
14. $\frac{d[ATP]}{dt} = -v_1 - v_2 + v_6 + v_7 + v_{13} - v_{15} - v_{ANT} + v_{ATP}$
15. $\frac{d[NAD]}{dt} = -v_5 + v_8 - v_{10} - v_{12} - 2v_{13} - v_{17} + v_{18} + v_{resp}$
16. $\frac{d[ALA]}{dt} = ALA_{in} - v_{17} - v_{19} + v_{20}$
17. $\frac{d\Delta\phi}{dt} = \frac{1}{C_m} (10v_{resp} - 3v_{ATP} - v_{leak} - v_{ANT})$

(9)

Capitolo 4

Generazione di un data-set sintetico per lo studio della cinetica degli aminoacidi con modelli matematici durante test di tolleranza al glucosio con pasto misto

4.1 Tecniche di generazione di data set sintetici

I data set sintetici sono set di dati realistici che simulano e mantengono le stesse proprietà statistiche dell'informazione reale. Esistono svariate tecniche per la loro generazione, dalle più tradizionali basate ad esempio su metodo Monte Carlo e Latin Hypercube sampling, alle più recenti strutturate su tecniche di machine learning, ed in particolare di deep learning, come il metodo autoencoder variazionale (VAE) e la rete antagonista generativa (GAE).

Il metodo Monte Carlo seleziona in modo casuale un valore dalla distribuzione definita di ciascuna ipotesi, in particolare viene prodotto un numero N sufficientemente elevato di combinazioni che possono assumere le variabili d'ingresso e da cui si calcola il relativo output in base alle equazioni del modello. Per costruire ciascuna delle N combinazioni, viene generato casualmente un valore per ogni variabile di input, in accordo con la distribuzione di probabilità scelta. Ripetendo N volte tale procedimento si ottengono N valori indipendenti i quali rappresentano un campione dei possibili valori assumibili che verranno poi analizzati con dovute tecniche statistiche. All'aumentare del numero di iterazioni si ha una maggior convergenza dei risultati ottenibili verso valori più esatti e conformi.

Il Latin Hypercube sampling invece, seleziona i valori in modo casuale e li distribuisce omogeneamente nella distribuzione definita per ciascuna ipotesi. Una volta eseguito un singolo campionamento per ciascun segmento, il processo viene ripetuto fino al termine della simulazione. Questo tipo di campionamento necessita di un numero di prove minore per ottenere lo stesso livello di precisione del metodo Monte Carlo ma ha un costo più elevato in quanto richiede maggiore quantità di memoria.

Le tecniche più innovative basate invece su modelli di machine learning, utilizzano un set di dati reali per allenare un sistema di intelligenza artificiale istruito ad individuare le

correlazioni e le metriche statistiche del data set originale per generarne uno ex novo che ne mantenga la stessa distribuzione. Ciò consente di creare un grande volume di dati da campioni autentici in un breve lasso di tempo.

Il VAE è appunto un modello di apprendimento automatico non supervisionato che fa uso di codificatori e decodificatori. Il GAN invece, è costituito da due reti che competono tra loro di cui una è il generatore, responsabile della generazione di dati sintetici, mentre l'altra è il discriminatore che opera confrontando i dati generati con un data set reale e cerca di determinare quali dati sono falsi informando il generatore che apporterà le dovute modifiche rendendo così i dati stessi sempre più realistici.

I data set sintetici possono solo replicare le proprietà specifiche dei dati reali ma tuttavia presentano numerosi vantaggi come essere svincolati da norme sulla privacy, simulare condizioni non ancora verificatesi e sono mediamente più economici rispetto all'acquisizione di dati reali e per questo sempre più utilizzati in vari ambiti di ricerca.

4.2 Metodi

Partendo da uno studio trasversale condotto su partecipanti con T1D e T2D di cui era nota la durata del diabete inferiore ad un anno, e controllo della tolleranza al glucosio aventi età, sesso e body mass index (BMI) simile, denominate CON-T2D e CON-T1D, è stato generato un data set sintetico per lo studio della cinetica degli aminoacidi.

Le curve presenti nello studio riguardanti gli andamenti delle concentrazioni di BCAA, isoleucina, leucina e valina, dei pazienti con T1D, T2D, CON-T1D e CON-T2D sono caratterizzate da 6 punti specifici in corrispondenza di istanti temporali ben determinati, per $t=0$ e dopo 30,60,90,120 e 180 minuti.

Ottenute le tre serie temporali relative alla media e alle deviazioni standard delle concentrazioni aminoacidiche, il ciclo è stato iterato più volte fornendo così una serie di

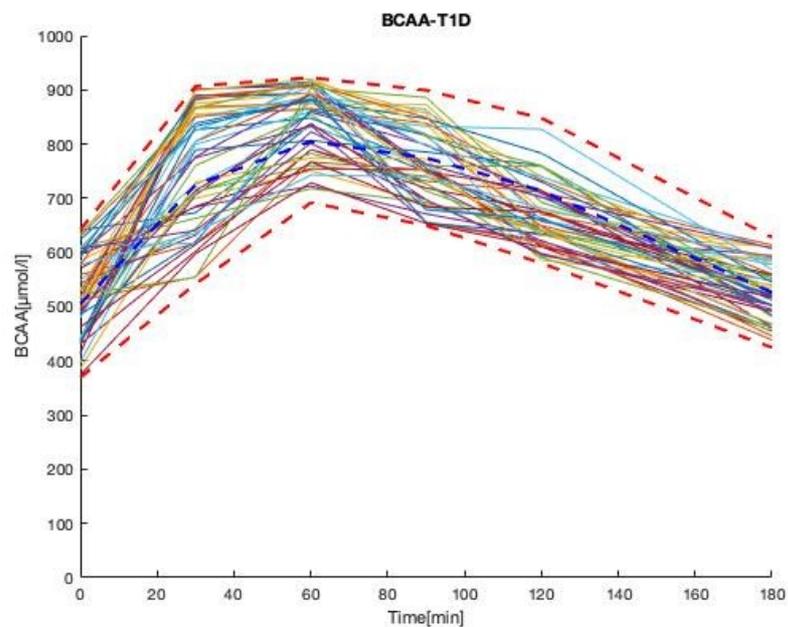
50 campioni virtuali per ciascuna popolazione di T1D, T2D e CON-T2D e 15 campioni per la popolazione CON-T1D, contenute all'interno di specifici intervalli.

Tale set di pazienti virtuali infatti, è stato ottenuto generando in maniera random valori di concentrazione per ogni istante temporale come appartenenti ad una distribuzione gaussiana con media e deviazione standard pari a quelli riportati nello studio [12].

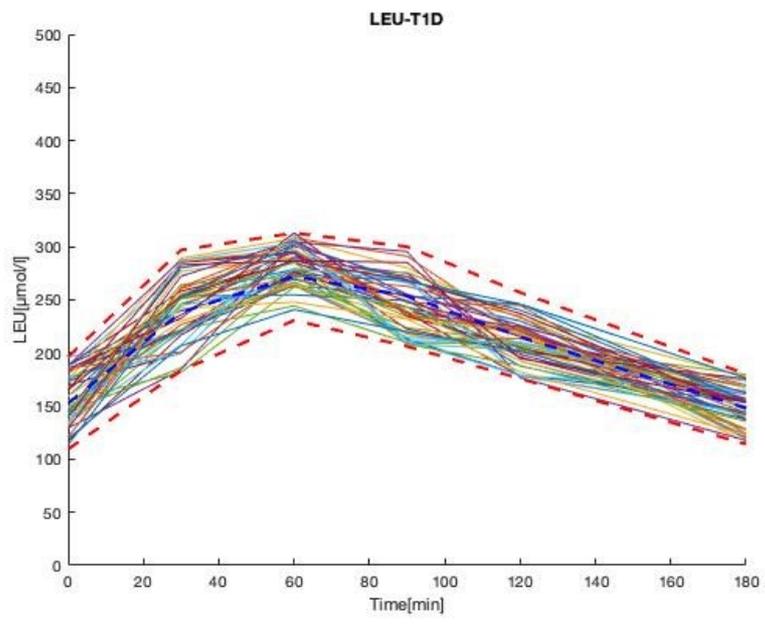
4.3 Risultati

I risultati conseguiti sono mostrati attraverso i sottostanti grafici i quali sono relativi sia ai pazienti con T1D (*Figura 15*) e T2D (*Figura 16*) che a quelli in controllo CON-T2D (*Figura 17*) e CON-T1D (*Figura 18*).

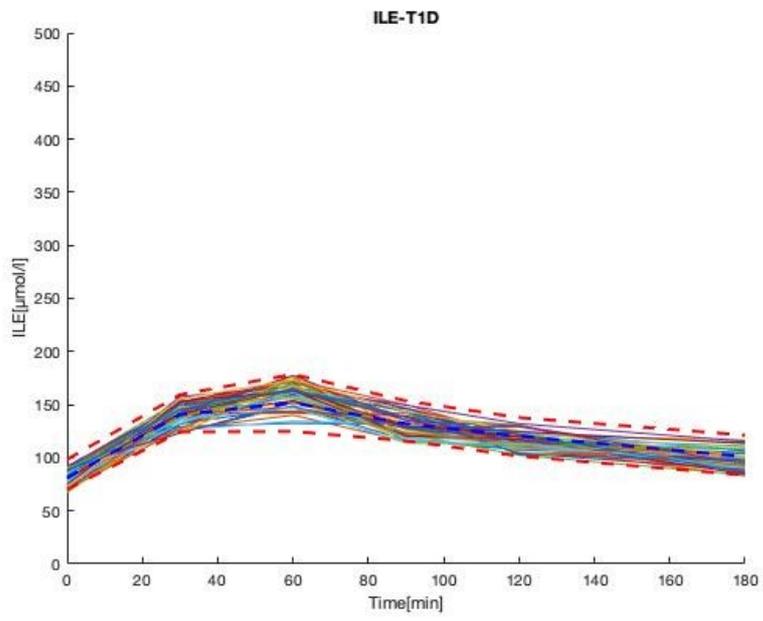
A



B



C



D

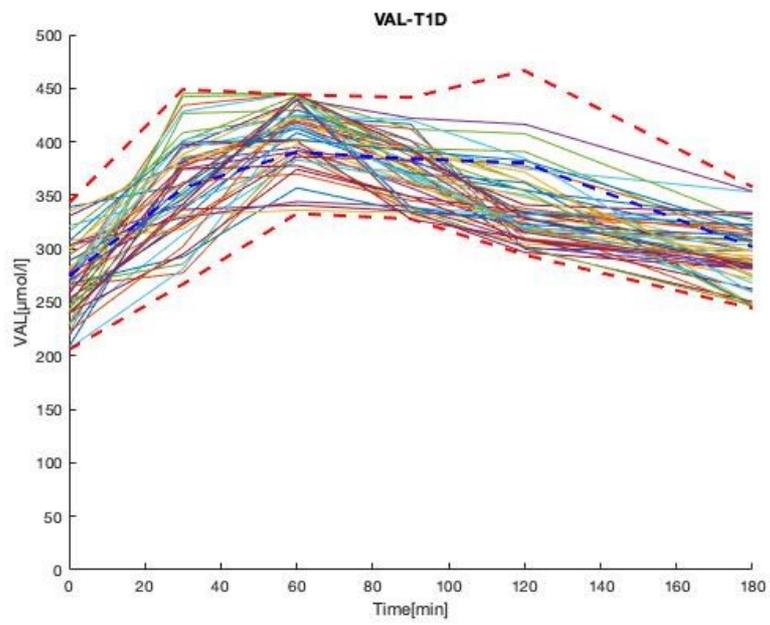
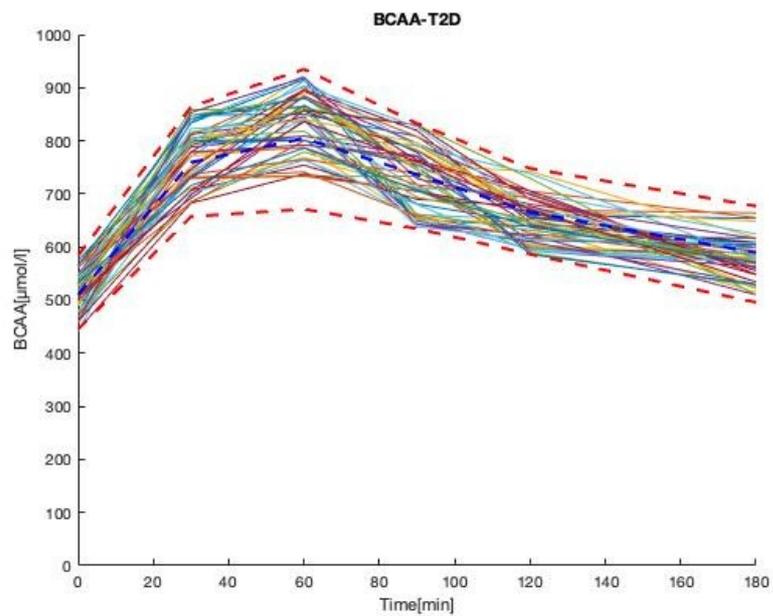
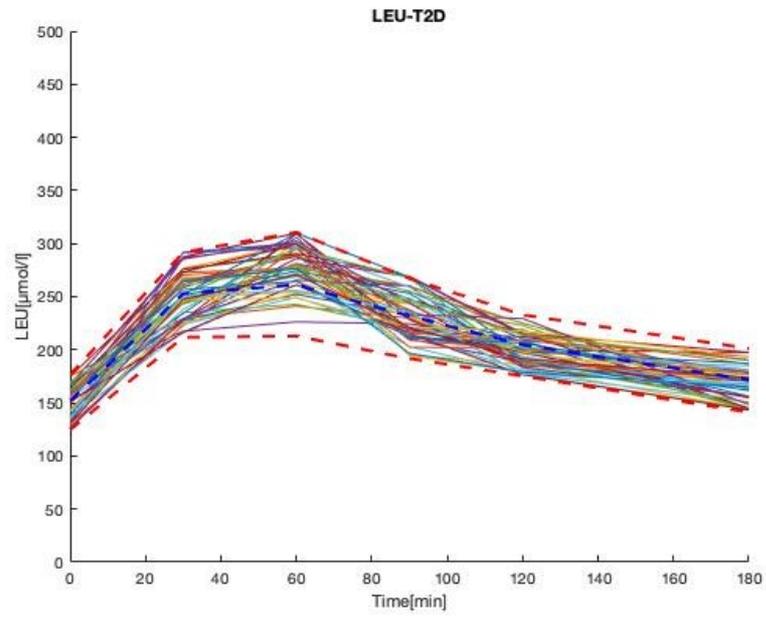


Figura 15. Grafici relativi alle concentrazioni di aminoacidi in pazienti con T1D. (A) BCAA. (B) Leucina. (C) Isoleucina. (D) Valina.

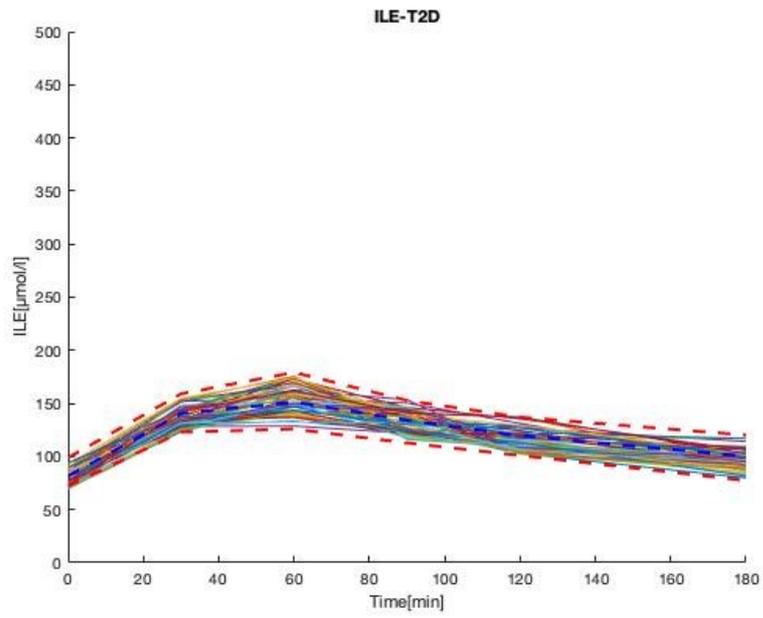
A



B



C



D

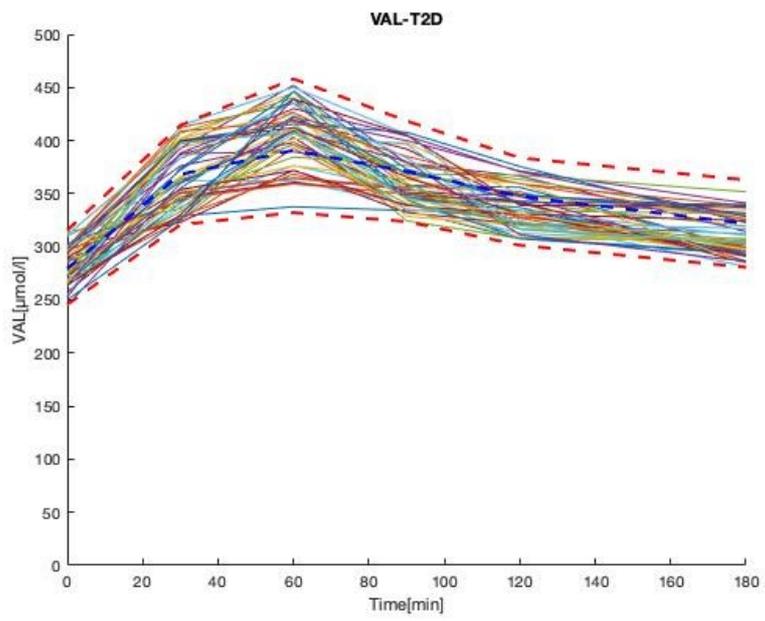
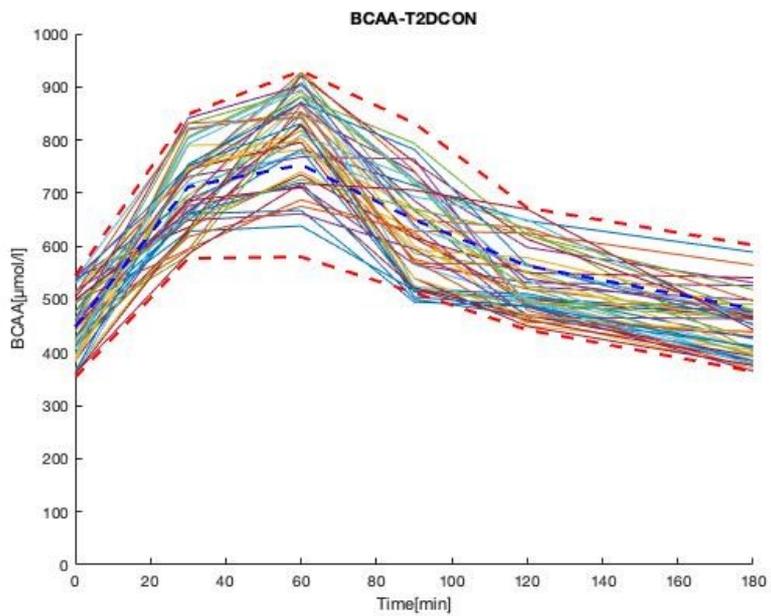
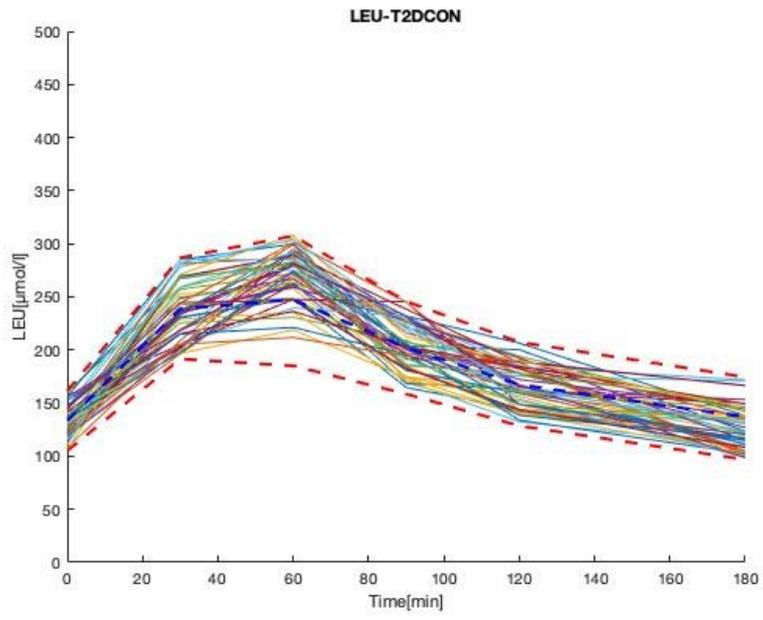


Figura 16. Grafici relativi alle concentrazioni di aminoacidi in pazienti con T2D. (A) BCAA. (B) Leucina. (C) Isoleucina. (D) Valina.

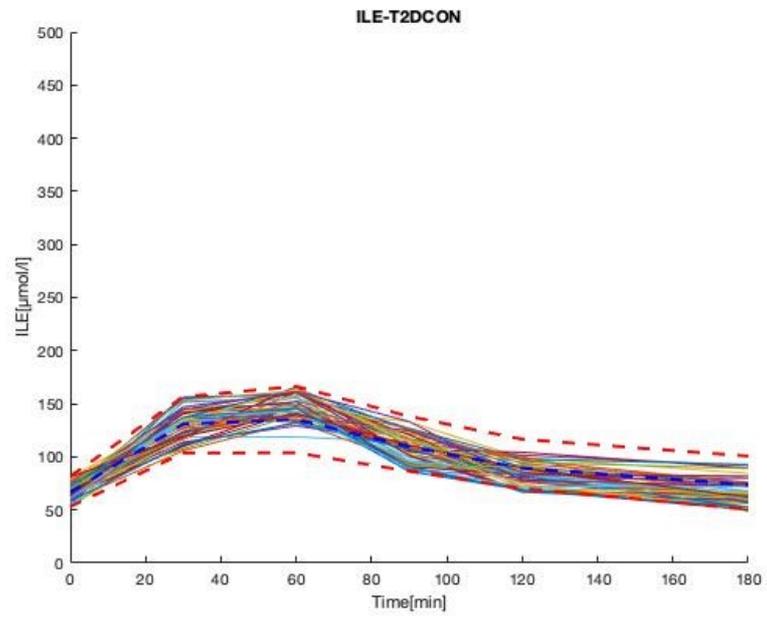
A



B



C



D

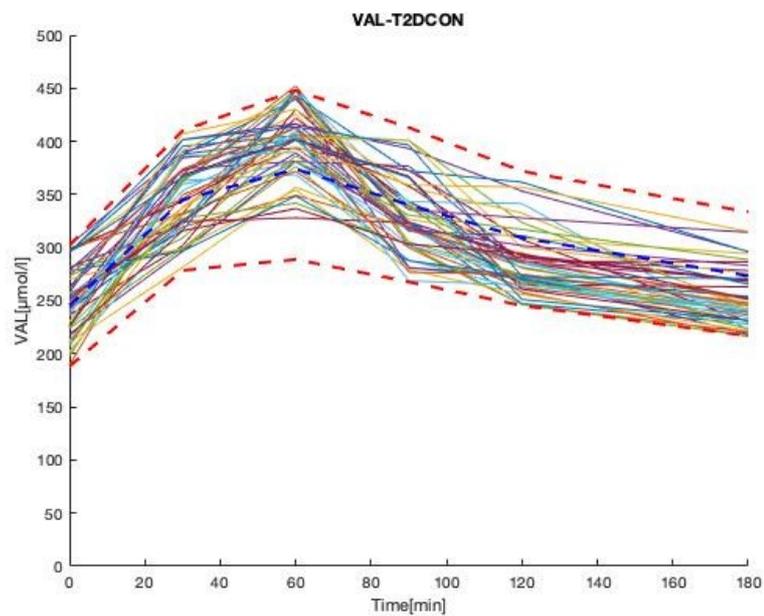
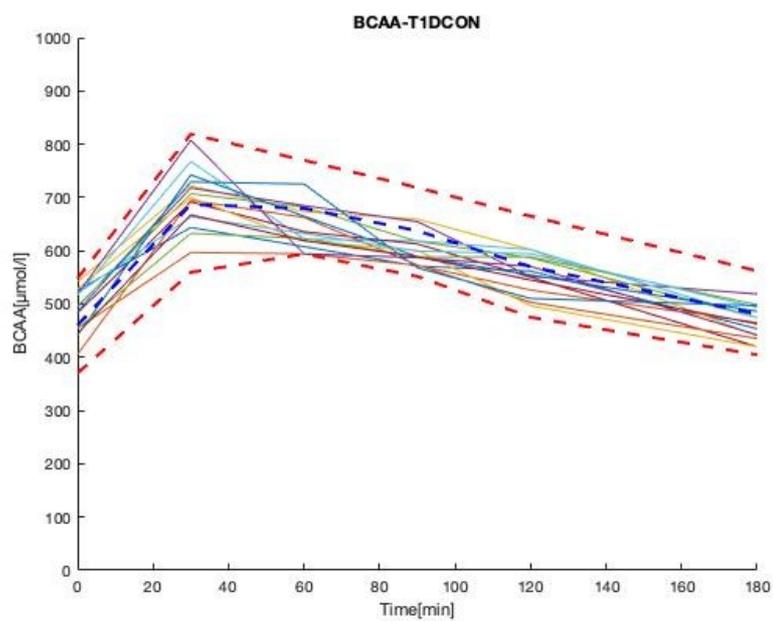
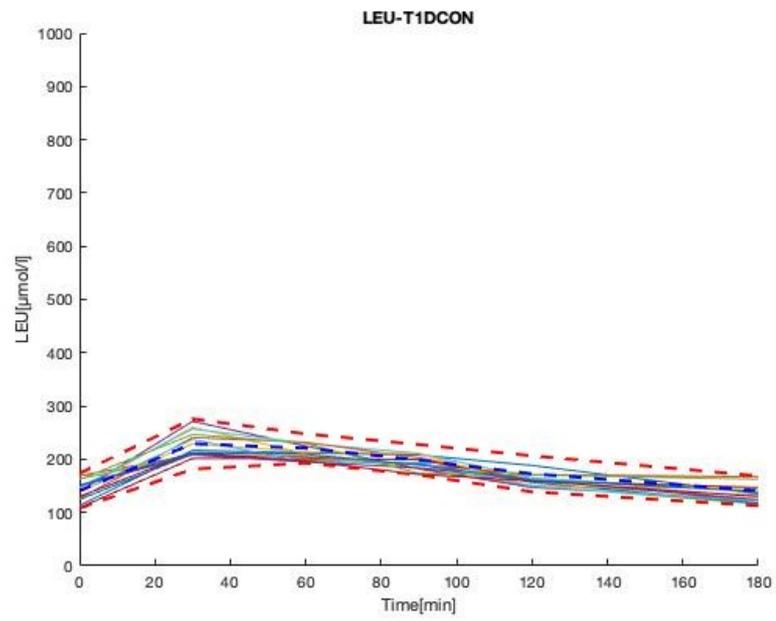


Figura 17. Grafici relativi alle concentrazioni di aminoacidi in pazienti in CON-T2D. (A)BCAA. (B) Leucina. (C) Isoleucina. (D) Valina.

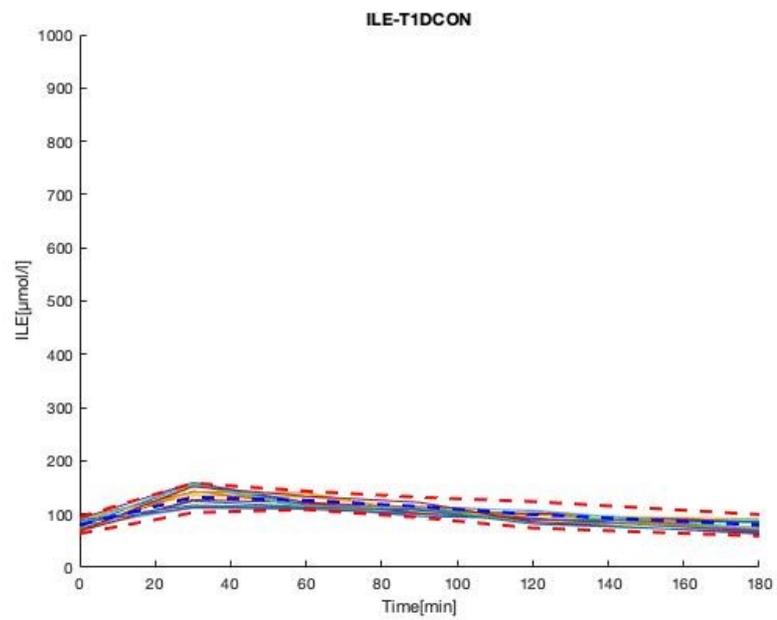
A



B



C



D

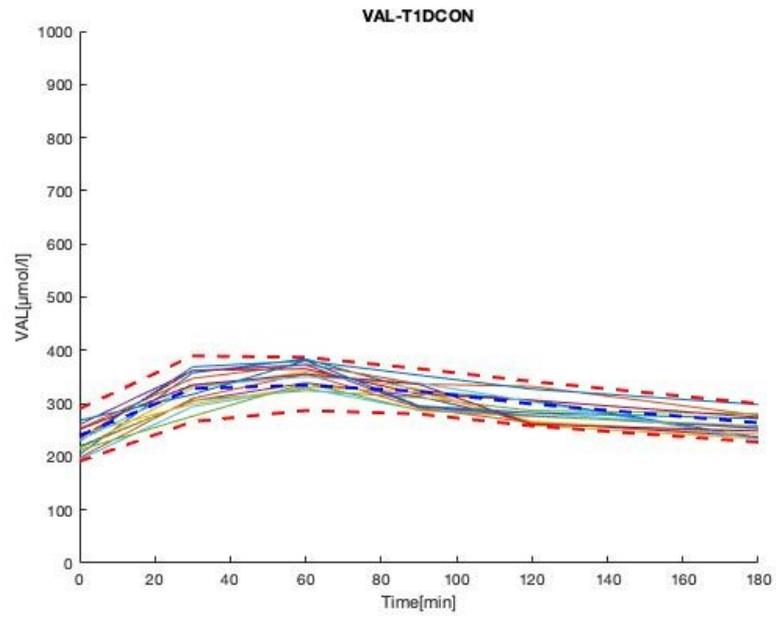


Figura 18. Grafici relativi alle concentrazioni di aminoacidi in pazienti in CON-T1D. (A)BCAA. (B) Leucina. (C) Isoleucina. (D) Valina.

CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi si è concentrato principalmente sul ruolo svolto dagli aminoacidi in quanto molecole coinvolte in vari processi metabolici e su come l'azione di questi possa contribuire allo studio del diabete.

Dalla ricerca è emerso che specifiche categorie come gli aminoacidi a catena ramificata e L-alanina risultano maggiormente implicate nella patologia in quanto le loro concentrazioni variano notevolmente in pazienti diabetici rispetto ai soggetti sani andando ad interferire sulla regolare secrezione d'insulina.

In particolare analizzando un modello che mira a descrivere le interazioni della rete di aminoacidi plasmatici basato su modello S-system si è visto che intercorrono relazioni positive tra glicina ed isoleucina in soggetti sani e tra alanina e glicina in quelli patologici entrambe spiegabili attraverso dinamiche interne al metabolismo glucidico.

Nell'altro modello riportato invece, vengono riprodotti attraverso equazioni differenziali lineari i principali processi metabolici che conducono alla produzione di ATP nelle β cellule pancreatiche focalizzando l'attenzione sull'azione svolta dall'L-alanina nella secrezione d'insulina evidenziando come l'aumentare della concentrazione di una, corrisponda ad un altrettanto incremento dell'altra.

L'analisi è stata quindi integrata andando ad implementare in maniera random dei data set di pazienti virtuali relativi alle concentrazioni di aminoacidi a catena ramificata presi singolarmente e nella loro totalità sia in pazienti con diabete di nuova insorgenza sia in pazienti in controllo della tolleranza al glucosio. Questi sono stati prodotti entro determinati range temporali come appartenenti ad una distribuzione gaussiana attraverso codici al calcolatore ripetutamente iterati.

Lo sviluppo di data set sintetici infatti consente di generare in modo realistico ed in breve periodo una grande quantità di pazienti virtuali utili allo sviluppo di modelli capaci di riprodurre in modo semplificato le intricate reazioni interne all'organismo come appunto il metabolismo glucidico legato alle variazioni delle concentrazioni aminoacidiche.

Il monitoraggio del diabete attraverso la formulazione di modelli basati sulla cinetica degli aminoacidi è un campo ancora non molto esplorato e solo negli ultimi anni si è

arrivati allo sviluppo di modelli utili per lo studio delle cause e/o delle conseguenze che questi hanno sull'organismo. Pertanto non è stato semplice riuscire a rintracciare dati e articoli funzionali allo sviluppo di questa tesi, ma al tempo stesso ha reso più avvincente l'idea che vi sia ancora molto da poter fare e scoprire riguardo alla correlazione tra aminoacidi e diabete e le possibili implicazioni di tale legame.

Bibliografia

[1] Sadava D., Hillis D.M., Heller H.C., Berenbaum M.R., Posca V., (2016), *Chimica organica, biochimica e biotecnologie*. Il carbonio, gli enzimi, il DNA. Zanichelli editore S.p.A., Bologna

[2] Colombini B., Perego C., Rufini S. et al., (2017), *Fisiologia Umana un approccio integrato*, settima edizione. Dee Unglaub Silverthorn. Pearson Italia, Milano-Torino

[3] Carbone E., Cicerata F., Aicardi G. et al., (2008), *FISIOLOGIA: dalle molecole ai sistemi integrati*, EdiSES s.r.l, Napoli

[4] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013 Jan;36 Suppl 1(Suppl 1):S67-74. doi: 10.2337/dc13-S067. PMID: 23264425; PMCID: PMC3537273.

[5] Arneth B, Arneth R, Shams M. Metabolomics of Type 1 and Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci*. 2019 May 18;20(10):2467. doi: 10.3390/ijms20102467. PMID: 31109071; PMCID: PMC6566263.

[6] Newgard CB. Interplay between lipids and branched-chain amino acids in development of insulin resistance. *Cell Metab*. 2012 May 2;15(5):606-14. doi: 10.1016/j.cmet.2012.01.024. PMID: 22560213; PMCID: PMC3695706.

[7] Würtz P, Soininen P, Kangas AJ, Rönnemaa T, Lehtimäki T, Kähönen M, Viikari JS, Raitakari OT, Ala-Korpela M. Branched-chain and aromatic amino acids are predictors of insulin resistance in young adults. *Diabetes Care*. 2013 Mar;36(3):648-55. doi: 10.2337/dc12-0895. Epub 2012 Nov 5. PMID: 23129134; PMCID: PMC3579331.

[8] Brosnan JT, Brosnan ME. Branched-chain amino acids: enzyme and substrate regulation. *J Nutr.* 2006 Jan;136(1 Suppl):207S-11S. doi: 10.1093/jn/136.1.207S. PMID: 16365084.

[9] Adeva MM, Calviño J, Souto G, Donapetry C. Insulin resistance and the metabolism of branched-chain amino acids in humans. *Amino Acids.* 2012 Jul;43(1):171-81. doi: 10.1007/s00726-011-1088-7. Epub 2011 Oct 8. PMID: 21984377.

[10] Tanaka T, Mochida T, Maki Y, Shiraki Y, Mori H, Matsumoto S, Shimbo K, Ando T, Nakamura K, Endo F, Okamoto M. Interactive network analysis of the plasma amino acids profile in a mouse model of hyperglycemia. *Springerplus.* 2013 Jun 28;2(1):287. doi: 10.1186/2193-1801-2-287. PMID: 23853755; PMCID: PMC3701794.

[11] Salvucci M, Neufeld Z, Newsholme P. Mathematical model of metabolism and electrophysiology of amino acid and glucose stimulated insulin secretion: in vitro validation using a β -cell line. *PLoS One.* 2013;8(3):e52611. doi: 10.1371/journal.pone.0052611. Epub 2013 Mar 8. PMID: 23520444; PMCID: PMC3592881.

[12] Karusheva Y, Strassburger K, Markgraf DF, Zaharia OP, Bódis K, Kössler T, Tura A, Pacini G, Burkart V, Roden M, Szendroedi J. Branched-Chain Amino Acids Associate Negatively With Postprandial Insulin Secretion in Recent-Onset Diabetes. *J Endocr Soc.* 2021 Apr 20;5(6):bvab067. doi: 10.1210/jendso/bvab067. PMID: 34027277; PMCID: PMC8130764.