



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE
FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Corso di Laurea triennale in Ingegneria Biomedica

**STIMA MODELLISTICA DELLE COMPONENTI EPATICA ED EXTRA-
EPATICA DELLA CLEARANCE DELL'INSULINA IN SOGGETTI CON
DIABETE DI TIPO 2 E LORO RELAZIONE CON L'ETÀ**

**MODEL-BASED ESTIMATION OF THE HEPATIC AND EXTRA-HEPATIC
COMPONENTS OF INSULIN CLEARANCE IN SUBJECTS WITH TYPE 2
DIABETES AND THEIR RELATIONSHIP WITH AGE**

Relatore:

Dott.ssa **Micaela Morettini**

Tesi di Laurea di:

Antonio De Felice

Correlatori:

Prof.ssa **Laura Burattini**

Dott. **Andrea Tura**

A.A. 2020/2021

Abstract

L'insulina è un ormone peptidico secreto dalle cellule β del pancreas e svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo dei carboidrati, ma anche nel metabolismo delle proteine e dei grassi. La concentrazione di insulina nel sangue aumenta all'aumentare della glicemia, ciò promuove il trasporto del glucosio dal sangue alle cellule del fegato, dei muscoli e di altri tessuti, riportando la glicemia verso i valori standard. L'omeostasi del glucosio è un meccanismo di regolazione necessario per mantenere il giusto apporto glucidico al tessuto nervoso, in particolare il cervello, organo glucosio-dipendente, per il suo corretto funzionamento anche durante i periodi di digiuno. In caso di shock ipoglicemico si possono verificare perdita di coscienza, convulsioni e coma. Una carenza di secrezione di insulina oppure un'iposensibilità dei tessuti all'insulina stessa, causa una patologia cronica: il diabete mellito. Esistono diversi tipi di diabete: diabete mellito di tipo 1 (insulino-dipendente), causato da una mancanza di secrezione di insulina da parte delle cellule β , diabete mellito di tipo 2 (non insulino-dipendente), dovuto ad una minore sensibilità dei tessuti all'azione dell'insulina (insulino-resistenza) oppure ad un deficit della secrezione di insulina e, infine, diabete gestazionale, che si manifesta per la prima volta durante la gravidanza. Negli ultimi anni si è verificato un aumento dell'incidenza del diabete mellito di tipo 2, tipico dell'età adulta, nei giovani, causato da diversi fattori di rischio rappresentati dall'obesità combinata con predisposizione genetica o storia familiare. Per clearance dell'insulina s'intende la sua completa scomparsa dal flusso sanguigno. È stato ipotizzato che un suo abbassamento potrebbe causare un aumento di probabilità di sviluppare il diabete di tipo 2. Presenta due componenti: clearance epatica ed extra-epatica. La prima consiste nell'eliminazione di una notevole quantità di insulina da parte del fegato durante il primo passaggio attraverso circolazione portale epatica (vena porta epatica). La seconda consiste nell'eliminazione dell'insulina anche dagli altri tessuti, come muscoli scheletrici, reni e cuore. Per misurare la secrezione e la clearance dell'insulina esistono metodi diretti (arterio-venosi) non applicabili sull'uomo, perché necessiterebbero di campioni di sangue proveniente dalla vena portale, e metodi indiretti. Quelli indiretti sono basati sullo sviluppo di modelli cinetici utilizzati per calcolare il tasso di secrezione dell'insulina e la sua clearance durante il test di tolleranza al glucosio somministrato per via endovenosa (frequently sampled intravenous glucose tolerance test: FSIGT) e per via orale (oral glucose tolerance test: OGTT). Per la stima non invasiva della clearance in vivo vengono utilizzati modelli matematici che possono essere a tre, a due o a compartimento singolo. Questi modelli permettono di studiare le cinetiche del

peptide C, e di conseguenza anche dell'insulina, essendo entrambi ormoni secreti in quantità equimolari. Tra questi vi sono: Modello di Eaton, Modello Tura, Metodo Toffolo, Metodo Campioni, Metodo Piccinini, Metodo Polidori. In particolare, il metodo Polidori permette di stimare la clearance dell'insulina nelle sue componenti epatica ed extraepatica. Queste ultime sono state valutate in una popolazione di soggetti affetti da diabete di tipo 2. In particolare, sono stati considerati 17 soggetti di sesso maschile con un'età compresa tra i 51 e i 68 anni sottoposti a Insulin Modified IVGTT. Tali soggetti sono stati suddivisi in due gruppi, separando quelli di età inferiore (n=12) e superiore o uguale a 65 (n=5) anni. Il metodo di Polidori richiede come input il calcolo dell'Insulin Secretion Rate dalle concentrazioni plasmatiche del C peptide; quest'ultima è stata valutata utilizzando un metodo di deconvoluzione numerica proposto da Boston, che riduce il problema della deconvoluzione ad una stima risolvibile con il metodo dei minimi quadrati. Dalle analisi non sono state riscontrate correlazioni significative né tra la componente epatica della clearance dell'insulina e l'età, né tra quest'ultima e la componente extra-epatica della clearance dell'insulina. Infine sono state riscontrate differenze nei due gruppi di soggetti sia per la componente epatiche che quella extra-epatica.

INDICE

Introduzione.....	I
Capitolo_1: Descrizione del sistema di regolazione insulina-glucosio.....	1
Capitolo 2: Fisiopatologia del diabete.....	4
2.1: Diabete mellito di tipo 1.....	5
2.2: Diabete gestazionale.....	6
2.3: Diabete mellito di tipo 2.....	6
2.3.1: Diabete mellito di tipo 2 nei giovani.....	7
2.3.2: Diabete mellito di tipo 2 negli anziani.....	9
Capitolo 3: La clearance dell'insulina.....	11
3.1: Possibile causa del diabete mellito di tipo 2.....	12
3.2: Metodi per la stima della clearance epatica ed extraepatica.....	12
Capitolo 4: Deconvoluzione numerica per la stima dell'ISR.....	21
4.1: Modello della secrezione del peptide C usando una Gaussiana come input.....	22
Capitolo 5: Stima delle componenti della clearance dell'insulina.....	24
5.1: Caratteristiche dei soggetti e test metabolico.....	24
5.2: Modelli utilizzati.....	24
5.3: Analisi statistica.....	25
5.4: Risultati.....	25
Discussioni e conclusioni.....	III
Bibliografia.....	IV

Introduzione

Il diabete mellito è una patologia cronica causata da una carenza di secrezione di insulina oppure da una iposensibilità dei tessuti all'insulina stessa, ed è caratterizzata da un aumento della concentrazione di glucosio nel sangue.

Secondo la World Diabet Federation sono circa 415 milioni le persone nel mondo affette da diabete (8,5%), numero costantemente in crescita che, secondo le stime, arriverà a circa 642 milioni nel 2040. Secondo l'Oms Europa, 52 milioni di persone in Europa soffrono di diabete. La presenza del diabete è in crescita in tutta Europa; questo aumento è in parte dovuto all'invecchiamento generale della popolazione ma principalmente alla diffusione di condizioni di rischio come sovrappeso, obesità, scorretta alimentazione, sedentarietà e disuguaglianze economiche [1].

In Italia le persone affette da diabete sono circa 3 milioni, il 10% degli uomini e il 7% delle donne è diabetico, l'8% degli uomini e il 4% delle donne è in una condizione borderline (intolleranza al glucosio). Tra gli anziani (fascia d'età dai 65 ai 74 anni), il 20% degli uomini e il 15% delle donne sono diabetici; mentre i giovani affetti da diabete sono circa lo 0,8% nella fascia tra i 20 e i 34 anni. La percentuale di diabetici aumenta con l'età, infatti tra i 34 e i 49 la percentuale di diabetici è di circa il 2%, si arriva a circa il 10% nella fascia d'età compresa tra i 50 e i 69 anni, ed è più frequente negli uomini (5,1%) rispetto alle donne (3,8%) [2].

Innumerevoli sono le complicanze causate dal diabete: attacchi cardiaci, ictus, amputazioni, dialisi, coronaropatia (15%), retinopatia (22%), piede diabetico (3%). In Italia sono circa 496 i decessi annui per diabete (sia come causa diretta che come comorbidità), inoltre si può verificare una riduzione dell'aspettativa di vita di 7-8 anni se il soggetto non è in buon controllo glicemico [3].

Per valutare l'insulino-sensibilità, la secrezione e la clearance dell'insulina possono essere utilizzati modelli matematici, che forniscono una rappresentazione della realtà fisiologica espressa sotto forma di equazioni matematiche, ciò permette di evitare l'utilizzo di tecniche invasive anche molto pericolose per il paziente.

Per clearance dell'insulina s'intende la sua completa scomparsa dal flusso sanguigno. Presenta due componenti ben distinte: clearance epatica ed extra-epatica. La prima consiste nell'eliminazione di una notevole quantità di insulina da parte del fegato durante il primo

passaggio attraverso circolazione portale epatica (vena porta epatica). La seconda consiste nell'eliminazione dell'insulina anche dagli altri tessuti, come muscoli scheletrici, reni e cuore. Lo scopo di questo elaborato è quello di effettuare una stima modellistica delle componenti epatica ed extra-epatica della clearance dell'insulina in soggetti con diabete di tipo 2 e di valutare la loro relazione con l'età.

Capitolo 1: Descrizione del sistema di regolazione insulina-glucosio

Il pancreas è un organo appartenente all'apparato digerente e al sistema endocrino, si trova nello spazio retroperitoneale della cavità addominale, all'altezza e anteriormente alle prime due vertebre lombari. Si comporta come una ghiandola (sia endocrina all'altezza che esocrina). La porzione endocrina, formata dalle isole di Langerhans (agglomerato di cellule vascolarizzate), visibili in Figura 1, ha il compito di regolare la concentrazione di glucosio nel sangue, secernendo ormoni come glucagone, prodotto dalle cellule α , insulina, prodotta dalle cellule β , polipeptide pancreatico, prodotto dalle cellule γ , e somatostatina, prodotta dalle cellule δ . Mentre, la porzione esocrina, formata dagli acini pancreatici, si occupa della digestione del cibo producendo i succhi pancreatici che si riversano nel duodeno tramite due condotti escretori, il dotto pancreatico principale (di Wirsung) e il dotto pancreatico accessorio (di Santorini) [4].

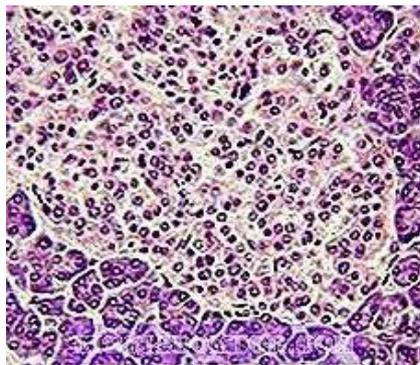


Figura 1. Isole di Langerhans viste al microscopio elettronico.

L'insulina è un ormone peptidico che svolge un ruolo fondamentale nel metabolismo dei carboidrati, ma anche nel metabolismo delle proteine e dei grassi. È formata da 2 catene peptidiche, A e B legate da ponti disolfurici. Quest'ormone viene secreto in grandi quantità quando la dieta di un individuo è ricca di cibi ad alto contenuto energetico. Svolge un'importante funzione per la conservazione di sostanze energetiche (carboidrati, proteine, grassi) in eccesso. Per quanto riguarda i carboidrati, promuove il loro deposito come glicogeno principalmente nel fegato e nei muscoli; quelli in eccesso, che non possono essere depositati come glicogeno, li converte in grassi. Per i grassi, ne promuove la conservazione nel tessuto adiposo; mentre per le proteine favorisce l'assorbimento di amminoacidi da parte delle cellule, in modo da poter essere utilizzate per la sintesi proteica, impedendo la demolizione delle proteine già presenti all'interno delle cellule.

L'insulina viene sintetizzata nelle cellule β , seguendo la sintesi proteica, che inizia con la traduzione dell'RNA insulinico con la formazione della proinsulina, costituita dal 2 catene peptidiche, A e B, il peptide C (peptide di collegamento) e il peptide segnale all'estremità N-terminale. Successivamente la proinsulina viene scissa nel reticolo endoplasmatico (rimozione del peptide segnale) e si trasforma in proinsulina, costituita da 3 catene peptidiche (A, B, C) la quale viene degradata in insulina, mediante la rimozione del peptide C nell'apparato di Golgi (Figura 2). L'insulina e il peptide C vengono immagazzinati in granuli secretori e secreti, in caso di bisogno, in quantità equimolari.

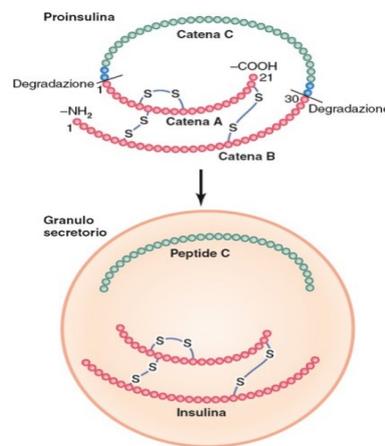


Figura 2. Rappresentazione della struttura della proinsulina e successiva degradazione che porta alla formazione di insulina che, insieme al peptide C, viene immagazzinata in granuli.

Quando la concentrazione di glucosio nel sangue sale al di sopra dei $100 \text{ mg}/100 \text{ mL}$, la secrezione dell'insulina aumenta rapidamente e raggiunge livelli superiori di circa 20 volte rispetto a quello normale per concentrazioni di glicemia comprese tra i 400 e i $600 \text{ mg}/100 \text{ mL}$ (Figura 3).

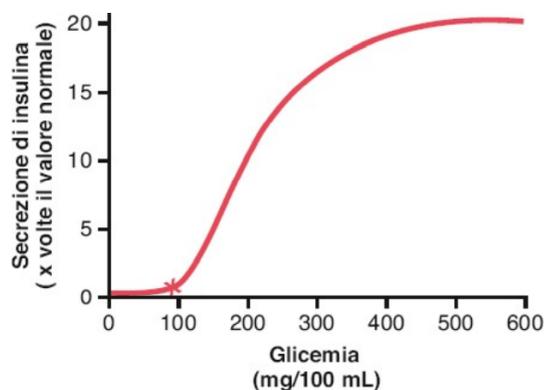


Figura 3. Aumento della secrezione di insulina a differenti valori della glicemia.

Questa risposta della secrezione insulinica rappresenta un meccanismo a feedback fondamentale per la regolazione della glicemia: l'aumento del glucosio fa aumentare la secrezione di insulina che, a sua volta, promuove il trasporto del glucosio dal sangue alle cellule del fegato, dei muscoli e di altri tessuti, riportando la glicemia verso i valori standard (tra i 60 e i 110 *mg/100 ml* a digiuno e inferiore a 140 *mg/100 ml* dopo i pasti). L'omeostasi del glucosio è un meccanismo di regolazione necessario per mantenere il giusto apporto glucidico al tessuto nervoso, in particolare il cervello, organo glucosio-dipendente, per il suo corretto funzionamento anche durante i periodi di digiuno. In caso di shock ipoglicemico si possono verificare perdita di coscienza, convulsioni e coma. Nell'intervallo tra un pasto e l'altro, nel quale si ha un abbassamento della concentrazione di glucosio nel sangue, si arresta la secrezione di insulina, e le riserve di glicogeno presenti nel fegato vengono riconvertite in glucosio e reimmesse nel flusso sanguigno in modo da evitare che il livello della glicemia si abbassi fino ad arrivare a livelli critici. Durante la maggior parte della giornata, i muscoli, essendo poco permeabili al glucosio, dipendono dagli acidi grassi.

La permeabilità al glucosio viene aumentata quando viene secreta l'insulina, ma quella prodotta negli intervalli tra i pasti quantitativamente non basta per poter permettere l'ingresso del glucosio nella fibra muscolare.

I muscoli riescono ad utilizzare grandi quantità di glucosio in due casi: quando l'individuo svolge attività fisica oppure nelle prime ore dopo il pasto.

Nel primo caso, aumentando la contrazione muscolare, si va a generare la traslocazione del GLUT4 (trasportatore del glucosio 4) verso la membrana cellulare, che facilita l'ingresso del glucosio all'interno della cellula muscolare. Quindi in questo caso il muscolo non necessita di grandi quantità di insulina per utilizzare il glucosio. Nel secondo caso, invece, visto che la glicemia è elevata, il pancreas secreta una notevole quantità di insulina, la quale permette l'ingresso del glucosio nella cellula muscolare, il cui utilizzo viene preferito rispetto agli acidi grassi. Se durante questo periodo la muscolatura resta a riposo, gran parte del glucosio presente all'interno delle cellule muscolari viene conservato come glicogeno, che potrà essere utilizzato a scopo energetico, in caso di contrazione anaerobica, tramite la degradazione di quest'ultimo in acido lattico.

La figura 4 mostra come la secrezione dell'insulina fa aumentare la concentrazione di glucosio all'interno delle cellule muscolari, infatti è possibile notare che, in assenza di insulina (controllo), la concentrazione intracellulare rimane quasi a zero nonostante quella

extracellulare raggiunga valori di circa $750 \text{ mg}/100 \text{ mL}$. Mentre in presenza di insulina la concentrazione intracellulare del glucosio nella cellula muscolare aumenta fino a raggiungere i $400 \text{ mg}/100 \text{ mL}$.

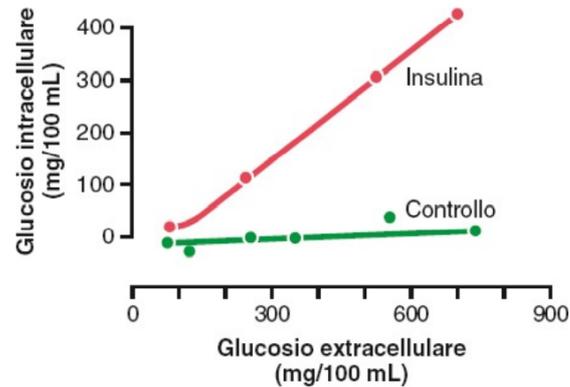


Figura 4. Aumento della secrezione dell'insulina a differenti valori della glicemia.

Inoltre, l'insulina, subito dopo un pasto, consente al glucosio di essere immagazzinato nel fegato sottoforma di glicogeno. Se la quantità di glucosio che entra nel fegato è superiore rispetto a quella massima immagazzinabile (condizione di saturazione), l'insulina induce nel fegato la conversione del glucosio in acidi grassi, i quali vengono poi immagazzinati nel tessuto adiposo sottoforma di grassi di deposito [5].

Capitolo 2: Fisiopatologia del diabete

Il diabete mellito è una patologia cronica causata da una carenza di secrezione di insulina oppure ad una iposensibilità dei tessuti all'insulina stessa, ed è caratterizzata da un aumento della concentrazione di glucosio nel sangue. La sua diagnosi è certa se la concentrazione di glucosio nel sangue raggiunge i 200 mg/dl rilevato in qualunque momento della giornata oppure a due ore da un pasto ricco di carboidrati e l'HbA1c (emoglobina glicata) raggiunge concentrazioni maggiori del 6,4 % (46 mmol/L).

Esistono 3 tipi di diabete mellito: diabete mellito di tipo 1 (insulino-dipendente), diabete mellito di tipo 2 (non insulino-dipendente) e diabete gestazionale [5].

2.1 Diabete mellito di tipo 1

In questo caso il diabete è dovuto alla mancanza di secrezione di insulina da parte delle cellule β . La loro incapacità di produrre insulina può derivare da infezioni virali, da malattie autoimmuni (in questo caso gli autoanticorpi attaccano le cellule β) oppure da fattori ereditari. Il diabete mellito di tipo 1 si manifesta spesso in giovane età per questo viene chiamato anche diabete giovanile e i soggetti che ne sono affetti costituiscono circa il 5-10% del totale dei pazienti diabetici. Causa iperglicemia, aumento dell'utilizzo dei grassi sia a fini energetici sia per la sintesi di colesterolo nel fegato, deplezione delle proteine corporee.

- L'iperglicemia (aumento della concentrazione di glucosio nel sangue fino a raggiungere valori 300-1200 mg/dL) provoca anche glicosuria (presenza di glucosio nelle urine) che si verifica quando una percentuale di glucosio non viene riassorbita dal tubulo prossimale. Inoltre l'iperglicemia causa anche disidratazione: il corpo cerca di eliminare il glucosio in eccesso attraverso l'urina, costringendo il rene ad espellere grandi quantità di acqua tramite la minzione. Infine, se l'iperglicemia permane per un periodo di tempo prolungato, si possono verificare dei danneggiamenti dei tessuti che possono aumentare il rischio di malattie cardiache, ictus, retinopatia, patologie renali, ischemia, cancrena agli arti; ma anche danni al sistema nervoso quali neuropatia periferica (funzionamento alterato dei nervi periferici) e disfunzioni del sistema nervoso vegetativo.
- Il metabolismo dei grassi rispetto a quello dei carboidrati genera un maggiore rilascio nel plasma di chetoacidi (acido acetoacetico) che causa una acidosi metabolica. Questo fenomeno unito alla disidratazione porta ad una grave acidosi e

successivamente a coma diabetico. Sopraggiunge la morte del paziente (nei casi più gravi dopo poche ore) se non vengono iniettate tempestivamente delle dosi di insulina. Inoltre l'utilizzo eccessivo di grassi da parte del fegato provoca un aumento di colesterolo nel sangue e quindi la possibilità di sviluppare arteriosclerosi.

- La deplezione delle proteine corporee causa un'astenia (aumento della debolezza, dovuto alla perdita di forza muscolare) e successiva perdita di peso. Queste anomalie possono danneggiare gravemente organi e tessuti e, se non curate, possono degenerare con la seguente morte del paziente.

Ai soggetti affetti da diabete mellito di tipo 1 vengono somministrate dosi di insulina per riportare il metabolismo dei carboidrati, e di conseguenza la glicemia, a valori normali. L'insulina ordinaria ha un'attività che dalle 3 alle 8 ore, mentre quella precipitata con zinco (a lento assorbimento) ha effetti che durano dalle 10 alle 48 ore [5].

2.2 Diabete gestazionale

Per diabete gestazionale si intende un aumento della glicemia che si manifesta per la prima volta durante la gravidanza, e si verifica nell'8% delle donne incinte. Di solito scompare al termine della gravidanza, ma la sua comparsa implica una maggiore probabilità della donna di essere affetta da diabete mellito di tipo 2 in età avanzata. Tra i fattori di rischio, che accrescono le probabilità di essere affetti da questo tipo di diabete, vi sono obesità e presenza di un parente diabetico.

È consigliata una dieta con il giusto apporto calorico, sia per la madre che per il feto, in modo da riuscire ad evitare sia l'iperglicemia che l'ipoglicemia, abbinata anche ad attività fisica. La terapia con dosi di insulina viene effettuata solo se, con la terapia precedente, i valori glicemici sono superiori agli standard [6].

2.3 Diabete mellito di tipo 2

Questo tipo di diabete mellito rappresenta circa il 95% di tutti i casi di diabete mellito e si manifesta soprattutto in soggetti tra i 50 e i 60 anni, per questo viene definito diabete dell'età adulta. È dovuto alla minore sensibilità dei tessuti all'azione dell'insulina, chiamata insulino-resistenza oppure ad un deficit della secrezione di insulina (l'insulina prodotta non basta per soddisfare le necessità dell'organismo), con conseguente aumento della glicemia. Oltre che da fattori ambientali (vita sedentaria, stress) ed ereditari, dipende anche da caratteristiche

fisiche quali l'obesità: infatti in un soggetto obeso si ha una diminuzione dei recettori dell'insulina in particolare nei muscoli scheletrici, nel fegato e nel tessuto adiposo.

I fattori di rischio che rendono alcune persone più predisposte a sviluppare diabete mellito di tipo 2 rispetto ad altre sono: obesità, inattività fisica, ipertensione (con $PAS \geq 140 \text{ mmHg}$ o $PAD \geq 90 \text{ mmHg}$), colesterolo HDL (High-Density Lipoprotein) con valori minori o uguali a 35 mg/dL ; trigliceridi $\geq 350 \text{ mg/dL}$.

I sintomi sono molto simili a quelli del diabete mellito di tipo 1, ma con una manifestazione più graduale e in modo meno evidente, per questo la diagnosi del diabete mellito di tipo 2 non è tempestiva ma avviene quando ormai la malattia si trova in una fase conclamata. Ai soggetti affetti da diabete mellito di tipo 2 si consiglia di seguire un'alimentazione più sana e praticare attività fisica, in questo modo è possibile ridurre il peso corporeo (obesità) e contrastare l'insulino-resistenza. Se non si manifestano miglioramenti è possibile somministrare farmaci che aumentano la sensibilità all'insulina o che ne stimolano la produzione; anche se nella maggior parte dei pazienti è necessario somministrare l'insulina per riuscire a controllare in modo efficace la glicemia [6].

2.3.1 Diabete mellito di tipo 2 nei giovani

A partire dalla metà degli anni '90 si è notata una crescita dell'incidenza del diabete mellito di tipo 2 nei bambini e negli adolescenti, in seguito ad un aumento dell'incidenza di obesità e sovrappeso in giovane età; ad oggi il diabete mellito di tipo 2 rappresenta l'8-45% dei nuovi casi di diabete tra i giovani. La prevalenza di questo tipo di diabete nei giovani è più alta nelle ragazze rispetto ai ragazzi, lo stesso vale per gli adulti. Molto spesso la patologia viene diagnosticata intorno ai 13-14 anni con un'insorgenza precoce nelle ragazze; questo suggerisce che l'insulino-resistenza durante la pubertà potrebbe ricoprire un ruolo importante. Inizialmente le cellule β riescono a contrastare l'insulino-resistenza incrementando la secrezione di insulina nella patogenesi dell'intolleranza al glucosio. L'iperinsulinemia compensatoria induce un aumento di appetito e quindi di peso. Dopo che le cellule β diminuiscono la loro funzionalità, producendo una quantità di insulina insufficiente, ci sarà una transizione dalla condizione di insulino-resistenza a quella di intolleranza al glucosio, seguita dal diabete mellito di tipo 2.

I rischi principali per il diabete mellito di tipo 2 nei giovani sono rappresentati dall'obesità combinata con predisposizione genetica o storia familiare in aggiunta con bambini nati

piccoli per un'età gestazionale (< 2500 g), macrosomia neonatale causata da madre diabetica (> 4000 g), adrenaemia prematura nelle bambine (pubertà precoce).

Per il trattamento del diabete di tipo 2 nei giovani viene utilizzata la metformina in monoterapia o associata all'insulina, unite ad un cambiamento dello stile di vita. La metformina è l'unico farmaco antidiabetico orale approvato in Europa per uso pediatrico ed è consigliato per bambini con età superiore ai 10 anni. Agisce principalmente inibendo la gluconeogenesi epatica e abbassando il glucosio basale; utilizzata in monoterapia può indurre una diminuzione media di HbA1c pari a 1,5% e non è accompagnata da ipoglicemia o aumento di peso. Il suo utilizzo è sconsigliato in tutti quei pazienti che presentano severe infezioni, malattie epatiche o abuso di alcol.

I criteri diagnostici per il diabete sono basati su misurazioni del glucosio nel sangue e sull'assenza o presenza di sintomi:

- *FPG* > 126 mg/dL (7,7 mmol/L);
- *random plasma glucose sample* ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L);
- *2 h PG* ≥ 200 mg/dL (11,1 mmol/L);
- *HbA1c* ≥ 6,5% (48 mmol/L), che viene prodotta quando il glucosio nel sangue si lega all'emoglobina, quindi rispecchia l'andamento della glicemia.

È possibile confrontare le differenze tra giovani e adulti affetti da diabete mellito di tipo 2 (Tabella 1) [7].

Tabella 1. Differenze tra adulti e giovani affetti da T2DM.

Parametri	Adulti	Bambini e adolescenti
anni	> 40 anni	> 10 anni
insorgenza	insidiosa	insidiosa / segni di iperglicemia
sessò	entrambi	prevalentemente femminile
diminuzione della funzionalità delle cellule β del pancreas	insidiosa	Più veloce (meno di 4 anni)

trattamento	Modifica dello stile di vita, vari tipi di agenti antidiabetici orali	Modifica dello stile di vita, metformina +/- insulina
Complicazioni/comorbidità	tardive	Presto (dopo circa 2-2.5 anni dopo l'insorgenza)

2.3.2 Diabete mellito di tipo 2 negli anziani

La maggior parte delle persone con un'età superiore dei 60 anni è affetta da diabete mellito di tipo 2. Le complicazioni e la gestione di questi pazienti variano in base alla durata dell'iperglicemia e alle comorbidità, specifiche per ciascun paziente. Il diabete negli anziani è causato da diversi meccanismi tra i quali vi è la lunga aspettativa di vita, che porta ad una diminuzione della secrezione di insulina, e l'obesità che è responsabile dell'insulino-resistenza. Si è riscontrato che lo stile di vita degli anziani è caratterizzato dall'assenza di attività fisica e da disturbi alimentari, che sono i fattori principali che poi portano alla manifestazione della patologia. Però vi sono anche altri fattori come l'AVP (arginine vasopressin) o il suo frammento terminale (Copeptina), che hanno un ruolo chiave sulla diminuzione dell'insulino-resistenza (predominante negli anziani obesi); un fattore aggiuntivo è anche la carenza di vitamina D, fondamentale per inibire l'accumulo di grasso, preservare le cellule delle isole pancreatiche, aumentare la sintesi di insulina, ridurre l'insulino-resistenza; l'assenza di questa vitamina, oltre a favorire il diabete, predispone il paziente ad altre malattie cardiovascolari, metaboliche e cancerogene, in aggiunta a debolezza muscolare dovuta ad una riduzione dell'attività mitocondriale muscolare causata dall'invecchiamento.

Con l'invecchiamento si verificano anche: riduzione dell'attività di enzimi antiossidanti e di proteine di riparazione cellulare, perdita di telomeri e apoptosi della cellula; in particolare quella delle cellule β dovuta ad un'ipersecrezione di amilina (ormone peptidico sinergico all'insulina) che causa la formazione in placche di amiloide, riducendo il numero delle isole di Langerhans e la funzione delle cellule β . Gli anziani obesi presentano un aumento del grasso viscerale, che va di pari passo con uno stato infiammatorio cronico determinabile dall'aumento di $\text{TNF}\alpha$ (fattore di necrosi tumorale α) e PCR (proteina C reattiva). Nel tessuto adiposo vengono prodotte adipochine pro-infiammatorie ($\text{TNF}\alpha$, IL6) responsabili delle alterazioni metaboliche e delle complicanze cardiovascolari [8].

I sintomi più comuni che permettono di diagnosticare il diabete di tipo 2 negli anziani sono principalmente complicazioni come neuropatia, nefropatia, problemi cardiovascolari, infezioni urinarie oppure problemi della pelle. Sintomi come stanchezza, incontinenza, compromissione cognitiva, demenza possono essere sintomi premonitori del diabete che spesso vengono erroneamente attribuiti all'invecchiamento [9].

Capitolo 3: La clearance dell'insulina

Il fegato è il più grande organo pieno dell'organismo umano, rappresentando nell'adulto dal 2% al 5% del peso corporeo. È situato nella loggia sottofrenica destra, precisamente nella regione sovramesolica dello spazio peritoneale della cavità addominale. Può essere considerato una ghiandola anficrina, cioè svolge funzioni sia di tipo esocrino sia di tipo endocrino-metabolico. Infatti da un lato secerne la bile, che tramite le vie biliari viene

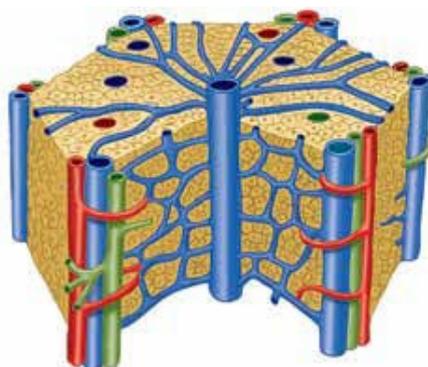


Figura 5. Struttura del lobulo epatico.

riversata nel duodeno, indispensabile per la digestione dei grassi. Dall'altro, ha un ruolo fondamentale per l'omeostasi metabolica dell'intero organismo, regolando il metabolismo energetico. Il sangue raggiunge il fegato tramite la vena porta e l'arteria epatica, che entrano nel fegato in corrispondenza dell'ilo, mentre, per mezzo delle vene epatiche, il sangue lascia l'organo e giunge nella vena cava inferiore. L'unità funzionale del fegato è il lobulo epatico (Figura 5), costituito da numerosi cordoni di epatociti (cellule epiteliali), che formano un sistema labirintico nel quale sono presenti dei capillari chiamati sinusoidi epatici. Gli epatociti e i sinusoidi si dispongono in forma radiale e convergono verso la vena centrale o centrolobulare. Nella zona di contatto di tre o più lobuli, si formano gli spazi portali (o portobiliari) di Kiernan, un involucro di tessuto connettivo attorno alle diramazioni interlobulari della vena porta, dell'arteria epatica, dei dotti biliari e dei vasi linfatici [4].

L'insulina, una volta prodotta dalle cellule β , entra nella vena porta addominale e successivamente nel fegato; dove una parte (circa la metà) viene raccolta dagli epatociti prima che giunga nella circolazione extraepatica.

Per clearance dell'insulina s'intende la sua completa scomparsa dal flusso sanguigno. È stato ipotizzato che un suo abbassamento potrebbe causare un aumento di probabilità di sviluppare il diabete di tipo 2 (o diabete mellito), mentre l'iperinsulinemia potrebbe essere connessa

alla patogenesi di disfunzioni cognitive comprese la malattia di Alzheimer e alcune forme di cancro. La clearance dell'insulina consta di due processi:

- La clearance epatica consiste nell'eliminazione di una notevole quantità di insulina da parte del fegato durante il primo passaggio attraverso circolazione portale epatica (vena porta epatica).
- La clearance extraepatica consiste nell'eliminazione dell'insulina anche dagli altri tessuti, come muscoli scheletrici, reni e cuore.

Per estrazione di insulina si intende la quantità percentuale di insulina secreta che viene eliminata nell'unità di tempo, e può essere sia epatica che extraepatica. [10]

3.1 La clearance dell'insulina come possibile causa del diabete mellito di tipo 2

La causa esatta del diabete mellito di tipo 2 rimane ancora sconosciuta, ma è possibile che la ridotta clearance epatica dell'insulina sia un fattore che causi la patologia. Infatti la clearance dell'insulina cambia con fattori ambientali, come la dieta, ed è inferiore in alcuni gruppi etnici con un elevato rischio di T2DM, con questa differenza osservata fin dall'infanzia. Tra il 20% e l'80% dell'insulina potrebbe essere degradata appena entra nel fegato, con la restante parte che entra nella circolazione sistemica per stimolare l'assorbimento di glucosio e regolarne la sua produzione. La produzione epatica di glucosio potrebbe essere controllata dai FFA (acidi grassi liberi) nel plasma, che sono a loro volta regolati dai livelli sistemici di insulina. Tuttavia, il grasso epatico è inversamente proporzionale alla clearance dell'insulina, quindi si può ipotizzare che, nella situazione prediabetica (obesità), la clearance epatica dell'insulina si riduca, con conseguente iperinsulinemia periferica. Quest'ultima potrebbe essere il risultato di un'insulino-resistenza periferica, dovuta ad una sovraesposizione all'insulina endogena. Quindi è possibile che una ridotta clearance dell'insulina epatica sia un fattore primario o attenuante nella patogenesi del diabete mellito di tipo 2 [11].

3.2 Metodi per la stima della clearance epatica ed extraepatica dell'insulina

Per determinare i livelli plasmatici dell'insulina è necessario fare riferimento ai parametri di rilascio dell'insulina e alla clearance.

Per misurare la secrezione e la clearance dell'insulina è possibile utilizzare metodi diretti (arterio-venosi) oppure metodi indiretti.

I metodi diretti vengono utilizzati per la misurazione in vivo della clearance dell'insulina, ma non sono applicabili sull'uomo, perché necessiterebbero di campioni di sangue proveniente dalla vena portale.

Quelli indiretti sono basati sullo sviluppo di modelli cinetici utilizzati per calcolare il tasso di secrezione dell'insulina e la sua clearance durante il test di tolleranza al glucosio somministrato per via endovenosa (frequently sampled intravenous glucose tolerance test: FSIGT) e per via orale (oral glucose tolerance test: OGTT) [12]:

- Nel FSIGT, per valutare l'azione dell'insulina sulla scomparsa del glucosio, si utilizza il modello minimo; questa tecnica utilizza un modello matematico per analizzare i tempi di concentrazione di glucosio ed insulina dopo un'iniezione intravenosa di glucosio. Esistono due procedure relative al FSIGT: rFSIGT (regular FSIGT), nella quale viene effettuata una singola iniezione di 300 mg/ml di glucosio seguita dal prelievo di circa 30 campioni in 3-4 ore, e il mFSIGT (insulin-modified FSIGT), nella quale viene effettuata una somministrazione aggiuntiva di insulina o tolbutamide dopo 20 minuti dopo quella del glucosio. Entrambe le procedure, con l'analisi minima del modello, riescono a fornire lo stesso S_I (indice di sensibilità dell'insulina), ma forniscono S_G (efficacia del glucosio) diverso del 28%, dovuto probabilmente alla relazione tra S_G e la quantità di insulina in circolo. Il mFSIGT viene raccomandato per stimare la sensibilità dell'insulina in diverse situazioni, in particolare quando manca la risposta dell'insulina endogena.

La scelta dell'utilizzo dell'FSIGT è giustificata dalle seguenti considerazioni: permette una stimolazione diretta delle cellule β senza confondere gli effetti dei fattori gastrointestinali propri del OGTT; fornisce una dinamica piuttosto elevata delle concentrazioni di glucosio e insulina; la dose data di glucosio è nota così come la comparsa della circolazione sistemica. Queste considerazioni permettono una valutazione accurata e precisa dei parametri metabolici estratti dal test [13].

- Nell'OGTT la tolleranza al glucosio è valutata dalla misura della concentrazione del glucosio circolante dopo un digiuno notturno (FPG: fasting plasma glucose concentration) e di nuovo dopo 2 ore da un carico di glucosio di 75 g (2-h PG: 2-h post-load glucose concentration). Durante questo test la concentrazione dell'insulina

circolante aumenta temporaneamente per poi aumentare e diminuire continuamente; questi andamenti dell'insulina circolante sono diversi in base ai tipi di soggetti in esame. Per distinguerli ci si basa su dei range del FPG e del 2-h PG che genereranno delle classificazioni; se $FPG < 110 \text{ mg/dL}$ e $2h PG < 140 \text{ mg/dL}$ allora il soggetto avrà una tolleranza normale al glucosio (NGT); se $110 < FPG < 125 \text{ mg/dL}$ o $2h PG \geq 200 \text{ mg/dL}$ allora il soggetto apparterrà alla categoria borderline type; se $FPG \geq 126 \text{ mg/dL}$ o $2h PG \geq 200 \text{ mg/dL}$ allora il soggetto sarà affetto da T2DM [14].

Tra i metodi indiretti, è possibile calcolare il tasso di secrezione dell'insulina (ISR) a partire dalla concentrazione plasmatica del peptide C, date le loro concentrazioni equimolari. Mentre per il calcolo della clearance epatica è possibile utilizzare il rapporto molare insulinico (insulin molar ratio) tramite cui si può determinare l'estrazione frazionata dell'insulina epatica (HE). Il rapporto molare insulinico è definito come il rapporto tra le aree delle curve incrementali (AUC) che rappresentano l'andamento relativo ai peptidi dopo l'assorbimento di nutrienti (utilizzati nelle fasi di digiuno e dopo l'OGTT e FSIGT). Se il peptide C ha la stessa AUC dell'insulina, allora il rapporto molare insulinico (insulin molar ratio) corrisponde alla clearance dell'insulina. Visto che il peptide C e l'insulina hanno una diversa durata della persistenza all'interno del plasma, hanno cinetiche di scomparsa diverse, quindi il rapporto molare non può essere considerato come una stima attendibile per la clearance, in particolare per il calcolo dell'estrazione frazionaria dell'HE.

Esistono altri metodi indiretti:

- Il primo basato sull'utilizzo di clamp euglicemici-iperinsulinemici (EGC) tramite i quali è possibile calcolare il tasso della clearance metabolica (MCR) in vivo definito come il rapporto tra il tasso di infusione di insulina esogena (iniettata) e la concentrazione risultante di insulina plasmatica a velocità costante (endogena). Anche se non permette la distinzione tra clearance epatica ed extraepatica.
- Il secondo permette di calcolare il tasso di clearance frazionaria dell'insulina (FCR) durante il FSIGT. Si è supposta una diminuzione esponenziale singola nell'insulina durante l'iniezione, ma questa supposizione non tiene conto dei cambiamenti nel rilascio di insulina endogena (che sono temporanei) e fanno sì che il risultato dell'assunzione mono-esponenziale della scomparsa dell'insulina sia una stima non

corretta della clearance dell'insulina. Nonostante ciò, questo metodo viene utilizzato per la stima della clearance in diversi studi clinici.

Esiste un nuovo metodo utilizzato per misurare l'HE, durante l'utilizzo di EGC. Consiste in una prima iniezione di insulina nella vena porta addominale, e la seconda, effettuata in un giorno successivo, nella vena periferica (esperimenti PPII). In questo modo è possibile calcolare il tasso della clearance intraportale e periferica.

$$CL_{po} = \frac{1}{m_{po}} \quad (1) \quad CL_{pe} = \frac{1}{m_{pe}} \quad (2)$$

Nella quale CL_{po} è il tasso della clearance intraportale; CL_{pe} è il tasso della clearance periferica; m_{po} e m_{pe} sono rispettivamente le pendenze del tasso di infusione di insulina intraportale e del tasso di infusione di insulina periferica, visibili nella Figura 6.

L'HE viene calcolata come valore percentuale:

$$HE(\%) = \left(\frac{CL_{po} - CL_{pe}}{CL_{po}} \right) \cdot 100 = \left(1 - \frac{m_{po}}{m_{pe}} \right) \cdot 100 \quad (3)$$

[11].

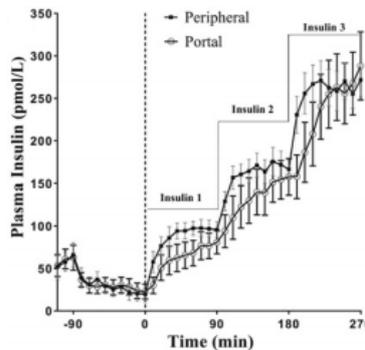


Figura 6. Profilo dell'insulina durante gli esperimenti PPII.

A causa dei limiti del peptide C, per la stima non invasiva della clearance in vivo vengono utilizzati modelli matematici. Per modello s'intende una rappresentazione della realtà che comprende un certo grado di approssimazione. Per la maggior parte si tratta di modelli matematici, che forniscono una rappresentazione della realtà fisiologica espressa sotto forma di equazioni matematiche. Esistono diverse categorie di modelli matematici, ma quello di rilevante importanza per i processi metabolici è quello di tipo esplicativo, tramite il quale è possibile capire in che modo il cambiamento di parametri fisiologici può causare variazioni

nell'assorbimento di sostanze. Sono molto utili poiché, essendo misure indirette, possono evitare l'utilizzo di tecniche invasive molto complesse [12]. Esistono vari modelli per determinare la stima della clearance dell'insulina:

- Modello di Eaton, nel quale la cinetica dell'insulina dipende da tre compartimenti: plasma, spazio extraepatico, spazio di diluizione extravascolare (Figura 6). La comparsa dell'insulina endogena viene assunta pari al tasso di rilascio del peptide C. La secrezione di insulina potrebbe essere calcolata dalla deconvoluzione (algoritmo utilizzato per il filtraggio) della concentrazione plasmatica del peptide C. HE viene stimato dopo l'ingestione di glucosio e l'iniezione di arginina (amminoacido insulinogenico). Il vantaggio di questo metodo è che permette di calcolare sia la clearance epatica che extraepatica dell'insulina considerando come valori medi 12 su 13 parametri del modello, relativi ad esperimenti sui cani, effettuati precedentemente. Per poterlo estendere agli umani, potrebbe essere necessaria la discussione della stima individuale del singolo valore costante dell'HE.

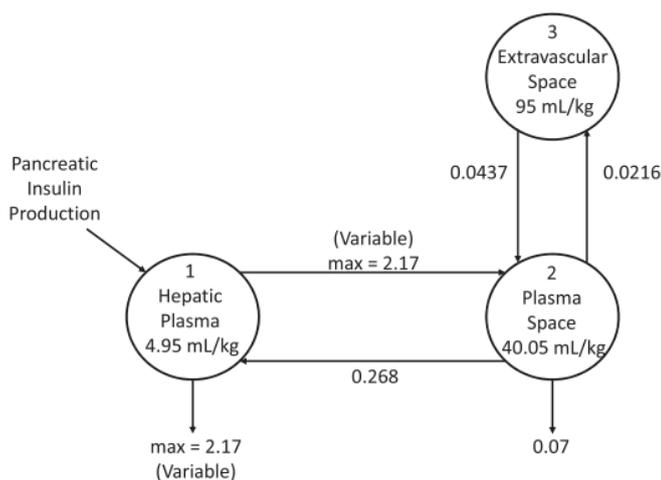


Figura 6. Modello a tre compartimenti, usato per descrivere la cinetica dell'insulina

Successivamente Cobelli propose un modello matematico più semplice formato da due compartimenti per la cinetica del peptide C. Questo modello considera la secrezione equimolare dei due peptidi, con solo l'insulina in fase di clearance epatica significativa. Quindi il calcolo individuale dell'ISR è possibile attraverso la stima parametrica a partire dalla cinetica del peptide C. Di conseguenza si può ricavare l'HE a partire dall'ISR e dall>IDR (tasso di distribuzione post-epatico dell'insulina), senza assumere alcun parametro a priori. Lo svantaggio di questo metodo sta nell'analisi contemporanea sia della secrezione

che della cinetica dell'insulina, che potrebbe causare una compensazione indesiderata nella stima del parametro.

- Modello Tura, nel quale vengono definiti il peptide C e l'insulina mediante una cinetica di distribuzione a compartimento singolo, considerata accettabile nei soggetti che manifestano durante l'IVGTT (intravenous glucose tolerance test) pattern a basse dinamiche. Permette la stima dell'ISR (stimato singolarmente con polinomi a tratti con parametri sconosciuti) e della degradazione dell'insulina durante l'OGTT. Il vantaggio di questo modello è dato dalla possibilità di determinare la stima della clearance epatica che extraepatica.
- Metodo Toffolo, ideato nel 2005, fornisce un modello della secrezione e della cinetica dell'insulina che permette di valutare l'HE durante il FSIGT ad insulina modificata. Utilizza la cinetica del peptide C a due compartimenti includendo valori standard della popolazione, tenendo conto di stime affidabili dell'ISR, indipendenti da compensazioni della secrezione cinetica indesiderate; mentre l'insulina viene descritta con un compartimento singolo lineare comprendente una descrizione funzionale del glucosio sull>IDR. Durante l'FSIGT ad insulina modificata si assiste ad una diminuzione della concentrazione di insulina dopo l'immissione di insulina esogena; ciò consente di stimare la cinetica dell'insulina, evitando sempre interazioni poco affidabili con la secrezione (insulina endogena). Combinando l'ISR, ottenuto dal modello del peptide C, e l>IDR, calcolato con l'insulina, l'HE nel corso del tempo, $HE(t)$, è calcolato come l'insieme di un indice che misura l'estrazione di insulina a livello basale (HE_b) e di uno che ne misura l'estrazione durante l'FSIGT ad insulina modificata (HE_{tot}). Il principale difetto di questo modello è l'incapacità di calcolare la clearance extraepatica dell'insulina (che viene assunta costante durante l'esperimento). Segue che $HE(t)$ è ottenuto solo considerando l'insulina appena secreta e non il ricircolo attraverso il fegato.
- Metodo Campioni, nel quale viene proposto un modello dell'HE durante l'OGTT. Utilizza la stessa cinetica del peptide C a due compartimenti (con valori della cinetica del peptide C assunti) per stimare l'ISR. Il modello a singolo compartimento usato da Toffolo per descrivere l'insulina doveva essere modificato per poter stimare l>IDR senza le caratteristiche del FSIGT ad insulina modificata. Per fare ciò, IDR viene derivato dall'equazione (1) e $HE(t)$ viene espresso come funzione lineare a tratti con un numero fisso di punti di rottura. Campioni sviluppò dei parametri standard della

cinetica dell'insulina, dipendenti dalle caratteristiche antropometriche. I punti di rottura sono gli unici a poter essere stimati. Questo modello presenta diversi svantaggi: l'espressione dell' $HE(t)$ come funzione lineare a tratti con un numero fisso di punti di rottura, piuttosto che un profilo continuo, può introdurre qualche errore; il calcolo dell' $HE(t)$ è basato solo sull'insulina appena secreta e non sul ricircolo dell'insulina plasmatica attraverso il fegato; inoltre non permette di stimare la componente extraepatica della clearance dell'insulina.

- Modello Piccinini, utilizzato per stimare l'HE durante l'OGTT. Comprende la stessa cinetica del peptide C (a due compartimenti) e descrizione della secrezione usata dal metodo precedente, ma utilizza tre compartimenti per la cinetica dell'insulina. La particolarità di questo modello è la rappresentazione fisiologica dell' $HE(t)$, che è linearmente dipendente dalle concentrazioni plasmatiche del glucosio:

$$HE(t) = -a_G \cdot G(t) + a_{OG} \quad (4)$$

dove a_G rappresenta il controllo del glucosio plasmatico sull'HE; a_{OG} ottenuto dai vincoli dello stato stazionario; HE_b e HE_{tot} vengono derivati dalle equazioni (2) e (3). La relazione espressa nell'equazione (4) è basata su fatto che, durante l'OGTT, i profili ricostruiti dell'HE subiscono un decremento, mentre le concentrazioni di glucosio ed insulina aumentano. Infine, oltre a fornire HE_b e HE_{tot} , questo modello consente la stima della sensibilità dell'HE alle concentrazioni plasmatiche del glucosio. Lo svantaggio di questo metodo è che non considera la componente extraepatica della clearance dell'insulina, e stima l'HE considerando solo l'insulina appena secreta e non il ricircolo dell'insulina plasmatica attraverso la vena e l'arteria epatica.

- Modello Polidori, migliore rispetto ai precedenti, stima sia la componente epatica che extraepatica della clearance dell'insulina a partire dal FSIGT ad insulina modificata (Figura 7). Per fare ciò sono necessarie alcune assunzioni:
 - a) l'insulina che viene secreta per via endogena entra prima nella circolazione portale e poi procede verso quella sistemica;
 - b) IDR viene calcolato dalle concentrazioni del plasma e dal valore fisso del flusso di plasma epatico;
 - c) il tasso di clearance extraepatica è proporzionale alle concentrazioni plasmatiche dell'insulina;

d) la clearance epatica può essere descritta come lineare o con cinetica di saturazione.

Con queste assunzioni, questo modello stima i relativi contributi di clearance dell'insulina epatica ed extraepatica, per tutta la durata del FSIGT. Per collegare i valori della clearance dell'insulina ottenuti da questo metodo, con quelli degli altri metodi, Polidori ha ricavato un indice della clearance per infusione endovenosa (CL_{IV}) per essere comparato con il clamp iperinsulinemico, e un indice della clearance per infusione portale (CL_{portal}) per essere comparata con la secrezione endogena. Questi parametri vengono ricavati dal rapporto tra i tassi di infusione endovenosa o portale dell'insulina e le concentrazioni di insulina allo stato stazionario sia per la versione lineare che per quella saturabile del modello [11].

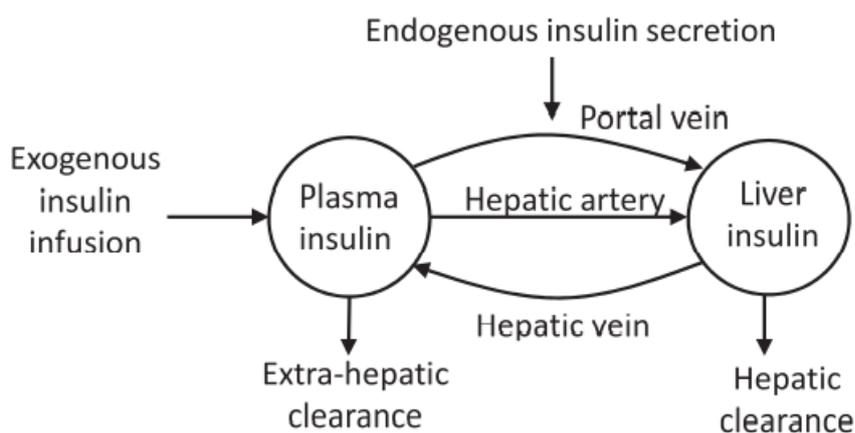


Figura 7. Rappresentazione grafica del modello matematico usato per stimare la clearance epatica ed extraepatica dell'insulina utilizzato da Polidori et al.

Successivamente si è scoperto che il metodo per la stima della clearance, basato sul rapporto tra l'AUC dell'ISR e quello della concentrazione plasmatica dell'insulina, potrebbe non essere adeguatamente preciso se l'insulina plasmatica non ritorna al livello basale dopo l'OGTT e il FSIGT. Questo difetto può essere superato con gli studi di Shah et al., mediante l'utilizzo della seguente formula:

$$\left(\frac{AUC_{ISR}}{AUC_{INS}}\right) - V_{INS} \times \frac{(INS_{FIN} - INS_{INIT})}{AUC_{INS}}$$

Nella quale:

- INS è l'insulina plasmatica;

- FIN è l'istante finale del test;
- $INIT$ è l'istante iniziale;
- V_{INS} è il volume di distribuzione dell'insulina, di solito pari a 0.14 L/Kg.

Questo metodo descritto poc'anzi è considerato il più accurato per la stima della clearance [15].

Capitolo 4: Deconvoluzione numerica per la stima dell'ISR

Durante l'IVGTT è possibile calcolare l'ISR con metodi matematici che analizzano la concentrazione plasmatica del peptide C. Questo è possibile perché il peptide C secreto dal pancreas è equimolare all'insulina secreta, infatti l'ISR è uguale al CPSR (C-peptide secretion rate). La stima del CPSR non è un problema banale perché sia la secrezione del peptide C da parte del pancreas che la sua clearance dalla circolazione periferica avvengono contemporaneamente.

La soluzione matematica di questo problema è basata su un metodo di deconvoluzione, considerando il CPSR come una funzione input sconosciuta, la risposta del plasma ad un impulso unitario come funzione di trasferimento, e le concentrazioni plasmatiche del peptide C come output. L'integrale di convoluzione sarà dato dalla seguente equazione:

$$C(t) = \int_0^t h(t - \tau) CPSR(\tau) d\tau \quad (5)$$

Nella quale $C(t)$ è la concentrazione plasmatica del peptide C (pmol/L), t sono i minuti trascorsi dopo la somministrazione di glucosio, $h(t)$ è la risposta impulsiva del peptide C e $CPSR(t)$ è il tasso di secrezione del peptide C (pmol/min).

Usando il metodo di Eaton [16] è possibile ricavare il CPSR come:

$$CPSR(t) = -e^{-k_2 t} \left[k_1 C(t_1) e^{k_2 t_1} + k_1 k_2 \int_{t_1}^t e^{k_2 s} C(s) ds \right] + \frac{dC(t)}{dt} + (k_1 + k_3) C(t) \quad (6)$$

dove k_1 , k_2 e k_3 sono le costanti di velocità frazionaria che descrivono il movimento del peptide C rispettivamente dal compartimento 1 (l'unico accessibile) al compartimento 2 (compartimento periferico), dal compartimento 2 al compartimento 1 e l'eliminazione del peptide C dal compartimento 1; $C(t_1)$ è la concentrazione iniziale del peptide C al tempo zero. Lo svantaggio maggiore del metodo di Eaton et al. è la necessità di un ulteriore studio per isolare la cinetica di disposizione del peptide C.

Un altro metodo di risoluzione fu proposto da Polonsky et al. [17] e Van Cauter et al. [18] che riuscirono a dimostrare che la cinetica di disposizione del peptide C poteva essere stimata dallo stato metabolico dell'individuo (normale, obeso, diabetico), così come dai dati demografici (anni, sesso, superficie corporea). Volund et al inserirono le informazioni dell'esperimento di Polonsky et al. all'interno di un programma informatico (ISEC) per

facilitare la stima dei profili della secrezione dell'insulina. Il metodo di deconvoluzione utilizzato prevede una regolarizzazione vincolata e approssimazione graduale alla secrezione dell'insulina. In questo modello viene utilizzata la stima dei minimi quadrati non solo per stimare i parametri di disposizione dell'insulina e del peptide C, ma anche per stimare una funzione che descrive la frazione della secrezione di insulina pancreatica estratta dal fegato. Vi è quindi l'assunzione che il fegato estrae dell'insulina, ma non estrae il peptide C; inoltre vengono utilizzati modelli a singolo compartimento per la disposizione sia dell'insulina che del peptide C.

Infine nell'ultima tecnica di deconvoluzione, chiamata deconvoluzione numerica, deconvoluzione parametrica o metodo di Cutler per la deconvoluzione, la forma funzionale della funzione in input viene ipotizzata Gaussiana, quindi il problema di deconvoluzione diventa una stima parametrica risolvibile con il metodo dei minimi quadrati. In questa risoluzione il problema principale è identificare la forma funzionale (Gaussiana) che abbia la capacità di descrivere l'andamento della funzione in input (CPSR) [19].

4.1 Modello della secrezione del peptide C usando una Gaussiana come input

La tecnica di deconvoluzione utilizzata in questo elaborato è quella ideata da Boston et al., che utilizza un modello a due compartimenti per descrivere la disposizione del peptide C, visibile nella figura 8. È molto simile al metodo di Cutler, ma con un'unica differenza; si assume che, subito dopo l'IVGTT, la secrezione del peptide C dal pancreas viene descritta da due processi: C_b (concentrazione basale del peptide C) costante e $G_1(t)$ (funzione Gaussiana che rappresenta la prima fase di secrezione del peptide C). Le equazioni che descrivono questo modello sono:

$$\frac{dC_1(t)}{dt} = S(t) + k_2C_2(t) - (k_1 - k_3)C_1(t) \quad (7)$$

$$\frac{dC_2(t)}{dt} = k_1C_1(t) - k_2C_2(t) \quad (8)$$

dove $C_1(0) = C_b$; $C_2(0) = \frac{C_b k_1}{k_2}$; $S(t) = S_b + G_1(t)$; $G_1(t) = P_1 e^{[-P_2(t-P_3)^2]}$.

$C_1(t)$ e $C_2(t)$ sono rispettivamente le concentrazioni del peptide C nel compartimento 1 e 2; k_1 , k_2 e k_3 sono le costanti di velocità di trasferimento; $S(t)$ è una funzione che descrive il tasso di secrezione del peptide C, S_b il tasso basale di secrezione del peptide C; P_1

rappresenta l'ampiezza della prima fase dell'impulso di secrezione, P_2 è inversamente proporzionale all'ampiezza dell'impulso a metà dell'altezza del picco, P_3 rappresenta il tempo per raggiungere il picco nella prima fase del tasso di secrezione del peptide C [19].

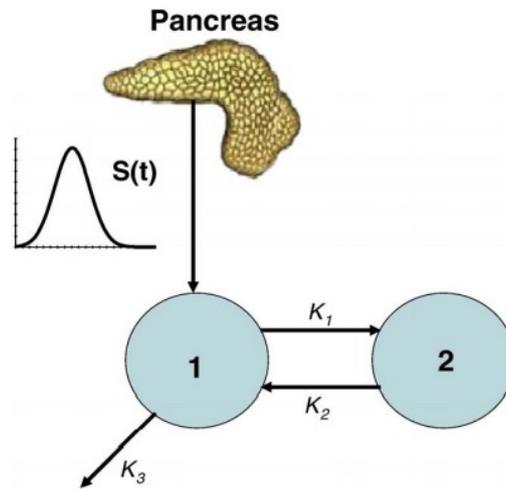


Figura 8. Modello a due compartimenti dell'insulina e del peptide C, usato per analizzare i dati dall'IVGTT.

Capitolo 5: Stima delle componenti della clearance dell'insulina in soggetti diabetici anziani

5.1 Caratteristiche dei soggetti e test metabolico

I soggetti presi in esame sono 17 uomini con età compresa tra i 51 ed i 68 anni, altezza compresa tra 151 e 170 cm e un peso corporeo compreso tra 48 e 85 kg, affetti di diabete mellito di tipo 2 (tabella 2). I dati messi a disposizione della Sezione Endocrino-Metabolica del laboratorio di Bioingegneria (Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione) dell'Università Politecnica delle Marche grazie alla collaborazione con l'Unità Metabolica dell'Istituto di Neuroscienze del CNR (Padova), sono stati raccolti nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki e con l'approvazione del comitato etico locale. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a Insulin Modified IVGTT. Il glucosio è stato iniettato al tempo $t = 0$ e l'insulina infusa al tempo $t = 20$ minuti per 5 minuti consecutivi. Le concentrazioni di insulina e del peptide C sono state ottenute durante il test, prelevando campioni di sangue venoso ad intervalli non equidistanti espressi in minuti (0, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180). I soggetti sono stati suddivisi in due gruppi separando quelli di età inferiore (under 65, $n=12$) e superiore o uguale a 65 (over 65, $n=5$) anni.

Tabella 2. Caratteristiche dei soggetti presi in esame.

Gruppo	Età	Peso (kg)	Altezza (cm)
under 65 (n = 12)	60 ± 5	72.00 ± 12.39	160.33 ± 7.15
over 65 (n = 5)	67 ± 1	73.80 ± 6.22	159.60 ± 8.85

5.2 Modelli utilizzati per la stima delle componenti della clearance dell'insulina

Risolvendo le equazioni di Van Cauter et al. (capitolo 4) che ci permettono di stimare la cinetica di disposizione del peptide C a partire dallo stato metabolico in nostro possesso e dalle caratteristiche dei pazienti e utilizzando la tecnica di deconvoluzione ideata da Boston et al. (paragrafo 4.1) è stato possibile calcolare il CPSR e di conseguenza l'ISR. Successivamente le componenti epatica (FE_I) ed extraepatica (CL_p) della clearance dell'insulina sono state calcolate mediante il modello Polidori (paragrafo 3.2).

5.3 Analisi statistica

È stata valutata l'esistenza di correlazione tra le componenti epatica ed extraepatica della clearance e l'età nella totalità dei soggetti. Per valutare la possibile provenienza del CL_p e del FE_l dei suddetti gruppi da una distribuzione normale standard è stato utilizzato il Kolmogorov-Smirnov test. Per variabili non normalmente distribuite è stata effettuata una trasformazione logaritmica prima di applicare lo Student t test, utilizzato per valutare eventuali differenze tra CL_p e FE_l dei due gruppi.

5.4 Risultati

Nella tabella seguente sono riportati i risultati della stima delle componenti epatica ed extraepatica della clearance dell'insulina.

Tabella 3. Risultati della stima delle componenti della clearance dell'insulina.

Soggetti	CL_p (L/min)	FE_l (%)
1	0.049	45.2
2	0.992	89.8
3	0.051	41.3
4	0.318	81.3
5	0.028	18.0
6	0.101	71.0
7	0.035	11.5
8	0.334	97.3
9	0.038	9.6
10	0.023	9.5
11	0.145	73.2
12	0.038	29.5
13	0.035	29.2
14	0.069	33.1
15	0.168	86.9
16	0.103	75.8
17	0.083	73.3
Gruppo	Media±deviaz. standard	Media±deviaz. standard
under 65	0.197±0.286	54.6±30.9

over 65	0.080 ± 0.057	44.1 ± 33.3
---------	-------------------	-----------------

Non sono state riscontrate correlazioni significative tra CL_p ($R=-0.177$, $p=0.498$) e l'età ed FE_l ($R=-0.323$, $p=0.206$) e l'età analizzate su tutta la popolazione.

Non sono state riscontrate differenze nei due gruppi di soggetti, né per CL_p ($p=0.45$) né per FE_l ($p=0.57$).

Discussioni e conclusioni

Lo scopo di questo elaborato è quello di effettuare una stima modellistica delle componenti epatica ed extra-epatica della clearance dell'insulina in soggetti con diabete di tipo 2 e di valutare la loro relazione con l'età. A tal proposito è stato utilizzato il modello matematico proposto da Polidori et al. [1] che permette la stima delle due componenti della clearance dell'insulina a partire da dati di test di tolleranza al glucosio per via endovenosa insulino-modificato. Il modello di Polidori richiede come input la stima della secrezione di insulina che in questo elaborato è stata stimata utilizzando un approccio di deconvoluzione numerica. Tale approccio, proposto da Boston et al. [19] consiste nel trasformare un problema di deconvoluzione in un problema di stima parametrica.

I risultati ottenuti attraverso questo approccio modellistico hanno mostrato che non si riscontra una differenza significativa nei due gruppi di soggetti caratterizzati da età diverse, né nella componente epatica né in quella extra-epatica della clearance dell'insulina. Si è inoltre indagata una possibile correlazione delle componenti della clearance con l'età dei soggetti non evidenziando però una correlazione significativa.

Per indagare più a fondo l'effetto dell'età sulla clearance dell'insulina in condizione di diabete di tipo 2 si rende necessario l'utilizzo di un dataset più ampio che permetta una maggiore stratificazione per età; infatti, visto l'aumento dell'incidenza del diabete mellito di tipo 2 nei bambini e negli adolescenti verificatosi negli ultimi vent'anni in seguito ad un aumento dell'incidenza di obesità e sovrappeso in giovane età, l'informazione ottenuta da un ampio dataset rappresenterebbe un punto di partenza per l'approfondimento dello studio del ruolo della clearance dell'insulina come processo alla base dello sviluppo del diabete di tipo 2 in diverse fasce d'età.

Bibliografia

- [1] www.salute.gov.it
- [2] www.epicentro.iss.it
- [3] www.diabete.com
- [4] Anastasi G et al. TRATTATO DI ANATOMIA UMANA-Volume Secondo. Edi-Ermes. 2010. Quarta edizione.
- [5] Guyton A, Hall J et al. Fisiologia medica. Edra. 2013. Tredicesima edizione.
- [6] www.diabete.net
- [7] Temneanu O R, Trandafir L M, Purcarea M R, Type 2 diabetes in children and adolescents: a relatively new clinical problem within pediatric practise. Journal of Medicine and Life Vol. 9, Issue 3, July-September 2016; pp 235-239.
- [8] Pellegrini M A et al., Il Diabete nell'Anziano Fragile: Istruzioni per l'uso A cura del gruppo AMD Diabete nell'Anziano, www.aemmedi.it.
- [9] Chently F, Azzoug S, Mahgoun S, Diabetes mellitus in elderly. Indian J Endocrinol Metab, Nov-Dec 2015;19(6):744-52.
- [10] Piccinini F, Bergman R, The Measurement of Insulin Clearance. Diabetes Care. 2020; 43:2296-2302.
- [11] Bergman R, Piccinini F et al., Hypothesis: Role of Reduced Hepatic Insulin Clearance in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. Diabetes (2019); 68: e1709-e1716.
- [12] Cobelli C, Carson E, INTRODUCING TO MODELING IN PHYSIOLOGY AND MEDICINE. Elsevier. 2008. Prima edizione.
- [13] Pacini G et al., Insulin sensitivity and glucose effectiveness: minimal model analysis of regular and insulin-modified FSIGT. American Journal of Physiology (1998). 274(4): e592-599.
- [14] Ohashi K et al., Increase in hepatic and decrease in peripheral insulin clearance characterize abnormal temporal patterns of serum insulin in diabetic subjects. NPJ Systems Biology and Applications (2018). 4:14.
- [15] Tura A, Pacini G, COMMENT ON PICCININI AND BERGMAN The Measurement of Insulin Clearance. Diabetes Care (2021); 44: e35.
- [16] Eaton R P et al., Prehepatic insulin production in man: kinetic analysis using peripheral connecting peptide behaviour. J Clin Endocrinol Metab 1980; 51:520-8. www.diabete.net

- [17] Polonsky K S et al., Quantitative study of insulin secretion and clearance in normal and obese subjects. *J Clin Invest* 1988; 81:435-41.
- [18] Van Cauter et al., Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels: comparison of individual and standard kinetic parameters for C-peptide clearance. *Diabetes* 1992; 41:368-77.
- [19] Boston R C et al., A numerical deconvolution method to estimate C-peptide secretion in humans after an intravenous glucose tolerance test. *Metabolism Clinical and Experimental* 58 (2009), 891-900.