

# LA SENSIBILITÀ INSULINICA NEL DIABETE MELLITO DI TIPO 2 È DIVERSA PER IL METABOLISMO GLUCIDICO E PROTEICO

P. LUCIDI, G. PERRIELLO, S. PAMPANELLI, F. PORCELLATI, M. LEPORE, G. BOLLI, P. DE FEO

Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche, Università degli Studi di Perugia, Perugia

riassunto

Nei pazienti con diabete di tipo 2 si verificano variazioni giornaliere della sensibilità insulinica caratterizzate da uno stato di insulino-resistenza con glicemie più elevate al mattino rispetto alle ore serali. Per verificare se il fenomeno dell'insulino-resistenza riguarda soltanto il metabolismo glucidico o se interessa anche il metabolismo proteico, abbiamo studiato un gruppo di 6 pazienti diabetici di tipo 2 con la tecnica del clamp iperinsulinemico isoglicemico in due differenti occasioni: nelle ore del mattino (studio M: dalle 5.00 alle 8.00) e in quelle serali (studio S: dalle 17.00 alle 20.00) dopo lo stesso periodo di digiuno (9 ore). Durante gli studi, abbiamo confrontato gli effetti di una fisiologica iperinsulinemia sul turnover proteico e sul metabolismo glucidico mediante infusione di isotopi stabili della leucina e del glucosio: la velocità dell'infusione esogena di glucosio e le glicemie plasmatiche sono risultate rispettivamente più bassa e più elevate nello studio M, mentre la proteolisi è risultata simile nei due studi (M e S). In conclusione, nei pazienti diabetici di tipo 2 il fenomeno dell'insulino-resistenza nelle ore del mattino è limitato al metabolismo glucidico e non si estende a quello proteico. Parole chiave. Insulino-sensibilità, metabolismo proteico e glucidico, diabete tipo 2.

summary

*Insulin sensitivity in type 2 diabetic patients is different between glucose and protein metabolism. Patients with type 2 diabetes show circadian change in insulin sensitivity characterized by insulin-resistance with higher plasma glucose levels in the morning hours. To verify whether insulin resistance affects only glucose metabolism or is extended also to protein metabolism we studied a group of 8 type 2 diabetic patients during hyperinsulinemic euglycemic clamp in two different occasion: in the morning hours (study M: from 0500 to 0800) and in the evening hours (study E: from 1700 to 2000) after the same period (9 hours) of fasting. During the studies, we compared the effects of physiological hyperinsulinemia on protein turnover and glucose metabolism by infusion of stable isotopes of leucine and glucose: the rate of exogenous glucose infusion and plasma glucose were lower and greater in the morning study respectively, but the rate of whole body proteolysis was similar in the two studies (morning and evening). In conclusion, in type 2 diabetic patients morning insulin-resistance affects glucose metabolism but not protein metabolism. Key words. Insulin-sensitivity, protein and glucose metabolism, type 2 diabetes.*

## Introduzione

Nei soggetti normali l'iperinsulinemia post-prandiale è essenziale per sostenere l'anabolismo proteico come dimostrato dalla perdita di masse muscolari fino alla cachessia riportata nei pazienti diabetici insulino-deficienti prima dell'introduzione della terapia insulinica (1). L'insulina favorisce l'incorporazione degli aminoacidi introdotti con la dieta nelle proteine corporee attraverso due meccanismi: l'inibizione della proteolisi e la stimolazione selettiva della sintesi proteica (1, 2). Quando l'insulina è carente, come nei pazienti dia-

betici di tipo 1 (insulino-deficienti), la perdita netta di proteine è dovuta proprio al concomitante incremento della proteolisi e alla ridotta incorporazione degli aminoacidi introdotti con la dieta (3, 4).

Nei pazienti diabetici di tipo 2 è stato chiaramente dimostrato che si verificano variazioni giornaliere della sensibilità insulinica caratterizzate da uno stato di insulino-resistenza mattutina (glicemie più elevate al mattino) relativamente alle ore serali (5). Non si sa se queste variazioni circadiane della sensibilità insulinica inte-

ressano solo il metabolismo glucidico o si estendono anche al metabolismo proteico. La risposta a questo quesito è rilevante oltre che da un punto di vista fisiopatologico anche da quello clinico. Infatti, se tale ipotesi venisse dimostrata, nei soggetti diabetici di tipo 2, sarebbe opportuno distribuire l'assunzione delle proteine contenute nella dieta privilegiando il periodo serale, in cui la sensibilità insulinica è maggiore.

Per testare questa ipotesi abbiamo studiato 6 soggetti con diabete mellito di tipo 2 in due occasioni diverse, alle ore 5 del mattino e alle 5 del pomeriggio mediante la tecnica del clamp iperinsulinemico euglicemico e la concomitante determinazione della cinetica proteica (turnover della leucina) e della quantità di glucosio esogeno necessario per il mantenimento della glicemia.

## Materiali e metodi

### Protocollo

Sono stati studiati 6 pazienti affetti da diabete mellito di tipo 2 (tab. I) in trattamento con la sola terapia dietetica. Una volta ottenuto il loro consenso informato, i soggetti si presentavano presso il Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche in maniera randomizzata in due diverse occasioni: dalle ore 5 alle ore 8 (studio M) e dalle ore 17 alle ore 20 (studio S). In entrambi i casi i pazienti erano digiuni da 9 ore a distanza da un pasto costituito da 600 kcal (55% carboidrati, 15% proteine e 30% lipidi) e venivano sottoposti a clamp euglicemico-iperinsulinemico e a infusione continua di  $[1-^{13}\text{C}]$  leucina per lo studio del metabolismo proteico.

Circa 30 minuti prima dello studio ai pazienti veniva inserito un catetere di teflon (G-18) in una vena antecubitale dell'avambraccio per consentire l'infusione di leucina, insulina e glucosio, mentre in una vena della mano controlaterale veniva inserito, in maniera retrograda, un ago Butterfly (G-19) e la stessa mano veniva posizionata in un dispositivo termoregolato a 65 °C per consentire il prelievo di campioni di sangue arterializzato (6). Alle ore 5 (studio M) o alle ore 17 (studio S) veniva iniziata l'infusione di L- $[1-^{13}\text{C}]$  leucina (bolo=0,7mg·kg + infusione continua alla velocità di 0,7 mg·kg·h<sup>-1</sup>) e di insulina (Actrapid HM, Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark) alla velocità di 10 mU/m<sup>2</sup>·min<sup>-1</sup> che venivano mantenute costanti durante le tre ore di durata dello studio. La velocità di infusione del glucosio esogeno invece veniva variata sulla base delle glicemie plasmatiche che venivano effettuate ogni 5-10 minuti. Ai tempi -15, 0, 150, 165 e 180 minuti, venivano prelevati campioni ematici per consentire

TAB. I. Caratteristiche dei pazienti con diabete mellito di tipo 2

|                           |           |
|---------------------------|-----------|
| Numero                    | 6         |
| Sesso                     | Maschile  |
| Età                       | 54±2      |
| IMC (kg/m <sup>2</sup> )  | 27,8±0,8  |
| Durata del diabete (anni) | 3,8±1,1   |
| Terapia                   | Dietetica |
| Glicemia basale (mM)      | 8,1±0,4   |
| HbA <sub>1c</sub> (%)     | 6,8±0,4   |

la determinazione delle insulinemie, delle concentrazioni plasmatiche e dell'arricchimento isotopico dell' $\alpha$ -ketoisocaproato ( $\alpha$ -KIC: il chetoacido corrispondente della leucina).

### Metodi analitici

Le concentrazioni plasmatiche di glucosio venivano determinate mediante Beckman Glucose Analyzer (Beckman, Palo Alto, CA), mentre quelle di insulina con un kit per analisi immunoradiometriche (Biosource Europe, Fleurus, Belgio).

Il metabolismo proteico è stato indagato determinando la velocità di proteolisi corporea globale utilizzando il metodo della diluizione isotopica (7). A tale scopo sono stati misurati le concentrazioni plasmatiche e l'arricchimento isotopico dell' $\alpha$ -KIC utilizzando un gas cromatografo di massa (GCMS Voyager, Finningan).

In particolare, il KIC è stato estratto come descritto in precedenza (8) dopo aver aggiunto al plasma 50  $\mu\text{L}$  di norleucina e 20  $\mu\text{L}$  di  $\alpha$ -ketoisocaproato come standard interno. L'arricchimento e le concentrazioni plasmatiche del KIC sono state determinate utilizzando il GCMS con ionizzazione in impatto elettronico e monitorando i suoi derivati siliquinoxalinolici tramite gli ioni 301 e 302 (9).

### Calcoli

L'arricchimento del KIC è stato espresso come rapporto tracciante/tracciato (TTR) tenendo conto della correzione per la distribuzione isotopomerica (10). La stima della proteolisi, rappresentata dalla velocità di

comparsa della leucina plasmatica ( $R_a$ :  $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}\cdot\text{min}$ ), è stata calcolata in condizioni di stato stazionario isotopico e metabolico (tempi 150-180 minuti utilizzando il modello del reciprocal pool (11) come segue:  $R_a=I/E_p$ , dove  $I$  rappresenta la velocità di infusione della L-[1- $^{13}\text{C}$ ] leucina ed  $E_p$  l'arricchimento plasmatico (TTR) del KIC.

### Analisi statistica

I dati vengono espressi come  $\text{media}\pm\text{SE}$  e le differenze vengono considerate significative con un  $p<0,05$ .

## Risultati

### Metabolismo glucidico (fig. 1)

Le concentrazioni plasmatiche basali di glucosio erano maggiori al mattino rispetto a quelle della sera (studio M= $7,2\pm 0,4$  vs studio S= $5,4\pm 0,3$  mM). L'infusione di glucosio esogena risultava notevolmente minore (circa 7 volte) al mattino rispetto a quella della sera (studio M= $1,3\pm 1,1$  vs studio S= $8,1\pm 1,5$   $\mu\text{Mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}$ ). Tale differenza, osservata in tutti i pazienti diabetici, non era dovuta a problemi metodologici perché le glicemie plasmatiche e le concentrazioni di insulina plasmatica degli ultimi 30 minuti del clamp erano simili tra i due studi (studio M= $5,5\pm 0,4$  vs studio S= $5,3\pm 0,3$  mM).

### Metabolismo proteico (fig. 2)

La velocità di comparsa della leucina ( $R_a$ ), indice della proteolisi corporea, a differenza delle drammatiche differenze nel fabbisogno di glucosio, era simile al mattino e alla sera durante il clamp iperinsulinemico isoglicemico (studio M= $1,34\pm 0,14$  vs studio S= $1,33\pm 0,15$   $\mu\text{Mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}$ ), a indicare che la sensibilità insulinica del metabolismo proteico non si modifica nei due periodi del giorno.

## Discussione

I risultati di questo studio confermano che nei pazienti con diabete mellito di tipo 2 esiste una marcata differenza nella sensibilità insulinica del metabolismo glucidico. I pazienti diabetici, che erano tutti solo in trattamento dietetico, presentavano prima dell'inizio dell'infusione insulinica (clamp) valori glicemici in media più elevati di circa il 50% con insulinemie basali simili. L'infusione di insulina induceva una iperinsulinemia fisiologica (incremento inferiore a 3 volte

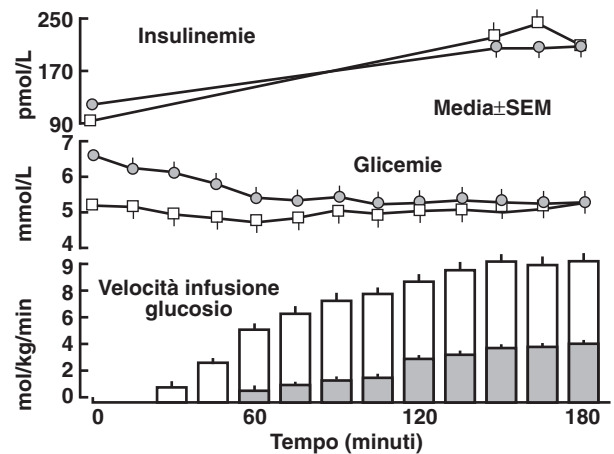


Fig. 1. Risultati del metabolismo glucidico. Rappresentazione dei dati come  $\text{media}\pm\text{SEM}$  delle insulinemie, delle glicemie e della velocità di infusione di glucosio esogena: in simboli pieni grigi sono rappresentati i dati dello studio S (h 17-20), mentre in simboli vuoti i dati dello studio M (h 5-8).

rispetto al basale) che era uguale al mattino e alla sera, ma richiedeva un fabbisogno di glucosio esogeno per il mantenimento dell'isoglicemia di circa 7 volte inferiore al mattino rispetto alla sera. Queste marcate differenze nella sensibilità insulinica non sono imputabili a problemi sperimentali in quanto i pazienti venivano studiati al mattino e alla sera dopo lo stesso periodo di digiuno, successivo all'introduzione di uno stesso pasto. Pertanto, i nostri dati confermano che l'insulino-resistenza glucidica mattutina e/o l'insulino-sensibilità serale rappresentano una caratteristica propria del diabete di tipo 2 con importanti riflessi clinico-terapeutici (5).

L'ipotesi di un analogo comportamento del metabolismo proteico e glucidico in risposta all'iperinsulinemia fisiologica al mattino e alla sera viene, invece,

### Ra LEUCINA = PROTEOLISI

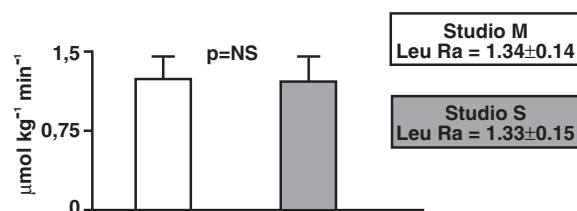


Fig. 2. Risultati del metabolismo proteico: Rappresentazione dei dati della proteolisi come  $\text{media}\pm\text{SEM}$  della  $R_a$  della leucina: in grigio sono rappresentati i dati dello studio S (h 17-20), mentre in bianco i dati dello studio M (h 5-8).

esclusa dal nostro studio. Si dimostra, infatti, per la prima volta in letteratura, che, nei pazienti con diabete mellito di tipo 2, metabolismo proteico e metabolismo glucidico si dissociano nella risposta circadiana all'insulina. In questi pazienti, il fenomeno dell'insulino-resistenza mattutina è limitato esclusivamente al metabolismo glucidico e non coinvolge quello proteico, non essendosi verificate variazioni circadiane riguardanti la proteolisi. Ciò è in accordo con i dati di Luzi et al, che non hanno trovato differenze nella cinetica degli aminoacidi imputabili al fenomeno dell'insulino-resistenza in pazienti con diabete mellito di tipo 2 rispetto ai soggetti normali nel corso di uno studio condotto soltanto al mattino (12). Pertanto, il meccanismo responsabile delle variazioni circadiane della sensibilità insulinica al glucosio deve essere necessariamente localizzato a livello post-recettoriale. Tale ipotesi è compatibile con la dimostrazione di specifiche vie di trasmissione intracellulare del segnale insulinico differenziate per il metabolismo glucidico e quello proteico (13).

In conclusione, i nostri dati dimostrano che il fenomeno della resistenza insulinica mattutina, tipica dei pazienti con diabete di tipo 2 che richiedono il solo trattamento dietetico, non coinvolge il metabolismo proteico e supportano i dati clinici che mostrano un mantenimento di una normale massa muscolare nelle prime fasi del diabete mellito di tipo 2, prima che si manifesti la deficienza insulinica.

## Bibliografia

1. De Feo P, MW Haymond: Effect of insulin on protein metabolism in humans: methodological and interpretative questions. *Diab Nutr & Meta* **4**, 241-249, 1991
2. De Feo P, Volpi E, Lucidi P, Cruciani G, Reboldi G, Siepi D, Mannarino E, Santeusano F, Brunetti P, Bolli GB: Physiological increment in plasma insulin concentrations have different effects on synthesis of hepatic proteins in normal humans. *Diabetes* **42**, 995-1002, 1993
3. Tessari P et al: Defective suppression by insulin of leucine-carbon appearance and oxidation in type I, insulin dependent diabetes mellitus: evidence for insulin resistance involving glucose and amino acid metabolism. *J Clin Invest* **77**, 1797-1804, 1986
4. De Feo P, Gan Gaisano M, Haymond MW: Differential effects of insulin deficiency on albumin and fibrinogen synthesis in humans. *J Clin Invest* **88**, 833-840, 1991
5. Trovati M, Burzacca S, Mularoni E, Massucco P, Cavalot F, Mattiello L, Anfossi G: A comparison of the predictive power for overall blood glucose control of a "good" fasting level in type 2 diabetic patients on diet alone or with oral agents. *Diabetic Medicine* **9** (2), 134-137, 1992
6. McGuire EJ, Helderman J, Tobin J, Andres R, Berman M: Effects of arterial venous sampling on analysis of glucose Kinetics in man. *J Appl Physiol* **41**, 565-573, 1976
7. Bier DM: Intrinsically difficult problems: The kinetics of body proteins and amino acid in man. *Diabetes Metab Rev* **5**, 111-132, 1989
8. Horber FF, Kahl J, Lecavalier L, Krom B, Haymond MW: Determination of leucine and ketoisocaproic acid concentrations and specific activity in plasma and leucine specific activities in protein using High-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **495**, 81-94, 1989
9. Knapp DR: Amino acid and peptides. In: Knapp DR (Ed): *Handbook of analytical derivatization reactions*. Wiley-Liss, New York, 1979, p. 325-326
10. Wolfe RR: Calculation of isotopic enrichment with SIM, including isotopomer effect. In: Wolfe RR (Ed): *Radioactive and stable isotope tracers in biomedicine*. Wiley-Liss, New York, 1992, p. 62-68
11. Schwenk WF, Beaufre B, Haymond MW: Use of reciprocal pool specific activities to model leucine metabolism in humans. *Am J Physiol* **249**, E646-E650, 1985
12. Luzi L, Petrides AS, De Fronzo RA. Different sensitivity of glucose and amino acid metabolism to insulin in NIDDM. *Diabetes* **42**, 1868-1877, 1993
13. Moule SK, Denton RM: Multiple signaling pathways involved in metabolic effects of insulin. *Am J Cardiol* **4**, **80** (3A), 41A-49A, 1997

Corrispondenza a: Dott.ssa Paola Lucidi, Dipartimento di Medicina Interna e Scienze Endocrine e Metaboliche, Università degli Studi di Perugia, Via E. dal Pozzo, 06126 Perugia e-mail: lucidi@dimisem.med.unipg.it

Pervenuto in Redazione il 15/9/2000 - Accettato per la pubblicazione il 30/10/2000

A questo lavoro è stato attribuito il 1° Premio Nazionale Roche - *Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo "Diabete, obesità e patologie metaboliche: dalla ricerca alla clinica"*