

## ACTIVITATEA INSULINICĂ

O. Nussbaum, Vera G. Nussbaum

Cercetările în domeniul diabetului s-au lărgit foarte mult în ultimii ani. Cu toate acestea sîntem departe de cunoaşterea exactă a patomecanismului şi a etiologiei diabetului zaharat. Diabetul nu este o boală unitară, ci un sindrom cu patogeneză variată. În trecut s-a presupus că toate simptomele diabetului sînt datorate lipsei insulinei (I) în ultimul timp însă, cercetătorii au pus în evidenţă cantităţi apreciabile de I în serul unor bolnavi. Cauza tulburărilor metabolice nu pare astfel a fi întotdeauna lipsa I endogene ci poate fi şi un defect în utilizarea hormonului la periferie — de către ţesuturile bolnavului. S-a presupus că în astfel de cazuri de diabet I circulantă se găseşte într-o formă ineficace. Atenţia cercetătorilor s-a îndreptat deci, asupra particularităţilor fizice, chimice şi biochimice ale I circulante precum şi asupra acţiunii ei la nivelul diferitelor ţesuturi.

### *Metoda pentru determinarea activităţii insulinice*

Dozarea I în ser întîmpină mari greutăţi, măsurarea ei cu metode chimice sau fizico-chimice în prezent nu este posibilă. Metoda cromatografică a lui *Fenton* are doar o importanţă teoretică, deoarece necesită cantităţi mari de ser. Metodele de dozare cel mai des întrebunţate sînt metodele biologice.

## Metode de dozare biologică

Principiul dozării I serice cu metode biologice constă în compararea efectului serului de cercetat cu cel al I purificate și standardizate, pe medii biologice receptive la acțiunea I. Inconvenientul comun al acestor metode rezidă în faptul că aprecierea cantității de hormon se limitează numai la constatarea efectelor determinate de acțiunea acestuia (de exemplu creșterea cantității de glicogen, scăderea cantității de glucoză sau a acizilor grași liberi etc.) în mediul respectiv.

Metodele biologice *in vivo* prezintă doar un interes pur teoretic. Astfel, s-a dozat insulinemia la animale mici de laborator pe baza efectului hipoglicemiant al hormonului.

Mai simple și mai precise sînt metodele biologice *in vitro*. Aceste metode întrebuințează țesuturi izolate, sensibile la acțiunea I; țesutul muscular (diafragma de șobolan) și cel adipos (țesutul adipos epididimal de șobolan).

Bornstein a publicat în 1950 primele sale experiențe cu metoda diafragmului de șobolan, urmat de Groen (1852), Vallance Owen (1954), Randle (1954), Wright (1957), Selzer și Schmidt (1959).

O altă metodă biologică *in vitro* pentru dozarea hormonului este cea a țesutului adipos epididimal de șobolan introdusă de Ditschuneit (1959) și aplicată de Shep (1960).

Pentru obținerea unei precizii mai mari, unii autori dozează I pe ambele țesuturi, avînd în vedere modul diferit de acțiune al acestora.

Indepărtarea factorilor inhibitori ai I și eliberarea ei din complexul proteic din plasma de cercetat, se face prin mai multe metode:

- diluția plasmei (1/2, 1/4, 1/5, 1/16);
- aplicarea rășinilor schimbătoare de ioni;
- oxigenarea plasmei;
- tratarea serului cu acid-etanol;
- centrifugarea plasmei;
- incubarea serului cu extract de țesut adipos uman sau de șobolan;
- inactivarea cu EDTA;

Alte țesuturi (ficat uman, rinichi uman sau de șobolan) nu sînt propice pentru realizarea acestui efect de îndepărtare a factorilor inhibitori.

## Metode de dozare imunologică

Dozarea I prin metoda imunologică are cel mai mare viitor, pentru că este cea mai precisă și necesită cantități mici de plasmă. Metoda se bazează pe reacția antigen-anticorp, caracterizîndu-se prin specificitate, întrucît numai anticorpul care corespunde unui anumit antigen se unește cu acesta.

Reacția se petrece numai dacă cele două elemente — antigenul și anticorpul — se găsesc prezente în anumite proporții.

I este un antigen slab, dar la cobai și la șobolani se poate prepara un anticorp eficace împotriva ei, injectînd s. c. doze crescînde de I bovină sau porcină, suspendată în ulei cu adjuvant Freund. Dacă combinația antigen-anticorp este optimă, hematiile suspendate în acid tanic nu sînt hemolizate dar o mică creștere a cantității de I produce imediat hemoliza. Pe baza celor amintite se poate titra cantitatea I în serul de cercetat.

Metoda radio-imunologică a lui Yalow și Berson este o perfecționare a celei imunologice. Cu ajutorul ei se poate pune în evidență I din 0,01 ml de plasmă. Metoda se bazează pe principiul inhibării competitive într-un sistem de reacție. Se adaugă ser antiinsulinic (anticorp) la antigen, respectiv la insulină marcată cu I<sup>131</sup>. La acest sistem se adaugă I cristalizată în concentrația cunoscută și se măsoară cantitatea I marcate pusă astfel în libertate prin acțiunea competitivă a I cristalizate, adăugate. Reacția este aceeași dacă în locul I cristalizate se pune serul de cercetat. Pentru diferențierea I marcate libere de cea cuplată cu anticorpi se pot

Întrebuința mai multe metode (electroforeză, centrifugare și rășini schimbătoare de ioni). *Yalow* și *Berson* le separă cu ajutorul electroforezei *Morgan* și *Lazarow* cu ajutorul centrifugării, iar *Meale* și *Klitgaard* cu rășini schimbătoare de ioni.

### Valorile obținute cu ajutorul diferitelor metode

Rezultatele dozării insulinemiei prin diferite metode sînt foarte variate: de la 2—10 micro U/ml pînă la 22.000 micro U/ml. Cauzele obținerii unor valori atît de diferite sînt multiple, dar în primul rînd este vorba de metoda aplicată. Astfel metodele biologice nu dozează doar cantitatea absolută a I serice, rezultatul obținut fiind determinat și de activitatea unor factori antagoniști sau sinergiști ai I. Un alt factor determinant îl constituie natura țesutului izolat cu ajutorul căruia se face dozarea. Țesutul muscular și adipos — reacționează în mod diferit în soluția de incubare. Trebuie să se ia în considerație și factorul de timp și temperatură. Reiese astfel că metodele biologice *in vitro* pun în evidență numai rezultatul final al multiplexelor interacțiuni ale factorilor sus amintiți și ale unor factori încă necunoscuți. Nu se poate preciza dacă serul de cercetat indică absența I sau numai mascarea efectului ei de către alți agenți. Se dozează deci numai „activitatea asemănătoare a I” (insulin like activity — ILA). Nu se pot compara rezultatele diferitelor metode, ținînd seamă că majoritatea autorilor modifică metoda clasică, tratînd serul de cercetat cu diferite manopere.

*Randle* (1957) și *Wright* (1960) au demonstrat că simpla diluție a plasmei duce la creșterea ILA. Explicarea acestui fenomen este următorul: antagoniștii I se diluează mai mult ca I. *Power* a confirmat rezultatele lui *Randle* și ale lui *Wright*, arătînd că diluția plasmei modifică raportul dintre „I activă” și cea „inactivă”.

În plasmă au putut fi studiați numeroși antagoniști ai I, fie proteine obișnuite, fie anticorpi. Aceștia din urmă apar la diabeticii tratați cu I. Cu ajutorul electroforezei, s-a putut constata că antagoniștii I migrează cu diferitele fracțiuni ale proteinelor serice. Unii autori au descris antagoniști de natură lipoproteică.

*Reudi* a demonstrat că există o diferență apreciabilă în ILA între singele venos și cel arterial. El presupune că oxigenarea scade funcția inhibitorie a serului.

*Antoniades* a incubat serul cu țesut adipos pentru eliberarea I din complexul proteic, sau a eliberat-o cu ajutorul rășinilor schimbătoare de ioni.

Rezultatele experiențelor lui *Samaan* (1963) sugerează că extragerea serului cu un amestec de acid și alcool ar transforma „I atipică” (inactivă) în „I tipică” (activă). *Power* (1965) a demonstrat că tratarea serului uman normal cu alcool duce la creșterea ILA, față de țesutul adipos epididimal incubat *in vitro*. La diabeticii netratați cu I această manoperă duce la creșterea activității, dar într-o măsură mai redusă. Acest fapt are o mare importanță practică, dovedind existența I în serul bolnavilor de diabet zaharat, dar într-o formă inefficientă. *Steward* (1964) a examinat efectul ILA după extracție cu acid-etanol din plasmă diluată 1/4 cu metoda hemidiafragmului de șobolan și a constatat că diluția plasmei crește activitatea insulinică.

*Antoniades* a cercetat raportul dintre „I liberă” (sau tipică, activă) și „I legată complexă” (sau atipică, inactivă), la indivizi sănătoși, à jeune după încărcare cu glucoză i.v. A constatat că „I complexă” predomină în serul recoltat à jeune, iar la 10—30 minute după administrarea gluozei, crește cantitatea de „I liberă” cea „complexă” scăzând în mod apreciabil. După 40—60 minute de la încărcare, începe să crească din nou cantitatea de „I complexă”. Autorul este de părere că creșterea glicemiei la indivizii sănătoși duce la disocierea I din forma sa complexă în formă liberă.

La diabeticii adulți netratați, sau la cei care nu sînt dependenți de I, se poate pune în evidență în ser I sub formă „complexă” (inactivă). După administrarea de glucoză i.v. „I complexă” nu scade apreciabil, dar crește în cantitate minimă „I liberă” (activă). Persistența unor cantități crescute de „I complexă” în sîngele diabeticilor maturi sugerează o dereglare a activității insulinice la nivelul țesuturilor. Această deficiență se poate asocia cu viteza crescută de transformare a „I libere” în formă „complexă”, sau a posibilității scăzute de utilizare a „I complexe”, sau pot fi prezente ambele mecanisme. Cauza acestor dereglări la nivelul țesuturilor, nu este încă clarificată, ea putînd fi de origine genetică sau metabolică. După *Antoniades* transportul I în sînge sub formă „complexă”, legată de proteine, servește la reglarea activității insulinice, realizîndu-se cu ajutorul acestui mecanism un echilibru între „I activă” și „inactivă”.

## ACTIVITATEA INSULINICĂ CU DIFERITE METODE

### A) Copii

#### *Metoda diafragmului de șobolan*

(a jeun)

Sănătoși:		Diabetici:	
Schwarz	150—220 micro U/ml	Chiumello	151±32,9 micro U/ml
Endosienne	24 micro U/ml	Ceterchi	0—85 micro U/ml
Chiumello	157±37,2 micro U/ml	Bretán	0 micro U/ml
Ceterchi	8,6± 5,6 micro U/ml	Nusbaum	12,5 micro U/ml
Nusbaum	54 micro U/ml		

#### *Metoda țesutului adipos epididimal de șobolan*

(a jeun)

Steincke	159 micro U/ml
Lyngsoe	50 micro U/ml
Power	200 micro U/ml

#### *Metoda imunologică (-radioimunologică)*

(a jeun)

Johansen	10—15 micro U/ml
----------	------------------

## B) Nou născuți

### Metoda diafragmului de șobolan (a jeun)

#### Sândtoși:

Pfeiffer-Ziegler 58—91 micro U/ml  
Baird 200 micro U/ml

Pfeiffer-Ziegler 195±50 micro U/ml  
Baird (valori limită: 715)  
170 micro U/ml

#### Ale mamelor diabetice

### Metoda imunologică (-radioimunologică) (a jeun)

Shima 23—39 micro U/ml  
Stimmler-Braze 43 micro U/ml

### Importanța determinării ILA

Determinarea activității insulinice ne dă posibilitatea să ne orientăm asupra stării funcționale a pancreasului endocrin, a celulelor sale beta.

Prin dozarea ILA s-a putut demonstra că în diabetul adultului în faza incipientă există o activitate insulinică crescută à jeune. Încărcarea cu glucoză însă nu provoacă creșterea „I-libere“, ci numai a celei „complexe“. Examenul histopatologic al pancreasului confirmă datele de mai sus; celulele beta sînt hipertrofiate și hiperplaziate în prima fază a diabetului zaharat.

După unii cercetători în diabetul juvenil cu cetoză, activitatea insulinică este mult scăzută, ceea ce pledează pentru insuficiența pancreatică primară. *Steinke* a putut pune în evidență ILA la copii diabetici tratați și netratați (cu cetoză).

Dozarea ILA are valoare și în depistarea diabetului și a prediabetului, dar este încă o metodă prea complicată pentru determinări în masă.

Aprecierea ILA este o metodă bună în diagnosticul diferențial al hipoglicemiilor.

În distrofiile edematoase s-au putut pune în evidență ILA inițial crescută, care însă scade brusc după încărcarea cu glucoză. Acest fenomen pledează pentru „obosirea“ precoce a celulelor beta la acești bolnavi.

Datele de mai sus arată că dozarea ILA deschide noi căi în cercetarea diabetului zaharat și a tulburărilor metabolismului hidraților de carbon. Se așteaptă perfecționarea și introducerea acestor metode în practica curentă de laborator.

Sosit la redacție: 13 martie 1969.

Bibliografia la autori.