

Hiperinsulinisme a la cirrosi hepàtica

Ramon Gomis de Barbarà

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

H I P E R I N S U L I N I S M E a la CIRROSI HEPÀTICA

HOSPITAL CLINICO Y PROVINCIAL

F. CULT. — — — MEDI. NA

Casanova, 143 — BARCELONA-11



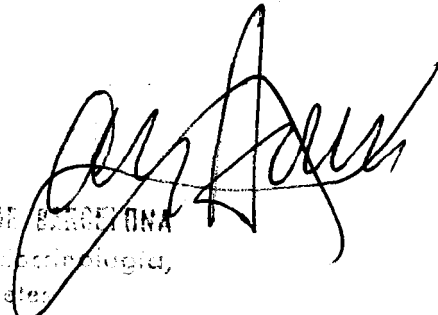
Cátedra de Patología General
y Propedéutica Clínica
Profesor: Dr. A. Balcells Gorina

Prof. D. A. BALCELLS GORINA, Catedrático de Patología General i Propedéutica Clínica de la Facultad de Medicina de la Universitat de Barcelona,

C E R T I F I C A:

Que la Tesi Doctoral: "Hiperinsulinisme a la cirrosi hepàtica" realitzada per R. Gomis de Barbará, estarà en condicions d'ésser presentada a la convocatòria de l'any 1.982.

Barcelona, 30 de juliol del 1.982.


FACULTAD DE MEDICINA DE BARCELONA
Escuela Profesional de Endocrinología,
Nutrición y Diabetes
Profesor: Dr. A. Balcells Gorina

Al meu pare que sempre ha exercit
la tolerància.

A Joan Fuster, de Sueca, que em feu
llegir, a vint-i-dos anys, el "Dis
cours de la méthode".

A Joaquim Molas, que als Estudis
Universitaris Catalans, m'ensenyà
a ordenar els meus calaixos.

AGRA I M E N T S

Al Prof. Alfons Balcells-Gorina, catedràtic de Patologia General, director d' aquesta tesi, pels seus consells en la plnificació del treball així com en la interpretació dels resultats.

Als Drs. Jaume Bosch i David Kravetz de la Unitat d'Hepatologia i a la Dra Roser Casamitjana del Laboratori Hormonal amb qui he compartit la possibilitat de realitzar aquests treballs.

A la Rosa Maria Viaplana pel seu ajut en l'endreça d'aquests papers.

Als companys de la Secció de Diabetis que m'han deixat el "temps per a la tesi".

Al Dr. Daniel Figuerola, cap de la Secció de Diabetis, que m'ha donat tot el suport necessari per a efectuar aquests treballs.

Al Dr. Enric Vilardell, cap del Servei d'Endocrinologia, pel seu constant estímul.

Al Dr. Joan Rodés, cap de la Unitat d'Hepatologia que m'ha permès i ha facilitat l'estudi dels malalts cirròtics.

A la Dra. Francesca Rivera, que sempre em fa les coses fàcils.

A la Dra. Isabel Valverde, de la "Fundación Jimenez-Diaz", a Madrid, pel seu estimable ajut en el montatge de la tècnica del glu - cagó.

Al Dr. Manuel Serrano-Rios del "Centro Ramón y Cajal" a Madrid, que ens proporcionà la insulina monoiodata per a estudi dels insulín-receptors.

Al Dr. Eduard Prats, de l'Hospital Sant Joan a Reus, que m'inicià a l'estudi de les alteracions metabòliques a la cirrosi.

Al Dr. Josep Maria Cuatrecases dels Laboratoris Kabi-Fides que m'ha facil.litat la so-matostatina per a les proves d'insulin-resistencia.

A Noyo Institute per la tramesa de
proinsulina I¹²⁵ i al National Ins-
titute for Biological Standarts and
Control per la de glucagó cristal.-
litzat.

MOTIVACIÓ

S'ha esmentat en diverses revisions, ja clàssiques, la freqüència en que la diabetes Mellitus s'associa a la cirrosi hepàtica. Sovint, també, quan de manera sistemàtica s'estudia la tolerància als carbohidrats dels pacients cirròtics, s'observa com un elevat percentatge són intolerants a la glucosa.

A la pràctica mèdica habitual, aquesta associació es motiu de consulta inter-especialitat amb l'intent de trobar la pauta terapèutica més adequada. I la pregunta s'amplia quan el consultant inquireix al consultor el perquè de la intolerància hidrocarbonada. I la qüestió esdevé, massa sovint, una sortida poc brillant, massa retòrica. El motiu no es altre que la desconeixença, que tenim els estudiosos de la diabetis, dels mecanismes fisiopatològics de l'hiperinsulinisme i la insulín-resistència a la cirrosi. I aquesta desconeixença, i la necessitat de donar una resposta, la més científica possible, crec pot ésser una motivació general suficient per a que diversos estudiosos hi dediquin el seu temps.

La motivació personal, però, respon a altres estímuls. Existeixen, es clar, les raons de la motivació general, però es evident que el meu motiu pot ésser també conseqüència de l'atzar. Sovint aquest ens dona unes opcions que per elles mateixes ens son raó d'estímul. Així el meu lligam a una clínica de medicina interna d'un hospital comarcal, va fer que sovint em veiés amb la necessitat de participar en projectes inter-especialitat, i un d'ells fou el control metabòlic de malalts afectes de cirrosi hepàtica. Tanmateix al integrar-me de nou a l'Hospital Clínic se'm facilità l'aprenentatge i la pràctica de les tècniques de laboratori hormonal, fonamentalment del radio-immuno-assaig. Aquesta, diem-ne, habilitat em permeté col·laborar en un projecte

comú amb la Unitat d'Hepatologia de l'Hospital. Tota la resta n'ha sigut l'esllavissada. L'entusiasme de les mateixes troballes m'ha esperonat a ampliar els projectes i d'ací la possibilitat d'elaborar aquesta tesi.

METABOLISME DE LA I N S U L I N A

Fins l'any 1.967, es creia que la insulina era sintetitzada a la cèl.lula beta per la combinació de les cadenes A i B previament formades¹. El descobriment de la proinsulina, polipèptid amb un pes molecular de 9.000 daltons que incloïa ambdues cadenes peptídiques, la A i la B desautoritzà la hipòtesi inicial i establí la proinsulina com la cadena proteica precursora de la insulina².

La proinsulina, malgrat tenir un pes molecular superior al de la insulina té un reguitzell de propietats que li són similars, entre elles la solubilitat, el punt isolèctric i la capacitat de reaccionar enfront d'un mateix anticòs³. La proinsulina, sintetitzada al retícul endoplàsmic de la cèl.lula beta⁴ i posteriorment transportada a l'aparell de Golgi⁵, sofreix un trencament proteolític intracel.lular que la converteix en dues molècules, una d'insulina i l'altra de Peptid-C. Ambdós polipèptids s'acumulen als granuls de la cèl.lula i són lliberats per exocitosi de forma equimolecular a la vena pancreàtica duodenal^{6 7}, si bé existeixen diferències importants pel que fa a la metabolització, tan de la proinsulina com de la insulina i del peptid de connexió⁸.

La metabolització i la degradació de la insulina és força complexa. D'una banda sabem que la insulina es metabolitzada fonamentalment pel fetge i en segon lloc pel ronyó. Tanmateix s'havia establert que la insulina s'uniria a un receptor específic de membrana i de la unió insulina-receptor se n'esdevindria l'acció biològica, amb la posterior reliberació, per part del receptor, de la molècula de la insulina, intacta. Aquest concepte, evidentment, és en crisi. S'ha suposat que existeixen suficients indicis com per a manifestar que fóra possible que la in-

insulina una vegada s'hagués unit al receptor, s'internalitzés, es lligués a diverses organel·les de membrana subcel·lular, i fos degradada. Tanmateix hi han hagut autors que han intentat unificar ambdues hipotesis, considerant que la unió de la insulina al receptor tan se'n pot esdevenir la degradació de la insulina com la seva íntegra rel·liberació.⁹

Els estudis de Freychet, l'any 1.972, varen demostrar que la degradació de la insulina i el lligat de membrana que li permeten la seva acció biològica no resideixen a la mateixa molècula. Es a dir, va suposar que podrien existir dos tipus de receptor a la insulina, uns que regularien la seva acció biològica i altres la seva degradació.¹⁰ La proposta seria més complexa, i aquesta degradació no es produiria a nivell de membrana, sino que el que esdevindria fora que el lligat insulina-receptor s'internalitzaria i es produiria la degradació.¹¹

En un recent treball del mateix grup,¹² ens mostra que els anticossos enfront del receptor de la insulina són capaços de bloquejar la degradació de la insulina del hepatòcits aïllats, la qual cosa vé a ratificar la importància que per a la degradació de la insulina té el lligat insulina-receptor i la seva posterior internalització. La manera com es produeix aquesta degradació no esta ben aclarida. Es possible que l'exposició del complexe resultant, insulina-receptor, a un enzim o a diversos en siguin els responsables. Tanmateix el fet pot esdevenir-se a nivell de la membrana cel·lular al internalitzar-se el complexe insulina-receptor, o més endavant, quan la insulina es posa en contacte amb les organel·les.

Actualment es proposen tres sistemes de degradació de la insulina:

- 1.- L'acció dels lissosomes.

2.- El trencament enzimàtic dels ponts disulfur.

3.- La degradació proteolítica.

- 1.- Els lissosomes són importants en el metabolisme de diverses substàncies i s'ha demostrat que poden degradar la insulina.¹³ Es possible, però, que la contribució relativa dels lissosomes al metabolisme de la insulina pugui variar sota diferents condicions i en relació a diferents tipus cel·lulars.¹⁴
- 2.- Inicialment es considera que la degradació de la insulina es faria mitjançant el trencament dels ponts disulfur que uneixen les cadenes A i B, per un enzim específic.^{15,16} Una vegada produït aquest trencament inicial possiblement un enzim proteolític convertiria cadascuna de les cadenes en un reguitzell d'aminoàcids. L'enzim que té la propietat de reduir els ponts disulfur és la glutatona insulina transhidrogenassa (GIT).¹⁷ L'activitat d'aquest enzim, s'esdevindria a nivell dels microsomes però també podria fer-ho lligat a la membrana cel·lular.¹⁸ Més recentment s'ha discutit la presència de l'enzim a la membrana¹⁹ i s'ha justificat llur troballa en poca quantitat com a deguda a contaminació microsomal a la preparació tècnica de les membranes. L'activitat biològica del GIT és controlada per la insulina. Els animals insulinopènics tenen una activitat disminuïda mentre que la insulina restaura de nou l'activitat,²⁰ possiblement per augment de la síntesi de GIT.²¹ Aquesta troballa s'interpreta com un mecanisme protector en el sentit que enfront de nivells baixos d'insulina hi hauria una disminució de GIT i una disminució

de la degradació d'insulina, la qual cosa seria un mecanisme protector en situacions de deficit d'insulina. Aquesta hipòtesi, però, no és ben demostrada, ja que s'ha descrit un augment en la degradació d'insulina en rates diabètiques per estreptozocina, tan en estudis globals com als fets en múscle aïllat.²² Tanmateix, cal dir que aquestes rates presenten un augment en el nombre de receptors i que la degradació correlaciona més amb el nombre de receptors²² que amb la degradació intracel·lular de la insulina. Aquests desacords ens suggereixen que la qüestió no és encara ben resolta.

- 3.- Un altre mecanisme que degrada la insulina és la proteolisis no necessàriament precedida per un trencament dels ponts disulfur.²³ Aquest enzim fou inicialment anomenat insulinassa, però mai Mirsky, que l'havia descrit i havia descrit les seves propietats,^{24,25} fou capaç d'obtenir-lo en forma purificada. Més tard, quan fou descrit el GIT, molts investigadors varen dir que el sistema proteolític anomenat insulinassa no era més que la combinació del GIT i enzims proteolítics no específics. Més endavant, es va aïllar un enzim proteolític capaç de degradar la insulina^{26,27} que posteriorment fou purificat, aïllat i caracteritzat. Aquest enzim es trobà en el múscle esquelètic³⁰, en el fetge²⁸ i en el ronyó.²⁹ Inicialment se l'anomenà proteassa específica per a la insulina, i aquesta especificitat es basava en la incapacitat de l'enzim de degradar la proinsulina, propietat que fou utilitzada per a determinar la proinsulina en diverses situacions.^{32,33,34} Tanmateix es trobà que aquest

enzim reconeixia l'estructura de la insulina molt específicament, trobant-se una estreta correlació entre l'activitat biològica i la degradació de l'enzim, semblant a l'especificitat insulina-receptor.³¹ Sorpren, però, que aquest enzim, sigui capaç de degradar el glucagó^{35,36} capacitat que no existeix per a altres polipèptids gastrointestinals com el Vaso-Intestinal-polipèptid (VIP), Gastro-insulinotrópic-polipèptid (GIP), Somatostatina (SMT), Polipèptid pancreàtic (PP).

La Km per a la degradació de la insulina enfront de la insulinassa es 2×10^{-8} , i per a la degradació per cel·lules és 1×10^{-7} , mentre que per al GIT és de 5 a 60×10^{-6} M.^{37,38,39,40} Com pot observar-se la Km per a la insulinassa i la degradació per cel·lules és considerablement més baixa que per al GIT.³⁹ Aquesta diferència és una de les raons per les quals s'hauria suggerit que la insulinassa tindria la seva acció a concentracions fisiològiques d'insulina i que el GIT actuaria a alts nivells d'insulina.⁴²

La insulinassa o insulin-proteassa és una cistina-proteassa. Es inhibida per un nombre ampli de petits pèptids^{41,43} així com per l'ACTH, bacitracina, tripsina i l'EDTA. El mecanisme com actua encara és motiu de recerca. Sembla que la seva acció de trencament peptídic s'iniciaria a la cadena B de la insulina a nivell dels ponts de disulfur.⁴⁴ El producte resultant seria d'igual pes molecular que la insulina, format per tres cadenes polipeptídiques però amb una disminució important de l'acció biològica. Una exposició més prolongada de l'enzim enfront de la insulina trenca aquesta molècula en més pèptids, però possiblement no més de sis.⁴⁵ Aquesta limitació de la insulin-proteassa en trencar la insulina fa que els pèptids formats siguin sensibles a les proteasses inespecífiques cosa que no succeeix amb la molècula

de la insulina íntegra.⁴⁶

Tanmateix de manera similar a la descripci3 del GIT, els nivells d'insulina circulant semblen actuar sobre l'activitat de la insulinassa.⁴³ Així, una elevaci3 dels nivells activa l'actuaci3 de l'enzim⁴³ i degrada més insulina. També l'edat del teixit influeix limitant l'acci3 de les proteases degradadores de la insulina.⁴⁷

La relaci3 de la insulin-degradaci3 amb l'acci3 de la insulina és motiu de controversia. D'una banda existeixen tres possibilitats.

1. Que l'acci3 i la degradaci3 de la insulina no tinguin res a veure.

2. Que la degradaci3 de la insulina sigui necessària per tal d'aconseguir l'efecte de la insulina o algun dels seus efectes.

3. Que la degradaci3 de la insulina sigui la fi de la insulin-acci3.

Els treballs de Freychet¹⁰ varen recolçar la primera hipotesi, és a dir, la inter-acci3 insulina-receptor era un fenomen reversible bimolecular, i el lligat, i la degradaci3 eren independents. Steiner,⁴⁸ cinc anys més tard, després d'una serie de treballs, en els quals mostrava el procés com a més complexe, va defensar la segona de les hipotesis, és a dir, que un fragment de la insulina degradable fos necessari per a acomplir-se alguna de les accions que se li atribueixen a la insulina. Aquesta suggerencia ha trobat el seu ress3 en treballs on es mostra que un peptid derivat de la cadena B de la insulina té una activitat insulin-identica, produint oxidaci3 de la glucosa en els adipocits.⁴⁹ La tercera hipotesi no ha estat demostrada. S'ha suggerit que la finalitzaci3 de l'acci3⁵⁰

de l'acció biològica de la insulina correlaciona molt bé amb la dissociació de la insulina del seu receptor però no queda ben precissat si el material dissociat és o no és material degradat.⁵¹ L'evaluació d'aquest material és important per a conèixer el procés. Així la troballa de les cadenes A i B intactes a l'estudi d'aquest material fa pensar en l'acció del GIT, mentre que l'aïllament d'altres tipus de fragments serien indicatius de degradació proteolítica.

Els estudis fets per diversos investigadors ho han intentat d'esbrinar utilitzant la incubació d'insulina I¹²⁵ amb cèl.lules aïllades i després un cop aturada la incubació separar els diferents components obtinguts mitjançant un procés cromatogràfic. La majoria d'estudis^{52,53,54,55} han observat tres pics : un de pes molecular superior a la insulina, un corresponent al pes molecular de la insulina, i un tercer pic d'inferior pes molecular. Altres^{56,57,58} han trobat un quart pic entre la insulina i la fracció de petit pes molecular. La fracció de més petit pes molecular és iodotirosina i petits pèptids amb iodotirosina. La fracció de més pes molecular és probablement heterogènea, i inclou complexos insulina-receptor i agregats d'insulina. La fracció intermèdia pot ésser per a alguns autors la cadena A¹⁵ però no tots hi estan d'acord. Més interès pot tenir el fet de conèixer si la fracció que surt al punt d'elució de la insulina és insulina intacta després de la incubació. Possiblement és un producte d'identificació pes molecular format per tres cadenes per trencament a nivell de la cadena B, entre els ponts disulfur de la molècula de la insulina. Aquest producte malgrat tenir el mateix pes molecular que la insulina no té les seves propietats biològiques. Pot ésser però, que en aquesta fracció cromatogràfica, a més d'aquest producte hi hagi una part d'insulina intacta i s'ha referit que l'acció biològica de tota la fracció és un 50% de la

potència-insulina de la insulina.⁵⁹ Aquesta suggerència faria pensar que no tota la insulina posada en contacte amb les cèl.lules seria depurada i que això dependria essencialment de la concentració d'insulina i del temps d'incubació.

La insulina es metabolitzada fonamentalment al fetge i és també aquest organ el lloc on esdevenen la gran part dels processos metabòlics modulats per la insulina.⁶⁰ En condicions normals la secreció d'insulina pel pàncreas passa a través del fetge abans d'anar a la circulació sistèmica i sembla que el fetge té un paper important en la regulació dels nivells d'insulina perifèrica.^{61,62}

Es admés que el fetge extreu al voltant d'un 50% de la insulina que li arriba, pero no hi ha un acord univ^{63,64}ersal. Així utilitzant fetges perfundits, en estudis in vitro, s'ha parlat d'extraccions de 17 a 34 %. Mesurant la metabolització d'insulina injectada per via portal i perifèrica s'ha parlat d'extraccions dels voltants d'un 19.6 %. S'ha especulat amb la possibilitat que l'extracció hepatica d'insulina es modifiqués amb les variacions en els nivells d'insulina que arriben al fetge amb la ingesta de glucosa, o amb la perfussió d'algunes substàncies com la somatostatina.^{65,66,67} Els resultats, però, son heterogenis,^{68,69,70,71} de manera que, per alguns autors, l'extracció hepatica d'insulina disminueix quan augmenten les concentracions que de la hormona arriba al fetge, per altres no es modifica i per uns tercers augmenta. Tampoc l'acord ha estat unànim quan es tracta de valorar el paper de la glucèmia.^{72,73,74} Aquestes discrepàncies, però, poden ésser la conseqüència d'estudis utilitzant models experimentals diferents que, donat el doble aport vascular (portal i arterial), són d'extraordinaria complexitat.⁷⁵ Recentment en un estudi practicat a humans, Traberg⁷⁶ mostra que possiblement

té més importància la glucosa que la mateixa insulina en modificar l'extracció hepàtica de l'hormona, resultats que concorden amb els treballs de Honey⁷⁷ on es demostra que pot ésser la glucosa, i no el glucagó, la substància que modifiqui l'extracció hepàtica d'insulina. Per a aquests autors^{76,77} la captació d'insulina pel fetge, tan la que li arriba en un primer pas després de la lliberació a la vena pancreàtico-duodenal com la que arriba recirculada, és difícil d'estimar, però, si són considerats valors fisiològics d'insulina circulant i condicions de normoglicèmia, s'observa que un 60% de la insulina es metabolitzada pel fetge, quantitat que pot variar a concentracions elevades de glucosa.⁷⁸ Aquest efecte regulador del fetge en la captació de glucosa i alhora amb l'extracció d'insulina és de gran interès per a la captació de glucosa pel teixits perifèrics i en definitiva per al manteniment de l'homeostasi de la mateixa.^{79,83}

Tanmateix, se'ns fa evident que no podem assumir la concentració d'insulina a sang perifèrica com a reflexe només de secreció pancreàtica. Cal assumir que també es l'expressió de l'extracció hepàtica d'insulina. I és més, d'acord amb diversos autors la metabolització global d'insulina pel fetge no només serà dependent de l'extracció hepàtica sino que també ho serà del fluxe hepàtic⁸², és a dir a la depuració global^{80,81}.

Es cert també que a nivells d'insulina considerats fisiològics aquestes variacions de fluxe hepàtic són petites⁸⁰ però poden ésser importants en algunes situacions patològiques com a les hepatopaties que comporten modificacions del fluxe hepàtic.²¹⁶

Altrament sembla que el dejú o el dèficit proteic sever no alteren la captació hepàtica d'insulina malgrat disminueixen els enzims hepàtics.^{62,85} En canvi, s'ha vist que els ratlins obesos ob-ob presenten hiperinsulinisme i un dèficit en l'ex

tracció hepàtica d'insulina.⁸⁷ Tanmateix, Faber⁸⁸ ha descrit una alteració en la metabolització hepàtica d'insulina als obesos després de l'estímul amb glucosa oral, però no ho ha evidenciat en condicions basals. Nosaltres en un estudi recent hem observat que aquest dèficit a la metabolització hepàtica d'insulina a l'obesitat només es dona en situació d'hiperinsulinèmia.⁸⁹ S'ha suposat que això pot ésser degut a una disminució del nombre de receptors hepàtics d'insulina en situació d'hiperinsulinèmia.⁹⁰

S'ha atribuït també a la cirrosi hepàtica possibles alteracions en el metabolisme de la insulina. Aquests pacients presenten sovint intolerància als carbohidrats, i hiperinsulinisme basal després de diversos estímuls amb insulin-resistència.^{91,92} La hiperinsulinèmia ha sigut atribuïda a un augment en la secreció beta-pancreàtica i/o a una alteració en el metabolisme hepàtic de la insulina.

A partir de la possibilitat de determinar el Pèptid-C a sang perifèrica i de l'ampliació dels coneixements teòrics sobre aquesta molècula, s'ha utilitzat el quocient molar Pèptid-C/Insulina a sang perifèrica per esbrinar possibles alteracions del metabolisme hepàtic de la insulina.⁹³

S'ha exposat, abans, que la secreció de la insulina i el Pèptid-C són equimoleculars però mentre la insulina té metabolització fonamentalment hepàtica el Pèptid-C és metabolitzat pel ronyó. Tanmateix, malgrat trobar-se en quantitats mesurables a la circulació perifèrica no es coneix l'acció biològica del Pèptid-C. S'esmenta la possibilitat que aquesta molècula sigui necessària per a la conformació espacial de la insulina i recentment s'ha suggerit que podria modular a través del polipeptid gastrointestinal insulinoatròpic (GIP), la secreció d'insulina, a la manera d'un sistema de retro-alimentació.^{94,95}

La diferent metabolització d'ambdós peptids, i la seva secreció equimolecular ha suggerit a diversos autors a utilitzar el quocient molar Peptid-C/Insulina a sang perifèrica com a índex de metabolització. Així la mesura a vena pancreàtico-duodenal on numerador i denominador són iguals ha de donar un quocient d'ú, quocient ja superior a 1 a vena hepàtica donada la metabolització hepàtica de la insulina. En tot cas, el valor d'aquest quocient, a sang perifèrica, dependrà també de l'equilibri en ambdues metabolitzacions, la hepàtica de la insulina i la renal del Peptid-C.

Així als pacients amb cirrosi hepàtica s'ha descrit un quocient molar Peptid-C/Insulina disminuït respecte als normals,⁹³ i s'ha suposat que això podria ésser degut a una inadequada metabolització hepàtica de la insulina, la qual cosa augmentaria el denominador del quocient, i en conseqüència disminuiria la relació. Tanmateix aquesta troballa s'ha fet extensiva als malalts amb hepatitis crònica. No hi ha hagut acord, però, pel que fa a la fisiopatologia d'aquesta alteració metabòlica. Es a dir, no és sabut si la disminució de la metabolització hepàtica de la insulina es conseqüència de l'alteració hepatocel·lular o bé conseqüència de les derivacions porto-sistèmiques, que evitarien el pas de la sang portal-amb concentracions superiors d'insulina que altres territoris vasculars- a través del filtre hepàtic.⁹⁶ Els més recents estudis suggerixen el primer dels dos mecanismes. Tanmateix aquests estudis són treballs que utilitzen una metodologia indirecta per arribar a les seves conclusions, donades les dificultats tècniques d'estudiar aquest metabolisme en humans.

Nogensmenys, tampoc és ben establert quin és el paper que els diferents tipus cel·lulars del fetge tenen en el me-

metabolisme de la insulina⁹⁷. Els dos tipus més importants de cèl.lules del fetge són les cèl.lules parenquimatoses (possiblement heterogènies) i les cèl.lules de Kupffer. Les cèl.lules de Kupffer⁹⁸ són responsables de la fagocitosi i de fer desaparèixer les toxines circulants, els complexos antigen-anticòs (inclosos els complexos insulina-anticòs) i les proteïnes estranyes a l'organisme, però el seu paper en la captació i metabolització de substàncies endògenes, entre elles, la insulina, és qüestionable. En el fetge perfundit, bloquejant el sistema reticul-endotelial, la metabolització d'insulina disminueix en un 50%. En estudis in vivo Cornell demostrà la metabolització d'insulina per les cèl.lules de Kupffer per possibles enzims lliberats per lisossomes d'aquestes cèl.lules.⁹⁸ Altres estudis, però, han negat aquestes troballes.⁹⁹ La dificultat de practicar estudis de degradació d'insulina en hepatòcits, pot explicar-nos les discrepàncies observades entre diferents autors. Una de les dificultats és que la degradació és provocada més pels enzims presents en el mitjà cel.lular que pel substracte cel.lular, en sentit estricte.

Possiblement aquest enzims són lliberats al mitjà per cèl.lules lesionades. Per a obviar aquest problema, avui molts dels estudis es fan en mitjà de cultiu d'hepatòcits actius en la degradació d'insulina i on no hi ha alteració del medi. Es en els estudis en aquest sistema on s'ha suggerit la interrelació lligat insulina-receptor i degradació, i la possibilitat de l'existència de dos receptors com abans s'ha exposat.^{100,101,102}

A més del fetge, el ronyó degrada quantitats força considerables d'insulina¹⁰³ i ho fa per dos mecanismes. D'una banda la insulina es filtrada pel glomèrul i després reabsorbida pel tubul proximal¹⁰⁴ i en aquest procés part de l'hormona es degradada i en molt petita quantitat eliminada intacta per la orina. D'altra banda el parènquima renal degrada, també una quantitat important d'insulina.¹⁰⁵

Semblant al fetge, la membrana plasmàtica de les cèl.lules renals té receptors específics per a la insulina,¹⁰⁶ i també el ronyó posseix els enzims que hem vist podem degradar la insulina, es a dir, la insulinassa i el GIT.¹⁰⁷ En canvi a diferència del fetge, l'extracció d'insulina pel ronyó sembla no saturable. Aixó pot ésser degut a l'existència de dos mecanismes de degradació de la insulina, un d'ells, la depuració glomerular difícilment saturable.

Altres teixits d'altres territoris també degraden petites quantitats d'insulina i en tots ells existeixen receptors específics. Així el teixit greixós,¹⁰⁸ les cèl.lules sanguínees,¹⁰⁹ els illots de Langerhans,¹¹⁰ el múscle, els fibroblasts i la placenta.¹¹¹ Possiblement el teixit placentari és el que degrada més quantitats d'insulina, i s'ha suggerit que aquesta degradació seria la responsable de l'increment de les necessitats d'insulina de les gestants diabètiques.¹¹²

El metabolisme de la insulina també s'ha estudiat, globalment, en humans i s'ha observat - mitjançant la analisi de la freqüència de desaparició de la insulina exògena injectada - una desaparició multiexponencial similar a la que s'havia observat en animals. S'ha proposat una distribució de la insulina tricompartmental:¹¹³

1.- Espai plasmàtic

2.- Espai de rapid equilibri.

3.- Espai d'equilibri lent.

Els espais 2 i 3 vindrien a representar un primer lligat de la insulina al receptor i una segona lliberació de part de la insulina lligada intacta, fins l'equilibri.

Tanmateix els estudis del metabolisme de la insulina mitjançant l'ús d'aquestes tècniques són discordants. Així s'ha parlat d'una depuració global d'insulina normal en pacients diabètics però també augmentada i fins i tot disminuïda.^{116,117}

METABOLISME DEL PÈPTID-C

Els estudis inicials sobre el metabolisme del Pèptid-C, varen suggerir una degradació fonamentalment renal.⁸ Aquest estudi practicat a ratolins es concordant amb la troballa de nivells elevats de Pèptid-C en el plasma d'humans nefrectomitzats o amb insuficiencia renal on es suposa una metabolització renal de Pèptid-C disminuïda. Tanmateix l'observació de quantitats considerables de Pèptid-C a l'orina de controls sans fa pensar que l'excreció urinaria més que la degradació renal pot contribuir en gran mesura a la depuració renal.¹¹⁸

En canvi, pot dir-se que no hi ha metabolisme hepàtic del Pèptid-C en els animals. Aquesta afirmació, no ha estat sostinguda per tots els autors, i alguns han descrit una extracció hepatica (20%) del Pèptid-C en els porcs, si bé aquesta metabolització hepàtica es molt inferior a la de la insulina . Les discordàncies entre autors, podrien ésser l'expressió de l'ús de mètodes distints. Així Stoll¹¹⁹ ha estudiat el metabolisme del Pèptid-C de porc, a les rates, i en canvi Kùlh¹²⁰ ho ha fet en porcs. Malgrat aquestes controvèrsies, es ben assumit que el Pèptid-C i Insulina tenen un metabolisme ben diferent. Per al primer pèptid el metabolisme es fonamentalment renal i per al segon hepàtic. Aquesta diferència ha donat lloc a la determinació del Pèptid-C a la sang perifèrica com a index de secreció beta pancreàtica, ús que es ben aplicable a aquells processos en els que es preveu una possible alteració o en el metabolisme hepàtic de la insulina.

ACCIÓ DE LA INSULINA.INSULIN-RESISTÈNCIA

L'home enmagatzema els carbohidrats ingerits en excés en forma de triglicèrids, i una petita quantitat, inferior a 500 gr., en forma de glicògen.

El fetge, en els espais inter-ingesta, es practicament la única font que té l'organisme per a obtenir glucosa a partir del glicògen acumulat (Producció hepàtica de glucosa). Aquesta producció de glucosa es depenent de la situació metabòlica (dejú o ingesta) i varia des de 2-3 mgr/kg. min. fins a 150-180 mgr/kg/min. Aproximadament un 80-100 mgr/min. de glucosa van a parar al cervell, i uns 30 mgr/min. van al múscle, quantitat relativament petita si considerem que el teixit muscular pot arribar a representar el 40% de la massa corporal. Tanmateix el fetge només guarda glucosa en forma de glucògen per a mantenir la glucèmia unes 16 hores, si bé mitjançant la neoglucogènesi (síntesi de glucosa a partir d'aminoàcids i altres precursors) l'organisme pot obtenir quantitats importants de glucosa (10% de la producció hepàtica de glucosa a les 12 hores de la ingesta, tan per cent que augmenta amb el dejú prolongat).¹²¹

Després de la ingesta de 100 gr. de glucosa, l'organisme assimila rapidament aquest carbohidrat. Els nivells d'insulina basal augmenten rapidament des de valors, a sang perifèrica, de 10-20 μ U/ml a concentracions de 100 μ U/ml.,^{122,123} valors que son, gairebé, el doble si es mesuren a sang portal.

Perque la insulina exerceixi el seu efecte biològic, i un dels més importants efectes es la seva acció sobre el metabolisme de la glucosa, cal que sigui sintetitzada i segregada per les cèl.lules beta del pàncreas, transportada als

teixits diana, i que es lligui als receptors específics de les cèl·lules d'aquests teixits, a nivell de la membrana cel·lular, lligat que li permetrà internalitzar-se i en conseqüència desencadenar una serie de fenòmens post-receptor, en cara no ben coneguts.¹²⁴

Usualment, els treballs, practicats en situacions metabòliques on es manifesti una intolerància dels carbohidrats, tenen com a objectiu fonamental l'estudi dels dèficits en la síntesi i secreció de la insulina per les cèl·lules beta.

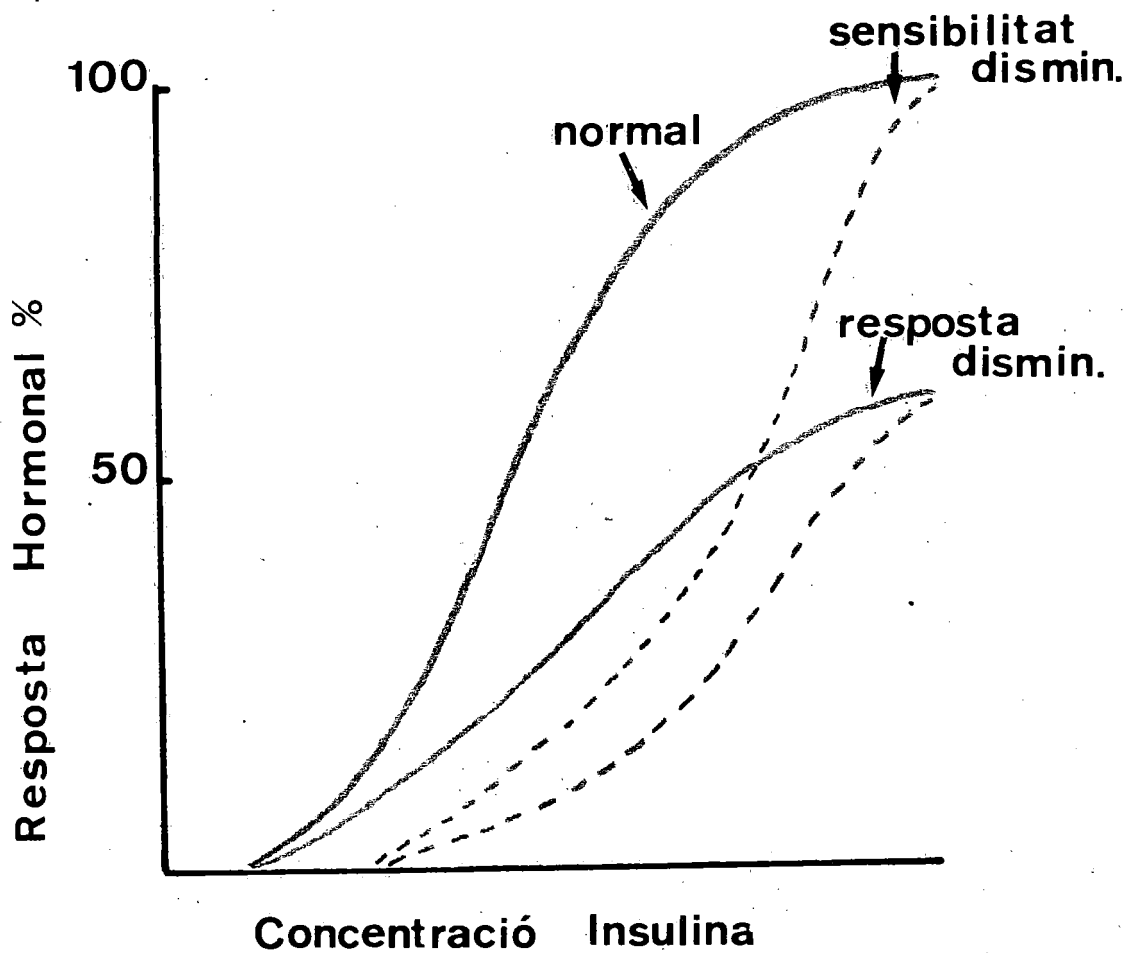
Nogensmenys, es ben cert, que no només una escassa secreció d'insulina es la responsable de les diferents entitats patològiques amb anomalies en el metabolisme dels hidrats de carboni sino que algunes d'elles cal atribuir-les a la insulín-resistència.

La insulín-resistència és aquella situació metabòlica en la qual concentracions d'insulina considerades normals produeixen una resposta biològica inferior a l'esperada com a normal. De tota manera aquesta definició cal considerar-la com a genèrica, i pot parlar-se d'insulín-resistència tisular, cel·lular o global, i cal, a més, diferenciar-la d'altres termes que podrien donar lloc a confusió.^{124.125}

Així caracteritzem la sensibilitat d'una resposta biològica a la insulina, a aquella concentració d'insulina que es capaç de produir la mitad de la maxima resposta biològica possible (km) (Fig. 2) Com més alta sigui la concentració necessària per a obtenir aquesta resposta més baixa sera la sensibilitat.¹²⁶

Tanmateix podem parlar de situacions d'insulín-resistència, amb resposta disminuïda, aquelles situacions en les quals la resposta biològica màxima a la insulina es disminuïda, pero la relació dosi-resposta entre el màxim i el mínim efec

Fig 2



te és normal, i per tant la relativa Km és normal. Aquesta situació de resposta disminuïda pot també acompanyar-se d'insulin sensibilitat (Figura 2). Les diferències conceptuals establertes sobre aquest terme global evaluades com a importants per diversos autors, i considerades l'expressió de defectes a nivells del prerreceptor, receptor o postreceptor . Així, podríem esmentar, com a causes d'insulin-resistència a nivell del receptor, a aquells factors que redueixen la concentració d'insulina lliure circulant, com per exemple l'existència d'anticossos enfront de la insulina circulant. En aquestes circumstàncies, existiria una sensibilitat a l'acció de la insulina disminuïda. (Km baixa) però l'augment de les concentracions d'insulina comportaria obtenir una màxima resposta.^{126.127}

Tanmateix, a nivell del receptor, poden trobar-se situacions d'insulin-resistència degudes a la disminució en el nombre de receptors i en la seva afinitat per la insulina. Aquesta situació també es manifesta per una sensibilitat disminuïda a la insulina, i només podríem trobar una disminució en la resposta màxima a la insulina en aquelles situacions metabòliques amb reducció de més del 90% dels receptors, situació en la que existeixen les dues possibilitats, insulin-sensibilitat alterada i disminució de la màxima resposta a la insulina, situació mai observada en els humans, i només aconseguida en condicions experimentals. Malgrat aquesta afirmació els anticossos enfront de la insulin-resistència poden tenir la capacitat de produir, al menys en part, el defecte abans esmentat.¹²⁷

I en darrer lloc, podem trobar-nos en situacions d'insulin-resistència per alteració del post-receptor, que es manifestarà per una alteració de la sensibilitat a la insulina i també per una disminució de la resposta màxima.¹²⁷

Així quan no existeix una reducció dràstica

en el lligat del receptor i s'observa una disminució de la resposta màxima de la insulina podem sospitar la possibilitat d'una afectació a nivell del post-receptor.

Amb aquesta perspectiva pot establir-se una taula amb les causes de la insulin-resistència.¹²⁷

- 1.- Conseqüència de l'alteració en la qualitat de la secreció de la cèl.lula beta.
 - a/ molécula d'insulina anormal.
 - b/ conversió incompleta de la proinsulina a insulina.
- 2.- Antagonistes circulants de la insulina.
 - a/ nivells elevats de les hormones de contraregulació (hormona de la creixença, cortisol, glucagó i catecolamines).
 - b/ anticossos enfront de la insulina circulant.
 - c/ anticossos enfront del receptor a la insulina.
- 3.- Defectes en el teixit diana.
 - a/ defectes en el receptor a la insulina.
 - b/ defectes en el postreceptor.

I a/

SECRECIÓ D'INSULINA ANÒMALA

Recentment s'ha descrit hiperglucèmia i hiperinsulinèmia amb sensibilitat normal a la insulina exògena. Estudis moleculars han demostrat que aquests pacients segreguen una insulina, amb alteracions a l'aminoàcid 24 de la ca-

dena B, d'acció biològica disminuïda.¹²⁸

I b/

CONVERSIÓ INCOMPLETA DE LA PROINSULINA EN INSULINA.

La proinsulina es converteix per proteolisi en insulina. Aquesta conversió es usualment complerta i només el 5% del producte segregat per la cèl.lula beta es proinsulina. En cas d'èsser incomplerta la conversió aquest tan per cent pot ésser molt més elevat.

Tanmateix sabem que la proinsulina té una acció biològica inferior que la insulina, i que, a més, es mesurada com IRI al radioimmunoassaig.

En conseqüència els malalts amb hiperproinsulinemia familiar, presentaran nivells d'IRI circulants elevats i hiperglucèmia secundària a l'escassa activitat insulínica de la proinsulina.¹²⁹

II a/

NIVELLS ELEVATS D'HORMONES DE CONTRAREGULACIÓ.

Existeixen malalties endocrino-metabòliques amb hiperglucèmia i normo o hiper-insulinemia, conseqüència de la presència de nivells circulants d'hormones antagonistes a l'acció de la insulina, com el cortisol, l'hormona de la creixença, el glucagó i les catecolamines.¹²⁷

II b/

ANTICOSSOS ENFRONT DE LA INSULINA.

Els pacients diabètics tractats amb insulina exògena, fonamentalment d'origen porcí, poden presentar anticossos enfront de la insulina, Aquests anticossos són immunoglobulines

que lliguen tan la insulina com la proinsulina. Conseqüència de la seva presència és l'observació de nivells circulants elevats d'insulina total, sense acció biològica, i l'escassa circulació d'insulina lliure. Això es manifesta amb xifres elevades d'IRI a sang perifèrica i hiperglucèmia.^{130,131}

II c/

ANTICOSSOS ENFRONT DEL RECEPTOR A LA INSULINA.

Recentment s'ha descrit un síndrom on s'observen anticossos dirigits contra el receptor de la insulina. Aquest síndrom es caracteritza per acantosis nigricans, insulín-resistència i diabetis mellitus.¹³²

III a/

DEFECTES EN ELS RECEPTORS A LA INSULINA.

S'ha descrit una disminució en el nombre de receptors-insulina en diferents situacions fisiopatològiques caracteritzades per una alteració en el metabolisme dels carbohidrats.

Es assumit, també, que el lligat insulina-receptor és el primer esgraó necessari per a desencadenar-se l'acció de la insulina. Per tant, seria lògic suposar que la disminució en el nombre de receptors-insulina comportés insulín-resistència, però aquesta suposició cal matisar-la. Així, s'ha observat que el màxim efecte de la insulina s'obté a concentracions que ocupen només una petita quantitat del nombre total de receptors (un 10% en els adipòcits). Tanmateix, en condicions experimentals la resposta a l'augment de les concentracions d'insulina comporta un increment en el nombre de receptors lligats

a la insulina fins a arribar al nombre suficient capaç de generar una resposta màxima. En els adipòcits aixó es produirà quan s'ocupin el 10% del nombre total dels receptors a la insulina. Admesa aquesta relació entre lligat d'insulina-receptor amb l'acció insulínica, només pot esperar-se la disminució de l'acció biològica a la insulina en aquells cassos en els quals la insulina ocupa un nombre de receptors inferiors als necessaris per a obtenir una resposta màxima. (menys del 10% tractant-se d'adipòcits). En altres condicions, malgrat existir una disminució del nombre de receptors només es donaria un desplaçament de la corba (establerta entre efecte de la insulina-concentració d'insulina) a la dreta i en conseqüència un valor de la Km disminuïda, la qual cosa representa una alteració de la sensibilitat tisular enfront de la insulina però de cap manera una disminució de la resposta màxima (Figura ¹³³ 2).

III b/

DEFECTE DEL POST-RECEPTOR.

El lligat insulina-receptor es la primera seqüència de l'esquema que podem establir en relació a l'acció de la insulina. Un segon esgraó o seqüència pot establir-se un pic acomplert el primer, es a dir, a nivell del post-receptor.

La insulín-resistència pot ésser també conseqüència d'un defecte a aquest nivell. I aixó es degut o bé a un anormal relació entre el complexe insulina-receptor i el sistema transportador de la glucosa, o a una alteració d'aquest sistema transportador per se, o a un defecte cel.lular enzimàtic a nivell de qualsevolga de les vies metabòliques de la glucosa.

En els darrers anys, defectes a nivell del post-receptor s'han descrit com a responsables de la insulín-resistència observada en el "leprecheunism"¹³⁴.

Ja hem esmentat que la corba formada relacionant l'efecte de la insulina i la concentració d'insulina es desplaça vers la dreta en cas de defecte a nivells del receptor, però s'obté la màxima resposta (Figura 2) En cas de defecte en el post-receptor, aquesta resposta màxima no s'obté ni als màxims nivells de concentració d'insulina (Figura 2).

Un defecte a ambdós nivells comportara ambdues coses, es a dir, incapacitat d'obtenir una resposta màxima i desplaçament de la corba a la dreta. (Figura 2)¹³⁵.

La majoria de pacients amb cirrosi hepàtica presenten glucèmies basals normals, però tenen intolerància a la sobrecàrrega oral de glucosa.¹³⁶ També s'ha descrit que d'un 10 a un 15% de cirròtics poden en alguna època de la seva malaltia esdevindre diabètics.¹³⁷ Tan en les situacions d'intolerància hidrocarbonada com en algunes de les formes de diabetis observades en el cirròtic, la hiperglucèmia s'acompanya d'hiperinsulinisme la qual cosa fa suposar que la resistència a la insulina es la causa d'aquests trastorns metabòlics que afecten als carbohidrats, si bé la intolerància hidrocarbonada pot ésser conseqüència de l'augment de la producció hepàtica de glucosa¹³⁸ o de la disminució de la utilització de la glucosa, o d'ambdues coses.¹³⁹ Sherwin havia suggerit, basant-se en l'observació de nivells elevats de glucagó a la cirrosi,¹⁴⁰ un augment de la producció de glucosa, especialment a partir de la gluconeogènesi. Proietto,¹³⁹ recentment, ha demostrat, que la intolerància a la glucosa es conseqüència d'un defecte en l'ús d'aquest carbo-

hidrat pels teixits i no pas conseqüència de l'augment de la gluconeogènesi.

Aquesta insulín-resistència sembla manifestar-se mitjançant la resposta de la glucosa i la insulina a l'administració de la glucosa oral i e.v. o bé de l'arginina i de la tolbutamida, substàncies que estimulen la cèl.lula beta pancreàtica.^{141,142}

Els resultats d'aquestes proves mostren hiperinsulinisme i nivells de glucèmia superiors als esperats com a normals, la qual cosa porta a diversos autors a concloure que ens trobem davant d'una manifestació d'insulín-resistència.

A més a més, s'ha observat a la cirrosi la presència de nivells elevats d'altres hormones¹⁴⁸ com l'hormona de la creixença,¹⁴³ el glucagó,^{144,145} el polipèptid vaso-intestinal,¹⁴⁷ la somatostatina¹⁴⁹ i la prolactina.¹⁴⁶ Les dues primeres, sobretot, tenen un efecte antagonista al de la insulina damunt els carbohidrats, per la qual cosa es considera que podrien ésser els responsables de la insulín-resistència.

Recentment s'ha especulat amb la possibilitat de que la insulín-resistència de la cirrosi sigui conseqüència d'alteracions a nivell del receptor o del postreceptor.¹⁵⁰ Els mètodes utilitzats per a l'estudi i aplicats a distintes entitats patològiques en les quals es sospita una sensibilitat disminuïda a la insulina com per exemple, a l'obesitat i a la diabetis han estat els següents:

1.- Test de resposta glucèmica a la insulina.

Aquesta prova consisteix en l'administració d'una dosis única endovenosa d'insulina exògena i es valora mesurant la resposta de la glucèmia (hipoglucèmia) enfront de la in-

ulina. Es indicativa tan de la sensibilitat dels teixits perifèrics a la insulina com a la presència d'antagonistes a la insulina (Hormones de contraregulació, anticossos insulina).¹⁵¹

2.- Test d' estudi de la insulin-resistència.

Estudi de la insulin-resistència amb l'administració, simultànea i continua, endovenosa de glucosa, insulina exògena i antagonistes de la secreció endògena d'insulina i glucagó. Aquesta prova s'ha practicat utilitzant per a la frenació endògena de la secreció pancreàtica l'epinefrina i el propanolol, i recentment la somatostatina.¹⁵²

3.- Tècnica del "clamp euglucèmic".

Recentment aplicada per Sherwin i que valora l'acció de la insulina. Amb aquesta tècnica la concentració d'insulina augmenta fins a un nivell ja preestablert i constant, mitjançant una infusió continua i constant d'insulina, mentre la concentració de glucosa es també mantinguda a uns nivells preestablerts i constants gràcies a l'administració d'una infusió variable de glucosa exògena. Aquests estudis poden fer-se a diferents nivells constants d'insulinèmia i glucèmia. Quan la producció de glucosa no es bloqueja, la utilització de glucosa es la suma de la glucosa endògena produïda i la glucosa exògena infundida. Aquesta tècnica permet mesurar la utilització de glucosa a diferents concentracions d'insulina i ens permet per tant esbrinar si la insulin-resistència es deguda a una disminució de la sensibilitat a la insulina o a una alteració de la resposta màxima a la mateixa (Figura 2).

A la primera descripció del "clamp" la tècnica durava tres dies, la qual cosa era un inconvenient important. Recentment s'ha modificat aquesta tècnica mitjançant l'arteria -

lització de la sang venosa amb termoregulador i l'ús dels nous aparells Biostator (sistemes tancats d'infusió d'insulina o pàncreas artificial) i ha permès escurçar els estudis a 8-10 hores, la qual cosa els fa més factibles.^{153,154}

4.- Estudi dels receptors a la insulina.

Des de 1.970 s'han estudiat els receptors a la insulina. Aquests insulin-receptors de les cèl.lules diana tenen dues funcions primordials:

- a) la reconeixença de les moléculs d'insulina entremig d'altres hormones i substractes.
- b) la capacitat de desencadenar, efectuada la unió amb la insulina, un reguitzell de fets que tenen com a conseqüència el transport de substractes i la modificació de l'activitat enzimàtica. Aquests receptors son glucoproteïnes d'un pes molecular entre 150.000 i 300.000 daltons i el nombre de receptors per cèl.lula varia entre 50.000 (adipòcits) i 250.000 (hepatòcits).

Inicialment els receptors foren estudiats en adipòcits i en monòcits i posteriorment diversos autors ho feren en altres tipus cel.lulars. Aquests estudis han mostrat que el lligat insulina-receptor en les cèl.lules sanguínees es de característiques similars als adipòcits i hepatòcits. Això ha permès usar la seva determinació com a demostració d'insulin-resistència, per disminució en el nombre i afinitat dels receptors.

A la pràctica, la cèl.lula hemàtica, més usada en els estudis dels receptors a la insulina, ha estat l'eri-tròcit posseïdor de receptors altament específics a la insulina,

malgrat encara no sabem la significació fisiològica que tenen tan en situació de normalitat com d'insulin-resistència. Aquesta cèl.lula reuneix l'aventatge sobre altres cèl.lules sanguínees d'ésser la més abundant a la circulació i fàcilment aïllable. Aixó fa factible l'ús de la seva determinació amb l'objecte de mesurar la responsabilitat dels receptors en diverses formes d'insulin-resistència.^{155,156}

5.- Altres tècniques per a la valoració d'insulin-resistència.

En el ventall possible de causes d'insulin-resistència, la mesura dels anticossos insulina circulants així com dels anticossos enfront del receptor a la insulina pot ésser considerada d'interès.^{131,132} Es cert, però, que la seva responsabilitat com a causa d'insulin-resistència es escassa.

DETERMINACIÓ DELS NIVELLS PLASMÀTICS D'INSULINA.

La mesura dels nivells circulants d'insulina es va fer, fins l'adveniment del radio-immuno-assaig, (R.I.A.) per mètodes indirectes, mesurant la concentració d'insulina del plasma, per mitjà d'un assaig biològic "in vitro". El fonament d'aquest assaig rau en la capacitat que un plasma amb una concentració X d'insulina, té d'incorporar glucosa a un teixit animal, sensible a la seva acció.¹⁵⁷ A aquesta mesura de la capacitat insulínica d'un plasma se l'ha anomenat "insulin like activity" (I.L.A.).

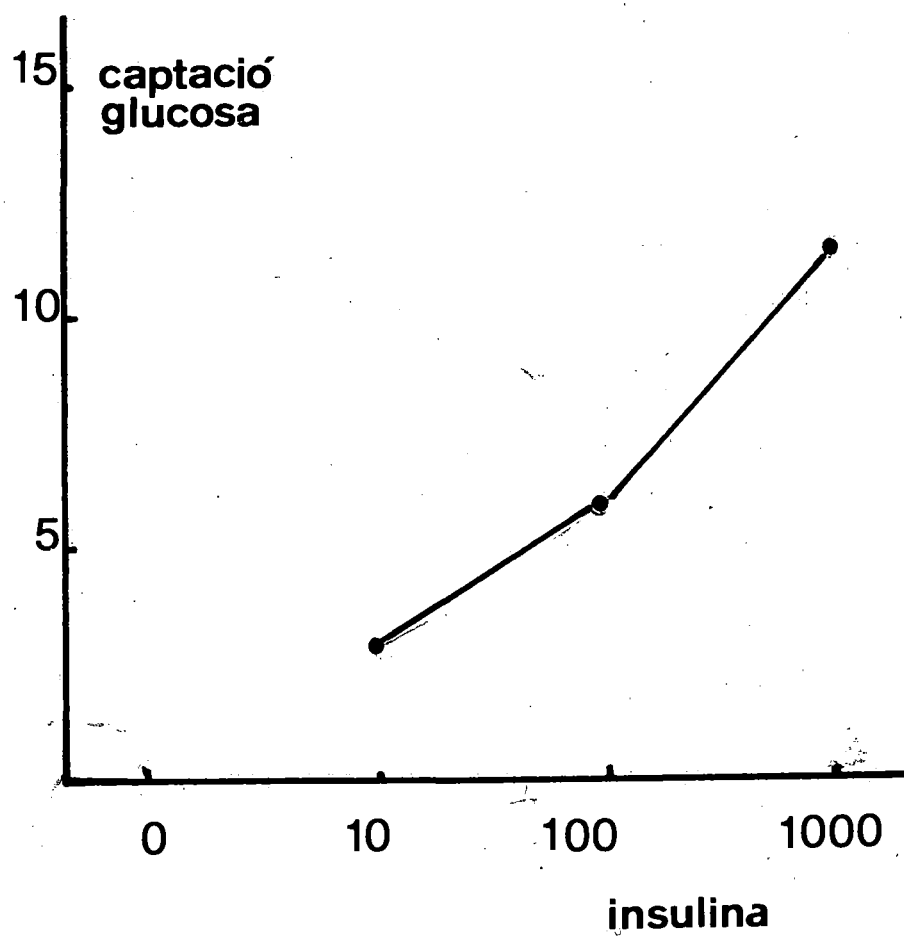
Mesura de l' I.L.A.

Per a la determinació de l'I.L.A. s'utilitza teixit, muscular del diafragma o cel.lules adiposes de l'epididim, de rates amb normopès.^{158,159}

El mètode consisteix en incubar un pes determinat de teixit, en una sol.lució tampó que conté quantitats conegudes d'insulina a distintes concentracions (usualment 10, 100 i 1000 pU/ml) i glucosa a una única concentració de 300 mgr%. Les mostres, després de noranta minuts d'incubació es col.loquen en un bany fred i la reacció biològica s'atura. La diferència entre la concentració de glucosa de la sol.lució abans i després de la incubació és l'índex de captació de glucosa pel múscle de la rata, i aquesta captació està en relació amb la concentració d'insulina present a la mostra, la qual cosa ens permet dibuixar la corba patró de l'experiment (Fig. 3).¹⁵⁹

Per a valorar un plasma problema es determina la glucemia d'aquest plasma, i s'hi afegeix la quantitat de glu-

Fig 3



cosa suficient i necessària per arribar fins a la concentració de la sol·lució dels patrons. S'incuba el problema, en les mateixes condicions i idèntic temps que els patrons i un cop enllestida la reacció es mesura la concentració de glucosa del problema. El valor de la diferència entre la concentració de glucosa previa a la incubació (300 mgr% usualment) i l'obtinguda després de la incubació es porta a la corba patró, com a valor de la captació de glucosa en mgr% per 10 mgr. de teixit sec i això ens permet conèixer l'I.L.A. del serum problema.¹⁵⁹

Aquesta tècnica presenta algunes imprecisions:

- a/ Variacions indeterminades de la dilució d'altres hormones del plasma que modifiquen la sensibilitat de la insulina versus el receptor, com per exemple l'epinefrina.¹⁵⁸
- b/ Creixement agut de la corba patró, la qual cosa fa que petites variacions de la captació de glucosa signifiquin variacions molt marcades del valor d'I.L.A.¹⁶⁰

Malgrat aquestes imprecisions la tècnica té una acceptable recuperació, els sèrums de malalts pancreatectomitzats tenen baixa activitat insulínica, i al contrari, aquesta activitat és marcadament elevada en els serums de pacients normals obtinguts després de l'estímul amb glucosa.

Cal dir, però, que d'aproximadament 200 pU/ml. d'I.L.A. en el serum de persones normals en dejú, només un 10% és d'origen pancreàtic. L'I.L.A. extrapancreàtica no és inhibida per anticossos-insulina i ha vingut a anomenar-se "non-suppressible-like-activity" (N.S.L.A.).¹⁶¹

Amb la descoberta de l'aplicació dels radioisotops a la determinació hormonal, s'ha pogut mesurar, usualment, la insulina mitjançant el radio-immuno-assaig.¹⁶²

Mesura de l'I.R.I.

La determinació de la insulina per radio-immuno-assaig es fonamenta amb la següent dinàmica:¹⁶³

-Un sèrum amb una quantitat coneguda d'insulina s'incuba, amb una quantitat també coneguda d'insulina marcada amb un radio-isòtop, generalment I^{125} , enfront d'un anticòs que sigui capaç de reconèixer ambdues formes d'insulina, la no marcada (freda) i la marcada. En aquestes circumstàncies i mentre dura la incubació, s'estableix una competència, entre ambdues insulines, pels llocs de l'anticòs. El pas següent és utilitzar un mètode capaç de separar la insulina lligada a l'anticòs de la lliure.

La metodologia de la insulina immunoreactiva fonamentada en l'hipòtesis abans proposta requereix el següent:

- a/ Una concentració patró d'insulina marcada d'elevada activitat específica.
- b/ Una substància tampó com a mitjà de solució.
- c/ Un anticòs específic per a la insulina. La capacitat de lligat d'aquest anticòs enfront de la concentració patró d'insulina marcada, incubada en el mitjà de solució ha vingut a anomenar-se Bo.
- d/ Quantitats creixents d'insulina freda que ens permeten d'establir la corba patró.

S'usen habitualment concentracions de
5,10,25,50,100,200 μ U/ml.

c/ Un mitjà de separació que acostuma a ésser un segon anticòs.

La tècnica requereix un primer temps d'incubació, en el qual competeixen insulina freda i marcada enfront de l'anticòs específic per a la insulina, i un segon temps d'incubació en el qual un segon anticòs es capaç de precipitar el lligat establert, insulina-primer anticòs específic, enfront de la insulina que resta lliure. El precipitat, en aquest cas, serà portat a un contador gamma on es determinarà el nombre de comptes per unitat de temps. La relació entre el número de comptes de Bo i el dels valors patró de la corba ens permetrà el disseny d'aquesta. (Fig. 4).

La determinació del valor d'IRI d'un sèrum problema requerirà les mateixes condicions abans esmentades, si bé a la mostra no haurà d'afegir-se insulina freda, donat que aquest és l'objectiu a valorar.

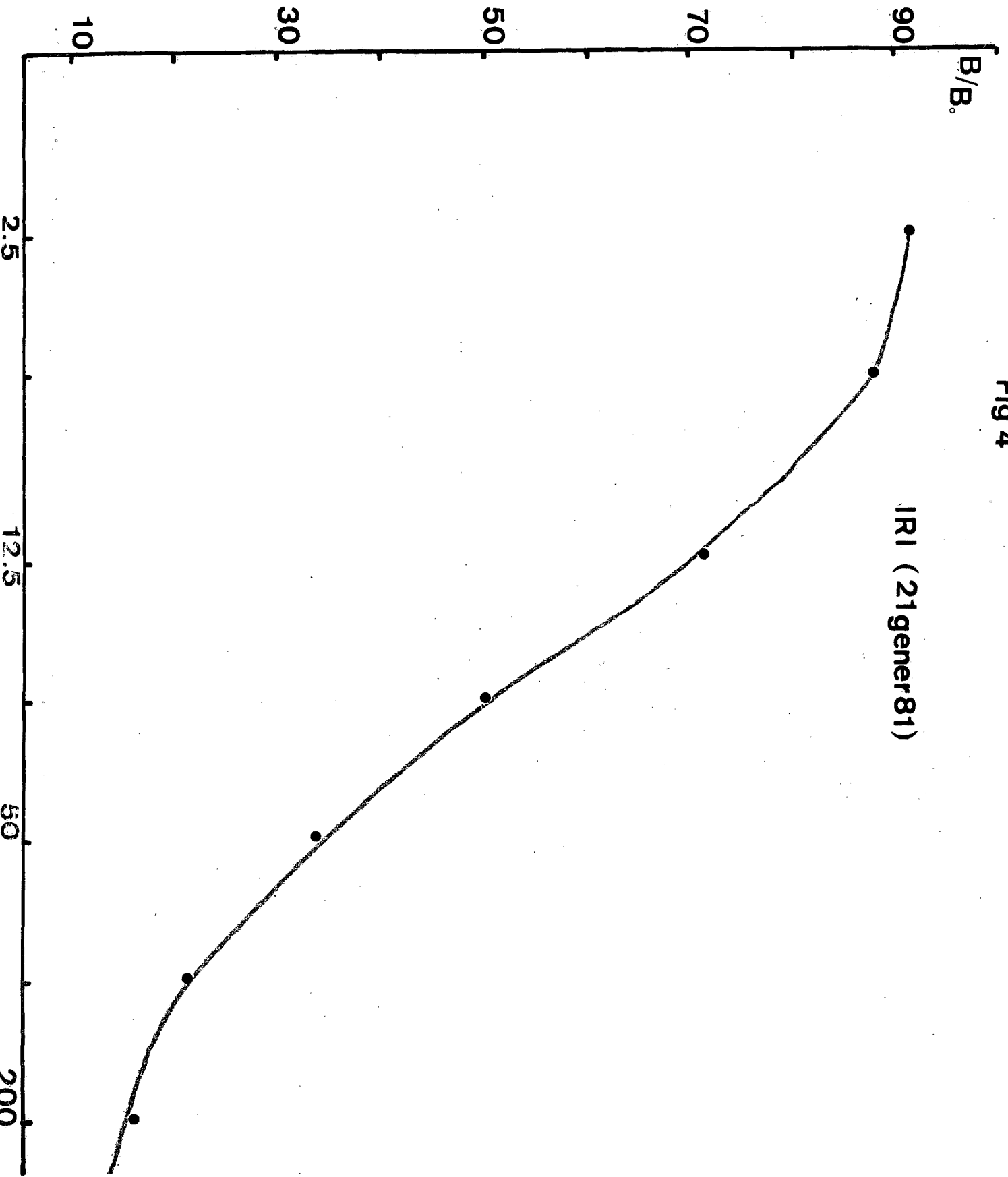
La relació de les comptes obtingudes dels precipitats del problema i del Bo ens indicarà el punt corresponent de la corba patró i en conseqüència el valor d'I.R.I. del sèrum objecte d'estudi.

La determinació de la insulina mitjançant el radio-immuno-assaig, si bé només determina la insulina d'origen pancreàtic, té alguns problemes.

164

a/ L'anticòs, enfront de la insulina, no reconeix el pèptid-C però sí reconeix la proinsulina, i s'ha descrit que fins un 20% del total de la I.R.I. determinada a sang perifèrica i en condicions basals pot tractar-se

Fig 4



de proinsulina. Aquest percentatge disminueix després d'estímuls de la secreció d'insulina i això fa que a la pràctica clínica aquest factor d'imprecisió no tingui massa importància, excepte en algunes patologies, especialment aquelles en les que poden existir títols elevats d'anticossos - insulina circulant, que pel fet de lligar-se també a la proinsulina li allarguen la vida mitjana i per tant augmenten la seva proporció en el valor de la I.R.I. Amb l'objecte d'obviar aquest factor d'error i a la vegada determinar només la insulina lliure (no lligada a anticossos-circulants) que és la insulina activa biològicament, els sèrums amb nivells elevats d'anticossos-insulina són tractats prèviament al R.I.A., amb polietilenglicol o etanol, que tenen la propietat de precipitar els anticossos (immunoglobulines) lligats a la insulina i a la proinsulina. Així, el R.I.A. posterior, només ens determinarà la insulina lliure i una petita proporció de proinsulina.

b/ La I.R.I. ens dona el valor de la insulina pancreàtica, però també pot determinar-nos la insulina administrada exògenament. Això pot donar lloc a problemes a l'hora de determinar, en el plasma de malalts afectes de Diabetes Mellitus tractats amb insulina, la insulina endògena segregada de l'exògena administrada.

Valoració del percentatge de proinsulina en la mesura de la I.R.I.

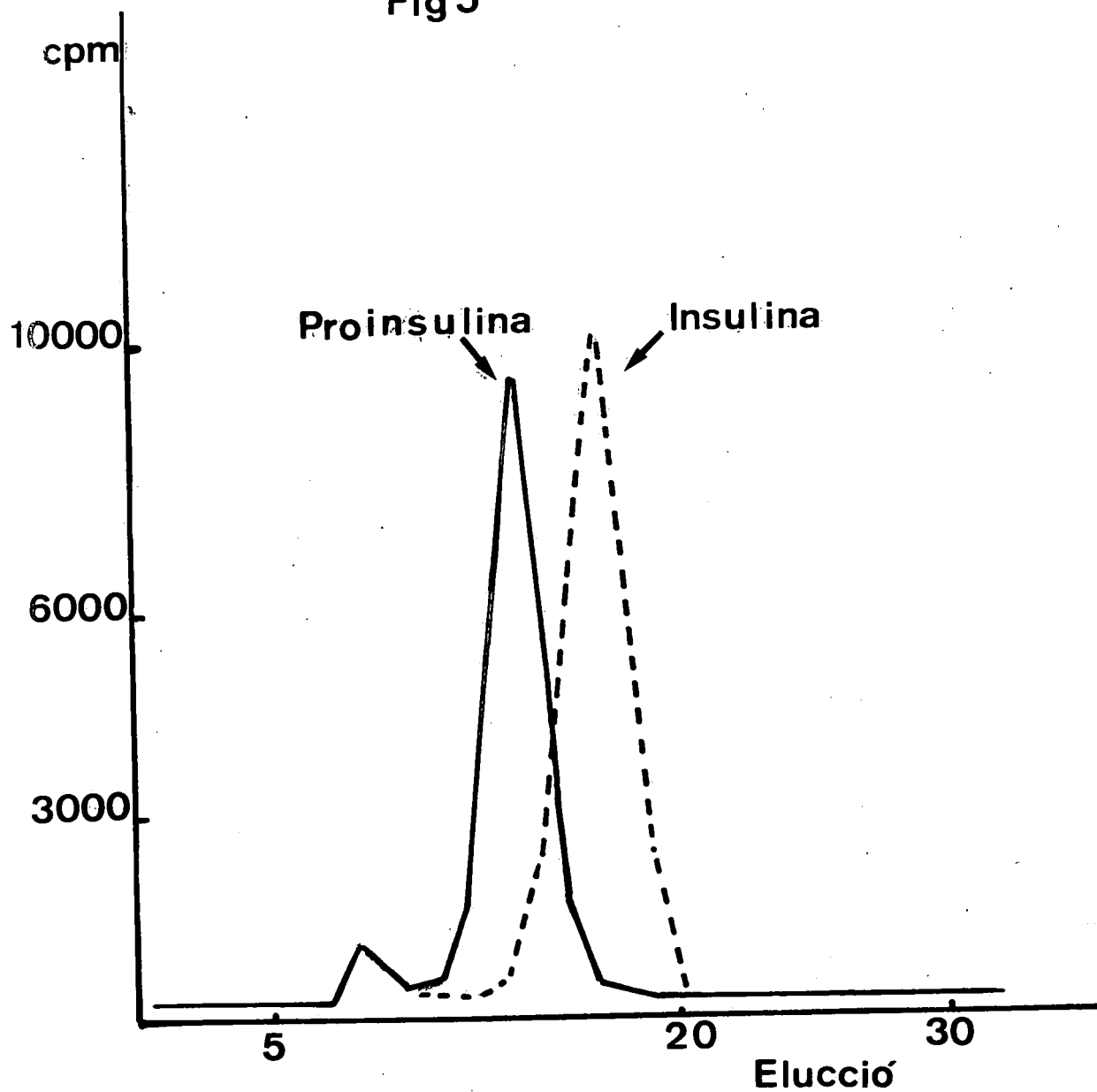
Amb l'objecte de conèixer quin percentatge de proinsulina es determinat en la mesura de la I.R.I. s'utilitza la tècnica cromatogràfica de columna.¹⁶⁵

Qualsevolga eluent que passi per la columna podrà recollir-se com a eluït pel col·lector de fraccions, amb el ben entès que el seu temps d'elució serà proporcional al pes molecular de l'eluent.

Per a poder aplicar aquets principis a la determinació del percentatge de proinsulina de la I.R.I. s'estandaritza una columna cromatogràfica amb una quantitat establerta d'insulina I-125 i proinsulina I-125. Donada la diferència de pesos moleculars la seva elució donarà dos eluïts radioactius diferents, recollits pel col·lector de fraccions. Els comptes per minut (C.P.M.) ens permetran establir un model patró. Fent l'elució d'un sèrum objecte d'estudi, cal esperar que els eluïts, obtinguts als llocs on s'ha establert la recollida d'insulina I-125 i proinsulina I-125, seran d'insulina i proinsulina. Determinat el I.R.I. de totes les eluccions es dibuixarà la gràfica problema que es superposarà a l'establerta com a patró (Fig. 5) i ens permetrà calcular el percentatge de proinsulina de la I.R.I.

Els nivells de la I.R.I., mesurats a sang perifèrica, en condicions basals, descrits a la literatura científica son de 0.2 a 1 ng/ml. (5-25 μ U/ml) i els de la proinsulina 0.19 ng/ml, i mesurats a sang portal en les mateixes condicions, per a la I.R.I. son 0.97 ng/ml. i per a la proinsulina 0.31 ng/ml.

Fig 5



DETERMINACIÓ DEL PÈPTID - C

La proinsulina, precursor de la insulina, es converteix, per proteolisi, a la cèl.lula beta pancreàtica en insulina i pèptid-C, i per exocitosi, ambdós molècules, junt amb una petita proporció de proinsulina, són lliberades a la circulació perifèrica.⁷

La mesura, en sang perifèrica, del pèptid-C, es pensava que podria gaudir d'algunes avantatges respecte a la mesura de la insulina.¹⁶⁶

Així sabem, que tant la insulina com el Pèptid-C són lliberats, alhora, i per idèntics estímuls, en proporció equimolecular, per la cèl.lula beta, però a diferència de la insulina, el Pèptid-C, no es metabolitza pel fetge, amb la qual cosa la determinació del Pèptid-C en sang perifèrica pot ésser un índex més fiable de secreció beta pancreàtica que la insulina, donat que els seus nivells perifèrics no estaran afectats per la metabolització hepàtica com ho estan els de la insulina.

A més, en teoria, els preparats d'ús clínic d'insulina mai han de contenir Pèptid-C. En el cas de pacients als quals se'ls hagués administrat insulina previament a l'assaig de Pèptid-C, aquest assaig no estaria interferit pels nivells circulants d'insulina exògena ni tampoc per la presència en el plasma d'anticossos enfront el Peptid-C.

L'equació fonamental del radio-immuno-anàlisi del Pèptid-C (CPR)¹⁶⁸ es similar a la descrita per a la insulina. Consisteix en establir competència entre el Pèptid-C patró o problema i el Pèptid-C marcat enfront d'un anticòs específic

per a Pèptid-C, i la posterior precipitació per un segon anticòs del lligat Pèptid-C-anticòs específic. La quantitat de lligat Pèptid-C marcat-anticòs específic estarà en relació amb la quantitat de Pèptid-C no marcat (patró o problema) a la mostra. Això ens permetrà dibuixar la corba patró, i en ella podrem localitzar els valors de Peptid-C dels problemes.

Aquesta ecuació fonamental del radio-immunoassaig precisa l'obtenció d'un Pèptid-C patró i d'un anticòs específic amb el mínim de reacció creuada amb altres substàncies presents al plasma.

La mesura del Pèptid-C es fa per radio-immuno-anàlisi (R.I.A.) i la tècnica fou referida, inicialment, per Melani i al. encara que posteriors treballs varen desenvolupar altres mètodes de R.I.A. que han evitat importants factors d'error que havien sigut criticats de la tècnica inicial.^{167,169}

Deis diferents mètodes descrits per a la determinació del Pèptid-C, pot dir-se que es habitual en tots ells l'ús del Pèptid-C sintètic com a hormona patró i del Pèptid-C sintètic I-125 com a hormona marcada. En canvi, existeixen importants variacions segons la tècnica de que es tracti, pel que fa a l'ús de l'anticòs (Taula 1). La majoria d'anticòssos ho son enfront del Pèptid-C, si be alguns investigadors utilitzen anticòssos enfront de la proinsulina.¹⁷⁰

La tria d'un o altre anticòs implica una metodologia tècnica diferent per a la pràctica dels radioimmunoassajos del Pèptid-C.

Així, si utilitzem un anticòs específic enfront del Pèptid-C, aquest anticòs malgrat la seva especificitat tindrà reacció creuada enfront de la proinsulina que pot variar des

ANTICÒS	M 1181	M 1219	M 1230	G	Y	C	M 1227
Invest,	Heding	Faber	Faber	Kuzuya	idem	Calbio.	Faber
Antigen	Proins.	C-Pep.	C-Pep.	Proins	C-Pep	C-Pep.	C-Pep.
Animal	Cobaia	Cobaia	Cobaia	Cobaia	Ratoli	idem	Cobaia
Reacció creuada amb la proinsulina	100	27	27	143	62	57	47

Anticossos utilitzats generalments en el assaig del Peptid-C ¹⁷⁰

TAULA 1

d'un 11 a un 62 per cent. Aquesta reacció creuada, en cas d'ésser important, pot donar nos valors no reals de Pèptid-C circulant. Aixó ha fet que alguns autors utilitzin anticòs enfront de la proinsulina en el radio-immuno-anàlisi del Pèptid-C.

Entre aquests autors, qui ha establert de manera rutinaria la tècnica de radio-immuno-anàlisi del Pèptid-C amb l'ús d'anticòs enfront la proinsulina, ha sigut Heding i al.¹⁶⁷

La tècnica consisteix en incubar les mostres problemes amb anticossos insulina lligats a sefarosa amb la qual cosa la proinsulina i la insulina presents al sèrum problema quedaran lligades a la sefarosa. El sobrenadant s'incuba amb Pèptid-C sintètic I-125, anticòs enfront de la proinsulina amb reacció creuada 100% amb el Peptid-C. Donat que el sèrum és, ara, exent de proinsulina, l'anticòs només reconeix el Pèptid-C i per tan permet la seva adequada valoració.

Ambdues tècniques de determinació del Peptid-C, la que utilitza anticòs enfront del Peptid-C i la que ho fa amb anticòs enfront la proinsulina,¹⁶⁷ s'usen a la pràctica diària, i si bé aquesta darrera es més precisa, també té una major complexitat que la fa menys adequada en la determinació rutinaria i en aquells cassos en que els nivells de proinsulina circulant són baixos.

Tan en una com en l'altra tècnica hi ha la possibilitat que la proinsulina lligada a l'anticòs interfereix amb el R.I.A. del Pèptid-C. Per aquesta raó, en els casos en que es sospita la presència de títols elevats d'anticossos insulina, a conseqüència de l'administració previa d'insulina exògena, es fa abans del R.I.A. una precipitació previa de la proinsulina lligada a anticossos mitjançant l'etanol

o el polietilenglicol.¹⁷¹

ÚS DE LA SOMATOSTATINA PER A L'ESTUDI DE LA
INSULIN-RESISTÈNCIA.

La somatostatina és un pèptid aïllat del teixit hipotalàmic animal, és inicialment descrit com a inhibidor de la lliberació d'hormona de la creixença per la hipòfisi. Mitjançant l'ús del radioimmunoassaig (RIA) i tècniques immunohistoquímiques, la somatostatina ha estat localitzada a més del sistema nerviós central a determinades cèl.lules endocrines del pàncreas i del tracte gastrointestinal, les anomenades cèl.lules D. Aquestes cèl.lules, vénen a representar un 2 a 2.5% del total de les cèl.lules dels illots i estan situades predominantment a la perifèria dels illots de Langerhans al pàncreas, amb estretes connexions a les cèl.lules alfa, secretores de glucagó i a les P, secretores de polipèptid pancreàtic. Tanmateix, les cèl.lules D tenen unes característiques especials que les fa diferents a d'altres cèl.lules del pàncreas i del tracte gastrointestinal. Així el seu citoplasma té una perllongació que acaba en una forma expansiva de capsa damunt la teòrica cèl.lula efectora.

En la majoria d'espècies animals aquesta perllongació és més gruixuda i més ben dibuixada a les cèl.lules D de la mucosa gàstrica que a la dels illots pancreàtics. De tota manera, aquesta troballa no és universal, i així les cèl.lules D del pàncreas del porc presenten evidents perllongacions, que posen en contacte les cèl.lules alfa, productores de glucagó i les cèl.lules beta productores d'insulina, i els capilars dels illots del veïnat. Aquesta relació amb els capilars té la seva importància donada la tendència del fluxe sanguini dels illots d'anar de la zona sense cèl.lules beta a la zona amb cèl.lules beta, amb la qual cosa es poden donar dues possibles explicacions a la funció de les perllongacions de la cèl.lula D i en

conseqüència a l'abast que aquestes poden tenir en la acció de la somatostatina. Una, en la que la secreció de la somatostatina actuaría directament damunt les membranes de les cèl.lules productores d'insulina i glucagó (funció pancreàtica) i una altra en la qual la somatostatina seria alliberada als capilars dels illots, els quals transportarien la somatostatina a les cèl.lules secretores d'insulina (funció endocrina). Així seria possible especular amb l'existència d'un sistema portal intra illots, anàleg al sistema portal hipotàlamo-hipofisi. Aquest sistema portal podria ésser el responsable del transport de la somatostatina a les cèl.lules pancreàtiques diana.^{173,188,189,190}

Acció biològica de la somatostatina.

Han estat descrites dues formes moleculars de somatostatina.^{192,191} La ja descrita inicialment, formada per 14 aminoàcids, l'anomenada somatostatina 14, i la descrita i aïllada recentment de 28 aminoàcids anomenada somatostatina 28, i per alguns considerada com un precursor o prosomatostatina. La vida media d'ambdues és diferent. La somatostatina 14 té una vida media de 1.32 ± 0.07 min., mentre que la somatostatina 28 té una vida media de 3.64 ± 0.98 min. Tanmateix la depuració de somatostatina 28 és molt més lenta 28.1 ± 7.5 ml/kg.min. enfront de la somatostatina 14, 157.0 ± 34.7 ml/kg.min., sense observar-se variacions en la distribució compartamental d'ambdós peptíds ni tampoc diferències en la seva acció biològica si bé la Somatostatina 28 té una potencia d'acció superior potser degut a la seva vida media més allargada.

La somatostatina exerceix, a través de receptors específics descrits en alguns teixits, com per exemple al sistema nerviós central, un gran nombre d'accions biològiques. Algunes d'aquestes accions s'han estudiat administrant dosis de somatostatina, que podriem considerar suprafisiològiques.

Fonamentalment són les següents:¹⁹⁷

- 1.- Inhibició de l'hormona de la creixença i de l'hormona tireoestimulant.¹⁹³
- 2.- Inhibició de la prolactina i de l'ACTH en condicions patològiques.¹⁹⁶
- 3.- Inhibició de l'alliberació de l'hormona tireotropa.
- 4.- Inhibició de l'alliberació d'insulina, glucagó i polipeptid pancreàtic.^{172,173}
- 5.- Inhibició de totes les hormones gastrointestinals (gastrina, secretina, CCK, GIP, VIP, motilina i enteroglucagó).¹⁹⁴
- 6.- Inhibició de la secreció de calcitonina.
- 7.- Inhibició de la lliberació de renina.
- 8.- Disminució del fluxe sanguini esplàncnic.¹⁸¹
- 9.- Alteracions en l'absorció de substàncies nutritives.¹⁹⁵
- 10.- Alteracions en l'agregació plaquetària.

Aquestes accions poden ésser modulades, en part, pels efectes de la somatostatina sobre la concentració de nucleòtids cíclics i més específicament per la disminució de la concentració d'AMP cíclic.

La somatostatina inhibeix insulina i glucagó tan en condicions basals com després de diversos estímuls. Aixó ha estat observat tant en estudis fets en pàncreas - aïllat i perfundit d'animal com en estudis fets a humans, i es fa evident també per als anàlegs de la somatostatina.

Així pot parlar-se de la somatostatina com un component fisiològic, hormonal, amb acció directa sobre la secreció d'insulina per la cèl.lula beta comparable a les catecolamines. En humans, s'ha descrit que el seu efecte inhibitori seria observable a dosis de 7 ng/kg./min. Aquesta acció de la somatostatina es dona malgrat l'estimulació paral·lela de les cèl.lules dels illots de Langerhans sigui amb glucosa, arginina, glucagó i tolbutamida. Tanmateix el grau del efecte inhibitori de la somatostatina no està en relació amb el grau insulinogènic d'aquests agents.

Quan s'administra una infusió continua de somatostatina a humans s'observa una caiguda inicial dels valors de glucèmia i de la producció hepàtica de glucosa, amb un descens dels valors d'insulina i glucagó i amb un posterior augment, als 120 minuts de la infusió, dels valors de glucèmia fins a aconseguir valors discretament superiors als de partida, sense augment paral·lel dels nivells de glucagó i insulina, i amb moderat ascens de la producció hepàtica de glucosa.¹⁷⁷

Aquesta elevació de les xifres de glucèmia ha estat objecte de diverses especulacions. Es coneix que el glucagó té una importància capdal en el manteniment de l'homeostasi de la glucosa en especial a les situacions de dejú.^{178,179} S'ha implicat al glucagó com a responsable de l'ascens dels valors de glucèmia, però aquesta implicació és controvertible donat que la infusió simultània de somatostatina i glucagó no modifica subs-

tancialment els valors de glucèmia a les dues hores d'infusió. Recents treballs descriuen com a responsable de l'augment de les xifres de glucèmia al marcat dèficit d'insulina. Aquets experiments pero tenen un resultat diferent quan s'apliquen a malalts afectes de cirrosi hepàtica.¹⁸⁰ En aquest cas s'observa que, a les dues hores d'infusió continua amb somatostatina, no es produeix un augment de les xifres de glucèmia. Aquests augment només pot ésser observable a les 5 hores de infusió i encara sense aconseguir els valors objectivats en normals. Aixó por ésser degut o bé a la manca de substrate del fetge cirròtic, la qual cosa dificulta la glucogenolisi o bé a la importància que per als cirròtics té l'hiperglucagonèmia, present, habitualment, en aquesta patologia, per a mantenir l'homeostasi de la glucosa.¹⁸⁰

Tanmateix la reducció del fluxe sanguini de la vena porta per administració de somatostatina, així com l'observació d'una disminuïda extracció hepàtica d'insulina,¹⁸¹ sense variació en l'extracció hepàtica de glucagó, durant la infusió de somatostatina,⁶⁷ podem tenir un paper en l'explicació dels canvis dels nivells glucèmics circulants observats en la cirrosi hepàtica.

Ús de la SMT per a estudi de la insulin-resistència.

La Somatostatina por ésser de gran utilitat per a estudiar la insulin-resistència en humans.

La demostració de la insulin-resistència global ha estat difícil donats els problemes que presenta la mesura del metabolisme hepàtic de la glucosa, alhora que hi ha la possibilitat en cas de no mantenir-se l'euglucèmia d'estimular-se la secreció d'insulina endògena.

Amb la infusió de Somatostatina pot bloquejar-se la secreció endògena pancreàtica, i si paralelament s'administra una infusió continua, sostinguda i simultànea d'insulina exògena alhora que una de glucosa se'ns permetrà obtenir, un pic aconseguits nivells constants d'insulinèmia, l'evaluació de la sensibilitat dels teixits a la insulina, gràcies a la mesura dels nivells de glucèmia a sang perifèrica.¹⁵²

M E T O D O L O G I A

- . RADIO-INMUNO-ASSAIG de la INSULINA.
- . RADIO-INMUNO-ASSAIG del PÈPTID-C.
- . RADIO-INMUNO-ASSAIG del GLUCAGÓ.
- . RADIO-INMUNO-ASSAIG dels RECEPTORS a la INSULINA.
- . RADIO-INMUNO-ASSAIG dels ANTICOSSOS INSULINA.
- . CROMATOGRAFIA del IRI (Insulina i Proinsulina)
- . MESURA del FLUXE HEPÀTIC.
- . METODE ESTADÍSTIC.

a/ MATERIALS.

- 1.- Insulina¹²⁵ (Cea Sorin)
 Activitat específica: 125 µCi/ng.
 Purificació: cromatografia de columna.
- 2.- Insulina patró (humana)
- 3.- Anticòs insulina (obtingut de cobaia)
- 4.- Segon anticòs (anticòs de conill enfront de la gamma-globulina de porc)
- 5.- Tampó fosfat, amb EDTA Na₂ i albúmina

b/ OBTENCIO DELS REACTIUS.

- 1.- Preparació de la corba patró, 200,100,50,25,10 µU/ml.
- 2.- Diluir la hormona marcada amb aigua destilada.
- 3.- Diluir els anticossos amb aigua destilada.
- 4.- Preparar el tampó. Diluir amb aigua destilada, obtenir un pH 7.4, i guardar abans del seu ús entre 2 i 8°C.

c/ ASSAIG de la INSULINA.

- 1.- Afegir 100 ul de patró de la insulina o sèrum problema als tubs.
- 2.- Afegir 100 de l'hormona marcada.
- 3.- Afegir 2 anticossos.
- 4.- Incubar durant 24 hores a la temperatura de 4°C
- 5.- Afegir 0.5 cc. de tampó
- 6.- Centrifugar a 2000 rpm. durant 45 minuts a 4°C.
- 7.- Aspirar el sobrenedant
- 8.- Comptar la radioactivitat en un comptador gamma.

168

.RADIO-INMUNO-ASSAIG del PÈPTID-C (Tecnica de Kuzuya).

a/ MATERIALS.

- 1.- Pèptid-C huma, per a ús com a patró.
- 2.- Anticòs de Pèptid-C obtingut de conill, per immunització de l'animal amb Pèptid-C humà.
- 3.- Anticòs enfront de la gamma-globulina de conill, obtingut per immunització de la cabra amb gamma-globulina de conill, per a ús com a segon anticòs.
- 4.- Pèptid-C marcat amb I^{125} (Daiichi Radioisotope Labs. Ltd).
- 5.- Tampó.

b/ OBTENCIÓ DELS REACTIUS.

- 1.-Reconstituir el Pèptid-C humà liofilitzat per a establir la corba patró a les següents concentracions: 0,0.3,1.0,3.0,10,30 ng/ml.
- 2.-Disoldre el liofilitzat d'anticòs enfront del Pèptid-C amb aigua destilada. Agitar.
- 3.-Diluir el Pèptid-C I^{125} amb aigua destilada. Agitar.
- 4.-Solució d'anticòs enfront la gamma-globulina de conill(disoldre amb aigua destilada) Cal afegir hi un estabilitzant d'una possible precipitació.

c/ ASSAIG del PÈPTID-C.

- 1.- Colocar 100µl del patró Pèptid-C o sèrum problema a cada tub.
- 2.- Afegir 100µl d'hormona marcada(Pèptid-C- I^{125}) a tots els tubs.
- 3.- Afegir 100 ul d'anticòs enfront del Pèptid a cadascún dels tubs.

- 4.- Agitar. Incubar a 4°C durant 24 hores.
- 5.- L'endemà, afegir 500 µl del segon anticòs.
- 6.- Agitar.
- 7.- Incubar a 4°C durant 24 hores.
- 8.- Centrifugar 45 minuts i a 4°C a més de 2.000 rpm.
- 9.- Aspirar el sobrenedant.
- 10.- Comptar la radioactivitat en un comptador gamma.

RADIO-INMUNO-ASSAIG del GLUCAGÓ (Tècnica de R. Unger)¹⁹⁸

a/ MATERIALS.

- 1.- Trasylol (Bayer)
- 2.- Àcid tetraacític (etilen-2-dinitril disòdic EDTA)
- 3.- Glicina.
- 4.- Sèrum de bè
- 5.- Glucagon I¹²⁵ (monoiodat).

HIS_SER_GLN_GLY_THR_PHE_THR_SER_ASP_TYR_SER_LYS_
 TYR_LEU_ASP_SER_ARG_ALA_GLN_ASP_PHE_VAL_GLN_TRP_
 LEU_MET_ASN_THR

Activitat específica 100-200 µCi/ng.

Iodació: 95% de tota la tirosina marcada es monoi-
 odada.

Marcatge: Segons el mètode de Hunter.

Purificació: Cromatografia de columna

Obtenció: New England Nuclear, amb purificació pos-
 terior al Lab. Hormonal-Hospital Clínic.

- 6.- Glucagó porcí cristal·litzat, obtingut del "Natio-

nal Institute for Biological Standarts and control".

- 7.-Charcoal.
- 8.- Dextrà-70
- 9.- Albúmina (Merck)
- 10.- Anticòs glucagó (30-K)

Setembre - Octubre 1.968 (Pool 5, Lot 9, 25 ml.

Obtingut del Prof. R. Unger (The University of Texas. Dallas).

RECOLLIDA I PREPARACIÓ DE LES MOSTRES.

Inmediatament després de recollida la mostra és guardada en tubs freds on hi hem posat 500 ui. de Trasylol i 1.2 mg. d'EDTA. Na₂ per cc. de sang. Es centrifuga a 4°C i és guarda el plasma en tubs de vidre a -20°C.

Abans de l'assaig, es descongelen les mostres a la temperatura de la cambra d'anàlisi, i es centrifugen a 4°C, 15 minuts i a 2000 rpm amb l'objecte de separar productes de precipitació que poguessin interferir el RIA.

c/ OBTENCIÓ DELS REACTIUS.

- 1.- Glicina 0.4 M (30 gr/l)
- 2.- Glicina per a separació amb el Charcoal
500 ml. 0.4 M de glicina pH 8.8 (afegir Na OH)
H₂O 1.000 ml.
- 3.- Diluïnt
500 ml. 0.4 M glicina
50 ml. Albumisol (5% Albúmina)
10 ml. NSS
Afegir H₂O quantitat necessaria i suficient per a 1000 ml. de diluïent (pH 8.8)

Totes les dilucions de glucagó I¹²⁵, antics, mostres de plasma, glucagó patró s'ha de fer amb aquest diluient.

4.- Trasylol.

5.- Glucagó I¹²⁵

6.- Preparació dels patrons de glucagó.

Cal pesar 5-10 mg. de glucagó patró. Dissoldre'ls amb diluient i ClH 0.02 N, fins a aconseguir una concentració 10 ug/ml.

d/ ASSAIG DEL GLUCAGÓ.

1.- Anticos. Diluir el 30 K en una solució 1:250

Fer-ne aliquotes i guardar-les congelades fins que calgui.

2.- Patrons, a la concentració

0,20,50,100,200,300,600,1200,2000 pg/ml.

3.- Assaig

0.5 ml. glucago I¹²⁵ (15 pg)

0.1 ml. Trasylol (1000 KIU)

0.2 ml. patró o mostres

0.4 ml. antics

1.2 volum total (Agitar)

4.- Ligat inespecífic

Tubs amb diluient, antics, hormona marcada.

5.- Activitat total.

Glucagó I¹²⁵ més Trasylol.

6.- 4 _____ incubació a _____°C.

e/ SEPARACIÓ.

- 1.- Preparar el Carbo-Dextrà (0.5% carbo'activat, 0.25% dextrà) S'aconsegueix barrejant volums igual de Carbo'activat 1% diluït amb glicina 0.2 M (pH 8.8) i de dextrà-70 0.5% diluït amb glicina 0.2 M (pH 8.8). Agitar.
- 2.- Afegir 0.2 ml. de serum de bé als patrons i als tubs sense plasma.
- 3.- Afegir 0.5 de carbo-dextrà a tots els tubs a excepció de l'activitat total.
- 4.- Incubar a 4°C, 45 minuts. Centrifugar a 4°C, 15 minuts , a 2000 rpm. Aspirar el sobrenedant. Comptar la resta (comptador gamma).

156

RADIO-INMUNO-ASSAIG dels RECEPTORS a la INSULINA.

a/ MATERIALS.

- 1.- Tampó (Buffer G)
- 2.- Ficoll-Pielograf
- 3.- Insulina de Porc I¹²⁵, monoiodada (New England Nuclear). Activitat específica: 85 µCi/ugr.
- 4.- Insulina de porc, monocomponent (Novo)

b/ OBTENCIO DELS REACTIUS.

- 1.- Tampó (Buffer G)
 - Tris 50 mM
 - Hepes 50 mM

Cl₂ Mg 6 H₂O 10 mM

Cl₂ Ca 10 mM

EDTA-Na₂ 2mM

D-Glucosa 10 mM

Na Cl 50 mM

K Cl 5 mM

Albumina bovina 1 gr/litro.

2.- Ficoll-Pielograf.

Barrejar 104 cc de la solució de Pielograf amb 250 cc. de la solució de Ficoll. Remenar 1 hora amb un agitador magnètic.

Aconseguir una densitat entre 1077-1075, mitjançant un densitòmetre (Caldera afegir aigua bidestilada).

Conservar a 4°C.

3.- Insulina I¹²⁵ de porc, monoiodada,

Es prepara una concentració d'insulina de 1.6 ng/ml.

4.- Insulina de porc, freda.

Es preparen solucions d'insulina a les concentra-

cions:

100.000 ng/ml.

1000 ng/ml. 5 ng/ml.

100 ng/ml 2 ng/ml.

10 ng/ml. 1 ng/ml.

8 ng/ml.

c/ OBTENCIO DE LES MOSTRES.

- Extracció de 30 cc. de sang.
- Recollir en un tub de vidre, heparinitzat.
- Separació del plasma. S'usa per a la determinació del IRI i la Glucèmia.
- Substituir el plasma separat, per tampó.

- Diluir a 1/3 part. (M)
- Obtenir una bateria de tubs de plàstic de 10 cc. on es col.loquen 3 ml. de Ficoll-Pielograf i 6 ml. de la mostra M'
- Centrifugar a 1580 rpm., durant 25 minuts.
- Eliminar el sobrenedant.
S'afegeixen 6 ml. de tampó al conglomerat d'hematies obtingut com a precipitat.
- Centrifugar de nou les mostres a 1200 rpm. durant 10 minuts,
- Eliminar el sobrenedant. Afegir 1 ml. de tampó al conglomerat d'hematies obtingut com a precipitat. Abocar el contingut dels tubs a un Erlen-Meyer i agitar amb suavitat.
- Contar el nombre d'hematies que cal ajustar a la concentració 4-10 cèl.lules ml.

d/ ASSAIG.

- Incubar els hematies amb Insulina I-¹²⁵, i concentracions creixents d'insulina freda. Com es habitual al RIA es prepara un tub blanc (lligat inespecífic de la insulina al tub) i un patró cero (màxim lligat de la insulina I¹²⁵ als hematies).
- La incubació es a 4°C. durant 18 hores.
- Un pic acabada la incubació, es posen 200 ul de la suspensió dins de tubs de microfuga i s'hi afegeixen 200 de tampó G, i 200 ul. de "dibutil-phatalat".
- Es centrifuga en una microfuga a 4°C, durant 2.5 min.
- S'aspira el sobrenedant deixant una capa de 0.1 ml. de " dibutil-phatalat" damunt el conglomerat d'hematies.

- Es compten els precipitats, en un contador gamma. També es compta una alíquota de 200 µl de la incubació total, i se la considera activitat total.
- Es calcula el % de lligat d'insulina segons la fórmula:

$$\% \text{ Insulina} = \frac{\text{Insulina I}^{125} \text{ unida al conglomerat} - \text{Blanc}}{\text{Blanc}} \times 100$$

Contes en 200 µl de la suspensió cel.lular

CROMATOGRAFIA DE L'IRI (Separació d'insulina i proinsulina)¹⁶⁵

a/ MATERIALS

- 1.- Columna de vidre Mida (1 x 50 cm)
- 2.- Tampó
- 3.- Biogel P-30
- 4.- Blau-dextrà 2000 (volum mort de la columna)
- 5.- Na I¹²⁵ (pic de sals)
- 6.- Insulina I¹²⁵ monoiodada porcina (Novo).
- 7.- Proinsulina I¹²⁵ porcina (Novo)

b/ OBTENCIO DELS REACTIUS

- 1.- Tampó
 - Tampó borat pH 8.0
 - Ac. bòric: 8.25 gr (0.13 M)
 - Na OH : 2.7 gr.
 - BSA, fracció V : 5 gr.
 - Tamponar amb HCl: 1000 m
- 2.- Bio-gel P-30
 - Calcular els gr. de gel necessari segons la fórmula.

$$\text{Volum tub} = Mr^2h \text{ on } M= 3.14$$

r = diàmetre del tub i h = a l'alçada

$$Mr^2h = 3.14 \times 0.5^2 \times 50 = 39.25 \text{ cm}^3$$

Si considerem 1 gr. de Biogel/11 ml. necessitarem inflar 3.56 gr. de Biogel.

- Inflar el Bio-Gel 18 hores a temperatura ambient.
- Aspirar les bombolles amb bomba de buit.

c/ ASSAIG (columna patró)

- Passar blau dextrà 2000 per la columna o Albúmina I^{125} amb l'objecte de conèixer el volum buit.
- Passar Proinsulina I^{125} per la columna. Les aliquotes obtingudes pel col·lector de fraccions, portar-les directament al comptador gamma.
- Passar Insulina I^{125} per la columna. Les aliquotes obtingudes pel col·lector de fraccions portar-les directament al comptador gamma.
- Passar a la construcció de la gràfica patró. Fig.
- Una vegada establerta la columna patró en lloc de la insulina i proinsulina marcades, es passaran els sèrums a través de la columna. De les aliquotes recollides es farà el radio-immunoassaig de l'IRI. Es comparara la gràfica problema amb la gràfica patró. Fig.

RADIO-UNMUNO-ASSAIG dels ANTICOSSOS INSULINA ¹³¹

a/ MATERIAL.

- 1.- Tampó fosfat
- 2.- Carbó-Dextrà

3.- Insulina patró (porcina)

4.- Insulina I¹²⁵ (porcina)

Activitat específica : 100 uCi/ugr

b/ OBTENCIO DEL REACTIUS.

1.- Tampó

- Tampó fosfat 0,04 M pH 7.4, 0.5% de BSA

- Carbó-Dextrà.

- Volums iguals de Carbó activat 5 gr% i dextra 80
(PM 80.000) 0.5 gr%.

ASSAIG

1.- Es prepara com a tots els RIA

- L'activitat total

- El Bo

- El Blanc

2.- 0.1 de tampó o serum problema

3.- Es col.loca l'hormona marcada a tots els tubs

4.- No es posa anticòs, ja que es suposa un titol endògen.

5.- S'incuba 24 hores a 4°C.

6.- S'afegeix el carbó activitat-dextrà.

7.- S'incuba 2 hores a 4°C

8.- Es centrifuga a 4°C, 3.500 rpm. durant 45 minuts.

9.- S'aspira el sobrenedant.

10.- Es compta la radioactivitat en el comptador gamma.

RADIO-IMMUNO-ASSAIG del GLUCAGÓ.

- . Sensibilitat: 25 pg/ml.
- . Coeficient variació intraassaig 8.05%
- . Coeficient variació interassaig 11.16%

RADIO-IMMUNO-ASSAIG de la INSULINA.

- . Sensibilitat 5 μ U/ml.
- . Coeficient variació intraassaig 6.3%
- . Coeficient variació interassaig 14.9%

RADIO-IMMUNO-ASSAIG del PEPTID-C.

- . Sensibilitat 0.3 ng/ml.
- . Coeficient variació intraassaig 5.5%
- . Coeficient variació interassaig 11.8%

EQUIVALENCIES I.R.I. i PEPTID-C (D'ús per al càlcul del quocient molar Pèptid-C/IRI) ^{7,8}

INSULINA (IRI)

$$1 \text{ mg} = 23.5 \text{ UI}$$

$$10^6 \text{ ng} = 23.3 \times 10^6 \mu\text{U}$$

$$1 \mu\text{U} = 0.04 \text{ ng.}$$

Pes molecular insulina = 5807

$$1 \text{ nmol} = 5807 \text{ ngr.}$$

$$1 \text{ pmol} = 5807 \text{ ngr.}$$

$$\text{pmol} = \frac{x \text{ ngr}}{5.807}$$

Pes molecular Pèptid-C = 3.021

$$1 \text{ nmol} = 3021 \text{ mgr}$$

$$1 \text{ pmol} = 3021 \text{ mgr}$$

$$\text{pmol} = \frac{x \text{ mgr}}{3.021}$$

MESURA DEL FLUXE HEPÀTIC ¹⁹⁹

A les 8 del matí, després d'un dejú de 12 hores, es col·loca a la vena hepàtica un cateter " n°7 French balloon (Medi Tech.Cooper Scientific Corp., Watertown,Mass) segons la tècnica descrita per Grossman i mitjançant l'ajut fluoroscòpic. Un pic col·locat el cateter es mesura dos o tres cops la pressió hepàtica enclavada.

Alhora un cateter Swan-Ganz es col·loca a l'arteria pulmonar amb l'objecte de mesurar pressions cardio pulmonars.

S'inicia, un cop practicats els cateterismes, una infusió e.v. de verd d'indocianina (ICG) (Cardiogreen, Hynson, Westcott and Dunning, Inc, Baltimore, Md.) preparada amb sèrum salí i albúmina humana i perfundida a la velocitat d'infusió, capaç d'administrar $0.20 \text{ mg/m}^2/\text{min.}$ amb la precaució d'injectar abans de l'inici de la perfusió una dosi única ICG (0.20 mgr/kg. de pes) Després de 40 minuts de perfusió, es considera aconseguit l'equilibri, i s'obtenen mostres simultànies de sang d'arteria pulmonar i vena hepàtica per a calcul del fluxe hepàtic i estudis metabòlics.

Les mostres per a l'estudi del fluxe hepàtic es centrifuguen immediatament. Es mesuren les concentracions de ICG, a sèrum, líquid d'infusió, i als controls patró, el mateix dia del estudi mitjançant un espectrofotòmetre Zeiss PMQ II a 805 nm.

El calcul del fluxe s'obtingué mitjançant l'equació:

$$\text{EHBF} = \text{R}(\text{A}-\text{H}) (1-\text{Hct})$$
 on R es el valor de la infusió de ICG expressat en mg/min.; A i H són les concentracions del colorant a arteria i a vena expressades en mgr/l. i Hct es el valor Hematòcrit.

Els valors obtinguts del fluxe hepàtic són la mitjana de tres determinacions en cadascun dels períodes de l'estudi.

Per a la infusió de l'ICG s'utilitza un perfussor Braun Unita II.

MÈTODE ESTADÍSTIC

Tots els càlculs estadístics s'han obtingut mitjançant una calculadora CompuCorp 445/44 P Statistician. Els conceptes i fórmules han sigut utilitzats d'acord amb criteris ja establerts.²⁰⁰

MITJANA

Mesura de la tendència central que s'obté dividint la suma de tots els valors pel nombre d'observacions. Es calcula segons la fórmula:

$$\bar{X} = \sum x_i / n$$

DISPERSIÓ TÍPICA

Mesura de la dispersió que s'aconsegueix calculant l'arrel quadrada de la varianza. Es designa per D.S. i es calcula segons la fórmula:

$$DS = \sqrt{\sum (x_i - \bar{X})^2 / (n-1)}$$

ERROR STANDART

Definim l'error standart de la mitjana (ES) segons la fórmula:

$$ES = DS / \sqrt{n}$$

TEST DE LA "t" d'STUDENT PER A MOSTRES NO APARELLADES.

Per a comprobar si les mostres pertanyen o no a una mateixa població pot aplicar-se el test de la "t" d'Student (t independent) que s'expressa segons el cocient:

$$t \text{ ind} = (\bar{X} - \bar{Y}) / \frac{\sqrt{[(N_x - 1) D_{sx}^2 + (N_y - 1) D_{sy}^2] / (N_x + N_y - 2)}}{(1/N_x + 1/N_y)}$$

on \bar{X} és la mitjana de la 1era. mostra.

\bar{Y} és la mitjana de la 2ona. mostra

N_x i N_y , el nombre de dades de cadascuna de les mostres.

D_{sx} i D_{sy} és la dispersió típica de cadascuna de les mostres.

La significació estadística s'ha obtingut segons els graus de llibertat $V = (N_x + N_y) - 2$ a les taules científiques Geigy (). S'accepta com a significació estadística vàlida valors de $p < 0.05$.

TEST DE LA "t" d'STUDENT PER A MOSTRES APARELLADES.

Per a comparar series de dades aparellades, es a dir, que a cada valor de la X li correspongui un valor de Y per a cada individu de la mostra es calcula la "t" dependent segons la fórmula:

$$t \text{ dep.} = (\bar{X} - \bar{Y}) / \left[(D_{sx}^2 + D_{sy}^2 - 2.r. D_{sx} D_{sy}) / N \right]$$

on $N = N_x = N_y$

R = coeficient de correlació lineals.

La significació estadística es mesura segons

els graus de llibertat N-1 per assatjos unilaterals.

CORRELACIÓ LINEAL

La manera quantitativa per a expressar la correlació lineal (línea de regressió) es calcula segons:

$$r = \pm \sqrt{\frac{E(Y_{\text{est}} - \bar{Y})^2}{E(Y - \bar{Y})^2}}$$

on Y_{est} representa el valor de Y estimat a la equació de la recta per a cadascún dels valors de X

Y es cadascún dels valors de Y

\bar{Y} es la mitjana dels valors de Y.

El coeficient de correlació pot oscil.lar entre +1 i -1, i com més s'apropa a 1 més precisa és la correlació. Si el valor es positiu la correlació es dierecta e inversa si es negatiu. La significació estadística és calcula segons els graus de llibertat N-2.

OBJECTIU DE LA T E S I

Els malalts amb cirrosi hepàtica presenten sovint intolerància hidrocarbonada i hiperinsulinisme.

Els objectius de la nostra tesi són:

- I.- Investigar si l'hiperinsulinisme observat als malalts cirròtics pot ésser degut a un augment de la secreció d' insulina o a una alteració en el seu metabolisme hepàtic.
- II.- En cas que existeixi alteració del metabolisme hepàtic, investigar si aquest és degut a una defectuosa extracció hepàtica d'insulina o conseqüència de les derivacions espontànies de sang portal a la circulació sistèmica observades als malalts amb cirrosi hepàtica.
- III.- Investigar la contribució del glucagó i la hormona de la creixença a la insulín-resistència de la cirrosi hepàtica.
Investigar si existeix alteració en el nombre de receptors a la insulina en els malalts amb cirrosi.

OBJECTIU I

Investigar si l'hiperinsulinisme de la cirrosi, observat a la sang perifèrica, és degut a un augment de la secreció beta pancreàtica o a una alteració del metabolisme hepàtic de la insulina.

I N T R O D U C C I Ó

S'ha descrit en els pacients amb cirrosi hepàtica intolerància oral a la glucosa amb hiperinsulinisme, tan en condicions basals com després de l'estímul amb glucosa.^{91,92,136,} No ha quedat, però, ben esbrinat si l'hiperinsulinisme observat a la cirrosi és conseqüència d'un augment de la secreció d'insulina per la cèl.lula beta pancreàtica o bé ho es d'una alteració al seu metabolisme hepàtic.^{93,201}

La possibilitat de determinar simultàniament a sang perifèrica la insulina i el pèptid-C, substància aquesta darrera que es segrega en forma equimolecular amb la insulina a la vena pancreàtica duodenal i que pràcticament no és metabolitzada pel fetge, pot facilitar els estudis que es proposin com a objectiu clarificar les dues hipòtesis abans esmentades.^{7,120,202,203} Amb aquesta intenció es va dissenyar el següent estudi.

P A C I E N T S i M È T O D E

S'estudiaren 10 pacients amb cirrosi hepàtica (edat mitjana 54.6 anys), que reunien els criteris exposants a la Taula 2, i 10 voluntaris sans (edat mitjana 38.8 anys). Cap dels pacients ingeria medicació des d'un mes abans de l'estudi, ni tampoc presentava un pes superior o inferior al 10% del pes teòric. El diagnòstic laparoscòpic i la probable etiologia de la cirrosi, venen expressats a les Taules 3,4.

A tots els pacients, cirròtics i voluntaris sans, se'ls va efectuar una sobrecàrrega oral amb glucosa (100 gr.) amb l'ingesta tres dies abans de la prova d'una dieta alimentària amb un contingut de carbohidrats superior a 300 gr/dia. Es varen obtenir mostres de sang per a determinació de la glucosa, insulina i pèptid-C, en condicions basals, i als 30, 60 i 120 minuts després de l'estímul de la glucosa oral. Les mostres de sang es varen aconseguir per canalització d'una vena del braç mitjançant una papallona Alofix-80,21 G, mantinguda permeable durant l'estudi mitjançant sèrum salí isotònic.

La glucosa es va medir pel mètode de la neocuproina, adaptat a un autoanalitzador de fluxe continu.²⁰⁵

La insulina i el pèptid-C es varen determinar per radio-immuno-assaig, utilitzant el segon anticòs com a mitjà de separació.^{131,168}

Les mostres de plasma per a la determinació de la insulina i del pèptid-C varen ésser separades i guardades a -20 °C fins al moment de l'assaig. L'anàlisi estadístic del resultat es va realitzar mitjançant l'ús de la prova de la t d'Student.

CRITERIS PER A LA INCLUSIO DE PACIENTS A L'ESTUDI

CRITERIS CLINICS

Absencia d'ascitis i edemes.

Absencia d'hemorragia digestiva.

Absencia d'encefalopatia

Absencia d'infecció intercurrent.

Absencia de derivació porto-caval quirúrgica.

CRITERIS BIOLOGICS

Albúmina plasmàtica superior a 3 gr/h.

Bilirrubinèmia total inferior a 3 mg/h.

Urea sanguínea inferior a 65 mg/ml.

TAULA 2

TAULA 3

DIAGNÒSTIC LAPAROSCÒPIA

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
CIRROSI MICRONODULAR	*	*		*	*	*	*	*	*	*
CIRROSI MACRONODULAR										
CIRROSI MIXTA			*							
SIGNES HIPERTENSIO PORTAL	□					□		□	□	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
alcohol	*	*		*	*		*	*		*
hepatitis virica								*		
transfusion s							*			*
hemocromatosi										
criptogenetica			*			*			*	
cirrosi biliar										

RESULTS

GLUCÈMIA

Els valors basals de glucèmia en els pacients amb cirrosi hepàtica foren superiors als valors observats en el grup de voluntaris sans. (Figura 7). Després de l'estímul amb glucosa oral, els cirròtics varen presentar valors promedi més elevats en tots els punts de la corba (Figura 7). Els valors individuals venen expressats a la Taula 5,6.

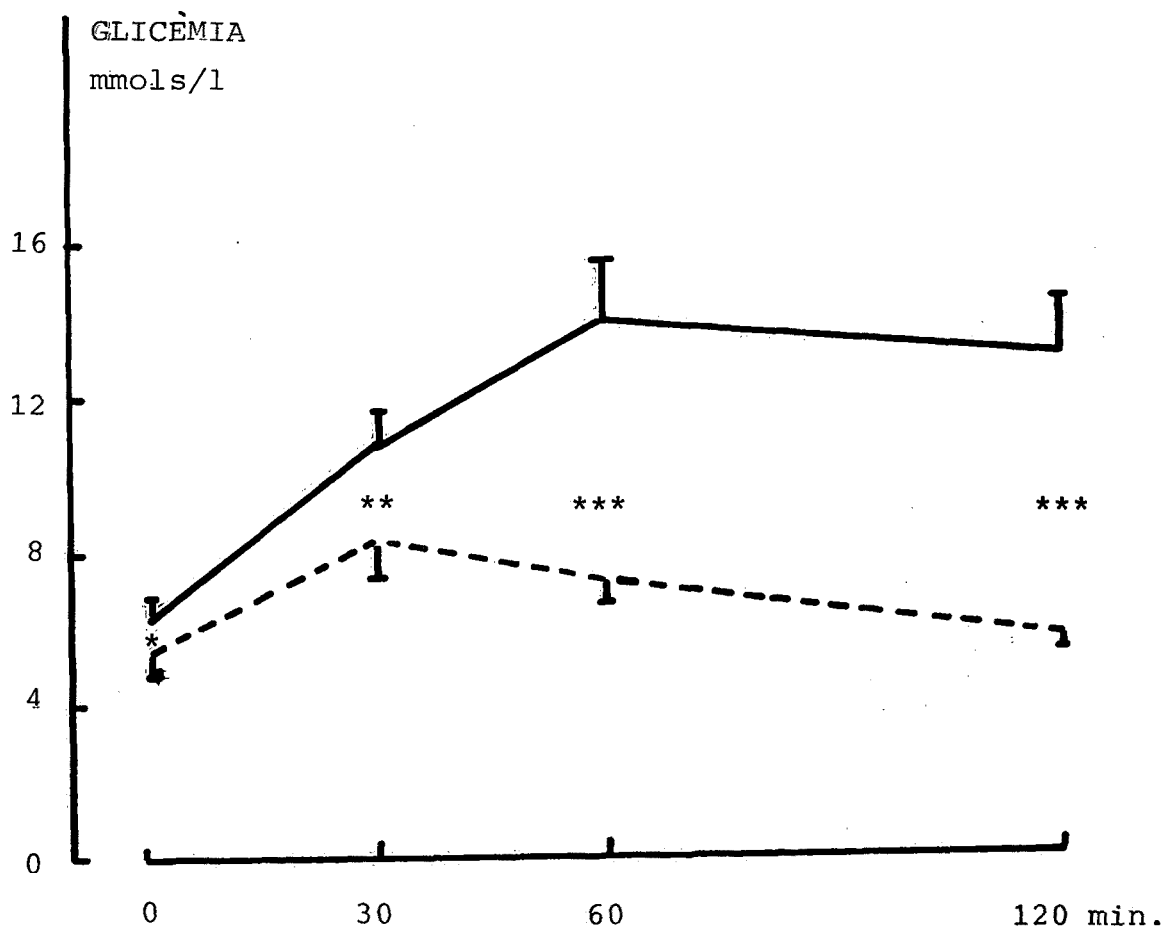
INSULINÈMIA

En condicions basals, tots els pacients amb cirrosi hepàtica presentaren hiperinsulinisme perifèric (Taula 7) Tanmateix als 120 minuts de la ingesta de glucosa, tots els pacients cirròtics presentaren xifres d'insulinèmia superiors als voluntaris sans (Taula 7,8). Tan en condicions basals com als diferents punts de la corba obtinguda amb l'estímul de la glucosa, els valors promedi observats en el grup de pacients cirròtics foren superiors als observats en els voluntaris sans (Figura 8).

PÈPTID-C

Els valors del pèptid-C determinats a sang perifèrica foren similars en ambdós grups de pacients tan en condicions basals com després de l'estímul amb glucosa. (Taula 9,10 Aquesta similitud també fou observada quan es compararen els valors promedi del pèptid-C a cirròtics i voluntaris sans (Fig. 9)

Fig.7



Valors de Glicèmia, basals i després de la ingesta de 100 grs de glucosa. Amb ratlla contínua els valors promedi dels cirròtics, amb ratlla trencada els valors promedi dels voluntaris sans.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

VOLUNTARIS S A N S

VALORS INDIVIDUALS DE GLUCEMIA (mmol/l) BASALS I DESPRES DE L'ESTIMULACIO AMB GLUCOSA.

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
1	4.61	5.50	6.00	5.77
2	5.16	6.61	6.00	5.44
3	5.61	9.44	8.55	6.50
4	5.00	5.72	5.83	4.77
5	5.44	9.50	7.77	6.05
6	5.22	9.16	7.55	5.66
7	5.16	8.83	7.94	5.72
8	6.00	7.61	7.11	6.22
9	5.50	7.50	6.94	5.83
10	5.55	10.50	7.50	5.88

TAULA 5

PACIENTS AMB CIRROSI HEPÀTICA

VALORS INDIVIDUALS DE GLUCEMIA (mmol/l) BASALS I DESPRÉS DE L'ESTIMULACIÓ AMB GLUCOSA.

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
0	5.72	15.50	24.94	17.83
1	5.88	10.00	9.94	8.44
2	5.44	8.83	6.27	6.83
3	6.83	12.44	12.38	13.61
4	7.66	15.00	20.00	16.77
9	6.11	9.22	10.55	12.22
5	7.22	11.94	17.16	20.11
6	4.16	8.61	12.00	13.00
8	6.66	11.72	13.61	9.00
10	5.77	5.83	13.22	13.11

TAULA 6

PACIENTS AMB CIRROSI HEPATICA

VALORS INDIVIDUALS D'INSULINEMIA (IRI) (pmols/ml) BASALS i DESPRES DE L'ESTIMULACIO

AMB GLUCOSA

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
0	0.227	0.427	1.085	0.461
1	0.189	0.982	0.895	0.774
2	0.158	0.551	0.620	0.447
3	0.192	1.067	1.790	1.378
4	0.214	0.723	0.551	0.565
9	0.181	0.413	0.293	0.998
5	0.246	0.465	0.792	1.050
6	0.152	0.827	1.136	1.790
8	0.189	0.465	0.998	1.274
10	0.152	0.936	1.928	2.066

TAULA 7

VOLUNTARIS S A N S

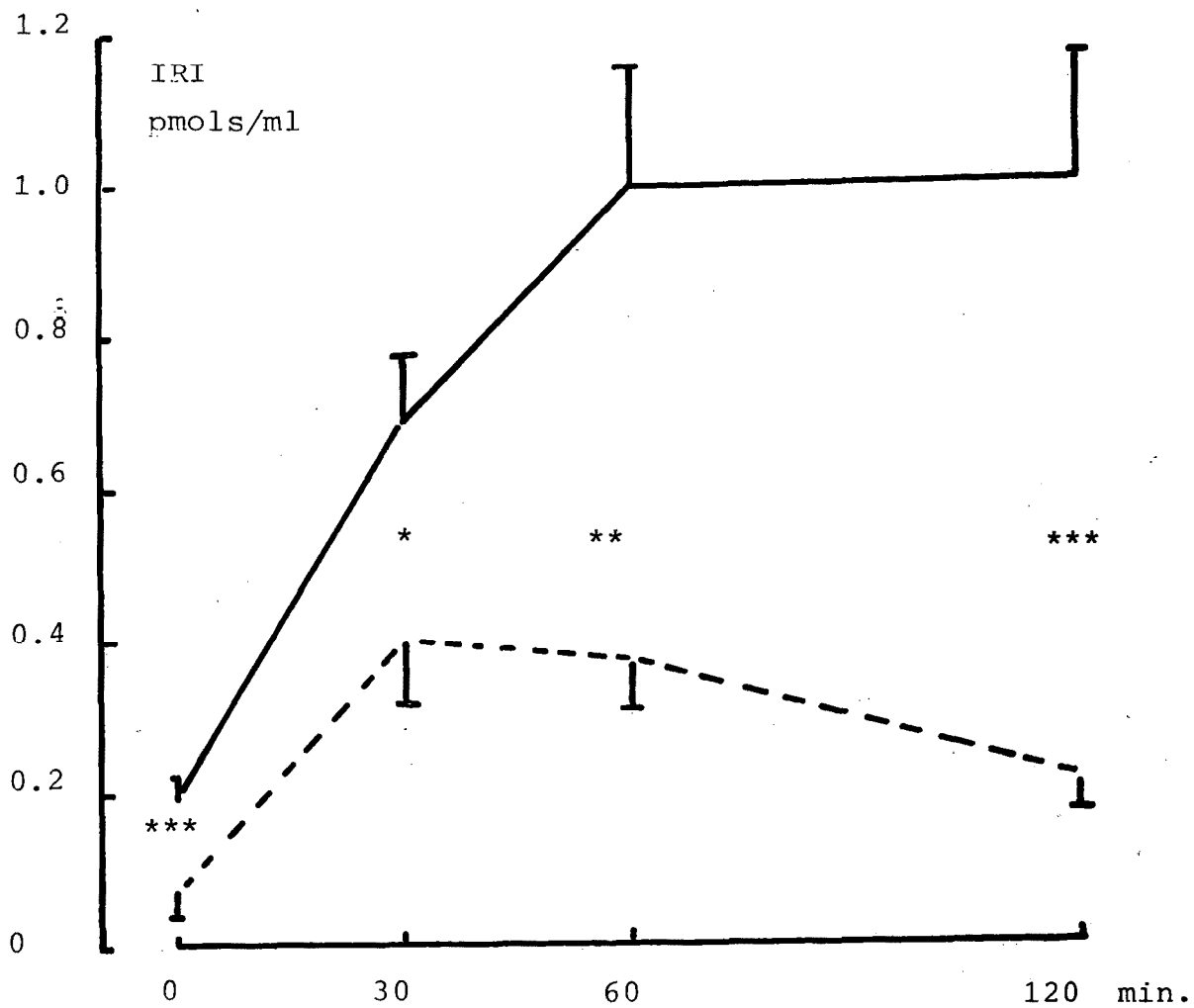
VALORS INDIVIDUALS D'INSULINEMIA (IRI) (pmols/ml) BASALS i DESPRES DE L'ESTIMULACIO

AMB GLUCOSA.

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
1	0.088	0.166	0.213	0.280
2	0.050	0.250	0.278	0.243
3	0.105	0.631	0.651	0.233
4	0.088	0.205	0.188	0.338
5	0.050	0.848	0.536	0.131
6	0.046	0.608	0.586	0.346
7	0.070	0.211	0.165	0.118
8	0.108	0.122	0.171	0.118
9	0.066	0.293	0.276	0.190
10	0.095	0.761	0.828	0.131

TAULA 8

Fig 8



Valors de IRI a sang perifèrica, basals i després de la ingesta de 100 grs de glucosa. Amb línia contínua els valors a cirròtics, amb línia trencada els valors a voluntaris sans.

* $p < 0.025$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

VOLUNTARIS S A N S

VALORS INDIVIDUALS DE PEPTID-C (pmols/ml) BASALS I DESPRES DE L'ESTIMULACIO AMB GLUCOSA.

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
1	0.866	1.400	1.833	2.500
2	0.766	1.700	2.066	2.100
3	0.833	2.833	2.333	2.066
4	0.900	0.833	1.733	2.100
5	0.500	1.733	1.800	1.400
6	0.500	2.666	3.233	2.800
7	0.766	2.666	3.233	2.500
8	0.866	1.600	1.866	1.733
9	0.733	2.266	1.700	2.200
10	0.966	3.500	3.333	3.000

TAULA 9

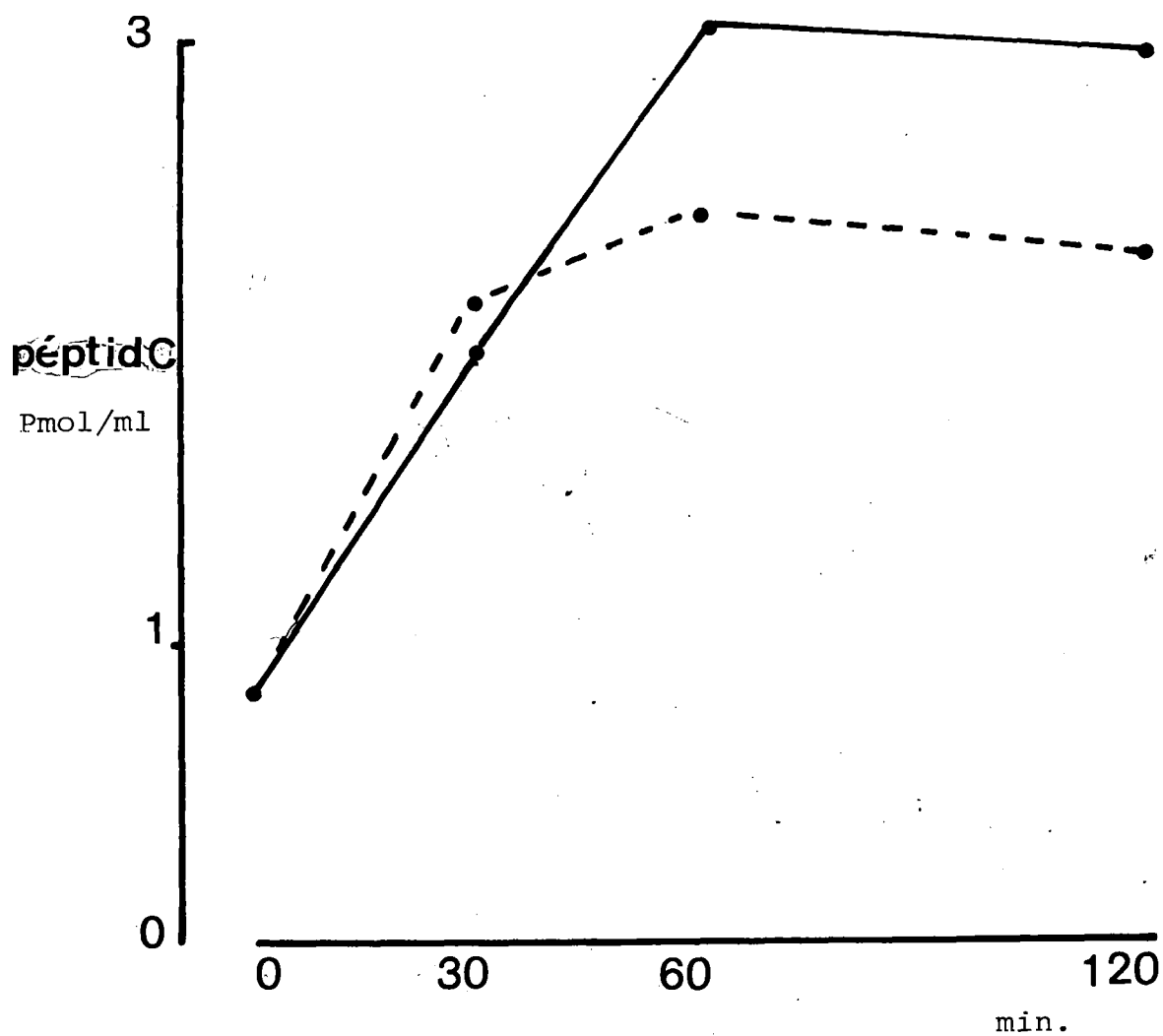
PACIENTS AMB CIRROSI HEPATICA

VALORS INDIVIDUALS DE PEPTID-C (pmols/ml) BASALS I DESPRES DE L'ESTIMULACIO AMB GLUCOSA.

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
0	0.725	0.877	1.681	1.327
1	0.926	3.641	4.468	1.820
2	0.596	2.648	3.343	2.152
3	1.192	2.317	3.972	4.138
4	0.728	0.795	1.125	1.489
9	1.059	1.423	2.317	2.879
5	1.324	1.390	1.522	2.714
6	0.596	1.556	2.052	2.483
8	0.860	1.622	3.145	4.137
10	1.092	2.979	6.620	6.323

TAULA 10

Fig 9



Valors de Peptid-C a sang periferica, basals i després de la ingesta de 100 grs. de glucosa. Amb (—) els valors dles cirròtics, amb (- -) els valors del voluntaris sans.

QUOCIENT MOLAR PÈPTID-C/INSULINA

Els valors basals del quocient pèptid-C/Insulina foren inferiors a tots els cirròtics, tan en condicions basals com als 120 minuts de l'estímul amb glucosa (Taula **11,12** . Així mateix els valors promedi dels quocients molar pèptid-C/Insulina en tots els punts de la corba foren inferiors en el grup de cirròtics respecte als voluntaris sans (Figura **10**).

VOLUNTARIS S A N S

VALORS INDIVIDUALS DEL COCIENT MOLAR PEPTID-C/INSULINA BASALS I DESPRES DE L'ESTIMULACIO

AMB GLUCOSA.

	BASAL	30 MINUTS	60 MINUTS	120 MINUTS
1	9.84	8.43	8.60	8.91
2	15.32	6.80	7.43	8.64
3	7.93	4.48	3.58	8.86
4	10.22	4.06	9.21	6.21
5	10.00	2.04	3.35	10.68
6	10.86	4.38	5.51	8.09
7	10.94	12.16	19.50	21.18
8	8.01	13.11	10.91	14.68
9	11.10	7.59	6.15	11.57
10	10.16	4.59	4.02	9.58

TAULA 11

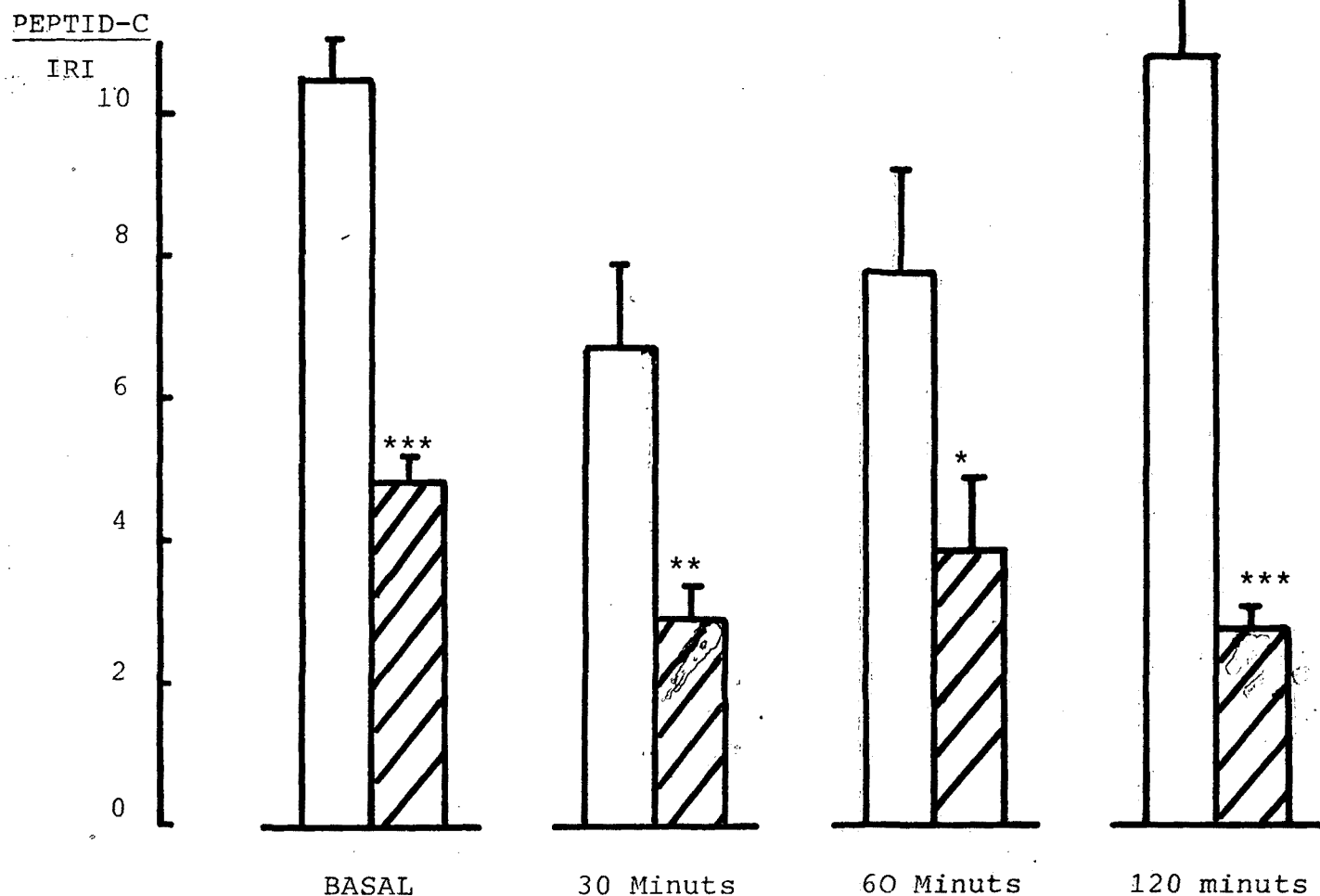
PACIENTS AMB CIRROSI HEPATICA

VALORS INDIVIDUALS DEL COCIENTS MOLAR PEPTID-C/INSULINA BASALS I DESPRES DE L'ESTIMULACIO
AMB GLUCOSA

	<u>BASAL</u>	<u>30 MIN.</u>	<u>60 MIN.</u>	<u>120 MIN.</u>
0	3.19	2.05	1.60	2.87
1	4.89	3.71	4.95	2.39
2	3.93	4.80	5.47	4.88
3	6.63	2.15	2.21	3.01
4	3.60	1.09	2.03	2.64
9	6.09	3.38	7.96	2.87
5	5.50	3.08	1.92	2.59
6	3.93	1.89	1.81	1.38
8	4.52	3.49	3.17	3.25
10	6.09	3.38	7.96	2.87

TAULA 12

Fig10



Valors de la relació molar PEPTID-C /IRI a sang perifèrica, basal i després de l'estímul de glucosa. En ratllat els resultats obtinguts en pacients cirròtics.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$

DISCUSSION

La cèl.lula beta pancreàtica converteix cada molècula de proinsulina a una d'insulina i una altra de pèptid-C, per tant la secreció d'ambdós pèptids a la vena pancreàtico-duodenal ha de considerar-se com equimolecular, si bé existeixen diferències, entre ells, pel que fa a la metabolització.

Així la insulina és metabolitzada fonamentalment pel fetge⁸ i en canvi el pèptid-C ho és pel ronyó.²⁰²

El fetge metabolitza un 50% de la insulina que li arriba, en un primer pas, a través de la vena porta.²¹⁹ Cal suposar, donada la importància de la metabolització hepàtica de la insulina, que la determinació dels nivells d'insulina a sang perifèrica, són un mirall poc precís de la secreció beta pancreàtica, i que, en tot cas, són tan l'expressió de la secreció de la insulina com de la seva metabolització. Aquesta observació es fa més palesa quan valorem la secreció d'insulina en pacients amb alteracions hepàtiques que suggereixen la possibilitat d'una alteració en el metabolisme de la insulina. En aquestes circumstàncies, i sempre que el funcionalisme renal no estigui alterat, la determinació del pèptid-C a sang perifèrica és un índex més fiable d'insulin-secreció que la mateixa insulina.^{60.206}

Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten sovint intolerància als carbohidrats. Aquesta intolerància s'acompanya de nivells elevats d'insulina (IRI) tan en condicions basals com després de la sobrecàrrega oral amb glucosa.⁹² Tanmateix s'ha relatat, en pacients cirròtics, insensibilitat a la insulina exògena administrada.²¹²

Aquesta observació, com també els nostres resultats (Figures 7.8) i les referències citades, fa pensar

que la intolerància als hidrats de carboni a la cirrosi, i fins i tot, les situacions clíniques de franca diabetis secundaries a aquesta malaltia, són, no tan la conseqüència d'un dèficit de la secreció d'insulina per la cèl.lula beta pancreàtica, sinó l'expressió de mecanismes hormonal o cel.lulars d'insulin-resistència.^{92,150}

D'altra banda, l'hiperinsulinisme relatat a la cirrosi hepàtica pot ésser o bé conseqüència d'una hipersecreció de la cèl.lula beta pancreàtica o bé d'una alteració al metabolisme hepàtic de la insulina.^{93,201}

Al grup de pacients cirròtics estudiats hem trobat nivells elevats d'insulina en condicions basals i després de la sobrecàrrega oral de glucosa. Aquesta observació concorda amb les d'altres autors.^{93,210} En canvi, no hem observat hipoinsulinisme com algú ha referit.⁹² El nostre grup de cirròtics té una edat promedi més elevada que el grup de voluntaris sans. Aixó podria ésser objecte de crítica, però, és ben demostrat que els nivells insulinèmics no es modifiquen en relació a l'edat, i, per tant, fa els dos grups comparables.^{207,208}

En els cirròtics, el patró de resposta del pèptid-C a la glucosa no és massa diferent de l'observat en normals. Així, si bé obtenim nivells elevats i estadísticament significatius d'insulina a tots els punts de la corba en el grup de pacients amb cirrosi respecte als voluntaris sans, els valors de pèptid-C obtinguts només són elevats als 60 i 120 minuts de l'estímul, i la diferència no té significança estadística. (Figura 9). Aquesta troballa ja ens fa pensar en la possibilitat que els pacients cirròtics estudiats tinguin una secreció d'insulina, manifestada pels nivells perifèrics del

pèptid-C, que pugui ésser considerada normal, i per tant permet de suggerir que els nivells elevats d'insulina són més la conseqüència d'un inadequat metabolisme hepàtic de la insulina que d'una hipersecreció de la cèl.lula beta. Nogensmenys, si establím el calcul molar pèptid-C/Insulina aquest quocient pot ésser influït en el cas que a una elevació dels nivells d'insulina no li correspongui una de similar de pèptid-C. Aquest quocient, tractant-se d'una secreció equimolecular, no estarà, en cap cas, modulada per la secreció beta pancreàtica, i si, en canvi, serà la manifestació més pregonada o bé d'una alteració del metabolisme hepàtic de la insulina o bé del metabolisme renal del pèptid-C. Admesa, com a condició de l'estudi, la normalitat al funcionalisme renal dels cirròtics escollits i a més, admés que l'alteració en el quocient molar observada en el cirròtics només es deguda a modificacions del denominador (Figura 10) és a dir, dels valors d'insulina, la troballa a sang perifèrica d'un quocient molar pèptid-C/Insulina disminuït reforça la suggerència que l'hiperinsulinisme de la cirrosi és la manifestació fonamentalment, d'un inadequat metabolisme hepàtic de la insulina.^{209,210}

Cal fer esment, que una disminució del metabolisme renal del pèptid-C (valors elevats als 60 i 120 minuts de l'estímul) no modifica el nostre discurs. Nogensmenys, cal precisar que en el nostre treball la troballa d'una relació molar, pèptid-C/insulina disminuïda als cirròtics només pot ésser interpretada com a:

1/ Alteració del metabolisme hepatocel.lular de la insulina,⁹⁶ i/o

2/ A conseqüència de la existència de derivacions portosistèmiques a la malaltia cirròtica, la insulina pot obviar el pas a través del fetge i per tant ésser alterada la seva metabolització.

Ambdues possibilitats cal que siguin elucidades.

OBJETIU II

Investigar si l'hiperinsulinisme de la cirrosi és degut a una defectuosa extracció hepàtica d'insulina o conseqüència de les derivacions espontànies de sang portal a la circulació sistémica.

INTRODUCCIÓN

Els pacients amb cirrosi hepàtica, sovint, són hiperinsulinèmics.^{91,212,213,221} Recentment, s'ha demostrat que les concentracions d'insulina i Pèptid-C a la sang portal dels cirròtics amb hiperinsulinisme son normals.^{201,214} Es possible, per tant, que els nivells elevats d'insulina a sang perifèrica observats a la cirrosi puguin ésser conseqüència de la derivació de la sang de la vena porta a la circulació sistèmica mitjançant colaterals, o bé d'una possible alteració del fetge cirròtic a extreure adequadament la insulina, o d'ambdues hipòtesis.

Alguns autors han demostrat, utilitzant la mesura del quocient molar pèptid-C/insulina a sang perifèrica, una alteració del metabolisme hepàtic de la insulina a la cirrosi.^{210,93} No ha quedat, però, ben establert a conseqüència de quin mecanisme això es possible.^{96,215,225,226}

L'objectiu d'aquest estudi es intentar esbrinar la relativa contribució de l'alteració hepatocel.lular i de les derivacions porto-sistèmiques a l'hiperinsulinisme de la cirrosi.

PACIENTS I . MÉTODE

S'han estudiat 39 pacients. D'aquests 39 pacients, 23 presentaven cirrosi hepàtica diagnosticada per biòpsia hepàtica, i 16 varen ésser utilitzats com a controls. La probable etiologia de la cirrosi hepàtica als 23 pacients estudiats fou la següent:

1.- ALCOHOLICA	16
2.- POST-HEPATITIS	4
3.- CRIPTOGÈNICA	3

Dels 23 pacients amb cirrosi hepàtica, a 8 (Grup I) se'ls havia efectuat de 3 a 24 mesos abans de l'estudi una derivació quirúrgica porto-cava terme-terminal, 10 per haver presentat episodis recurrents d'hemorragia per vèrtes esofàgiques

A la resta dels altres cirròtics, 15 pacients (Grup III) no se'ls havia practicat una derivació porta-cava però tenien manifestacions clíniques d'hipertensió portal, que havien sigut objectivades per l'evidència de vèrtes esofàgiques.

Els 16 pacients del grup control varen ésser escollits perquè se'ls havia proposat una cateterització cardíaca, en base a la sospita clínica de valvulopatia o isquemia cardíaca, però sense evidència hemodinàmica d'insuficiència cardíaca,

L'edat i el sexe , eren similars a la del grup de pacients amb cirrosi hepàtica.

Així mateix, cap dels controls, presentava malaltia hepàtica o alteració en el metabolisme dels carbohidrats, exclosa aquesta possibilitat per estudi clínic, anàlisi biològica i test de tolerància oral a la glucosa previa.

El protocol utilitzat per aconseguir l'objectiu establert (Objectiu II), és a dir, esbrinar la relativa contribució de les derivacions porto-sistèmiques i de l'alteració hepatocel·lular a l'hiperinsulinisme de la cirrosi, va exigir la cateterització de la vena hepàtica i de l'arteria pulmonar amb la intenció d'aconseguir mostres simultànies de sang de vena hepàtica i d'arterial per a la determinació d'insulina (IRI) i Peptid-C (CPR).

Aquest protocol pogué realitzar-se en ocasió d'estudis hemodinàmics practicats als pacients esmentats amb l'intenció d'assabentar-se de la permeabilitat de la derivació quirúrgica als pacients del Grup I, d'evaluar la hipertensió portal al Grup II, i d'establir el diagnòstic i les possibilitats d'intervenció quirúrgica de la cardiopatia al grup control.

Els pacients varen estar d'acord en participar a l'estudi, després d'explicar-los l'objectiu i el possible risc, i el protocol d'aquest estudi fou aprovat pel comitè de recerca de l'Hospital Clínic de la Universitat de Barcelona.

Tots els pacients cirròtics foren estudiats en idèntiques condicions, després d'un dejú nocturn de dotze hores. La cateterització de la vena hepàtica ho fou sota control fluoroscòpic.

Als pacients amb cirrosi hepàtica (Grups I i II)

es determinà la pressió hepàtica enclavada i lliure, i la diferència entre elles es valorà com a gradient de pressió venosa hepàtica (GPVH) i es feu servir com a mesura quantitativa de la hipertensió portal.

La derivació quirúrgica de porta a cava era penetrable en els 8 cirròtics del Grup I. Cap dels cirròtics del Grup II tenia trombosi de la vena porta.

Els cateters es mantingueren permeables mitjançant la infusió de petites quantitats de serum fisiològic, fins a aconseguir mostres simultànies de la vena hepàtica i d'arteria pulmonar.

S'ha de considerar a més a més, que els 8 cirròtics amb comunicació quirúrgica porto-cava (Grup I) el fluxe hepàtic (FH) fou determinat repetidament, amb una infusió contínua i constant de verd d'indocianina (VI). La tècnica d'infusió del verd d'indocianina va ésser la següent: a l'inici s'injecta una dosi única de 0.25 ng/kg. de VI, i a continuació i immediatament es va infundir a la concentració de $0.2 \text{ ng/m}^2/\text{min}$. tot el temps que dura l'estudi. Després d'un període de 40 minuts, amb l'objecte d'aconseguir una concentració estable de colorant (VI), es varen obtenir mostres simultànies de sang de l'arteria pulmonar i de la vena hepàtica a intervals de 4 minuts per tal de terminar el fluxe hepàtic. Això es va fer en condicions basals, després de l'estimulació de la secreció d'insulina per una infusió de glucosa (0.8)gr/min) durant 30 minuts i als 30 i 60 minuts de una infusió de somatostatina (KABI AB) (7.5 pg/min) i després de 30 minuts d'haver suprimit la infusió de somatostatina. En cadascun d'aquests temps, en el moment de determinar el fluxe hepàtic, s'obtingueren mostres simultànies de sang de la vena hepàtica i d'arteria pulmonar per a determi-

nació de la insulina i el Peptid-C.

Totes les mostres de sang es mantingueren a 4°C fins al final de l'estudi, foren centrifugades també a 4°C i després de separar el plasma, aquest fou guardat a -30 °C fins el moment de l'assaig, excepte per a la mesura de les concentracions de verd d'indocianina, que es realitzaren el dia de l'estudi per espectrofotometria a 810 nm.

Els nivells d'insulina i de Peptid-C es mesuraren per radio-immuno-anàlisi (IRI) i (CPR) (tècniques descrites a mètodes de laboratori, Pàgina, **67**).

El fluxe hepàtic es calculà pel principi de Fick utilitzant l'equació $FH = I/A - VH$ en la qual I és la quantitat de verd d'indocianina que s'infundeix, i A i VH les concentracions de verd de indocianina a sang arterial i a vena hepàtica, respectivament. Els resultats de FH representen el promedi de les tres determinacions efectuades en cada temps de l'estudi.

Evaluació del metabolisme hepàtic de la insulina.

El metabolisme hepàtic de la insulina a la cirrosi pot mesurar-se directament en els malalts cirròtics amb derivació quirúrgica porto-caval (Grup I), ja que el fetge d'aquests pacients només reb insulina mitjançant l'arteria hepàtica.

En aquest cas, l'extracció hepàtica d'insulina (EHI) pot ésser definida per l'equació $E IRI = (A - VH) / Ax FH$ i la freqüència d'eliminació d'insulina per la de $(A - VH) \times FH$, equacions en les quals A i VH representen els nivells de IRI a la sang arterial i a una vena hepàtica respectivament.

En els pacients cirròtics sense comunicació quirúrgica porto-cava (Grup II) i en els pacients del grup control, en el quals els esmentats paràmetres que ens indiquen el metabolisme hepàtic no poden ésser calculats perquè no es possible la coneixença de la mesura d'insulina a la vena porta així com el fluxe portal, el metabolisme hepàtic de la insulina pot ésser evaluat indirectament a partir de les concentracions de IRI i CPR a vena hepàtica. I aixó per la següent raó: si considerem que el Pèptid-C, a diferencia de la insulina no té extracció hepàtica⁸, els nivells de Pèptid-C a la vena hepàtica han d'ésser l'expressió de la secreció d'insulina, i la relació molar Pèptid-C/IRI a vena hepàtica ha de reflectir el metabolisme hepàtic de la insulina. Així, doncs, un metabolisme alterat de la insulina, incrementarà els nivells de IRI a la vena hepàtica, i en conseqüència en resultarà una reducció de la relació molar Pèptid-C/IRI a vena hepàtica.

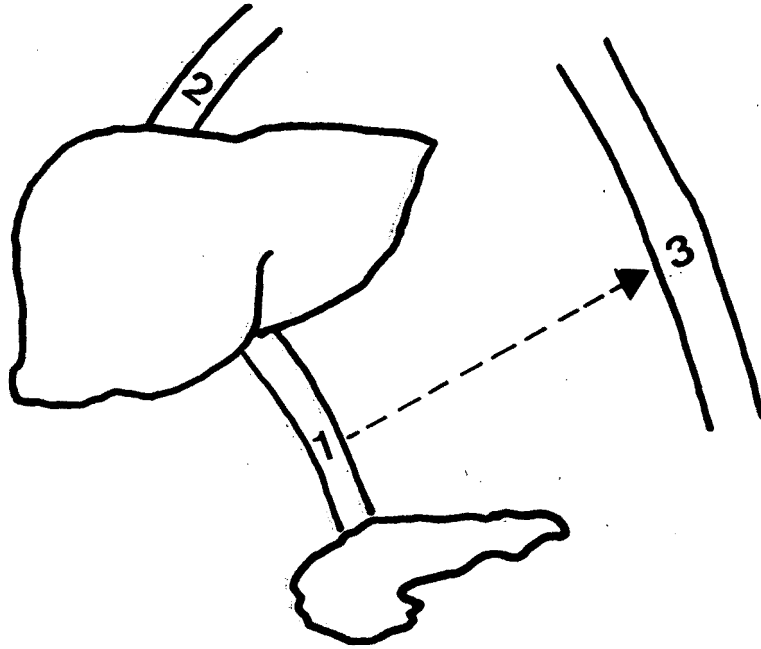
Evaluació del paper de les derivacions porto-sistèmiques.

El paper de les derivacions porto-sistèmiques com a responsables de l'hiperinsulinisme a la cirrosi pot investigar-se a partir d'acceptar les següents consideracions tècniques.

Sabut que la insulina es segregada a la vena porta i parcialment extreta pel fetge abans de passar a la circulació sistèmica, en condicions normals els nivells de IRI a sang de la vena hepàtica han d'esser més elevats que a la sang arterial perifèrica (Figura 11). Una disminució de l'extracció hepàtica d'insulina pot incrementar els nivells de IRI a

Fig 11

PAPER DEL SHUNT PORTOSISTÈMIC



- normal $1 > 2 > 3$
- shunt $3 > 2$

la vena hepàtica, però aquests seguiran éssent superiors als nivells d'insulina de sang perifèrica. En cas contrari, la troballa de nivells d'insulina en arteria perifèrica superiors als nivells de vena hepàtica només poden ésser la conseqüència de la derivació de la sang de vena porta a la circulació sistèmica (Figura 11). Podria dir-se, que la relació entre la IRI de sang arterial i de sang venosa (A/VH IRI) hauria d'ésser sempre inferior a 1 en els pacients normals i superior a 1 quan existissin derivacions de sang portal a territori sistèmic.

En ambdós casos, el grup control hauria de representar a un grup de pacients sense derivació porto-sistèmica, i el grup de cirròtics amb derivació quirúrgica terminal, representa un grup de pacients amb un 100% de derivació sistèmica de la sang portal.

RESULTS

Insulina i relació molar Pèptid-C/Insulina a sang perifèrica.

Els pacients amb cirrosi hepàtica, tan el grup I com el grup II, presenten nivells d'insulina, en sang perifèrica, significativament més elevats que els pacients del grup control. (Taula 14), la qual cosa demostra que els nostres pacients cirròtics, objecte d'estudi, són hiperinsulinèmics. Malgrat això, no s'observen diferències significatives entre els nivells perifèrics basals d'insulina entre els pacients cirròtics del grup I i del grup II (Taula 14). Els pacients del grup control tenen nivells d'insulina similars a un grup de voluntaris sans, no obesos, de edat i sexe similars i estudiats al nostre laboratori.

La relació molar Pèptid-C/Insulina a sang perifèrica, es troba significativament més baixa als pacients amb cirrosi hepàtica tinguin o no tinguin derivació quirúrgica porto-cava que al grup control (Taula 14) d'acord amb les conclusions de l'OBJECTIU I.

En canvi entre ambdós grups de pacients cirròtics (Grup I i Grup II) no hem observat diferències significatives en la relació molar Pèptid-C/Insulina a sang perifèrica, i tampoc entre grup control i el grup de pacients normals estudiats ja previament (Taula 14).

Evaluació del metabolisme hepàtic de la insulina.

El metabolisme hepàtic de la insulina s'ha pogut evaluar indirectament, amb la mesura dels nivells de Pèptid-C

I R I (pmol/mL)

P E P T I D-C (pmol/mL)

P E P T I D-C/ I R I

	Arteria	Vena Hep.	Arteria	Vena Hep.	Arteria	Vena Hep.
NORMALS \bar{X}	0.083	0.143	0.857	1.125	11.55	8.48
DS	± 0.009	± 0.018	± 0.018	± 0.137	± 1.35	± 0.67
CIRROSIS \bar{X}	0.205	0.132	1.305	1.256	6.091	9.497
DS	± 0.041	± 0.029	± 0.180	± 0.170	± 1.060	± 1.131
CIRROSIS DPS \bar{X}	0.234	0.130	0.820	0.955	4.870	9.84
DS	± 0.037	± 0.028	± 0.070	0.130	± 1.03	± 2.69

Taula 14

i de la relació molar Pèptid-C/Insulina a la sang de la vena hepàtica. I hem observat que no existeixen diferències significatives en els valors de Pèptid i de la relació molar Pèptid-C/Insulina a la vena hepàtica entre els pacients cirròtics i els controls.

Tanmateix, als cirròtics amb derivació quirúrgica porto-sistèmica (Grup I) ha sigut possible evaluar el metabolisme hepàtic de la insulina directament, i així hem pogut mesurar l'index hepàtic d'extracció, la depuració hepàtica i la freqüència d'eliminació hepàtica de la insulina en condicions basals i després de l'estimulació i frenació d'insulina amb glucosa i somatostatina (Taula 15, 16, 17).

L'extracció hepàtica d'insulina als pacients cirròtics es de $47.6 \pm 6.2\%$ en condicions basals i aquesta extracció hepàtica d'insulina no varia quan estimulem o suprimim la secreció d'insulina (Figura 12).

La depuració hepàtica d'insulina és de 35.5 ± 3.2 pmol/m. en condicions basals i tampoc es modifica amb l'estímul o supressió de la secreció d'insulina Taula 16.

La freqüència d'eliminació d'insulina és de _____ en condicions basals, i aquesta freqüència d'eliminació d'insulina correlaciona directament amb els nivells d'insulina en sang arterial de manera que el fetge cirròtic incrementa l'eliminació d'insulina quan augmenten els seus nivells arterials per estimulació de la cèl.lula beta amb glucosa, decreix l'eliminació quan disminueixen els nivells d'insulina per frenació de la seva secreció i de nou aquesta eliminació, quan augmenten altra vegada els nivells d'insulina, després de suprimir la infusió de somatostatina (Figura 13).

Aquesta capacitat que té el fetge cirròtic de mo-

Taula 15

CIRROTICS DERIVACIO PORTO - SISTEMICA

	PEPTID-C / IRI		INDEX D'EXTRACCIO IRI				Recu- peraci6
	Arteria	Vena	Basal	Estimul	Frenaci6 (1ra.extr.)	Frenaci6 (2°extr.)	
J.C.	4.906	7.709	0.300	0.423	0.178	0.288	0.473
T.F.	3.259	7.834	0.624	0.692	0.370	-	0.722
D.C.	3.187	4.844	0.367	0.604	0.274	0.318	0.415
T.V.	2.324	3.204	0.300	0.508	0.295	0.235	0.328
Cl.M.	9.059	20.479	0.542	0.675	0.564	0.543	0.510
J.G.	6.472	15.000	0.661	-	-	-	-
J.Cl.	-	-	0.455	0.453	0.524	0.522	0.319
A.J.	-	-	0.566	0.601	-	-	-
Mitjana	4.867	9.845	0.476	0.565	0.367	0.387	0.461
Error ST	1.033	2.691	+ 0.062	+ 0.089	0.059	0.108	0.078

CIRROSI DERIVACIO PORTO - SISTEMICA

	B A S A L		ESTIMULACIO		FRENACIO (1ra. extracció)		FRENACIO (2° extracció)		RECUPERACIO	
	Fluxe pl.	Depuració	Fluxe pl.	Depuració	Fluxe pl.	Depuració	Fluxe pl.	Depuració	Fluxe pl.	Depuració
J.C.	0.529	46.023	0.529	90.988	0.505	13.130	0.486	20.412	0.573	130.644
T.F.	0.254	49.022	0.214	77.468	0.197	7.289	-	-	0.284	104.512
D.G.	0.217	16.275	0.234	40.014	0.161	5.474	0.159	9.222	0.245	38.465
T.V.	0.281	34.844	0.298	75.990	0.261	19.575	0.246	22.386	0.284	90.028
Cl.M.	0.342	19.494	0.348	23.002	0.318	20.352	0.318	32.118	0.402	268.536
J.G.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
J.Cl.	0.293	35.746	0.303	45.45	0.231	17.325	0.240	17.46	0.322	50.876
A.J.	0.367	34.498	0.367	103.127	-	-	-	-	-	-
Mitjana	0.326	33.700	0.327	65.144	0.278	13.857	0.289	20.319	0.351	113.843
Error Stand.	+ 0.038	+ 4.624	+0.039	+11.100	+ 0.50	+2.587	+0.055	+3.706	+0.049	+ 33.918

Taula 16

CIRROSIS HEPATICA

(Derivació porto-sistemica quirurgica)

	FLUXE PLASMATIC (l/m)	INDEX D'EXTRACCIO IRI (%)	DEPURACIO IRI (l/m)
J.C.	0.529	30.0	0.158
T.F.	0.254	62.4	0.158
D.G.	0.217	36.7	0.079
T.V.	0.281	30.0	0.084
Cl.M.	0.342	66.1	0.226
Cl.Cl.	0.293	45.5	0.133
A.J.	0.367	56.6	0.207

Taula 17

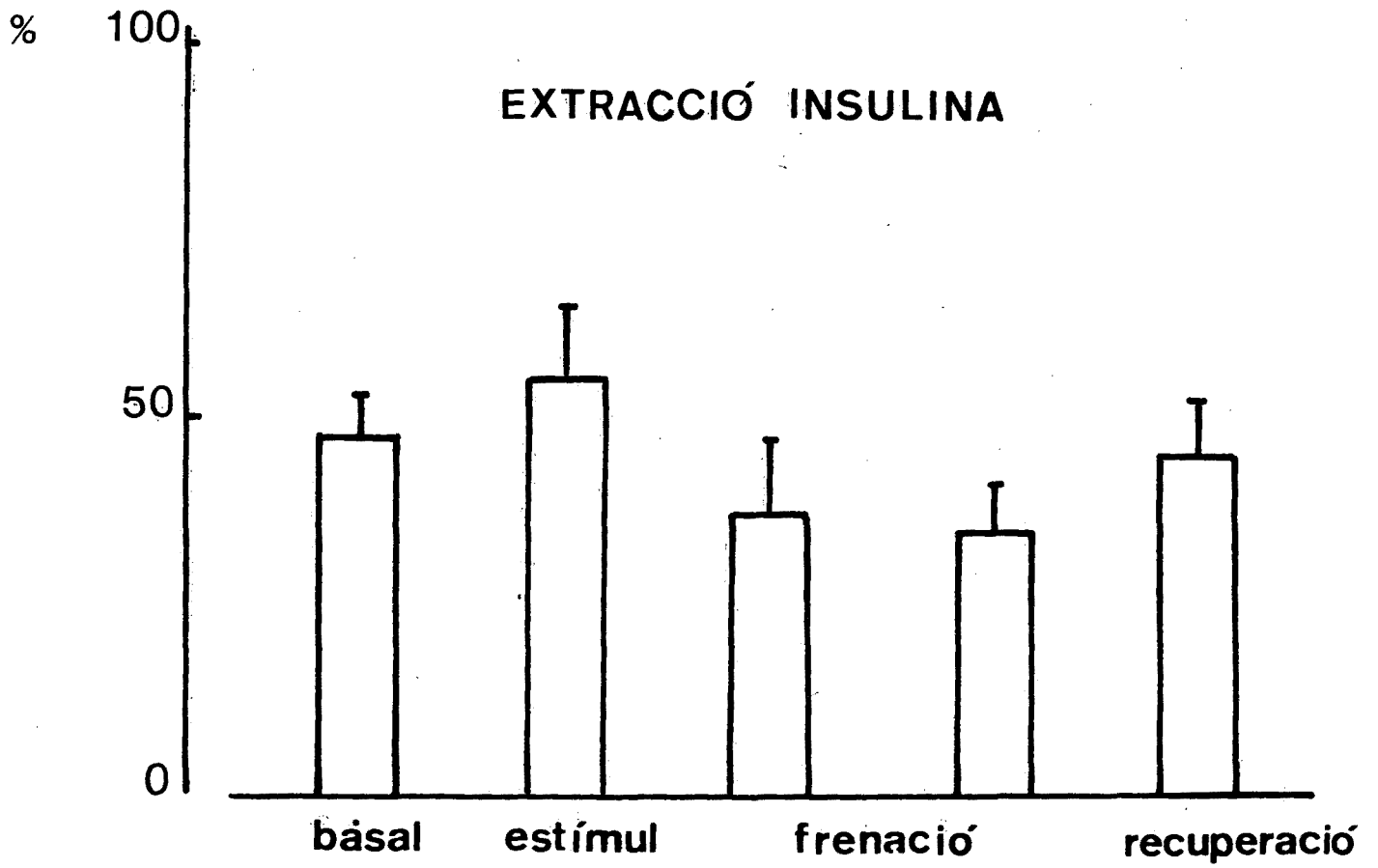
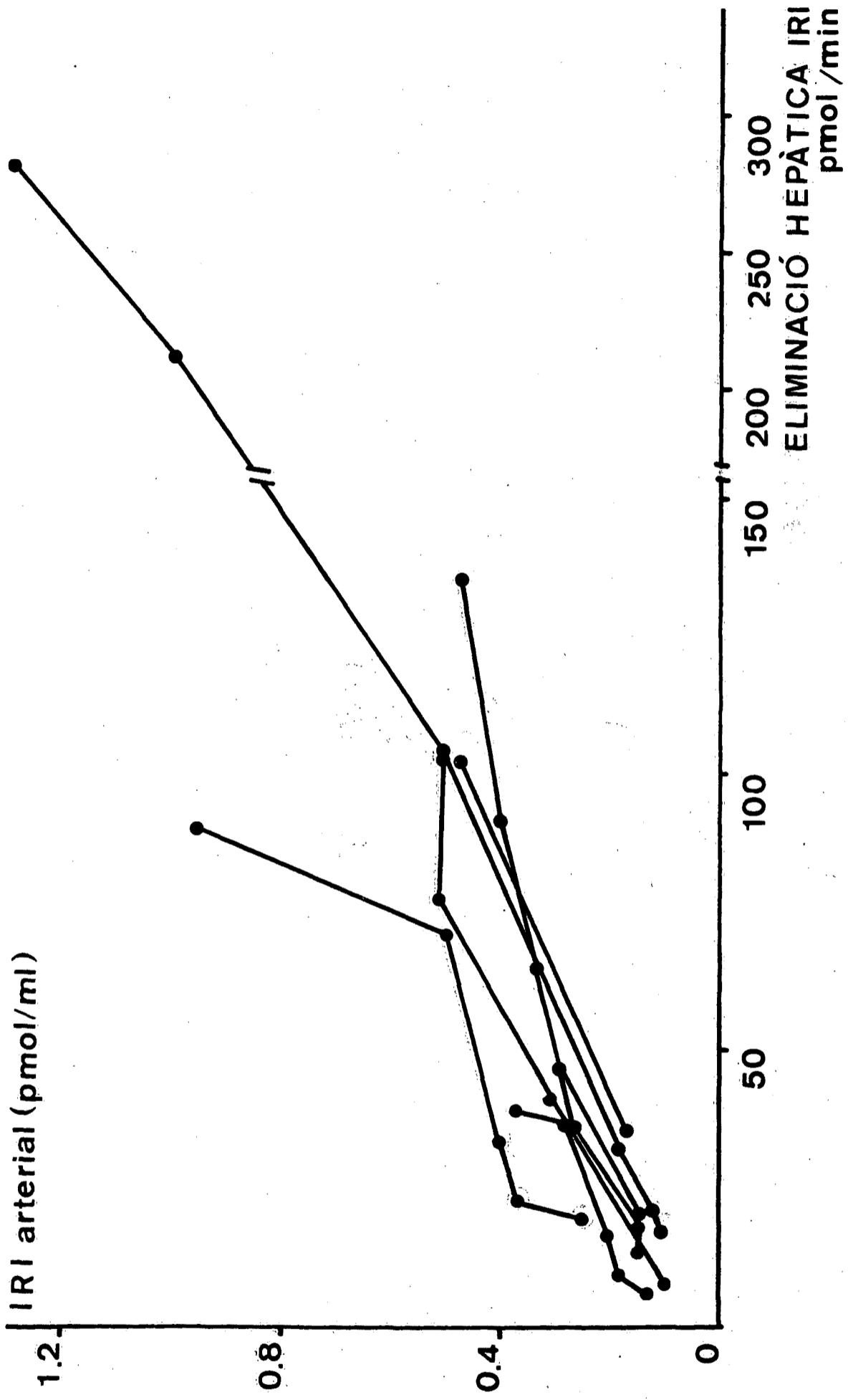


Fig 12

Fig 13



dificar la seva freqüència d'eliminació d'insulina en relació a la insulina que li arriba (recordi's, grup II, amb derivació quirúrgica porto-sistèmica) es dona fins i tot a concentracions elevades d'insulina.

No varem observar que existís una significativa extracció de Pèptid-C (Figura 14).

Evaluació del paper de les derivacions porto-sistèmiques.

La contribució de les derivacions porto-sistèmiques a l'hiperinsulinisme de la cirrosi hepàtica s'ha evaluat per la mesura dels nivells d'insulina en mostres simultànies de vena hepàtica i de sang arterial (veure mètode, pagina 121). No hi ha diferències significatives entre les concentracions d'insulina a la vena hepàtica entre els controls i els cirròtics, tinguin o no tinguin una derivació quirúrgica porto-sistèmica. (Figura 15). Cal remarcar però que mentre al grup control els nivells d'insulina a vena hepàtica són molt superiors a la concentració d'insulina a sang arterial, als pacients amb cirrosi hepàtica tinguessin o no tinguessin derivació quirúrgica porto-sistèmica els nivells d'insulina a vena hepàtica són inferiors als de la arteria perifèrica (Figura 15). A més a més, la relació Insulina arterial/Insulina a vena hepàtica era significativament diferent entre el grup de pacients control i el de cirròtics. (Figura 18).

Aquests resultats concorden amb l'hipòtesi de treball, ja esmentada (Pagina 127, i demostren la contribució de les derivacions porto-sistèmiques a l'hiperinsulinisme de la cirrosi.

L'anterior resultat és reforçat, per l'observació d'una correlació directa entre la diferència establerta entre

Fig14

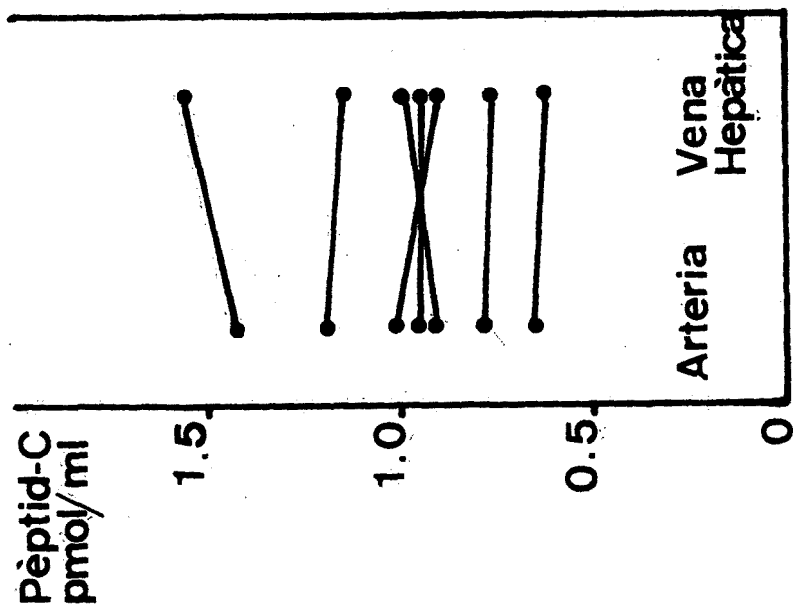
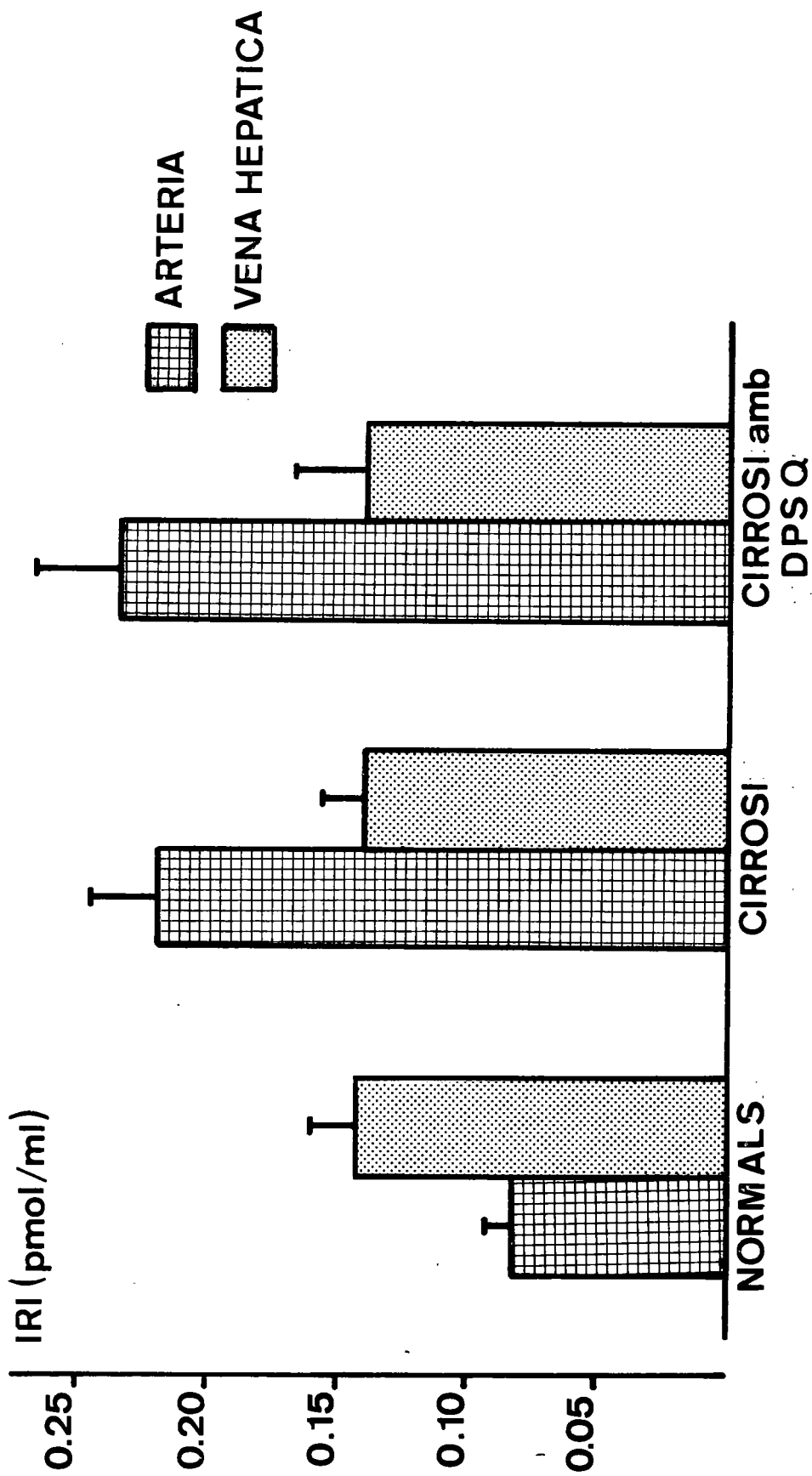


Fig15



VALORS BASALS INSULINEMIA i PEPTID-C

NORMALS

	IRI pmol/ml		Peptid-C pmol/ml.		Peptid-C/IRI		IRI
	Arteria	Vena Hep.	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena Hep.	
A.G.	0.017	0.031	0.258	0.198	15.18	6.39	0.55
M.G.	0.061	0.100	0.264	0.662	4.33	6.62	0.61
F.V.	0.086	0.166	0.602	0.837	7.00	5.04	0.52
A.B.	0.099	0.103	1.069	1.151	10.80	11.17	0.96
.M.	0.051	0.127	0.963	1.420	18.88	11.18	0.40
F.G.	0.141	0.243	1.453	1.900	10.30	7.82	0.58
P.B.	0.035	0.120	0.724	1.089	20.68	9.07	0.29
V.H.	0.034	0.061	0.711	0.863	20.91	14.15	0.56
A.S.	0.110	0.293	1.426	1.734	12.96	5.92	0.37
J.M.	0.139	0.237	1.456	1.847	10.47	7.79	0.59
A.G.	0.125	0.210	1.128	1.400	9.02	6.67	0.59
R.Q.	0.049	0.068	0.569	0.731	11.61	10.75	0.72
T.M.	0.115	0.172	0.946	1.429	8.23	8.31	0.67
A.T.	0.082	0.086	0.602	0.678	7.34	7.88	0.95
P.M.	0.068	0.141	1.426	1.492	20.96	10.58	0.48
S.G.	0.124	0.133	0.956	1.019	5.57	7.66	0.93
Mitjana	0.083	0.143	0.909	1.118	12.14	8.56	0.61
Error Standart	+ 0.009	+ 0.018	+ 0.100	+ 0.135	+ 1.40	+ 0.60	+ 0.53

Taula 18

nivells d'insulina a sang arterial i a vena hepàtica, i el gradient de pressió hepàtica, utilitzat com a mesura de la severitat de l'hipertensió portal (Figura**16**).

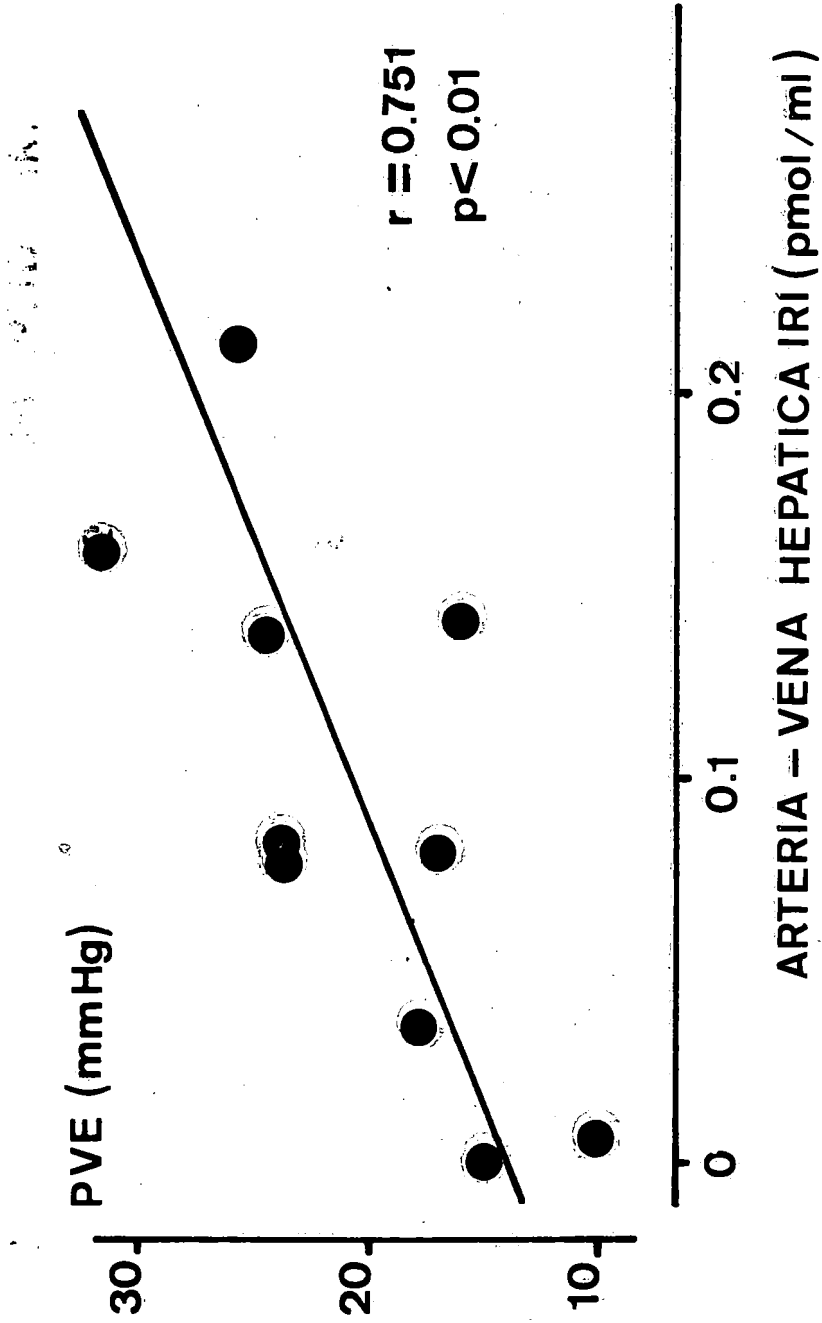
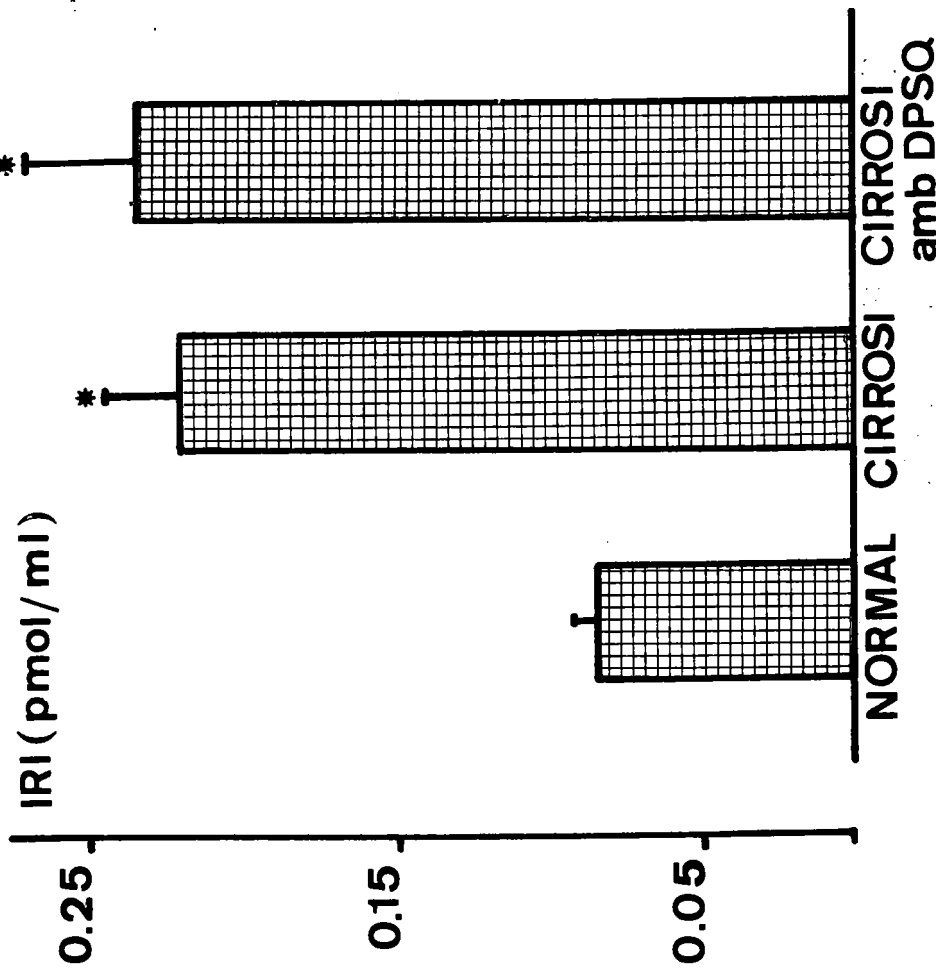
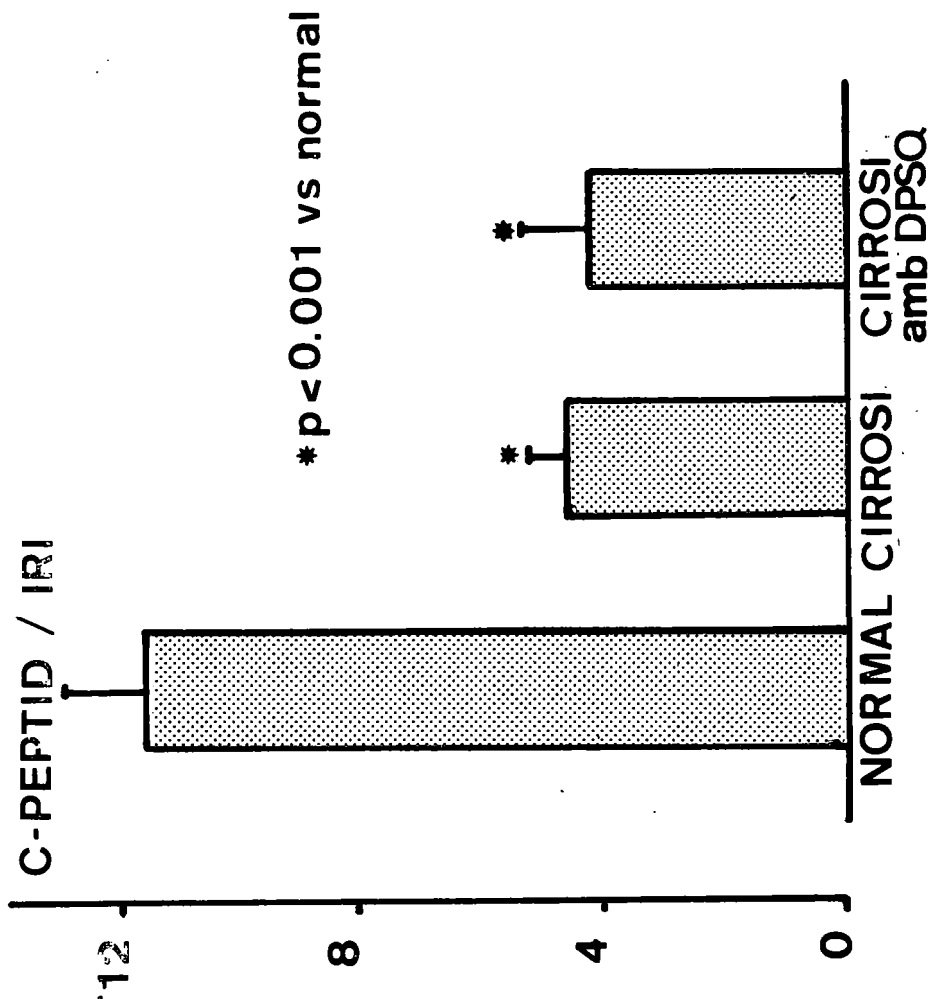
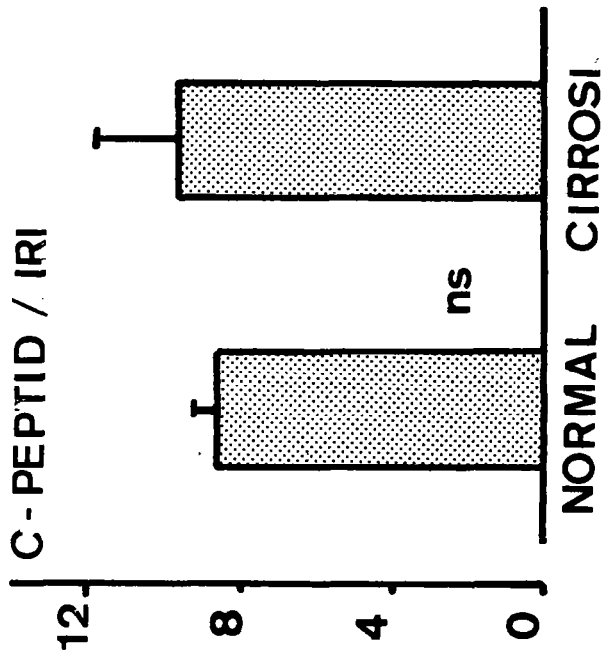


Fig 16





VALORS BASALS INSULINEMIA I PEPTID-C

CIRROSI	IRI pmol/ml		Peptid-C pmol/ml.		Peptid-C/IRI		IRI Arteria/ Vena Hep.
	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena hep.	
F.H.	0.322	0.221	1.764	1.602	5.48	7.25	1.46
J.R.	0.217	0.130	1.919	2.085	8.84	16.04	1.81
E.C.	0.118	0.041	0.294	0.268	2.49	6.54	2.88
N.P.	0.241	0.161	1.426	1.522	5.92	9.45	1.50
G.A.	0.130	0.120	1.234	1.486	9.49	12.38	1.08
F.A.	0.170	0.080	0.625	1.098	3.68	13.73	2.12
A.V.	0.163	0.127	1.161	1.095	7.12	8.62	1.28
J.G.	0.342	0.130	2.499	2.320	7.31	17.85	2.63
M.C.	0.340	0.183	2.277	2.201	6.70	12.03	1.86
F.R.	0.154	0.152	0.827	1.061	5.37	6.98	1.01
J.B.	0.263	0.127	1.678	0.834	6.38	6.57	2.07
F.P.	0.141	0.139	0.847	0.840	6.01	6.04	1.01
S.C.	0.243	0.163	0.936	0.860	3.85	5.28	1.49
J.II.	0.084	0.078	0.781	0.331	9.30	4.24	1.08
R.M.	0.155	-	0.523	-	3.37	-	-
Mitjana	0.205	0.132	1.252	1.257	6.091	9.50	1.66
Error stand.	+0.021	+ 0.012	+0.169	+0.172	+0.55	1.13	+0.16

p < 0.001

VS NORMALS

VALORS INSULINEMIA CIRROTICS DERIVACIO PORTO- SISTEMICA (pmol/ml)

	B A S A L		E S T I M U L		FRENACIO (1ra.extracció)		FRENACIO (2°extracció)		RECUPERACIO	
	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena hep.	Arteria	Vena hep.
J.C.	0.290	0.203	0.406	0.234	0.146	0.120	0.146	0.104	0.482	0.254
T.F.	0.390	0.116	0.523	0.161	0.100	0.063			0.509	0.141
D.G.	0.204	0.129	0.283	0.112	0.124	0.090	0.182	0.124	0.378	0.221
T.V.	0.413	0.289	0.502	0.247	0.254	0.179	0.387	0.296	0.964	0.647
A.M.	0.105	0.048	1.005	0.326	0.117	0.051	0.186	0.085	1.308	0.640
J.G.	0.121	0.041	-	-	-	-	-	-	-	-
J.CL.	0.268	0.146	0.331	0.181	0.141	0.134	0.134	0.060	0.495	0.337
A.J.	0.166	0.072	0.484	0.193	-	-	-	-	-	-
MITJANA	0.234	0.130	0.504	0.229	0.147	0.095	0.207	0.133	0.787	0.504
ERROR ST.	0.037	0.028	0.089	0.030	0.022	0.019	0.046	0.041	0.159	0.149

VALORS PEPTID-C CIRROTICS DERIVACIO PORTO SISTEMICA

BASAL ESTIMUL

	Arteria	Vena Hep.	Porta	Arteria	Vena hep.	Porta
F.G.	1.046	1.565	1.866	2.313	1.582	2.026
T.F.	0.791	0.857	-	1.171	1.244	1.506
D.G.	0.572	0.625	0.791	0.844	0.619	0.665
T.V.	0.923	0.926	0.741	0.973	0.890	0.847
Cl.M.	0.951	0.983	1.102	1.665	1.784	2.105
J.G.	0.638	0.777	0.612	5.835	6.570	5.405
Mitjana	0.820	0.955	1.022	2.133	2.114	2.092
Error Standart	0.070	0.130	0.255	0.772	0.908	0.704

FRENACIO(1ra.extracció) FRENACIO (2°extracció) RECUPERACIO

	Arteria	Vena hep.	Porta	Arteria	Vena hep.	Porta	Arteria	Vena hep.	Porta
F.G.	1.685	-	1.353	2.631	2.231	2.072	2.254	1.459	1.436
J.F.	0.718	0.331	0.599	-	-	-	1.698	1.665	1.873
D.G.	0.397	0.446	0.400	0.178	0.476	0.695	0.910	1.039	1.112
T.V.	0.734	0.754	0.769	0.870	0.794	0.744	1.304	1.406	1.039
Cl.M.	1.653	0.959	0.817	0.681	0.767	0.824	2.012	-	1.843
J.G.	-	-	-	-	-	-	3.932	3.320	3.095
Mitjana	0.837	0.622	0.786	1.090	1.067	1.083	2.018	1.777	1.733
Error Standart	0.218	0.143	0.159	0.534	0.394	0.330	0.430	0.398	0.307

ADDENDA: VALIDACIO DE LA MESURA DE LA I.R.I.

La determinació de la insulina per radio immunoassaig (IRI) pot, a vegades, ésser una mesura no del tot precisa de la insulina circulant. Sabem que l'antisèrum enfront de la insulina es capaç de reconèixer quantitats importants de proinsulina. Aquesta capacitat es menyspreable (inferior a un 10% del total IRI), en condicions en les quals la secreció de proinsulina es normal, pero pot ésser un factor d'error considerable quan existeix un augment d'aquesta secreció, es a dir en situació d'hiper-proinsulinèmia.

Amb l'objectiu d'evaluar la possibilitat que una part quantiosa de la IRI mesurada fos proinsulina és separà - per cromatografia de columna (Biogel P-30) mostres de sèrum de 4 pacients cirròtics a diversos territoris, segons les condicions metodològiques expressades a la pàgina **76** . Com pot observar-se a la figura **17** la proporció relativa de proinsulina dels cirròtics mesurada per la IRI es similar als normals , sigui quin sigui el territori on hem obtingut la mostra.

Aquesta troballa valida el mètode utilitzat per nosaltres al mesurar la insulina circulant dels pacients cirròtics a vena hepàtica, a sang arterial i a vena porta, com a IRI en el sentit de que el pèptid que mesurem es fonamentalment insulina, i que les variacions observades a diversos territoris són conseqüència de variacions dels nivells d'insulina i no pas de la proinsulina circulant.

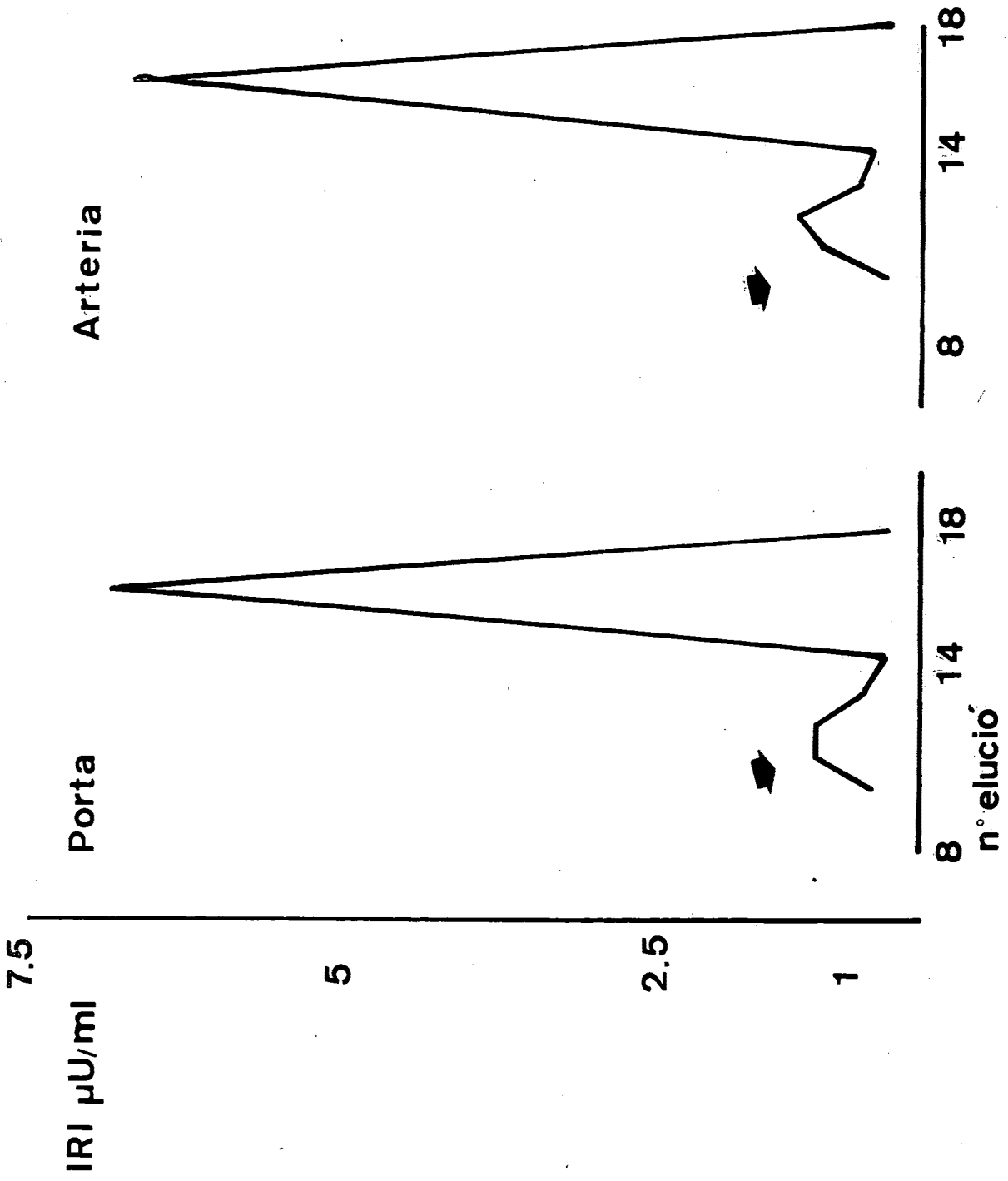


Fig 17

DISCUSSIO

Estudis recents han demostrat que l'hiperinsulinisme de la cirrosi hepàtica no és conseqüència d'un increment de la secreció beta pancreàtica.^{201,214} En el ben entès, que la insulina segregada per la cèl.lula beta pancreàtica i lliurada a vena pancreàtic-duodenal i posteriorment a la vena porta, és metabolitzada en part pel fetge abans de passar a la circulació sistèmica⁷, l'hiperinsulinisme observat a la cirrosi hepàtica, pot ésser degut tan a una deficient extracció hepàtica d'insulina com a les derivacions sistèmiques de la sang portal, i fins ara, s'ha d'admetre que existeixen estudis que defensen ambdues hipòtesis.

Els autors que han suggerit que les derivacions porto-sistèmiques són les responsables de l'hiperinsulinisme als cirròtics, es basen en la troballa d'un augment, als nivells circulants, d'insulina després de la construcció quirúrgica d'una derivació porto-caval.²²⁵ Així, de tota manera, no ha estat una troballa universal, encara que la dificultat d'observar un increment dels nivells circulants perifèrics d'insulina als cirròtics operats tampoc nega la possibilitat que les derivacions de sang portal al terreny sistèmic siguin les responsables de l'hiperinsulinisme a la cirrosi ja que cal recordar que els cirròtics sense derivació quirúrgica porto-caval però amb hipertensió portal, habitualment ja tenen derivacions espontànies porto-cava, que poden evitar que fins un 60 a un 80 per cent de la sang portal passi pel fetge.^{221,222} A més a més, cal afegir, que Sherwin²¹³ i col. han observat que els pacients cirròtics amb derivació porto-cava quirúrgica terme-terminal tenen nivells superiors d'insulina a sang perifèrica que els cirròtics amb graus espontànies i

variables de derivació de la sang portal al territori sistèmic, i aquests, nivells superiors, als observats en els cirròtics sense derivació porto-sistèmica.

D'altra banda diversos autors suggereixen la possibilitat que l'hiperinsulinisme de la cirrosi sigui el resultat de la lesió hepatocelular i per tant de l'alteració del metabolisme hepàtic de la insulina^{215,96}. Aquesta hipòtesi la fonamenten en la troballa d'una disminució important de la relació molar pèptid-C/insulina a sang perifèrica dels pacients amb cirrosi hepàtica, que fa suposar una secreció normal d'insulina amb reducció del seu metabolisme hepàtic, però aquesta disminució no és capaç d'aclarir la naturalesa de l'alteració metabòlica, donat, que tant l'afectació hepatocelular com les derivacions portosistèmiques en poden ésser responsables.

El present estudi, va ésser dissenyat per a elucidar aquestes discrepàncies. El metabolisme hepàtic de la insulina s'ha estudiat directament en pacients cirròtics amb derivacions quirúrgiques terme-terminal. Aquest grup de pacients cirròtics fou escollit per raons metodològiques, amb l'objecte de significar l'estudi del metabolisme hepàtic de la insulina, per al seu estudi. En cirròtics sense un 100% de derivació de la sang portal, es precisa el cateterisme de la vena porta que permeti la mesura de la concentració d'insulina així com del fluxe portal, i per tant poder calcular, l'extracció i la depuració de la insulina pel fetge. Això no es possible o difícilment possible en pacients humans. En canvi els cirròtics, amb derivació quirúrgica porto-sistèmica terme-terminal, presenten la peculiaritat que tota la insulina que arriba al fetge ho fa per l'arteria hepàtica, i així la diferència entre els nivells d'insulina

entre arteria i vena, ens poden permetre de calcular l'extracció hepàtica de la insulina, i si a més a més podem conèixer el fluxe hepàtic sabrem la depuració i la freqüència d'eliminació de la insulina pel fetge cirròtic.

L'extracció hepàtica d'insulina observada als pacients cirròtics (47.6 %) és dins la normalitat referida a humans i a animals d'experimentació, i és similar a la descrita per Sherwin²¹³ (51%) en una serie similar de pacients cirròtics. L'extracció hepàtica d'insulina es manté constant tan quan estimulem la secreció d'insulina com quan la frenem.

En canvi la freqüència d'eliminació hepàtica d'insulina correlaciona directament a la quantitat d'insulina que arriba al fetge.

Aquestes observacions, és a dir, una extracció hepàtica normal d'insulina als cirròtics, i una freqüència d'eliminació hepàtica d'insulina no saturable, fan més sòlida l'afirmació que el metabolisme hepàtic de la insulina no és alterat en els pacients cirròtics.

Quan hem mesurat el metabolisme hepàtic de la insulina, indirectament, valent-se de la relació molar pèptid-C/insulina a sang de vena hepàtica, en el ben entés que el Pèptid-C no és metabolitzat ni pel fetge normal ni pel cirròtic, i que les variacions que poguessin existir en el cocient a vena hepàtica han d'ésser degudes a una alteració del metabolisme hepàtic de la insulina sense interferència de les possibles derivacions portosistèmiques, hem de dir que no hem observat diferències entre els valors dels cirròtics i dels normals, contràriament a les diferències observades i referides a sang perifèrica, la qual cosa també suggereix que el metabolisme hepàtic de la insulina és normal a la cirrosi.

La contribució de les derivacions porto-sistèmiques a l'increment dels nivells perifèrics d'insulina dels cirròtics l'hem estudiat mesurant l'IRI a vena hepàtica i a arteria pulmonar, que considerem com a sang perifèrica.

Si admetem la nostra hipòtesi, en el sentit que la insulina segregada per la cèl.lula beta pancreàtica és parcialment metabolitzada pel fetge abans de passar a la circulació sistèmica, en pacients normals els nivells d'insulina a vena hepàtica han d'ésser superiors als de sang perifèrica (Figura 11), i al contrari, nivells d'insulina inferiors a vena hepàtica que a sang perifèrica només poden ésser deguts a la derivació de sang portal a la circulació sistèmica.

D'acord amb aquesta hipòtesi, en els pacients normals la concentració d'insulina a vena hepàtica era superior a l'observada simultàniament a sang perifèrica, la qual cosa era d'esperar donat que tot el fluxe portal dels cirròtics amb aquest tipus de derivació quirúrgica es adreçat a la circulació sistèmica i en conseqüència tota la insulina segregada pel pàncreas es derivada a la circulació sistèmica, saltant-se el pas del fetge. Una troballa, però, del present estudi, és l'observació que els pacients cirròtics sense derivació quirúrgica tenen nivells d'insulina a vena hepàtica inferiors a arteria perifèrica, similar a allò observat als cirròtics amb derivació quirúrgica. Aquesta troballa només pot ésser el resultat de la derivació, en aquets pacients, de fluxe portal a la circulació sistèmica o a l'existència de territoris extra esplànquics de secreció de la insulina, afirmació aquesta última mai demostrada.

Podem, doncs, afirmar que el nostre estudi demostra que la troballa d'una relació molar Peptid-C/Insulina disminuïda a la sang perifèrica dels pacients cirròtics és deguda a les derivacions porto-sistèmiques i no pas a les lesions hepatocelulars.

Per tant, podem dir que les derivacions porto sistèmiques són les responsables de l'hiperinsulinisme observat a la cirrosi hepàtica. Aquesta suggerència concorda amb un treball previ que afirmava que els cirròtics serien hiperinsulinèmics quan presntessin derivacions porto-sistèmiques fossin quirúrgiques o espontànies.^{140,213}

Cal esmentar, que a més a més el fet que hagin trobat una correlació directa entre el gradient de pressió venosa hepàtica i la diferència entre els nivells d'insulina entre arteria perifèrica menys vena hepàtica, reforça el paper fonamental que les derivacions porto-sistèmiques juguen com a responsables de l'hiperinsulinisme a la cirrosi hepàtica.

En aquest estudi només hem incluit cirròtics hiperinsulinèmics amb evidència de derivacions porto-sistèmiques (sangrat per vèrtes esofàgiques i augment de pressió portal). D'acord amb els nostres resultats, caldria esperar, en absència d'hiperinsulinisme, que els nivells d'insulina a la cirrosi fossin més alts a vena hepàtica que a sang perifèrica com succeix als pacients normals. Aixó pot ésser observat al treball de Pelkonen i alt. on s'estudien cirròtics sense derivació porto-sistèmica i amb nivells d'insulina normals.

Aquestes conclusions, estan amb desacord amb els treballs realitzats per Smith-Laing⁹⁶ i alt. i per Iwasaki²¹⁵ i alt. on es suggereix que la lesió hepatocelular és més important, que les derivacions portosistèmiques, com a mecanisme responsable de l'hiperinsulinisme a la cirrosi.

En el primer d'aquests treballs⁹⁶ s'estudien pacients amb trombosi de la vena porta la qual cosa comporta hipertensió portal. Observen, en aquests pacients, nivells d'insulina i relació molar Peptid-C/Insulina similar als normals a sang perifè-

rica, sempre que no hi hagi afectació hepatocelular, és a dir nivells de GOT i GPT normals.

Aquest model però, no és comparable al de la cirrosi amb hiperfunció portal. I no ho és, perquè el bloqueig de la trombosi ho pot ésser a diferents blocs del recorregut de la vena porta, en el sentit que el fet d'una trombosi de la vena porta, no presuposa que la secreció de la vena pancreàtica-duodenal no dreni directament a través d'un bocí de porta intacte a fetge. A més, és demostrat, que les derivacions portals que s'estableixen en aquesta entitat són més hepatopetals que hepatofugues ^{221,222} i per tant drenen directament, com la porta a fetge.

Tanmateix, els nivells elevats de transaminases poden ésser més duguets als possibles casos de trombosi portal amb derivació hepatofugal amb reducció del fluxe portal que a possible lesió hepatocelular previa, i en aquest cas més que refusar les nostres tesis, podrien des de la nostra interpretació ²²³ ésser coincidents.

²¹⁵
Pel que fa al segon treball, aquest es feu amb pacients japonesos afectes d'hipertensió portal idiopàtica. En aquests pacients, on les derivacions si que son hepatofugals, s'observa un patró de normoinsulinemia amb relació molar PèptideC/Insulina també normal a sang perifèrica. Però cal, precisar, que aquestes derivacions s'acompanyen d'augment del fluxe esplènic, ²²⁴ amb hiperesplenisme i per tan tampoc són un model similar al de la cirrosi hepàtica i com a tal model indirecte no ens permet extrapolar les observacions, en ell trobades, a la cirrosi.

En resum, aquest estudi mostra que l'hiperinsulinisme a la cirrosi és el resultat de la derivació de la sang de la vena pancreaticoduodenal a la circulació sistèmica. Així es pot

suggerir que l'hiperinsulinisme a la cirrosi es més conseqüència d'una alteració circulatoria, que no pas d'una lesió hepatocelular.

OBJECTIU III

Investigar si l'hiperinsulinemia determina insulin-resistència a la cirrosi i evaluar el paper dels possibles mecanismes responsables.

INTRODUCCIÓ.

Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten intolerància hidrocarbonada i hiper-insulinèmia la qual cosa suggereix la possibilitat d'insulin-resistència.⁹¹ Diferents autors han suposat que els possibles mecanismes responsables d'aquesta insulin-resistència podrien ésser l'elevació de les hormones de contraregulació entre elles el glucagó i la hormona de la creixença, que s'han descrit elevades a la cirrosi hepàtica.^{140,141} D'altres ho han atribuït a una alteració de l'insulin receptor, o bé a una disminució de la seva afinitat. I més recentment s'ha questionat la responsabilitat del receptor,¹⁵⁰ i en canvi s'hi ha implicat el postreceptor.²²⁷ Aquesta alteració del postreceptor podria localitzar-se a nivell de qualsevol dels cicles que la internalització desencadena.

Aquesta insulin-resistència pot observar-se en algun o en tots els teixits insulin-sensibles del cos - fetge, teixit muscular i adipòs - i pot manifestar-se com una incapacitat de la insulina de metabolitzar la glucosa. Demostrar la resistència global a l'insulina en els pacients cirròtics pot ésser dificultós donat que caldria mesurar el metabolisme de la glucosa. Una possibilitat fora estudiar aquesta resistència en condicions de bloqueig de la producció hepàtica de glucosa.^{152,231} Aleshores el metabolisme de la glucosa només estaria relacionat amb la glucosa exògena administrada.

La infusió simultànea de somatostatina amb insulina i glucosa permet alhora que frenar la secreció endògena pancreàtica de glucagó i insulina, aconseguir nivells constants i sostinguts d'insulinèmia.¹⁵² La mesura simultànea dels nivells de glucèmia pot ésser un index directe molt fiable de la capaci-

tat de la insulina per a modificar el metabolisme de la glucosa.¹²⁷

PACIENTS i MÈTODE.

S'han estudiat 11 pacients, 6 d'ells amb cirrosi hepàtica i 5 voluntaris sans d'edat i sexe similar.

Els pacients cirròtics estudiats, presentaven els criteris clínics i biològics de la Taula 2 i no ingerien medicació de cap tipus des d'un mes abans de l'estudi.

Tots els pacients, efectuaren, tres dies previs a l'estudi, una dieta de 2.400 calories, amb un contingut d'hidrat de carboni superior a 300 gr/dia.

A tots ells, després d'un dejú nocturn de 12 hores, se'ls cateteritzà una vena cubital (Drum-Cartridge Catheter, Abbot Laboratories) amb l'objecte de tenir permeable una via per infusió, i es canalitzà la vena cubital contralateral (Alofix 70- 22G-Palex) que es mantingué permeable amb serum fisiològic per a obtenció de mostres sanguínees.

Després d'un període de 60 minuts de control, a tots se'ls administrà, mitjançant un perfusor d'alta precisió Braun, simultàneament, una infusió constant d'insulina porcina (0.77 mU/kg/min.) Novo-Actrapid i glucosa (6 mgr/kg/min) durant 120 minuts, mentre la secreció endògena pancreàtica d'insulina i glucagó se'ls bloquejà amb una infusió continua de somatostatina (6 µg/kg/min.) (Somatostatina-Kabi/DqW 44).

S'obtingueren mostres basals per a determinació de: Glucèmia, Glucagó (IRG), Insulina (IRI), Peptid-C (CPR) la hormona de la creixença, anticossos anti-insulina i insulín-receptors a hematies. Així mateix s'obtingueren mostres cada 15 minuts després d'iniciada la perfusió simultànea per a de-

terminació de glucosa, glucagó, insulina i Pèptid-C durant els 120 minuts.

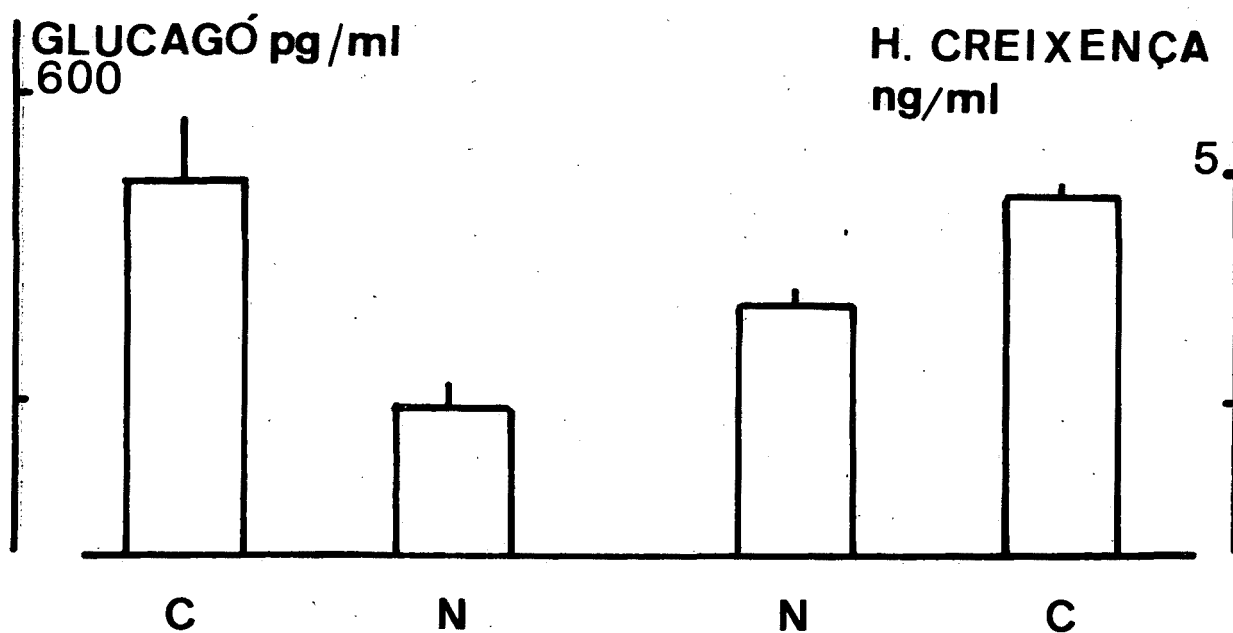
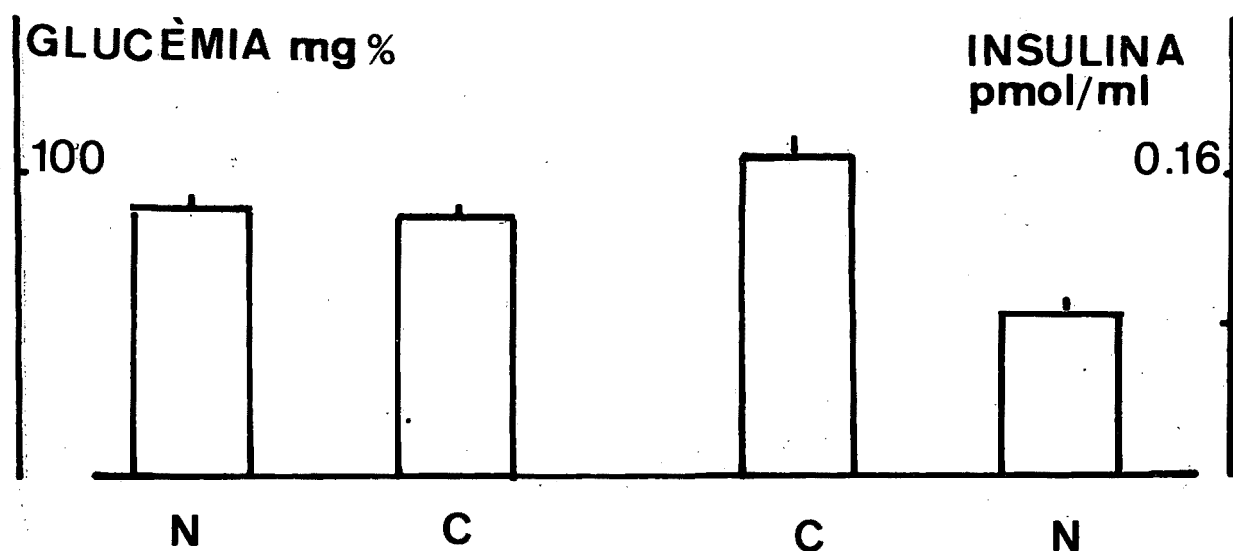
Els tubs per a recollida de mostres estigueren amb gel i s'hi mantingueren durant els 120 minuts de l'estudi. Un pic finalitzat aquest, les aliquotes per a insulina, Pèptid-C, Glucagó, la hormona de la creixença i anticossos insulina foren centrifugades a 4°C, separat el plasma, congelat ràpidament amb neu carbònica i conservat a -20°C fins el moment de l'assaig.

Les aliquotes per a glucèmia foren centrifugades i processades immediatament un pic finalitzat l'estudi. L'aliquota per a receptor conservada a 4°C fou processada el mateix dia de l'estudi,

La insulina, el Pèptid-C, el Glucagó, la hormona de la creixença, els anticossos insulina foren determinats per radio-immunoassaig. La glucèmia ho fou per un mètode enzimàtic. Els receptors-insulina foren mesurats en hematies per radio-immunoassaig per la tècnica de Gambir.

RESULTATS

En condicions basals els valors de glucèmia en els cirròtics son similars als dels voluntaris sans ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, mgr/ml) (83.83 ± 2.38 v.s. 79.20 ± 1.65) Fig. 19. En canvi la insulinèmia fou significativament alta en el grup de cirròtics respecte al de voluntaris sans ($\bar{X} \pm \text{SEM}$, pmols/ml) (10.16 ± 0.01 v.s. 0.08 ± 0.01 , $p < 0.01$) Figura 19. Tanmateix, els valors basals de glucagó i hormona de la creixença foren més elevats en els cirròtics versus els normals. (Figura 19). Els nivells de glucagó i hormona de la creixença son coincidents amb els observats en una serie més amplia de cirròtics estudiats.



VALORS BASALS

FIG19

Durant la perfusió els nivells de Pèptid de co-nexió, glucagó i hormona de la creixença (Taula 19,20 varen disminuir progressivament, i pot dir-se que al 90 minuts els nivells de Pèptid-C foren indetectables (Figura 20), demostrant un bloqueig efectiu de la secreció endògena de la cel.lula beta pancreàtica. A més a més, als 90 minuts, s'aconseguien nivells circulants constants d'insulina, similars entre ambdòs grups de pacients (cirròtics i voluntaris sans) (Figura 21). Malgrat això, en aquests moments, els nivells de glucèmia circulant (Figura 21) foren significativament més elevats en els cirròtics que en els normals, la qual cosa es un argument per a suggerir existència d'insulin-resistència perifèrica a la cirrosi.

També, varem observar que els nivells de glucèmia als 90 minuts en els cirròtics correlacionaven directament amb els nivells basals d'insulina ($r = 0.88$, $p < 0.01$) la qual cosa demostra una inter-relació entre el grau d'hiperinsulinisme i el grau d'insulin-resistència expressat pel nivell de glucèmia. Els anticossos insulina foren indetectables en ambdòs grups de pacients. Tampoc a la mostra d'orina recollida després de la prova s'observaren quantitats apreciables de glucosa a l'orina.

El lligat màxim de la insulina als receptors dels hematies per a concentracions d'Insulina I-125 de 1.6 ng/ml. fou de 9.3 ± 0.5 % ($M \pm SEM$) per als cirròtics i de 10.31 ± 0.71 % ($M \pm SEM$) per als normals diferències no significatives, així com les de la constant d'afinitat (K_a) que fou de 1.42 ± 0.05 ($M \pm SEM$, nM) per als cirròtics i 1.52 ± 0.13 ($M \pm SEM$, nM) per als normals

TEST INSULIN-RESISTÈNCIA - GLUCAGÓ pg/ml

CIRROSI

	BASAL	30"	30"	75"	90"	105"	120"
A.U.G.	720	440	560	420	410	420	430
J.P.B.	450	115	105	95	100	108	105
F.G.M.	820	450	440	430	430	430	410
J.M.G.	115	75	71	69	68	65	85
F.R.D.	580	440	470	400	400	400	380
A.B.G.	250	50	52	47	50	47	37

VOLUNTARIS SANS

M.L.L.	169	88	87	87	88	70	58
M.A.	160	170	74	60	60	64	96
P.M.	160	82	81	82	82	75	130
F.F.	300	76	86	94	94	78	150
E.F.	130	85	82	87	92	110	95

Taula 19

TEST D'INSULIN-RESISTÈNCIA - PÈPTID-C ng/ml.

CIRROSI

	BASAL	30'	60'	75'	90'	105'	120'
A.U.G.	1.55	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM	0.60
J.P.B.	1.53	0.32	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM
F.G.M.	1.53	0.33	0.24	<SM	<SM	<SM	<SM
J.M.G.	1.55	0.22	0.22	<SM	<SM	<SM	0.21
F.R.D.	0.84	0.25	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM
A.B.G.	0.29	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM	0.27

VOLUNTARIS SANS

M.LL.	0.58	0.39	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM
M.A.	0.27	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM
P.M.	0.15	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM
F.F.	0.76	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM
E.F.	0.23	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM	<SM

Taula 20

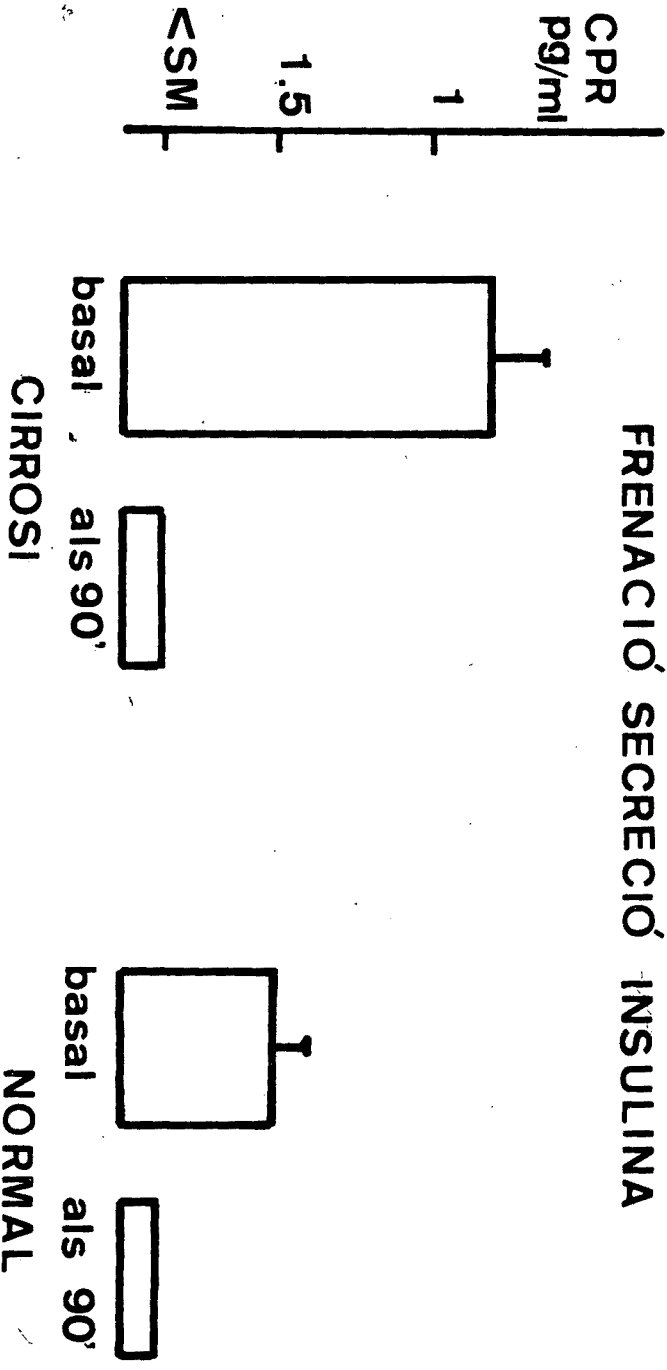
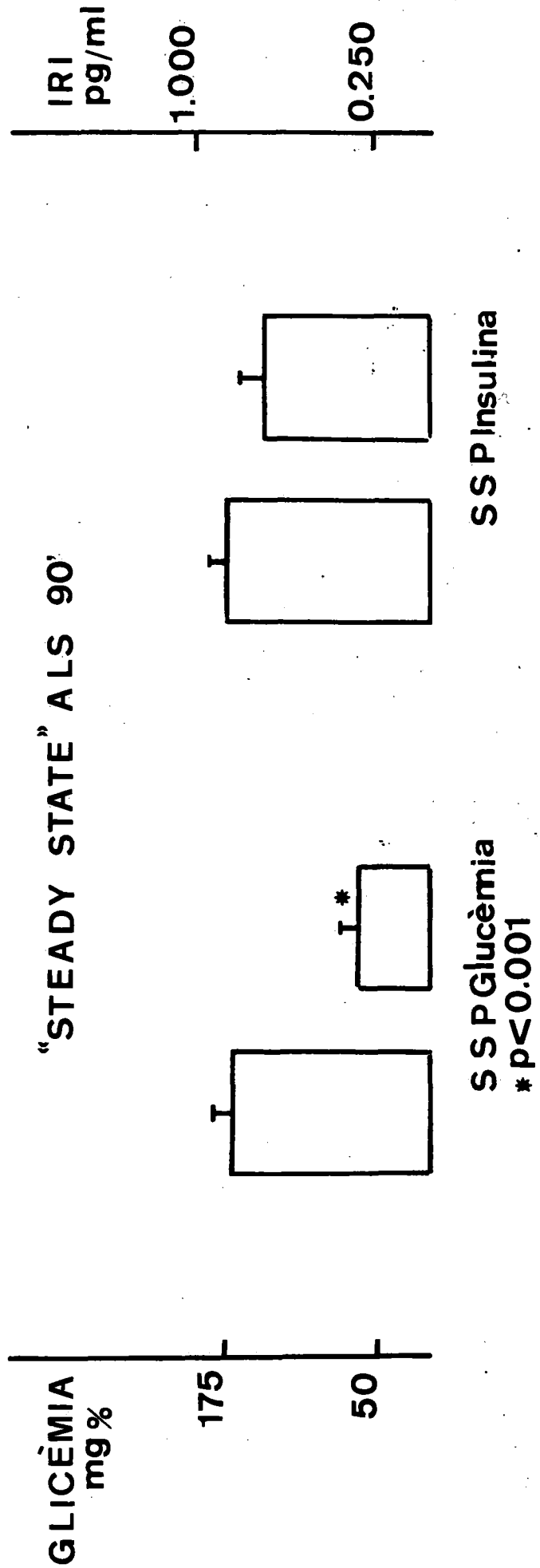
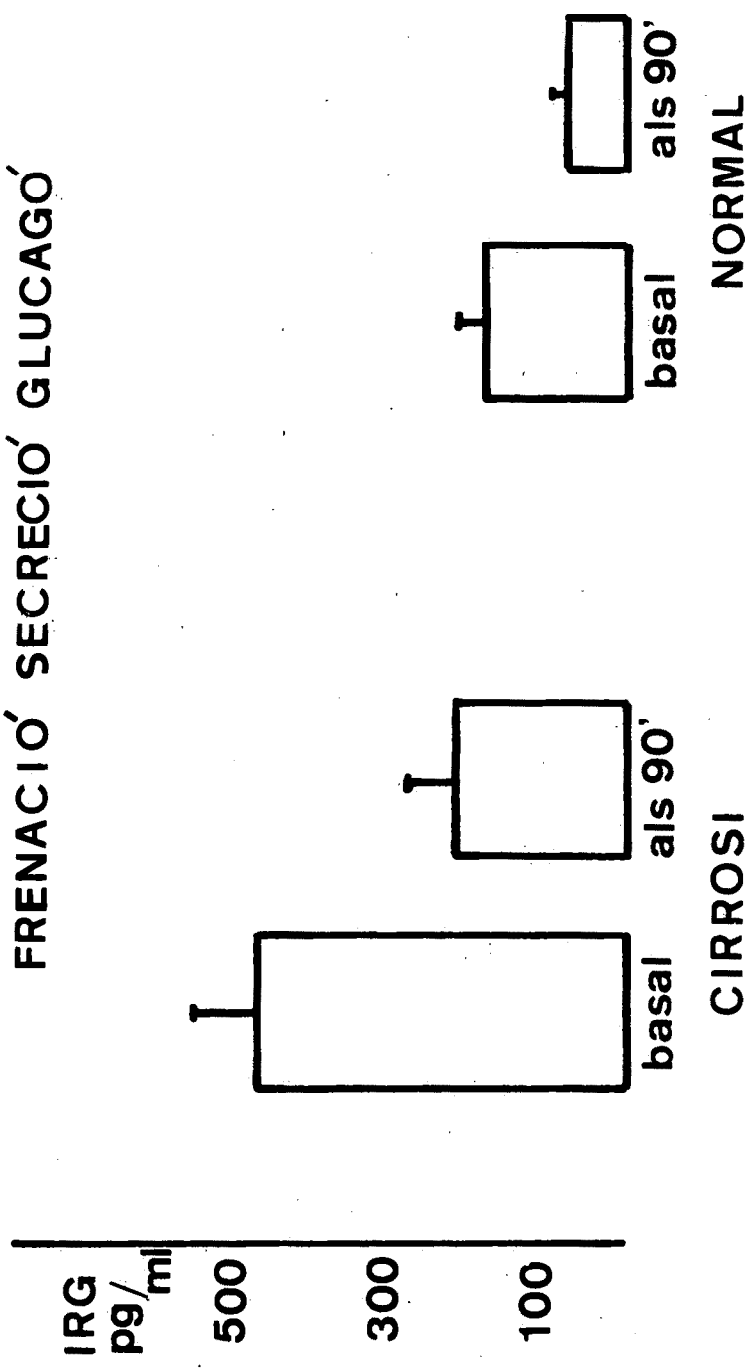


Fig 20

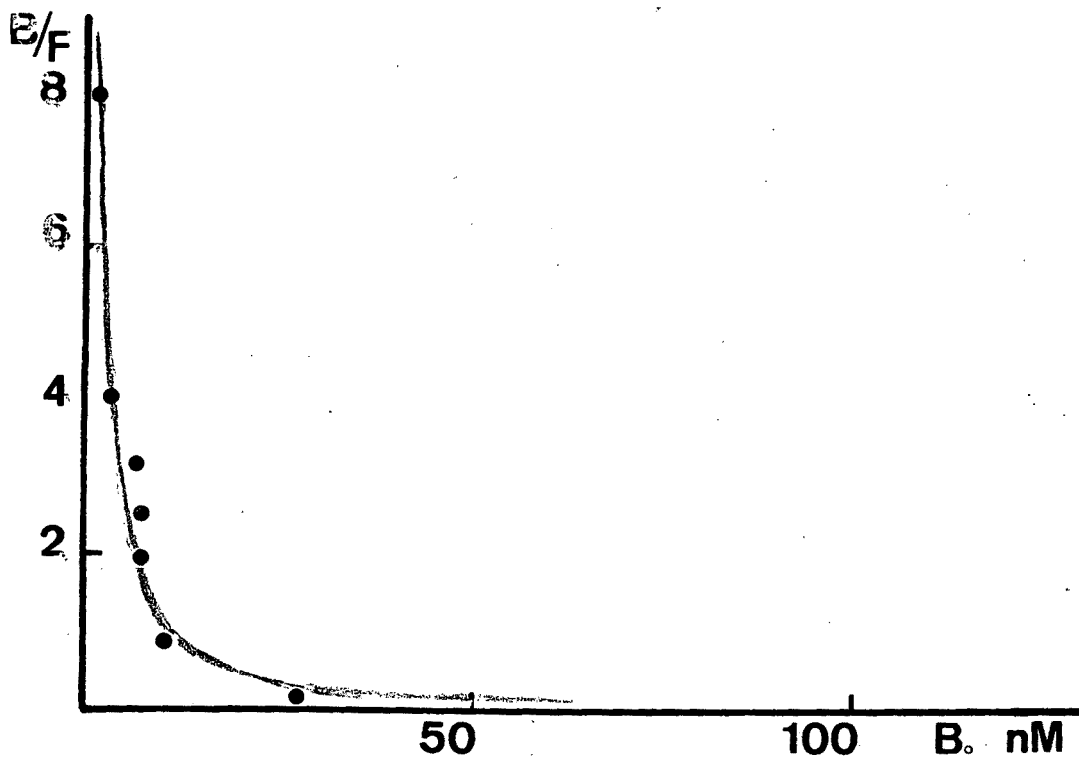
Fig 21



FRENACIO' SECRECIO' GLUCAGO'



Corba scatchard Receptors



1945

1946

1947

1948

1949

1950

1951

1952

1953

1954

1955

1956

1957

1958

1959

1960

1961

1962

1963

1964

1965

1966

1967

1968

1969

1970

1971

1972

1973

1974

1975

1976

1977

1978

1979

1980

1981

1982

1983

1984

1985

DISCUSSIÓ

Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten hiperinsulinisme e insulin-resistència si bé els mecanismes responsables d'aquesta darrera no han estat, encara, ben establerts.²¹² En el nostre estudi hem observat que els pacients cirròtics, malgrat tenir nivells basals d'insulina més elevats que els normals, presenten hiperglucèmia, la qual cosa ja mostra que el cirròtic es resistent a l'acció de la insulina sobre la glucosa.⁹¹

També s'ha descrit la possibilitat de que algunes hormones de contraregulació que tenen efecte hiperglucèmiat i que es troben elevades a la cirrosi com el glucagó i la hormona ~~lactat~~^{140,141} en siguin les responsables. En aquest estudi hem intentat evaluar la responsabilitat d'aquestes hormones.

La somatostatina es capaç de frenar la secreció d'insulina i de glucagó,^{180,228} sense les desavantatges d'altres substàncies.²³¹ Amb la infusió de somatostatina, hem observat una caiguda dels nivells de glucagó i pèptid-C tan als voluntaris sans com als cirròtics. En aquestes circumstàncies podem suposar un bloqueig efectiu tan de la secreció endògena d'insulina com de la de glucagó, i conseqüència d'aquesta última l'abolició de la producció hepàtica de glucosa.¹³⁸ Paralelament, als 90 minuts d'infusió simultànea amb glucosa e insulina, amb bloqueig de les hormones de contraregulació, éssent els nivells de glucèmia circulant expressió de la seva utilització perifèrica, i per tant, també, de l'eficàcia de la insulina. Es per aixó, que podem considerar que a nivells circulants d'insulina idèntics en ambdòs grups, les diferències significatives en els valors de la glu-

cèmia seran la manifestació d'una distinta eficàcia de la insulina, possiblement deguda a modificacions del receptor i/o del post-receptor, i en els nostres resultats els nivells considerablement superior de glucèmia dels cirròtics als 90 minuts, només poden ésser el mirall d'una resistència a la insulina tisular global. Evidentment, pot objectar-se que hem trobat al 90 minuts una frenació de glucagó, en xifres absolutes, inferior en el cirròtics que en els normals. Però els nivells observats no semblen tenir efecte sobre la producció hepàtica de glucosa i per tan modificar substancialment els resultats. D'altra banda la troballa de nivells indetectables d'anticossos insulina en el plasma dels malalts d'ambdòs grups de pacients, descarta la possibilitat de que aquests anticossos puguin fer inefectiva l'acció de la insulina.

Aquestes consideracions, ens poden fer suposar que el defecte de la insulina sobre el metabolisme de la glucosa és perifèric. Per aquesta raó, varen estudiar els receptors a la insulina dels hematies, on observarem que la capacitat màxima de lligat a la insulina era similar als cirròtics versus els normals, així com ho era l'afinitat del receptor per a la insulina. Això ens fa suposar que el receptor a la insulina no estaria afectat a la cirrosi. Cert que no es possible estudiar en els humans el receptor a la insulina del teixit hepàtic, teixit diana fonamental del metabolisme de la glucosa i en conseqüència teixit específic per a la insulina, però s'ha demostrat una bona correlació, en els animals, entre els insulín-receptors dels hematies i d'altres teixits.

Cal, doncs, esbossar altres hipòtesis, com la d'atribuir la insulín-resistència de la cirrosi a l'existència d'una alteració del post-receptor encara una capsula tancada o bé a d'altres substàncies que puguin tenir efecte antagonista de in-

ulina i que no siguin bloquejades per la somatostatina.

Tanmateix, la troballa d'una correlació directa entre nivells basals d'insulina i glucèmia als 90 minuts mostra com l'hiperinsulinisme condiciona el grau d'insulin-resistència, en el sentit que els cirròtics més hiperinsulinèmics seran els més insulin-resistents. Podria suposar-se que l'hiperinsulinisme del cirròtic, conseqüència de les derivacions de la sang portal al territori sistèmic desencadenaria diversos mecanismes d'adaptació del'organisme per a protegir-lo de l'hipoglucèmia, entre ells un augment de les hormones de contraregulació i modificacions a nivell del receptor o del postreceptor. En aquest sentit la insulin-resistència podria ésser un sistema de protecció enfront l'hiperinsulinisme, i per tant caldria considerar les alteracions hemodinàmiques de la cirrosi hepàtica com les autèntiques responsables de les modificacions metabòliques.

TEST d'INSULIN-RESISTENCIA - GLUCÈMIES mgr%

	BASAL	30'	60'	75'	90'	105'	120'
<u>CIRROSI</u>							
A.U.G.	102	192	233	256	276	261	269
J.P.B.	84	99	116	120	124	126	115
F.G.M.	82	110	115	126	135	127	126
J.M.G.	115	197	230	254	269	269	244
F.R.D.	84	145	176	180	196	215	220
A.B.G.	75	117	133	136	135	139	130
<u>VOLUNTARIS SANS</u>							
M.L.L.	78	80	50	44	42	44	42
M.A.	78	91	51	45	40	42	39
P.M.	85	110	115	106	101	97	97
F.F.	80	105	85	83	80	76	89
E.F.	75	85	87	84	73	75	58

TEST D'INSULIN-RESISTENCIA. INSULINÈMIES (pmol/ml)

CIRROSI

	BASAL	30'	60'	75'	90'	105'	120'
A.U.G.	0.173	0.778	0.773	0.557	0.631	0.605	0.620
J.P.B.	0.154	0.780	0.720	0.564	0.639	0.638	0.630
F.G.M.	0.136	0.735	0.748	0.572	0.648	0.646	0.652
J.M.C.	0.216	0.880	0.874	0.545	0.758	0.736	0.700
F.R.D.	0.165	0.751	0.762	0.437	0.601	0.610	0.386
A.B.G.	0.123	0.711	0.787	0.610	0.784	0.723	0.797

VOLUNTARIS SANS

M.L.L.	0.091	0.390	0.708	0.683	0.656	0.591	0.679
M.A.	0.063	0.782	0.812	0.772	0.766	0.773	0.837
P.M.	0.046	0.421	0.544	0.551	0.644	0.696	0.628
F.F.	0.134	0.362	0.636	0.599	0.693	0.701	0.685
E.F.	0.095	0.475	0.608	0.585	0.573	0.572	0.621

CONCLUSIONS

- 1/ Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten intolerància hidrocarbonada.
- 2/ Els cirròtics són hiperinsulinèmics, tan en condicions basals com després d'estímul.
- 3/ L'hiperinsulinisme de la cirrosi hepàtica no és conseqüència d'un augment de la secreció beta pancreàtica, i si ho és, en canvi, d'una disminució del metabolisme hepàtic de la insulina.
- 4/ Els nivells plasmàtics de Pèptid-C a la cirrosi són normals.
- 5/ L'extracció hepàtica d'insulina a la cirrosi es normal.
- 6/ El fetge cirròtic és capaç de modificar la seva freqüència d'eliminació d'insulina en relació a la insulina que li arriba.
- 7/ El Pèptid-C no es metabolitza al fetge cirròtic.
- 8/ L'alteració del metabolisme hepàtic de la insulina a la cirrosi no es conseqüència d'una alteració en el metabolisme hepatocel·lular.
- 9/ Les derivacions porto-sistèmiques, tan si són espontànies com quirúrgiques són les responsables del'hiperinsulinisme de la cirrosi.
- 10/ Els pacients amb cirrosi hepàtica són insulín-resistents.
- 11/ Els pacients amb cirrosi hepàtica presenten hiperglucagonèmia i nivells elevats d'hormona de la creixença.

- 12/ Ni l'hiperglucagonèmia ni els nivells elevats d'hormona de la creixença són els únics responsables de la insulín-resistència a la cirrosi hepàtica.
- 13/ La insulín-resistència de la cirrosi no es deguda a la presència d'anticossos enfront de la insulina.
- 14/ La insulín-resistència de la cirrosi no es deguda a la secreció d'un percentatge superior al normal de proinsulina.
- 15/ La insulín-resistència de la cirrosi no sembla secundària a una alteració global en el nombre i afinitat dels receptors a la insulina.
- 16/ La insulín-resistència de la cirrosi pot ésser conseqüència d'una alteració de receptors específics hepatocel·lulars.
- 17/ La insulín-resistència de la cirrosi pot ésser conseqüència d'alteracions a nivell del post-receptor.

En conclusió podem dir:

- A/ Les modificacions hemodinàmiques de la cirrosi hepàtica semblen ésser les responsables de les alteracions en el metabolisme de la insulina.
- B/ La insulín-resistència de la cirrosi hepàtica pot ésser un mecanisme per adaptar-se a nivells elevats d'insulina circulant, conseqüència d'una disminució del metabolisme hepàtic de la insulina,

I N D E X

DEDICATORIA. **1**

AGRAIMENTS. **2**

MOTIVACIÓ. **7**

P A R T T E Ò R I C A .

- . METABOLISME DE LA INSULINA **10**
- . METABOLISME DEL PÈPTID-C **26**
- . ACCIO DE LA INSULINA. INSULIN-RESISTÈNCIA. **28**
- . DETERMINACIÓ DELS NIVELLS PLASMÀTICS D'INSULINA. **42**
- . ÚS DE LA SOMATOSTATINA PER A L'ESTUDI DE LA INSULIN-RESISTÈNCIA. **58**

P A R T P R A C T I C A .

- . METODOLOGIA GENERAL. **66**
- . OBJECTIU DE LA TESI. **87**
- . OBJECTIU I **89**
- . INTRODUCCIÓ I. **91**
- . PACIENTS I MÈTODE I. **93**
- . RESULTATS I. **98**
- . DISCUSSIÓ I. **113**
- . OBJECTIU II **118**
- . INTRODUCCIÓ II. **119**
- . PACIENTS I MÈTODE II **121**
- . RESULTATS II **130**
- . DISCUSSIÓ II. **153**
- . OBJECTIU III. **162**

- . INTRODUCCIÓ III. **164**
- . PACIENTS I MÈTODE III. **165**
- . RESULTATS III. **166**
- . DISCUSSIÓ III. **176**

CONCLUSIONS. **181**

BIBLIOGRAFIA. **187**

BIBLIOGRAFIA

- 1/ STEINER,D.F., OYER,P.E. The biosynthesis of insulin and a probable precursor of insulin by a human islet cell adenoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 57:473,1976.
- 2/ STEINER,D.F. CLARK,JL. NOLAN,C. Proinsulin and the biosynthesis of insulin. Rec.Prog. Horm. Res. 25:207,1969
- 3/ RUBENSTEIN,A.H. MAKO,M. WELBOURNE,W.P. Comparative immunology of bovine, porcine and human proinsulin and C-peptide. Diabetes 19:546,1970
- 4/ PERMUTT,M.A.,KIPNIS,D.M. Insulin biosynthesis: studies of islet polyribosomes. Proc. Natl.Acad.Sci.USA. 69:505, 1972
- 5/ HOWELL,SL. KOSTIANOVSKY,M. LACY,PE. Beta granule formation in isolated islets of Langerhans: a study by electron microscopic radioautography. J. Cell.Biol. 42: 695, 1969.
- 6/ HEDING,L.G. LARSEN,V.D. MARKUSSEN,J. JØRGENSEN,K.H. HALLUND O. Radioimmunoassays for human pork and ox C-peptides and related substances. Horm. Metab. Res. 5 (suppl):40, 1974
- 7/ HORWITZ,D.L. STARR,J.I. MAKO,M.E. BLACKARD,W. RUBENSTEIN,A.H. Proinsulin,Insulin and C-peptide concentrations in Human Portal and Peripheral Blood. J. Clin. Invest. 55:1278,1975
- 8/ KATZ,AI. RUBENSTEIN,A.H. Metabolism of Proinsulin,Insulin and C-peptide in the rat. J.Clin. Invest. 52: 1113, 1973

- 9/ STEINER,D.F. CLARK,JL. The spontaneous reoxidation of reduced buf and rat proinsulins. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 60: 622, 1968
- 10/ FREYCHET,P. KAHN CR, ROTH,J. NEVILLE,DM. Insulin interactions with liver plasma membranes:independence of binding of the hormone and its degradation. J, Biol.Chem. 247:3953, 1972.
- 11/ TERRIS,S. STEINER,D.F. Retention and degradation of 125 I-insulin by perfused liver from diabetic rats. J. Clin.Invest. 57.885,1976.
- 12/ BALDWIN,D. TERRIS,S. STEINER,D.R. Characterization of insulin-like actions of anti-insulin receptor antibodies. J.Biol. Chem. 255:4028, 1980.
- 13/ GRISOLIA,S., WALLACE,R. Insulin degradation by lysosomal extracts from rat liver; model for a role of lysosomes in hormone degradation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70:22,1976
- 14/ DUCKWORTH W.C. RUNYAN,K.R. WRIGHT,R.K. HALBAN,P.A. SOLOMON,SS. Insulin degradation by hepatocytes in primary culture. Endocrinology. 108: 1142, 1981.
- 15/ VARANDINI,P.T. Insulin degradation I. Purification and properties of glutathione insulin transhydrogenase of rat liver. Biochim. Biophys. Acta. 286: 126, 1972
- 16/ VARANDINI,P.T. Insulin degradation II. The widespread distribution of glutathione insulin transhydrogenase in the tissues

- of the rat. Biochim. Biophys. Acta. 286:136,1972.
- 17/ TOMIZAWA Hlt. NUTLEY,M.L. NARAHARA,N.T. WILLIAMS,R.H.
The mode of inactivation of insulin by rat liver. J.Biol. Chem. 214:285 , 1955.
- 18/ ANSORGE,S. BOHLEY,P. KIRSCHKE,H. LANGNER,J. WIEDERANDERS,B.
HANSON,H. Metabolism of insulin and glucagon. Glutathione-
insulin transhydrogenase from microsomes of rat liver.
Eur. J. Biochem. 32: 27,1973
- 19/ DUCKWORTH,W.C. Insulin Degradation by liver Cell Membranes.
Endocrinology 104:1758, 1979.
- 20/ THOMAS,J.H. WAKEFIELDS,S.M. The effect of insulin deficiency
on the glutathione insulin transhydrogenase activity of
rat liver. Biochem. Soc. Trans. 1: 1179,1973.
- 21/ HERN,E.P. VARANDINI,P.T. Turnover of hepatic glutathione in-
sulin transhydrogenase (disulfide interchange enzyme) in
normal and diabetic rats utilizing a new simplified isolation
procedure. J. Biol. Chem. 255: 697,1980
- 22/ DUCWORTH,W.C. GIFFORD,D. KITABEHI,A.E. RUNYON,K. SOLOMON,SS.
Insulin binding and degradation by muscles from streptozoto-
zin-diabetic rats. Diabetes 28: 746,1979
- 23/ MIRSKY,I.A. PERISUTTI,G. The relative specificity of the
insulinasa activity of rat liver extracts. J. Biol. Chem.
288: 77,1957

- 24/ MIRSKY ,I.A. The metabolism of insulin. Diabetes 13:225, 1964.
- 25/ MIRSKY,I.A. Insulinase,insulinase inhibitors and diabetes mellitus. Recent Prog. Horm. Res. 13:429,1957
- 26/ IZZO,J.L. BARLETT,J.W. RONCONE A. IZZO,M.S. BOLE,W.R. Physiological processes and dynamics in the disposition of small and large dose of biologically active and inactive 131 I-insulin in the rat. J. Biol. Chem. 242:2343,1976
- 27/ RUDMAN,D. GARCIA,L. DI GIROLAMO M. SHANK P.W. Cleavage of bovine insulin by rat adipose tissue. Endocrinology 78:169, 1966.
- 28/ BURGHEEN,G.A. KITABCHI,A.E. BRUSH,J.S. Purification and properties of a rat liver protease with specificity for insulin. Endocrinology , 91: 633,1972
- 29/ DUCKWORTH,W.C. Insulin and glucagon degradation by the kidney.II Characterization of the mechanisms at neutral pH. Biochim Biophys. Acta 437:531,1976
- 30/ BRUSH,J.S. Purification and characterization of a proteasa with specificity for insulin from rat muscle. Diabetes. 20: 140, 1971.
- 31/ KITABCHI, A.E. Proinsulin and C-Peptide: a review. Metabolism 26:547,1977

- 32/ KITABCHI, A.E., DUCKWORTH, W.C., BRUSH, J.S., HEINEMANN M. Direct measurement of proinsulin in human plasma by the use of an insulin-degrading enzyme. J. Clin. Invest. 50:1792, 1971
- 33/ DUCKWORTH W.C., KITABCHI A.E., Hyperinsulinemia in hypoglycemic subjects. Horm. Metab. Res. 4:133,1972
- 34/ DUCKWORTH W.C., KITABCHI A.E. The effect of age on plasma proinsulin in response to oral glucose. J. Lab. Clin. Med. 88:359,1976
- 35/ DUCKWORTH W.C., KITABCHI A.E. Insulin and glucagon degradation by the same enzyme. Diabetes 23:536,1974
- 36/ BASKIN F.K., DUCKWORTH W. C., KITABCHI A.E. Sites of cleavage of glucagon by insulin glucagon protease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67:163, 1975
- 37/ DUCKWORTH W.C., HEINEMANN M. A., KITABCHI A.E. Purification of insulin specific protease by affinity chromatography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:3698,1972
- 38/ DUCKWORTH W. C. Insulin degradation by liver cell membranes. Endocrinology 104:1758,1979.
- 39/ BRUSH J.S. Purification and characterization of a protease with specificity for insulin from rat muscle. Diabetes 20: 140, 1971
- 40/ BURGHEM G.A., KITABCHI A.E., BRUSH J.S., Purification and properties of a rat liver protease with specificity for insulin. Endocrinology 91:633,1972
- 41/ DUCKWORTH W.C. Insulin and glucagon binding and degradation by the kidney cell membrane. Endocrinology 102: 1766, 1978

- 42/ THOMAS J.H. The role of insulinase in the degradation of insulin. Postgrad. Med. J. 49:940, 1973
- 43/ YOKONO K., IMAMURA Y., SAKAR H., BABA S. Insulin degrading activity of plasma membranes from rat skeletal muscle. Its isolation, characterization, and biologic significance. Diabetes 28:810, 1979
- 44/ DUCKWORTH W.C., STENZ F., HEINEMANN M., KITABCHI A.E. Initial site of cleavage of insulin by insulin protease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:635, 1979
- 45/ DUCKWORTH W.C., HEINEMANN M., KITABCHI A.E. Proteolytic degradation of insulin and glucagon. Biochim. Biophys. Acta 377:421, 1975
- 46/ DUCKWORTH W.C. Insulin and glucagon degradation by the kidney II Characterization of the mechanisms at neutral pH. Biochim. Biophys. Acta 437:531, 1976
- 47/ RUNYAN K., DUCKWORTH W.C., KITABCHI A.E., HUFF G. The effect of age on insulin degrading activity in rat tissue. Diabetes 28:324, 1979
- 48/ STEINER D.F. Insulin today. Diabetes 26:322, 1977
- 49/ FUJINO M., WAKIMASU M., TAKETOMI S., IWATSUKA H. Insulin-like activities and insulin-potentiating actions of a modified insulin B21-26 fragment Endocrinology 101:360, 1977
- 50/ CROFFORD O.B. The uptake and inactivation of native insulin by isolated fat cells. J. Biol. Chem. 243: 362, 1968
- 51/ GLIEMANN J., GAMMELTOLT S., VINTEN J. Time courses

- of insulin-receptor binding and insulin-induced lipogenesis in isolated rat fat cells. J. Biol. Chem. 250:3368,1975
- 52/ TERRIS S., STEINER D.F. Binding and degradation of 125 I-Insulin by rat adipocytes. J. Biol. Chem. 250:8389,1975
- 53/ MARSHALL S., OLEFSKY J.M. Effects of lysosomotropic agents on insulin interactions with adipocytes Evidence for a lysosomal pathway for insulin processing and degradation. J. Bio. Chem. 254: 10153,1979
- 54/ KAHN C.R., BAIRD K. The fate of insulin bound to adipocytes. Evidence for compartmentalization and processing. J. Biol. Chem. 253:4900, 1978
- 55/ GLIEMANN J., SONNE V. Binding and receptor mediated degradation of insulin in adypocytes J. Biol. Chem. 253: 7857, 1978
- 56/ BECK-NIELSEN H., PEDERSEN D. Insulin binding, insulin degradation and glucose metabolism in human monocytes Diabetologia 17:77, 1979
- 57/ HAMMOND J.M., JARETT L. Insulin degradation by isolated fat cells and their subcellular fractions. Diabetes 24: 1011, 1975
- 58/ LE CAM A., FREYCHET P., LENOIR P. Degradation of insulin by isolated rat liver cells. Diabetes 24:566,1975
- 59/ POSNER B.I., PATEL B., VERMA A.K., BERGERON J.J.M. Uptake of insulin by plasmolemma and Golgi subcellular fractions of rat liver. J. Biol.Chem. 255: 735, 1980
- 60/ RUBENSTEIN A.H., POTTENGER L.A., MAKO M., GETZ G.S. STEINER D.F. The metabolism of proinsulin and insulin

by the liver. J. Clin. Invest. 51:912, 1972

- 61/ OOMS H.A., BRUNENGRABER H., FRANCKSON J. RH. Hepatic influence on labelled insulin metabolism. Acta Diabetol. Lat. (Suppl. 1) 5: 162, 1968
- 62/ MISBIN R.I., MERIMERE T.J., LOWENSTEIN J.M. Insulin removal bi isolated perfused rat liver. Am. J. Physiol. 730:171, 1976
- 63/ NAVALESI R., PILO A., FERRANNINI E. Insulin Kinetics after portal and peripheral injection of 125I-Insulin II Experiments in the intact dog. Am. J. Physiol. 230: 1630, 1976
- 64/ PILO A., NAVALESI R., FERRANNINI E. Insulin kinetics after portal and peripheral injections of 125I-Insulin I Data analysis and modeling Am. J. Physiol. 230:1626 1976.
- 65/ ROJDMARK S., BLOOM G., CHOU MCY., JASPAN JB.? FIELD J.B. Hepatic insulin and glucagon extraction after their augmented secretion in dogs. Am. J. Physiol. 235: E88, 1978
- 66/ BLACKWARD W.G., NLESON N.C., ANDREWS S.S. Portal and peripheral vein immunoreactive glucagon concentrations after arginine and glucose infusion. Diabetes 23:199,1974

- 67/ ISHIDA T., RÖDJD MARK S., BLOOM G., CHOU M.C.Y., FIELD J.B. The effect of Somatostatin on the hepatic extraction of insulin and glucagon in the anesthetized dog. Endocrinology 106: 220, 1980
- 68/ FRANCKSON J.R.M., OOMS H.A. The catabolism of insulin in the dog: evidence for the existence of two catabolic pathways. Postgrad. Med. J. 49: 931, 1973
- 69/ FRIEDLER D, BENHAMON J.B., LUBETZKI J., AZERAD E. Contribution to the metabolism of radio-active insulin in the dog: the course of plasma decrease, hepatic extraction, and excretion (Abstract) Diabetologia 4:390, 1968
- 70/ HARDING, P.E., BLOOM G., and FIELD J.B. Effect of infusion of insulin into portal vein on hepatic extraction of insulin in anesthetized dogs. Am. J. Physiol. 228: 1580, 1975
- 71/ SAMOLS E., RYDER J.A. Studies on tissue uptake of insulin in man using a differential immunoassay for endogenous and exogenous insulin J. Clin. Invest. 40: 2092, 1961
- 72/ CAMU, F. Hepatic balances of glucose and insulin in response to physiological increment of endogenous insulin during glucose infusions in dogs Eur. J. Clin. Invest. 5: 101, 1975

- 73/ ERWALD R., HED R., NYGREN, A., RÖDJMARK S., SUNBLAD L. WIECHEL K.L. Insulin concentration in portal and peripheral venous blood after oral glucose in human pancreatitis. Acta Med. Scand. 194:, 103, 1973
- 74/ KADEN, M., HARDING P., FIELD J.B., Effect of intraduodenal glucose administration on hepatic extraction of insulin in the anesthetized dog. J. Clin. Invest. 52: 2016, 1973
- 75/ KAPLAN, N., MADISON L.L. Effects of endogenous insulin secretion on the magnitude of hepatic binding of labeled insulin during a single transhepatic circulation in human subjects. (Abstract) Clin. Res. 7: 248, 1959
- 76/ TRANBERG K.G. Hepatic uptake of insulin in man Am. J. Physiol. 273: E 509, 1979
- 77/ HONEY R.N., PRICE S. The determinants of insulin extraction in the isolated perfused rat liver Horm. Metab. Res. 11: 111, 1979
- 78/ TRANBERG K.G., DENCKER J. Modeling of plasma disappearance of unlabeled insulin in man Am. J. Physiol. 235: E 577, 1978
- 79/ BUTTERFIELD W.J.H., ABRAMS M.E., ST JOHN D.J.B., WICHELOW M.S. The intravenous glucose tolerance test: pe

ripheral disposal of the glucose load in controls and diabetics. Metabolism 16:19, 1967

- 80/ MONDON, C.E., OLEFSKY J. M., DOLKAS C. B., REAVEN G.M. Removal of insulin by perfused rat liver: effect of concentration Metabolism 24:153, 1975
- 81/ RUBENSTEIN A.H., POTTENGER L.A., MAKO M., GETZ G.S., STEINER D.F. The metabolism of proinsulin and insulin by the liver J. Clin. Invest. 51:912, 1972
- 82/ KATZ, M.L., BERGMAN E.N. Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. Am. J. Physiol. 216:946,1969
- 83/ CAHILL, G.F. Insulin and Glucagon. In: Peptide Hormones Ed. by J.A. Persons pp 85-103 Mac Millan London 1976
- 84/ KADEN, M., CURTIN, R., CAREY L., TAYLOR F., FIELD J.B. Evaluation of factors regulating hepatic extraction of insulin Diabetes 20:341,1971
- 85/ KADEN M., HARDING P., FIELD J.B. Effect of intraduodenal glucose administration on hepatic extraction of insulin in the anesthetized dog. J. Clin. Invest. 52:2016,1973
- 86/ SACKS H., PIMSTONE B., WALIGORA K., PEIRES L., WEINKOVE E., SAUNDERS S. Differences between insulin degradation

by soluble fractions and insulin clearance by perfused livers of normal, protein depleted and starved rats.

Diabetes 26:956,1977

- 87/ KARAKASH C, ASSIMACOPOULOS-JEANNET F., JEANRENAUD B.
An anomaly of insulin removal in perfused livers of obese hyperglycemic (ob/ob) mice. J. Clin. Invest. 57: 1117,1976
- 88/ FABER O.K., CHRISTENSENSEN J., KEHLET H, MADSBAD S.,
BINDER C., Decreased insulin removal contributes to hyperinsulinemia in obesity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 53:618,1981
- 89/ ROSSELL R., GOMIS R., CASAMITJANA R., VILARDELL E.,
SEGURA R., RIVERA F. Insulin hepatic extraction in the obesity. Relationship with plasma insulin levels J. Clin. Endocrinol. Met. (Revised manuscript C82-3-128)
- 90/ KAHN C.R., NEVILLE D.M., ROTH J. Insulin-receptor in the obese-hyperglycemic mouse. A model of resistance J. Biol. Chem. 248:244,1973
- 91/ MEGYESI C., SAMOLS E., MARKS V. Glucose intolerance and diabetes in chronic liver disease Lancet 2:1051,1967
- 92/ COLLINS J.R., LACY W.W., STIEL J.N., CROFFORD O.B.

- Glucose intolerance and insulin-resistance in patients with liver disease Arch. Intern. Med. 126:608,1970
- 93/ JOHNSTON,D.G. , ALBERTI K.G.M.M., FABER O.K., BINDER C., WRIGHT R. Hyperinsulinism of hepatic cirrhosis: diminished degradation or hypersecretion Lancet 1:10, 1977.
- 94/ JOHNSON D.G., CONLEY V. Postinhibitory overshoot of insulin release by gastric inhibitory polypeptide. Life Sciences 27:2373,1980
- 95/ DRYBURGH J.R., HAMPTON S.M., MARKS V. Endocrine pancreatic control of the release of gastric inhibitory polypeptide. Diabetologia 19:397,1980
- 96/ SMITH-LAING G., SHERLOCK S., FABER O. Effects of spontaneous portal systemic shunting on insulin metabolism Gastroenterology 76:685,1979
- 97/ KITABCHI A.E., STENZ F.B. Degradation of insulin and proinsulin by various organ homogenates of rat. Diabetes 21:1091,1972
- 98/ CORNELL R.P. Mechanisms of acute hyperinsulinemia after Kupffer cell phagocytosis Am. J. Physiol. 238:E276,1980
- 99/ BERGERON J.J.M.,LEVINE G., SIKSTROM R., O'SHANHNESSY D.,

- KOPRIWA B., NADLER N.J., POSNER P.I. Polypeptide hormone binding sites "in vivo" initial localization of 125I-labeled insulin to hepatocyte plasmalemma as visualized by electron microscope radioautography. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5051,1977
- 100/ BLACKARD W.G., GUZELIAN P.S., SMALL M.E. Down regulation of insulin receptors in primary cultures of adult rat hepatocytes in monolayer. Endocrinology 103:548, 1978-
- 101/ CARO J.F., AMATZUDA J.M. Functional relationship between insulin binding, action, and degradation. J. Biol. Chem. 255:1052 ,1980
- 102/ OLEFSKY, J., KOBAYASHI M., CHANG H. Inter-actions between insulin and its receptors after the initial binding event. Functional heterogeneity and relationships to insulin degradation Diabetes 28:460,1979
- 103/ RUBENSTEIN A.H., MAKO M.E., HORWITZ D.L. Insulin and the kidney Nephron 15:306,1975
- 104/ BOURDEAU J.E., CHEN E.R.Y., CARONE F.A. Insulin uptake in the renal proximal tubule Am. J. Physiol. 255: 1399,1973
- 105/ RABKIN R., KITABCHI A.E., Factors influencing the handling of insulin by the isolated rat kidney. J. Clin.

Invest.62:169,1978

- 106/ BLANCHARD R.F., DAVIS P.J., BLAS S.D. Physical characteristics of insulin receptors on renal cell membranes Diabetes 27:88,1978
- 107/ KUROKAWA K., LERNER R. Binding and degradation of insulin by isolated renal cortical tubules Endocrinology106:655,1980
- 108/ CHALLONER D.R. Degradation of porcine insulin and proinsulin by rat adipose tissue Diabetes 20:276,1971
- 109/ BECK_NIELSEN H., PEDERSEN D. Insulin binding, insulin degradation and glucose metabolism in human monocytes Diabetologia 17:77,1979
- 110/ HALBAN P.A., WOLLHEIM C.B. Intracellular degradation of insulin stores by rat pancreatic islets in vitro J. Biol. Chem. 255:6003,1980
- 111/ BUSE M. G., ROBERTS W.J., BUSE J. The role of the human placenta in the transfer and metabolism of insulin J.Clin. Invest. 41:29, 1962
- 112/ FREINKEL N. The effect of pregnancy on insulin homeostasis Diabetes 13:260,1964

- 113/ SILVERS A., SWENSON R.S., FARQUHAR J.W., REAVEN G.M.
Derivation of a three compartment model describing
disappearance of plasma insulin 131I in man. J.Clin.
Invest. 48:1461, 1969
- 114/ SHERWIN R.S., KRAMER K., TOBIN J.D., INSEL P.A.,
LILJENQUIST J.E., BERMAN M., ANDRES R. A model of
the kinetics of insulin in man J. Clin. Invest. 53:
1481, 1974
- 115/ ZELEZNIK A.J., ROTH J. Demonstration of the insulin
receptor in vivo in rabbits and its possible role as
reservoir for the plasma hormone J. Clin. Invest. 61:
1363, 1978
- 116/ NAVALESI R., PILO A., FERRANNINI E. Kinetic analysis
of plasma insulin disappearance in non-ketotic diabetic
patients and in normal subjects J.Clin.Invest. 61:197,
1978
- 117/ MCGUIRE E.A., ROBIN J.D., BERMAN M., ANDRES R. Kinetics
of native insulin in diabetic, obese and aged men
Diabetes 28:110,1979
- 118/ KUZUYA T., MATSUDA A., SAKAMOTO Y., TANABSHI S., KAJINUMA
H. C-Peptide immunoreactivity(CPR) in urine Diabetes
27(Suppl.1) 210,1978

- 119/ STOLL R.W., TOUBER J.L., MENAHAN L.A., WILLIAMS R.H.
Clearance of porcine insulin, proinsulin, and connecting
peptide by the isolated rat liver Proc. Soc. Exp. Biol.
Med. 133: 894, 1970
- 120/ KUHL C., FABER O.K., HORNNES P., LINDKAER JENSEN S.
C-Peptide Metabolism and the liver Diabetes 27:(Suppl.
1):197, 1978
- 121/ CAHILL G.F. Starvation in man N. Engl. J. Med 282:668,
1970
- 122/ RABINOWITZ D., LILJENQUIST J.E. Glucose Metabolism
in intact man: The responsiveness of splanchnic and
peripheral tissues to insulin Metabolism 27:1832, 1978
- 123/ RABINOWITZ D., MERIMEE T.J., MAFFEZZOLI R. Patterns
of hormonal release after glucose, protein and
glucose plus protein Lancet 2:454, 1966
- 124/ OLEFSKY J.M. Insulin Resistance and insulin action
Diabetes 30 :148, 1981
- 125/ OLEFSKY J.M., KOLTERMAN O.G. Mechanisms of insulin
resistance in obesity and noninsulin-dependent (Type
II) diabetes Am J Med 70:151, 1981

- 126/ KAHN C.R. Insulin resistance, insulin insensitivity and insulin inresponsiveness: a necessary distinction Metabolism 27:1893,1978
- 127/ RIZZA R.A., MANDARINO L.J., GERICH J.E. Mechanisms of insulin resistance in man Am. J. Med. 70:61,1981
- 128/ TAGER H., GIVEN B., BALDWIN D., MAKO M., MARKESE J. RUBENSTEIN A., OLEFSKY J., KOBAYASHI M., KOLTERMAN O. POUCHER R. A structurally abnormal insulin causing human diabetes Nature 281:122,1979
- 129/ KANAZAWA Y., HAYASHI M., IKEUCHI M. HIRMATSU K., KOSAKA K. Familial proinsulinemia: a possible cause of abnormal glucose tolerance Eur. J. Clin. Invest 8:327,1978
- 130/ DIXON K., EXON P., HUGHES H. Insulin antibodies in aetiology of labile diabetes Lancet I:343,1972
- 131/ CASAMITJANA R., GOMIS R., RIVERA F. Determinación de insulina libre, insulina total y título de anticuerpos en pacientes diabéticos tratados Diag. Biol. 27:295,1978
- 132/ FLIER J.S., KAHN C.R., JARRETT D.B., ROTH J. Characterization of antibodies to the insulin-receptor -a cause of insulin-resistant diabetes in man J. Clin. Invest. 58:1442,1976

- 133/ OLEFSKY J.M. The insulin receptor: its role in insulin resistance in obesity and diabetes. Diabetes 25:1154,1976
- 134/ KOBAYASHI M., OLEFSKY J.M., ELDERS J., MAKO M., GIVEN B.D., SCHEDWIE H., FISER R., HINTZ R., HORNER J., RUBENSTEIN A. Insulin resistance due to a defect distal to the insulin receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3469, 1978
- 135/ OSEID S., BECK-NIELSEN H., PEDERSEN O. Decreased binding of insulin to its receptor in patient with congenital generalized lipodystrophy. N. Engl. J. Med. 296:245,1977
- 136/ SAAMAAN N., STONE D., ECKHARDT R. Serum glucose insulin, and growth hormone in chronic hepatic cirrhosis. Arch. Intern. Med. 124:149, 1969
- 137/ CREUTZFELDT W., FRERICHS H., SICKINGER K. Liver disease and diabetes mellitus In: Progress in liver disease. Vol III pp 371-407 Grune&Stratton New York 1970
- 138/ ISSEKUTZ B., WRANIC M. Role of glucagon in regulation of glucose production in exercising dogs Am. J. Physiol. 238:E13,1980
- 139/ PROIETTO J., ALFORD F., DUDLEY F. The mechanism of the

- carbohydrate intolerance of cirrhosis. J.Clin. Endocrinol. Metab. 51:1030, 1980
- 140/ SHERWIN R.S., FISHER M., BESSOLF J., SNYDER N., HENDLER R., CONN H., FELIG Ph. Hyperglucagonemia in cirrhosis: altered secretion and sensitivity to glucagon Gastroenterology 74:1224,1978
- 141/ GRECO A., GHIRLANDA G., PATRONO C., FEDELI G., MANNA U. Behavior of pancreatic glucagon, insulin, and HGH in liver cirrhosis after arginine and i.v. glucose Acta diabet. lat. 11:330,1974
- 142/ CRUZ A., DAVID H., THERVET F., RAMBERT P., BERNARD H. Le test au tolbutamide intra veineux au cours des atteintes hépatiques de l'alcoolisme chronique Diabete 17:29,1969
- 143/ KASPERKA T., ROGALA H., Growth hormone in blood plasma of patient with liver cirrhosis Acta Med. Pol.19:485,1978
- 144/ MARCO J., DIEGO J., VILLANUEVA M.L., DIAZ-FIERROS M., VALVERDE I., SEGOVIA J.M. Elevated plasma glucagon levels in cirrhosis of the liver N. Engl. J. Med. 289:1107,1973
- 145/ SMITH-LAING G., ORSKOV H., GORE M., SHERLOCK SH. Hyperglucagonemia in cirrhosis Diabetologia 19:

:103,1980

- 146/ YAMAGUCHI K., FUKUSHIMA H., UZAWA H. Response of human growth hormone, prolactin, and thyrotropin, to thyrotropin releasing hormone in liver cirrhosis and diabetes mellitus. Endocrinol. Japon. 26:81,1979
- 147/ HUNT S., VAAMONDE C.A., RATTASSI T., BEVIAN G., SAID S., PAPPER S. Circulating levels of vasoactive intestinal polypeptide in liver disease. Arch. Intern. Med. 139:994,1979
- 148/ BODEN G., MASTER R., OLIVER O., RUDNICK M. Human pancreatic polypeptide in chronic renal failure and cirrhosis of the liver J. Clin. Endocrinol. Metab. 51:573,1980
- 149/ WEBB S., BOSCH J., KRAVETZ D., WASS J., GOMIS R., REES L. Metabolism of somatostatin in cirrhosis of the liver Hepatology (galerades)
- 150/ GRECO A., BERTOLI A., GHIRLANDA G., MANNA R., ALTOMONTE L., REBUZZI A. Insulin resistance in liver cirrhosis: Decreased insulin binding to circulating monocytes Horm. Metab. Res. 12:577,1980

- 151/ SCHADE D., EATON R. Dose response to insulin in man: differential effects on glucose and ketone body regulation J. Clin. Endocrinol Metab 44:1038,1977
- 152/ HARANO Y., OHGAKU S., HIDAKA H., HANEDA K., KIKKAW R., SHIGETA Y., ABE H. Glucose, insulin and somatostatin infusion for the determination of insulin sensitivity. J. Clin. Endocrinol. Metab. 45:1124,1977
- 153/ SHEN S.W., REAVEN G., FARQUHAR J. Comparison of impedance to insulin-mediated glucose uptake in normal subjects and in subjects with latent diabetes. J. Clin. Invest. 49:2151,1970
- 154/ RIZZA R., MILES J., VERDON C. Insulin sensitivity in man: a method for simple day dose-response assessment using the euglycemic glucose-insulin clamp technique Clin. Res. 28:409, 1980
- 155/ De PIRRO R., FUSCO A., LAURO R., TESTA I., FERRETI F., De MARTINIS C. Erythrocyte insulin receptors in non-insulin-dependent diabetes mellitus Diabetes 29:96,1980
- 156/ GAMBHIR K., ARCHER J., CARTER L. Insulin receptor assay for human erythrocytes Clin. Chem. 23:1590,1977
- 157/ GROENS J., KAMMINGA C., WILLEBRANDS A., BLICKMAN J.

Evidence for the presence of insulin in blood serum:
a method for an approximate determination of the insulin
content of blood J. Clin. Invest. 31:97,1952

- 158/ GROEN J., GELD H., BOLINGER R., WILLEBRANDS A. The
antiserum effect of epinephrine: its significance
for the determination of serum insulin by the rat
diaphragm method Diabetes 7:272,1958
- 159/ VALLANCE- OWEN J., HURLOCK B. Estimation of plas-
ma insulin by rat diaphragm method Lancet I:68,1954
- 160/ WILLEBRANDS A., GELD H., GROEN J. Determination of
serum insulin using the isolated rat diaphragm: the
effect of serum dilution Diabetes 7:119,1958
- 161/ CHARLES A. Pathophysiology of insulin secretion in
normal and diabetic humans In: Diabetes Mellitus
Vol I pp 123-206 Wiley&Sons Chichester 1981
- 162/ YALOW R., BERSON S. Assay of plasma insulin in hu-
man subjects by immunological methods Nature 184:
1648,1959
- 163/ MORGAN C., LAZAROW A. Immunoassay of insulin: Two
antibody system Diabetes 26 (Suppl 2):661,1972

- 164/ HEDING L. Determination of total serum insulin (IRI) in insulin-treated diabetic patients Diabetologia 8:260,1972
- 165/ JAFFE, B., BEHRMAN H. Methods of hormone radioimmunoassay pp 613-638, Academic Press New York 1979
- 166/ KUZUYA H., BLIX P., HORWITZ, D., STEINER, D., RUBENSTEIN A. Determination of free and total insulin and C-Peptide in insulin-treated diabetics Diabetes 26: 22,1977
- 167/ HEDING L. Insulin, C-Peptide, and Proinsulin in nondiabetics and insulin-treated diabetics Diabetes 27 (Suppl I) 178, 1978
- 168/ KUZUYA T., MATSUDA A., SAITO T., YOSHIDA S. Human C-Peptide Immunoreactivity (CPR) in blood and urine. Evaluation of a radioimmunoassay method and its clinical applications Diabetologia 12:511,1976
- 169/ BLOCK M., MAKO M., STEINER D., RUBENSTEIN A. Circulating C-Peptide immunoreactivity Diabetes 21:1013,1972
- 170/ FABER O.K., BINDER C., MARKUSSEN J., HEDING L., NAI_ THANI V., KUZUYA H., BLIX P., HORWITZ D., RUBENSTEIN A. Characterization of seven C-Peptide antisera Diabetes 27(Suppl 1):170,1978

- 171/ DESBUQUOIS B., AURBACH J. Use of polyethylene Glycol to separate free and antibody-bound peptide hormones in radioimmunoassays J. Clin. Endocrinol. Metab. 33:732,1971
- 172/ EFENDIC S., LINS P., LUFT R. Somatostatin and insulin secretion Metabolism 27: 1275, 1978
- 173/ GERICH J. Somatostatin modulation of glucagon secretion and its importance in human glucose homeostasis Metabolism 27:1283, 1978
- 174/ EFENDIC S., CLARO A., LUFT R. Studies on the mechanism of somatostatin action on insulin release III Effect of somatostatin on arginine induced release of insulin and glucagon in man and perfused rat pancreas. Acta Endocrinol. 81:753,1976
- 175/ GERICH J. LORENZ M., SCHNEIDER V. Effect of somatostatin on plasma glucose and insulin response to glucagon and tolbutamide in man. J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:1057,1974
- 176/ EFENDIC S., LUFT R., CLARO A. Studies on the mechanism of somatostatin action on insulin release in man II Comparison of the effects of somatostatin on insulin release induced by glucose, glucagon, and tolbutamide Acta Endocrinol. 81:743,1976

- 177/ SHERWIN R., TAMBORLANC W., HENDLER R., SACCA R.
FELIG P. Influence of glucagon replacement on the
hyperglycemia and hyperlactonemic response to pro
longed somatostatin infusion in normal man. J. Clin.
Endocrinol. Metab. 45:1104,1977
- 178/ LILJENQUIST J., CHIASSON J., CHERRINGTON A., KELLER
U., JENNINGS A., BOMBAY J., LACY W. An important role
for glucagon in the regulation of glucose production
in vivo Metabolism 25:1371,1976
- 179/ SPERLING M., GRAIWER L., LEAKE R., FISHER D. Role of
glucagon in perinatal glucose homeostasis Metabolism
25:1385,1976
- 180/ GRECO A., ALTOMONTE L., GHIRLANDA G., REBUZZI A.,
MANNA R., BERTOLI A. Somatostatin infusion in liver
cirrhosis: glucagon control of glucose homeostasis
Diabetologia 18:187,1980
- 181/ JASPAN J., POLONSKY K., LEWIS M., MOORSA R. Reduction
in portal vein blood flow by somatostatin Diabetes 28:
888,1979
- 182/ BRAZEAU P., VALE W., BURGUS R., LING N., BUTCHER M.,
RIVIER J., GUILLEMIN R. Hypothalamic polypeptide that
inhibits the secretion of immunoreactive pituitary
growth hormone Science 179:77,1973

- 183/ SCHALLY A., DUPONT A., ARIMURA A., REDDING T.,
NISHI N., LINTHICUM G., SCHELESINGER D. Isolation
and structure of growth hormone-release inhibiting
hormone (somatostatin) from porcine hypothalami
Biochemistry 15:509,1976
- 184/ ARIMURA A., SATO H., DUPONT A., NISHI N., SCHALLY
A. Somatostatin: abundance of immunoreactive hormo-
ne in rat stomach and pancreas Science 189:1007,1975
- 185/ ELDE R., HOKFELT T., JOHANSSON O., SCHULTZBERG
M., EFENDIC S., LUFT R. Cellular localization of so-
matostatin Metabolism 27:1151,1978
- 186/ ORCI L., BACTENS D., DUBOIS M., RUFENER C. Evidence
for the D-cell of the pancreas secreting somatosta-
tin Horm. Metab. Res. 7:400,1975
- 187/ POLAK J., PEARSE A., GRIMELINS L., BLOOM S. ARIMUSA
A. Growth hormone release inhibiting hormone (GHRH)
in gastrointestinal and pancreatic D-cells Lancet I:
1220,1975
- 188/ LARSSON L., GOLTERMANN N., De MAGISTRIS L, REHFELD
J., SCHWARTZ T. Somatostatin cell processes as path-
ways for paracrine secretion Science 205:1393,1979
- 189/ LARSSON L. Somatostatin cell in Gut Hormones Pp 350
Churchill Livingstone Edinburgh 1981

- 190/ LUFT R., EFENDIC S., HOKFELT T. Somatostatin -both hormone and neurotransmitter ? Diabetologia 14: 1, 1978
- 191/ BRAZEAU P., LING N., ESCH F., BOHLEN P., BENVIT R. GUILLEMIN R. High biological activity of the synthetic replicator of somatostatin 28 and somatostatin 25 Regulatory Peptide 1:2,1980
- 192/ VAYSSE N., PRADAYROL L., SUSINI C., CHAYVIALLE J., RIBET A. in Gut Hormones Pp 358 Churchill&Livingstone Edimburgh 1981
- 193/ LINS P., EFENDIC S., HALL K. Effect of 24 hour somatostatin infusion on glucose homeostasis and on the levels of somatomedin A and pancreatic and thyroid hormones in man Acta Med. Scand 206:441, 1979
- 194/ JORDE R., WALDUM H., BURHOL P., LYGREN I, SCHULZ T., FLORHOLMEN J., JENSSEN T. The effect of somatostatin on fasting and postprandial plasma GIP, serum insulin, and blood glucose in man Scand. J. Gastroent. 16:113,1981
- 195/ KREJS G., BROWNE R., RASKIN P. Effect of intravenous somatostatin on jejunal absorption of glucose, amino-acids, water, and electrolytes Gastroenterology 78: 26,1980

- 196/ TROVATI M, MASSARA F., CAMANNI F., MOLINATTI G.,
LORENZATI R., PAGANO G. Effect of the somatostatin
analog D-Trp8, D-Cys14 on glucose, insulin, pan-
creatic glucagon and growth hormone plasma levels
in acromegalics and mild diabetics J. Endocrinol.
Invest. 3:189,1980
- 197/ PATEL Y., ZINGG H., FITZ-PATRICK D., SRIKANT C. So-
matostatin: some aspects of its physiology and pa-
thophysiology in Gut Hormones Pp339 Churchill&Living-
stone. Edimburgh 1981
- 198/ AGUILAR-PARADA E., EISENTRAUT A., UNGER R. Pancrea-
tic glucagon secretion in normal and diabetic subjects
Am.J. Med. Sci.257:415,1969
- 199/ GROSZMANN R.J., KOTELANSKI B., COHN J.N., KHATRI I.M.
Quantitation of portasystemic shunting from the splenic
and mesenteric beds in alcoholic liver disease Am. J.
Med.53:715,1972
- 200/ DOMENECH i MASSONS J.M. Bioestadística Ed. Herder
Barcelona 1980
- 201/ GRECO A., CRUCITTI F., GHIRLANDA G., MANNA R., ALTOMON-
TE L., REBUZZI A., BERTOLI A. Insulin and glucagon con-
centration in portal and peripheral veins in patients
with hepatic cirrhosis Diabetologia 17:23,1979

- 202/ KUZUYA T., MATSUDA A. Disappearance rate in endogenous human C-Peptide from blood Diabetologia 12:519,1976
- 203/ FABER O.K., KEHLET H., MADSBAD S., BINDER C. Kinetics of human C-Peptide in man Diabetes 27:207,1978
- 204/ RUBENSTEIN A., CLARK J., MELANI F., STEINER D. Secretion of proinsulin C-Peptide by pancreatic B cell and its circulation in blood Nature 224:697,1969
- 205/ BROWN M. Methode a la néocuproina. Adaptation a l'autoanalyser Technicon Diabetes 10:60,1961
- 206/ JOHNSTON D., ALBERTI K.G.M.M., WRIGHT R., SMITH-LAING G., STEWART A., SHERLOCK S., FABER O., BINDER C. C-Peptide and insulin in liver disease Diabetes 27:201,1978
- 207/ O'SULLIVANS J. Age gradient in blood glucose levels Diabetes 27:201,1978
- 208/ STUART J. Insulin in Joslin's Diabetes Mellitus pg118 Lea&Febuger Philadelphia 1971
- 209/ SCHLIENGER S.L., BLICKLE F., DEMANGEAT C., HASSELMAN M. IMLER M. Analyse de l'insulinosecretion par le dosage du peptide C au cours des hepatopathies alcooliques Nouv. Presse Med. 7:4011,1978

- 210/ IWASAKI Y., OHKUBO A., KAJINUMA H., AKANBUMA Y., KOSA
KA K. Degradation and secretion of insulin in hepatic cirrhosis J. Clin. Endocrinol. Metab. 47:774,1977
- 211/ CONN H.O., SCHREIDER W., ELKINGTON S.G. Cirrhosis and diabetes. II Association of impaired glucose tolerance with portal-systemic shunting in Laennec's cirrhosis Am. J. Dig. Dis. 16:227,1971
- 212/ FELIG Ph., SHERWIN R. Carbohydrate homeostasis liver and diabetes In Progress in Liver Diseases 5 Pg 149 Grune&Stratton New York 1976
- 213/ SHERWIN R., JOSHI P., HENDLER R., FELIG Ph., CONN H. Hyperglucagonemia in Laennec's cirrhosis The role of portal systemic shunting N. Engl. J. Med. 290: 239,1974
- 214/ PELKONEN R., KALLIO H., SUORANTA S., KARONEN S. Plasma insulin, C-Peptide, and blood glucose in portal, hepatic and peripheral veins in liver cirrhosis, Effect of intravenous tolbutamide Acta Endocrinologica 97: 496,1981
- 215/ IWASAKI Y., SATO H., OHKUBO A., SANJO T., FUTAGAWA M., SUGIURA M., TSUJI S. Effect of spontaneous portal-systemic shunting on plasma insulin and amino acid concentrations Gastroenterology 78:677,1980

- 216/ BOSCH J., KRAVETZ D. RODES J. Effects of somatostatin on hepatic and systemic hemodynamics in patients with cirrhosis of the liver: Comparison with vasopresin Gastroenterology 80:518,1981
- 217/ ROWELL L. Measurement of hepatic-splanchnic blood flow in man by dye techniques In Dye Curves The Theory and Practice of Indicator Dilution Pp 209 Univesity Park Press Baltimore 1974
- 218/ HOLDSWORTH C., NYE L., KING E. The effect of portacaval anastomosis on oral carbohydrate tolerance and on plasma insulin levels Gut 13:58,1972
- 219/ MADISON L., KAPLAN N. The hepatic binding of I¹³¹-Labeled insulin in human subjects during a single transhepatic circulation J. Lab. Clin. Med. 52:927,1958
- 220/ MORTIMORE G., TIETZE F., STETTEN D. Metabolism of insulin-I¹³¹. Diabetes 8:307,1959
- 221/ SHERLOCK S. The portal venous system and portal hypertension. In : Diseases of the liver and biliary system Pg. 150 Blackwell Scientific Publications Oxford 1976
- 222/ SILK D, WILLIAMS R. Portal Hypertension In: Liver and Biliary disease. Pathophysiology. Diagnosis Management

Pp 1002 Saunders Company.London.1979

- 223/ RESNIK R., CHALMERS T., ISHIARA A., GARCEAU A., CALLLOW A.D., SCHIMMEL E.M., O'HARA E.T. A controlled study of the prophylactic portacaval shunt. Ann. Inter. Med. 70:675, 1969
- 224/ NAKAMURA SH., KERA K., SASAKI K., TAKEZAWA Y. Hepatic hemodynamics in idiopathic presinusoidal portal hypertension in Japan. Angiology 23:7,1972
- 225/ SHURBERG J.L., RESNICK R. H. KOFF R.S., ROS E., BAUM R.A., PALLOTTA J. Serum lipids, insulin and glucagon after portacaval shunt in cirrhosis.Gastroenterology 72:301,1977
- 226/ LICKLY, H.L.A., CHISHOLM D.J., RABINOWITCH A. Effects of portacaval anastomosis on glucose tolerance in the dog: evidence of an interaction between the gut and liver in oral glucose disposal Metabolism 24:1157,1975
- 227/ BLEI A., ROBBINS D., DROBNY E., BAUMANN G., RUBENSTEIN A. Insulin resistance in cirrhosis: a receptor study Gastroenterology (Abstract) 80: 1327, 1981
- 228/ MANDARINO L., STENNER D., BLANCHARD W., NISSEN S., GERICH J. Selective effects of somatostatin 14-25 and 28 on in vitro insulin and glucagon secretion.

Nature 291:76,1981

- 229/ ROBINSON T., ARCHER J., GAMBHIR K., HOLLIS V,
CARTER L., BRADLEY C. Erythrocytes: A new cell
type for the evaluation of insulin receptor
defects in diabetic humans Science 205:200,1979
- 230/ GAMBHIR K., ARCHER J., BRADLEY C. Characteristics of
human erythrocyte insulin receptors Diabetes 27:
701, 1978.
- 231/ LAMPMAN R., SANTINGA J., BASSET D., SAVAGE P.
Cardiac arrhythmias during epinephrine-propranolol
infusions for measurement of in vivo insulin
resistance Diabetes 30: 618, 1981

