

# CE SE AFLĂ DINCOLO DE GENETICA DIABETULUI ZAHARAT?

## *What is behind genetics of diabetes?*

C. Ionescu-Tîrgoviște, Elena Nicoleta Tudorică, Nicoleta Toma

*Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice „N.C. Paulescu”, București*

### REZUMAT

Epoca modernă a diabetului zaharat, care a debutat la începutul secolului al XIX-lea, continuă până în prezent, în ciuda speranțelor că revoluția genetică va aduce clarificări majore, atât în ceea ce privește definirea diabetului, clasificarea diferitelor sale fenotipuri, a mecanismelor patogenetice și mai ales a găsirii unor soluții terapeutice eficiente sau chiar prevenirea lor. Pe lângă informațiile utile aduse de revoluția genetică, care se referă în primul rând la identificarea unor molecule structurale sau funcționale, majoritatea prezente în celula  $\beta$ -pancreatică, scorul de risc genetic nu a reușit să amelioreze predicția diabetului zaharat. În concepția autorilor, cauza primară a diabetului, indiferent de fenotipul analizat, poate fi identificată în disfuncția secretorie  $\beta$ -celulară, la rândul ei, secundară incapacității celulei  $\beta$ -pancreatice de a produce vezicule secretorii mature, singurele capabile să răspundă prompt și eficient la stimulii săi fiziologici. Autorii propun ca indicator al disfuncției  $\beta$ -celulare creșterea proinsulinei plasmatice sau, și mai bine, a raportului proinsulină/adiponectină.

**Cuvinte cheie:** celule  $\beta$ -pancreatice, vezicule secretorii, fenotipuri ale diabetului, prevenția diabetului

### ABSTRACT

The modern era of diabetes, which began in the early nineteenth century, continues until now, despite the hopes that the genetic revolution will bring major clarifications, both in terms of defining diabetes, the classification of its different phenotypes, the pathogenetic mechanisms and especially the finding of effective therapeutic solutions or even their prevention. Despite the useful information brought by genetic revolution, which refers primarily to identify structural or functional molecules associated with the various phenotypes, most of them expressed in pancreatic  $\beta$ -cell, the pancreatic genetic risk score, failed to improve prediction of diabetes. In the authors' concept, the primary cause of diabetes, regardless of phenotype analyzed can be identified in  $\beta$ -cell secretory dysfunction, in turn, secondary to pancreatic  $\beta$ -cell inability to produce mature secretory vesicles, the only one able to respond promptly and efficiently to its physiological stimuli. The authors propose as indicator for the  $\beta$ -cell dysfunction, the increase of serum proinsulin, or better yet the ratio proinsulin / adiponectin.

**Keywords:** pancreatic  $\beta$ -cell, secretory vesicles, phenotypes of diabetes, prevention of diabetes

### INTRODUCERE

Aceasta este una din numeroasele întrebări la care trebuie să răspundem.

Este evident că în spatele genelor stau moleculele proteice, iar dacă ne referim la celula  $\beta$ -pancreatică, ne referim la câteva mii (peste 3.000) de repere proteice particulare. Proteinele structurale reprezintă numai o parte foarte mică (~6% dintre ele), majoritatea lor fiind proteine *funcționale*, cele mai multe având o funcție enzimatică. Acestea mediază

producția și utilizarea energiei necesare funcționării ansamblului de căi metabolice (1).

Este evident că orice modificare cât de mică în acest ansamblu care ar trebui să funcționeze ca un ceas elvețian (acestea din urmă având numai un număr mic de piese mecanice, funcționând numai într-o singură direcție și ferită de orice influență externă prin capacele lor solide). Evident, comparația este forțată, întrucât o celula  $\beta$ -pancreatică conține mult mai multe repere structurale și încă și mai

Adresa de corespondență:

Prof. Dr. Constantin Ionescu-Tîrgoviște, Institutul Național de Diabet, Nutriție și Boli Metabolice „N.C. Paulescu”, București

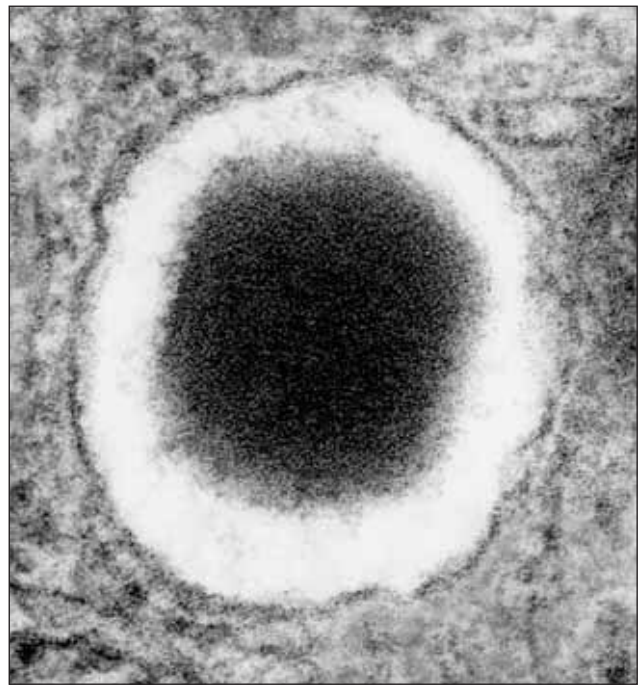
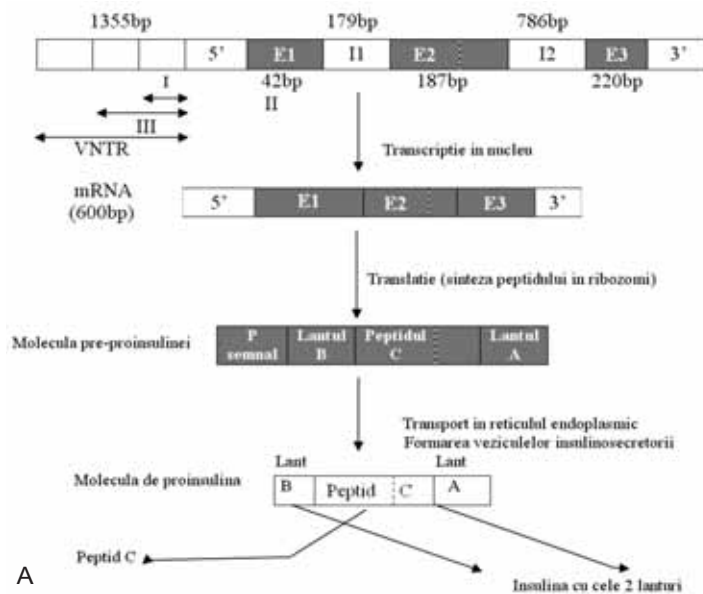
E-mail: cit@paulescu.ro

multe repere funcționale, care trebuie să se adapteze la modificările ce survin în mediul lor interior sau în afara lor, reflectând în ultimă instanță „mediul intern al organismului“, datorită contactului lor strâns cu fluxul sanguin. Se știe că insulele sunt bine vascularizate, dar și strâns conectate cu fiecare celulă  $\beta$ -pancreatică. Legătura se face prin mai multe „conexine“ (COX-36 fiind specifică acestei celule), realizând mai multe contacte în mai multe regiuni ale unei celule  $\beta$ -pancreatice.

### Formarea veziculelor secretorii mature

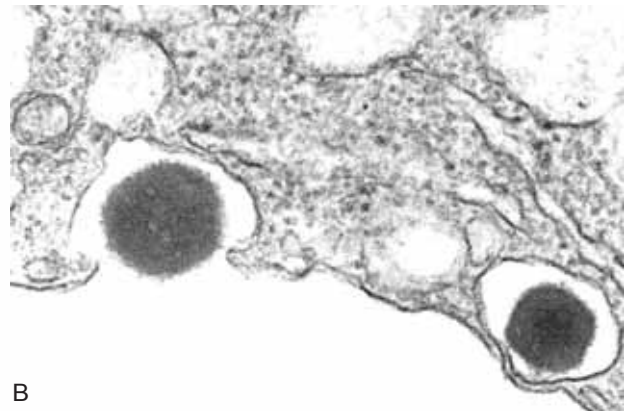
Dacă analizăm cu atenție ansamblul genelor asociate cu diferite fenotipuri de diabet vom constata că aprox. două treimi dintre ele codifică gene structurale sau funcționale din celula  $\beta$ -pancreatică (2,3). Am insistat mult asupra ideii că celula  $\beta$ -pancreatică nu este o simplă „fabrică de insulină“, așa cum inspirat a fost denumită de Orci în 1985 (4), ci mai curând poate fi denumită o fabrică de „vezicule secretorii (SVs) mature“ (5,6).

Suntem primii care am atras atenția asupra unui indicator precis al calității SVs din pancreasul unei persoane: nivelul de **proinsulină** rămasă nesplittată, care într-o veziculă normală reprezintă <2% din proinsulina deja prezentă în reticul endoplasmic (RE). Din molecula inițială de pre-proinsulină (codificată de gena zisă a „insulinei“), compusă din 110 aminoacizi, după detașarea peptidului semnal (primii 24 de aminoacizi) rămân 86 de aminoacizi care formează proinsulină (5,6). Între transcripția genei insulinei și până la formarea SVs finale (adică „mature“), dotate cu o membrană dublă, inclusiv depozitarea lor în compartimentele de stocare, trec cca 4 ore (Fig. 1).



**FIGURA 2.** O veziculă secretorie matură tipică (A) și două vezicule secretorii mature, una dintre ele deja parțial excitată (B)

În mod normal, în acest interval de timp, întregul ansamblu format prin modificări posttranslaționale succesive (din reticul endoplasmic – RE, aparatul Golgi – GA), conținând în veziculele secretorii aproape întreaga cantitate de proinsulină care pornește din RE, trebuie să fie quasi total splitată în **insulină** și **peptid C**. Acestea sunt SVs mature în care moleculele de insulină sunt asamblate în cristale hexamerice, fiecare format din câte 6 molecule de insulină legate de 2 atomi de zinc. Depozitarea acestor microcristale este vizibilă în nucleul central al SVs intens electronodens, bine delimitat de



**FIGURA 1.** Etapele parcurse după transcripția genei preproinsulinei până la formarea de insulină și peptid C

haloul din jurul acestuia, în care au rămas toate componentele funcționale care au susținut finalizarea modificărilor denumite, în ansamblul lor, „modificări post-tranlaționale“. (Fig. 2)

Numai veziculele secretorii care au parcurs întregul ciclu de „maturare“ sunt capabile să răspundă prompt și eficient la numeroșii săi stimuli fiziologici, reprezentați nu numai de nivelul carburanților circulanți, dar și de moleculele incretinice produse în celulele L și K aflate în tractul intestinal, proximal și distal.

### Ce se întâmplă când SVs nu se maturează complet?

Veziculele secretorii rămase imature nu vor mai răspunde prompt și eficient la stimulii fiziologici menționați. În plus, viabilitatea lor va depinde de gradul disfuncției  $\beta$ -celulare care poate fi mai mare sau mică, în funcție de vârsta la care se manifestă defectul secretor  $\beta$ -celular. Cu cât o celulă  $\beta$ -pancreatică este mai disfuncțională, cu atât durata ei de supraviețuire va fi mai mică, iar diabetul va apărea la o vârstă mai tânără.

Ținând cont de numărul mare de celule  $\beta$ -pancreatice prezente în cele cca 1,5 milioane de insule

aflate într-un pancreas normal și care este de cca 3 miliarde, se poate constata că o scădere minoră (să zicem de 5.000 de celule pe zi, timp de un an), va scădea masa  $\beta$ -celulară cu numai ~2% din întreaga masa  $\beta$ -celulară totală. Prea puțin pentru a putea fi pusă în evidență prin metodele imagistice de care dispunem în prezent. Este deci evident că procesele patogenetice însoțite de pierderea de celule  $\beta$ -pancreatice sunt procese care acționează lent sau foarte lent. Acesta este motivul pentru care debutul diabetului clinic (prin hiperglicemie) atinge un maximum de incidență în jurul vârstei de 60 de ani (Fig. 3), cu toate că procesul patogenetic inițial trebuie să fi debutat cu 4-5 decenii mai înainte.

Ce se petrece în această lungă perioadă de timp nu se știe în prezent. Studiile de metabolomică publicate în ultimii ani au pus însă în evidență existența unor modificări ale concentrației plasmatice ale unor intermediari metabolici aparținând celor 3 clase de carburanți – proteici, glucidici și lipidici. Prin aceasta se aduc dovezi clare privind caracterul insidios și lent progresiv al modificărilor biochimice care caracterizează etapele precoce ale diabetogenezei. Dintre aceștia, unii aminoacizi ramificați, de exemplu, au fost identificați la descendenții din

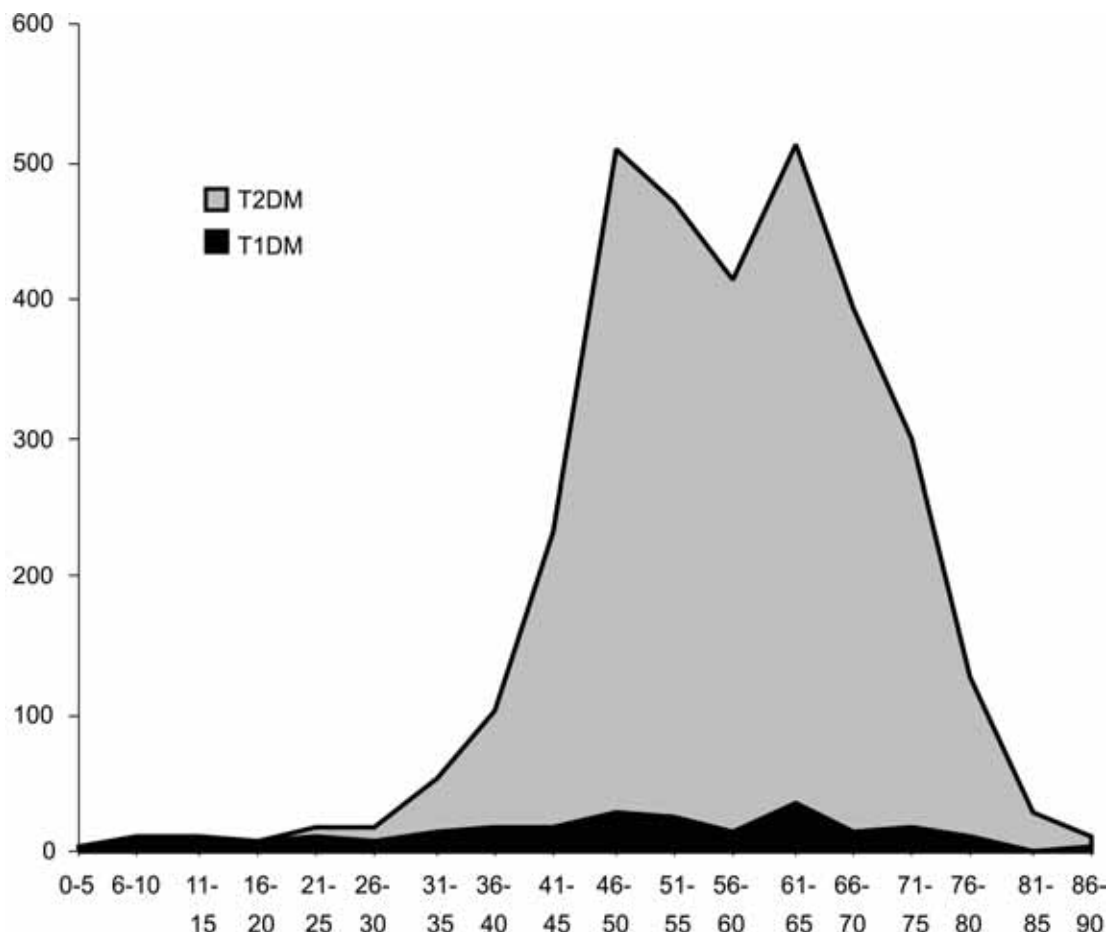


FIGURA 3. Distribuția celor două fenotipuri de diabet în populația României

părinți cu diabet zaharat, unii dintre ei dezvoltând în timp diabet zaharat (7).

Într-un studiu anatomohistologic început cu 30 de ani în urmă, în care au urmărit la microscopul optic aspectul insulelor pancreatice la pacienții decedați cu o boală cardiovasculară, aspectul insulelor era aparent normal, singura modificare găsită mai frecvent la acești pacienți fiind aceea a unei frecvențe mai mari a depozitelor amiloidice (a mărimii acestora în insule și a numărului de insule afectate).

Este un subiect pe care cardiologii ar trebui să-l preia în vederea analizei histologice a pancreasului, efectuând sistematic necropsii la pacienții nediabetici decedați în spital, dar purtători ai unor afecțiuni cardiovasculare. Ar fi de dorit, de asemenea, ca disfuncția reglării metabolice să fie apreciată prin determinarea raportului proinsulină/adiponectină (8,9), care indică deopotrivă disfuncția  $\beta$ -celulară și disfuncția adipocitară, ambele reprezentând rădăcina ascunsă a afectării vasculare cronice.

### Manifestări ale diabetului prehiperglicemic

Am menționat mai înainte *fenomenul* care stă în spatele hiperglicemiei, adică *defectul secretor  $\beta$ -celular*. Acest defect are consecințe și asupra duratei de supraviețuire a celulelor  $\beta$ -pancreatice, cu scădere progresivă, dar lentă, ca și consecință a unor defecte genetic determinate, dar dificil de identificat, pentru a înțelege mecanismul molecular aflat în spatele acestei scăderi. În multe cazuri această scădere nu atinge pragul (destul de arbitrar ales), acela de 50% din masa  $\beta$ -celulară, considerat a fi pragul dincolo de care se manifestă prin decompensarea reglării glicemice, adică prin apariția diabetului clinic manifest. Se știe, totuși, de multă vreme că boala cardiovasculară este prima cauză de deces. Ea se asociază cu modificări importante în profilul lipidelor plasmatic (10), iar studiile mai recente de metabolomică deja menționate (8) sugerează că, în ceea ce se numește „*prediabet*“, există mai mulți markeri biochimici modificați calitativ sau cantitativ, capabili să explice un efect negativ asupra endoteliului vascular, element esențial în generarea bolii vasculare. La acești bolnavi am înregistrat o creștere a proinsulinei plasmatic (11,12) indicatori extrem de importanți ai stării funcționale a celulei  $\beta$ -pancreatice. În acest context am susținut că boala cardiovasculară nu exprimă altceva decât un „*diabet prehiperglicemic*“. Să mai menționăm că, primul efect al disfuncției  $\beta$ -celulare este identificat în modificarea funcției metabolice hepatice, care prin dereglările multiple gluco-lipido-proteice

pe care le induce, va avea ca prim efect disfuncția endotelială din mai multe rețele arteriale, prima fiind cea a vaselor coronariene, în special când presiunea arterială este și ea crescută.

### Diabetul hiperglicemic: scenarii clinico-terapeutice diferite

În practica medicală curentă, diagnosticul de diabet clinic manifest este susținut de existența documentată a două valori glicemice determinate succesiv, obținute în zile diferite la aceeași persoană (cel mai adesea de vârstă mai mare), eventual supraponderală, trimisă pentru o valoare glicemică situată între 110 și 130 mg/dl. În unele cazuri, precizarea diagnosticului necesită efectuarea testului oral de încărcare cu 75 g de glucoză, în special când HbA1c determinată în diferite laboratoare se află în jurul cifrei de 5,5-6,2%.

Dintr-un lot mai mare de pacienți trimiși pentru evaluare de către medicii de familie, am analizat 129 de cazuri, la care s-a efectuat pentru precizarea diagnosticului hiperglicemia provocată oral. S-a luat în considerare valoarea glicemiei a jeun, valoarea la 2 ore, atât individual, cât și suma lor pentru a preciza raportul între această sumă și valoarea HbA1c (13). Din acești pacienți, la 70% din cazuri, la care suma celor 3 valori glicemice (0+1h+2h) a fost mai mare de 450 mg/dl, s-a putut constata în final că acesta poate fi un criteriu valabil pentru diagnosticul de diabet zaharat. Conform datelor statistice, ea corespunde cu valoarea de cut-off a HbA1c de 5,9%. Acest lucru a fost confirmat prin urmărirea acestor bolnavi timp de aproximativ 3 ani, toți rămânând cu diagnosticul de diabet zaharat tip 2 (T2D), varianta lent progresivă.

În 20% din cazuri, în care suma valorilor glicemice a fost < 350 mg/dl, diagnosticul de diabet a fost invalidat, inclusiv prin verificările făcute anual în următorii 3 ani.

În fine, la 10% din pacienți care au avut o sumă a valorilor glicemice între 350-400 mg/dl, la observațiile ulterioare, cei mai mulți dintre ei au evoluat către diabet, numai unul rămânând în următorii 3 ani în perimetrul valorilor glicemice nediabetice atât în ceea ce privește suma valorilor glicemice, cât și a valorilor HbA1c (7).

Observațiile menționate au făcut parte dintr-un grup mai mare de subiecți trimiși la Centrul de Diabet 1. Pavel de către medicii de familie cu suspiciunea de diabet, la care exista o discordanță fie între 2 sau 3 valori glicemice efectuate în timp, fie o discordanță cu valoarea HbA1c atunci când ea a fost determinată. (7)



Aceste observații au arătat că cca 98% din pacienții aflați la limita de cut-off a HbA1c de 5,9% s-au dovedit ca fiind diabetici și numai 2% au fost cazuri fals pozitive. Trebuie făcută mențiunea că și acestor bolnavi li s-a indicat modificarea stilului de viață și este posibil ca respectarea acestor indicații să fi influențat pozitiv metabolismul lor energetic.

Odată confirmat diagnosticul de diabet zaharat tip 2, se fac recomandări de dietă și mișcare fără o intervenție medicamentoasă chimică, chiar dacă în unele ghiduri este indicată administrarea unui medicament din primă linie (biguanide sau sulfonilureice). Această din urmă atitudine diminuează în mintea pacientului importanța majoră „terapeutică”, a modificării stilului de viață, care trebuie detaliat pacientului, atât în privința dietei, cât și a gradului și timpului alocat efortului fizic.

La 95% dintre acești pacienți, echilibrul metabolic s-a ameliorat pentru cel puțin 1 an în condițiile modificării stilului de viață și a administrării unui produs fitoterapic, Retinofort (extract de frunze de afin, dud alb și păstăi uscate de fasole), 1 cps/zi. În al doilea an de observație, la Retinofort a fost necesară adaugarea de Metformin 500 mg x 2cp /zi la un număr de 24 de pacienți.

Acest grup de persoane face bine legătura între *diabetul normoglicemic* și cel *hiperglicemic*. Evoluția lor diferită depinde în mare măsură de comportamentul pacientului, de stilul său de viață, la rândul său dependent de instinctul de conservare al fiecărui pacient, determinat în mare măsură respectarea sau nu a indicațiilor primite. Deși uneori pacienții prezintă a scădere în greutate, în multe cazuri greutatea se menține, iar în unele cazuri chiar se înregistrează creștere ponderală.

A treia variantă (cca 30% din cazurile înregistrate în grupul nostru de studiu) sunt cazurile care ajung la medic cu o valoare a glicemiei > 150 mg/dl sau 200 mg/dl, fără ca ei să fi avut simptome sugestive pentru diabet. La o anamneză mai atentă, setea și urinarea mai frecvente au fost considerate de persoanele respective secundare consumului crescut de apă din cursul verii. Era firesc – spunea un pacient – să urinez mai mult.

Cca 40% din cazuri se prezintă la medic pentru simptome specifice (poliurie, polidipsie, scădere ponderală, la pacienți cu exces ponderal important), dar rareori simptomatologia este aproape identică cu cea a diabetului zaharat apărut la vârste mai tinere (40 ani), și anume triada clasică: poliurie, polidipsie, polifagie cu pierdere ponderală rapidă.

## Diabetul intermediar (Intermediary Diabetes Mellitus – IDM)

Un procent de 10-15% din cazuri, având un debut între 20-40 de ani, sau chiar mai târziu la persoane fără exces ponderal important, s-ar putea încadra în ceea ce am numit „intermediary diabetes mellitus” (IDM), termen mai potrivit decât insistentul termen LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults), care nu corespunde criteriilor, diferite de la autor la autor, de încadrare în acest fenotip (6).

Ar fi interesant de știut, la fiecare pacient în parte, care este nivelul masei  $\beta$ -celulare la prima vizită și care este ritmul de scădere al acesteia de-a lungul timpului. Evaluarea funcției  $\beta$ -celulare prin probe dinamice (identificarea oscilațiilor insulino-secretorii, scăderii sau dispariției vârfului secretor insulenic) sunt tehnici laborioase incompatibile cu practica medicală curentă. Evaluarea în paralel a ariei sub curbă a glicemiei și insulinei plasmatică în cursul încărcării orale cu glucoză nu mai este necesară pentru diagnostic, dar poate fi utilă în aprecierea funcției  $\beta$ -celulare atunci când creșterea inulinemiei se distanțează mult de creșterea glicemică (12,14-19).

Există în prezent un interes crescând pentru dezvoltarea unei metode imagistice neinvazive de evaluare a masei  $\beta$ -celulare (20) și, deși s-au făcut unele progrese în această direcție, metodele nu sunt încă suficient de sensibile pentru o apreciere cantitativă a masei  $\beta$ -celulare, iar identificarea ei prin această metodă (bazată pe molecule marcate care se cuplează cu receptori  $\beta$ -celulari, precum agoniștii de GLP-1), nu oferă indicații privind calitatea acestor mase  $\beta$ -celulare astfel identificate.

Cea mai simplă metodă de identificare a disfuncției  $\beta$  celulare rămâne determinarea proinsulinei plasmatică și mai bine, a raportului proinsulină/insulină, ori și mai bine a raportului proinsulină/adiponectină (9), aceasta din urmă putând stabili cu mare precizie gradul disfuncției  $\beta$ -celulare în condițiile în care sarcina secretorie  $\beta$ -celulară este crescută datorită prezenței unui exces de țesut adipos în unul sau mai multe compartimente adipocitare.

Producerea și comercializarea unui kit de determinare a proinsulinei și adiponectinei, ar putea contribui în mod substanțial la precizarea unui diagnostic de diabet în faza lui *prehiperglicemică*, dar și la aprecierea patogeniei acestei forme de diabet, în special când avem la îndemână și celelalte investigații uzuale a jeun: glicemie, trigliceride, HDL-Col (și raportul trigliceride/HDL-Col).

Utilizarea kitului de proinsulină/adiponectină pe scară largă ar putea scădea costurile lor la un nivel

acceptabil, probabil similar cu cel al determinării glicemiei în prima parte a secolui trecut, când determinarea glicemiei era rareori efectuată. Evident această metodă ar putea fi introdusă inițial în țările

cu potențial economic mai mare, extinderea ei urmând să se facă progresiv și în alte țări, așa cum s-a întâmplat anterior și cu determinarea glicemiei sau a altor metode de diagnostic.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Scearce L.M., Brestelli J.E., McWeeney G.K. și col.:** Functional genomics of endocrine pancreas: the pancreas clone set and PancChip, new resources for diabetic research. *Diabetes*, 51:1997-2004, 2002.
2. **Todd J.A.** Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 32:457-467, 2010
3. **Guja C.,** Genetica Tipului 1 de Diabet, Ed Ilex, Bucuresti, 2012
4. **Orci L.** The insulin factory: a tour of the plant surroundings and a visit to the assembly line. *Diabetologia* 28:528-546, 1985
5. **Ionescu-Tirgoviste C.** Proinsulin as the possible key in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Acta Endocrinologica* (Buc), 5, 233-249, 2009
6. **Ionescu-Tirgoviste C.** To limit the black and white view on diabetes. *Acta Endo* (Buc) 4: 597-604, 2013
7. **Bain J.R., Stevens D.R., Wenner R.B., Ilkayeva O., Muoio M.D., Newgard B.C.** Metabolomics applied to diabetes research: moving from information to knowledge. *Diabetes* 58: 2429-2443, 2009
8. **Ionescu-Tirgoviste C., Vasilescu R., Timar R., Guja C., Gagniuc P., Bacanu E., Gligor R., Carniciu S.** The proinsulin-to-adiponectin ratio could be the best practical indicator of the early (prehyperglycaemic) phase of type 2 diabetes. *Adipobiology* 4:41-50, 2012.
9. **Ionescu-Tirgoviste C., Gagniuc P.A., Guja C.** A Challenge for the Autoimmune Diabetogenic Mechanism in Type 1 Diabetes? *Acta Endo* (Buc) 10: 317-328, 2014
10. **Mincu I., Ionescu-Tirgoviste C., Cheța D., Georgesco M.** Etude sur les hyperlipoproteinemies dans le diabete sucre. (Journées annuelles de diabetologie de l'Hotel-Dieu 12-14 mai 1977. Flammarion Medecine - Sciences p. 210-227.
11. **Vasilescu R., Ionescu-Tirgoviste C.** Relația dintre adipokine, markeri inflamatori, scăderea sensibilității la insulină și eliminarea urinară de albumină la subiecți nediabeteici, *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat.*, Iași - 2011- vol 115, nr. 4
12. **Kronborg J., Johnson S.H., Njølstad I. et al.** Proinsulin: insulin and insulin: glucose ratios as predictors of carotid plaque growth: a population based 7 year follow-up of the Tromsø Study. *Diabetologia* 50:1607-1614, 2007
13. **Diana Simona Ștefan, Augustina Ilinoiu, Simona Carniciu, Liliana Mardare, Constantin Ionescu-Tirgoviste.** Determinarea limitei cut-off pentru HbA1c în funcție de suma valorilor glicemice după încărcarea orală cu glucoza.
14. **Michael D.J., Xiong W., Geng X., Drain P., Chow R.H.** Human insulin vesicle dynamics during pulsatile secretion. *Diabetes* 56:1277-1288, 2007
15. **Ionescu-Tirgoviste C., Ioacara S., Guja C., Mota M., Mihai A., Lichiardopol R., Apetrei E.** Insulin resistance and metabolic syndrome in an adult Romanian population *Diabetes & Vascular Disease Research* 4 (Suppl.1) S75, 2007
16. **Ionescu-Tirgoviste C., Guja C., Vladica M., Ioacara S., Mihai A., Florea L., Bulgar A., Guja L.** The relationship between proinsulin level and body mass index in various diabetic phenotypes, including obesity and the metabolic syndrome. *Diabetes & Vascular Disease Research* 4 (Suppl.1) S 109, 2007
17. **Ionescu-Tirgoviste C., Guja C.** The various phenotypes of diabetes and the endoplasmic reticulum of the beta cell. *Rom J Intern Med.* 45(3):287-91; 2007
18. **Despa F., Ionescu-Tirgoviste C.** Accumulation of toxic residues in  $\beta$ -cells can impair conversion of proinsulin to insulin via molecular crowding effects. *Proc. Rom. Acad. Series B*, 3:225-233, 2007
19. **Rorsman P., Renstrom E.** Insulin granule dynamics in pancreatic  $\beta$  cells. *Diabetologia* 46:1029-1045, 2003
20. **Brom M., van der Weg W.W., Joosten Lieke et al.** Non-invasive quantification of the  $\beta$ -cell mass by SPECT with 111 In-labelled exendin. *Diabetologia* 57: 950-951, 2014