



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA



**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA**

**“EFFETTO DELL'ATTIVITA' FISICA SULLA SECREZIONE E  
CINETICA DELL'INSULINA IN INDIVIDUI SANI NORMOPESO”**

**Relatore: Dott. Michele Schiavon**

**Laureanda: Caterina Galafati**

**ANNO ACCADEMICO 2023 – 2024**

**Data di laurea: 19 Marzo 2024**



# Indice:

1. Introduzione .....	1
1.1 Sistema di regolazione glucosio-insulina .....	1
1.2 La funzione beta cellulare e l'insulina .....	2
1.3 Effetto dell'esercizio fisico sulla sensibilità all'insulina.....	4
1.4 Obiettivo della tesi.....	6
2. Database e protocollo sperimentale .....	8
2.1 Database .....	8
2.2 Protocollo sperimentale.....	9
2.3 Dati .....	10
3. Metodi .....	12
3.1 Modello Minimo Orale del C-peptide e Insulina .....	12
3.1.1 Modello Minimo Orale del C-peptide .....	12
3.1.2 Modello Minimo dell'Insulina .....	15
3.2 Stima parametrica.....	18
3.3 Modelli testati a confronto .....	21
3.4 Analisi Statistica.....	22
4. Risultati .....	22
4.2 Identificazione 1 .....	23
4.2 Identificazione 2 .....	29
4.3 Identificazione 3 .....	36
4.4 Selezione del modello .....	43
5 Conclusioni .....	44
6 Bibliografia .....	45



# Sommario:

In questa tesi è stato valutato l'effetto dell'esercizio fisico sulla secrezione e cinetica dell'insulina in soggetti sani normopeso. Per fare questo è stato utilizzato un database composto da 18 soggetti sani e normopeso. Questi soggetti sono stati sottoposti a tre visite in cui hanno effettuato un pasto controllato (cena) e, a seconda della visita, hanno svolto o meno esercizio fisico. In particolare, in una visita non è stato svolto esercizio fisico prima o dopo il pasto controllato, in un'altra visita è stato svolto esercizio fisico mattutino prima del pasto studiato, e in un'altra visita è stato svolto esercizio fisico serale, dopo il pasto studiato.

Da queste visite sono stati estratti i dati di concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina e C-peptide che sono stati usati come input e output di un modello di letteratura della secrezione e cinetica dell'insulina per identificare l'effetto dell'esercizio fisico, se presente, sui parametri del modello. Si sono svolte tre identificazioni diverse per determinare quali parametri fossero più o meno affetti dall'esercizio fisico. È stata in seguito selezionata l'identificazione che rappresentasse il miglior compromesso tra l'aderenza ai dati e la complessità del modello. Infine si è svolta un'analisi statistica sui parametri chiave del modello, attraverso un test ANOVA per misure ripetute, al fine di studiare le possibili differenze nelle tre visite, dalla quale però non sono emerse significatività statistiche rilevabili nel dataset oggetto di studio.





# Capitolo 1: Introduzione

## 1.1 Sistema di regolazione glucosio-insulina

Il sistema di regolazione glucosio-insulina è un meccanismo fisiologico di vitale importanza per il normale funzionamento del corpo umano, infatti permette all'intero organismo di avere l'apporto di glucosio necessario al suo funzionamento.

Il metabolismo, definito come l'insieme delle reazioni chimiche nell'organismo, è ciò che determina come vengono utilizzati i nutrienti assorbiti dopo il pasto. Il metabolismo è diviso in due stati, lo stato di sazietà o assimilativo (anabolico) che rappresenta il periodo susseguente al pasto in cui i nutrienti ottenuti dalla digestione vengono assorbiti, usati e accumulati e lo stato di digiuno o post-assimilativo (catabolico) che rappresenta il periodo in cui i nutrienti non sono più presenti in circolo. Di conseguenza nello stato di digiuno l'organismo utilizza le riserve accumulate nello stato di sazietà per mantenere la glicemia a livelli accettabili. [1]

Tra le varie biomolecole assorbite, i carboidrati sono convertiti prevalentemente sotto forma di glucosio, la cui concentrazione è la più strettamente regolata fra i nutrienti. Questo perché è il solo nutriente che il sistema nervoso possa usare direttamente, eccetto in condizioni di digiuno prolungato. Nel caso in cui nell'organismo sia presente un eccesso di glucosio, esso viene accumulato sotto forma di glicogeno e lipidi, formando così le riserve usate nello stato di digiuno. [1]

Per controllare il cambiamento del metabolismo tra lo stato di digiuno e quello di sazietà è importante l'utilizzo di enzimi diversi per la catalizzazione delle reazioni chimiche per la trasformazione del glucosio in glicogeno e le reazioni inverse. Tramite questo duplice controllo (anche definito controllo push-pull) viene regolata la direzione delle reazioni. L'attività degli enzimi menzionati in precedenza può essere modulata attraverso ormoni. In particolare, l'insulina è l'ormone pancreatico utilizzato per la riduzione dei livelli di glucosio nel sangue, specialmente durante lo stato di sazietà e/o iperglicemia, mentre il glucagone è l'ormone pancreatico utilizzato per l'aumento dei livelli di glucosio nel sangue, specialmente durante lo stato di digiuno e/o di ipoglicemia. L'insulina stimola gli enzimi che promuovono la glicogenosintesi (reazioni che trasformano glucosio in glicogeno) ed inibisce quelli della glicogenolisi (reazioni che producono glucosio dal glicogeno), mentre il glucagone stimola gli



enzimi della glicogenolisi e inibisce quelli della glicogenosintesi. In un individuo con metabolismo normale, la glicemia a digiuno è mantenuta a circa 90 mg/dL.[1] Nel momento in cui la concentrazione di glucosio plasmatico diminuisce sotto i 100 mg/dL la secrezione di glucagone aumenta notevolmente.

Il glucosio rappresenta il substrato primario per la produzione di ATP (adenosina trifosfato), che attraverso l'idrolisi ad ADP fornisce alla cellula l'energia per svolgere molte delle sue funzioni. Il glucosio inizialmente viene assorbito dall'intestino per poi entrare nel fegato attraverso la circolazione portale ed infine nei tessuti periferici. Il fegato, ne metabolizza circa il 30%, mentre il rimanente 70% in circolo raggiunge invece la circolazione periferica, tra cui il tessuto nervoso, i muscoli ed altri tessuti. Il glucosio poi esce dal circolo, spostandosi dal liquido interstiziale all'interno delle cellule attraverso i trasportatori di membrana GLUT. L'accumulo di glicogeno, principalmente situato nel fegato, rappresenta la fonte di glucosio più prontamente disponibile. Il fabbisogno energetico dell'organismo può essere coperto dal glicogeno nel sangue per circa 4-5 ore.[1]

## **1.2 La funzione beta cellulare e l'insulina**

Come scritto nel paragrafo precedente, la regolazione delle vie metaboliche avviene principalmente attraverso ormoni. Nella regolazione a lungo termine sono coinvolti molti ormoni, ma la regolazione istante per istante è essenzialmente dipendente dal rapporto tra insulina e glucagone che agiscono in antagonismo per mantenere le concentrazioni plasmatiche di glucosio nel range di normalità. Entrambi questi ormoni hanno un'emivita breve (4-6 minuti) quindi devono essere secreti continuamente per poter compiere un'azione longeva. Questi due ormoni sono secreti dalle isole di Langerhans, che sono agglomerati di cellule endocrine sparse nel parenchima pancreatico corrispondenti a circa il 2% della totale massa del pancreas. Le isole si trovano strettamente associate ai capillari e contengono quattro tipi di cellule: cellule  $\beta$ , cellule  $\alpha$ , cellule  $\delta$  e cellule  $\gamma$ . Le cellule  $\beta$ , che producono insulina ed amilina, rappresentano il 75% delle cellule delle isole (Fig. 1). Le cellule  $\alpha$ , che invece corrispondono a circa il 20% delle cellule delle isole, producono il glucagone. Le cellule rimanenti sono cellule  $\delta$  che producono somatostatina e cellule  $\gamma$  che producono polipeptide pancreatico.[1]

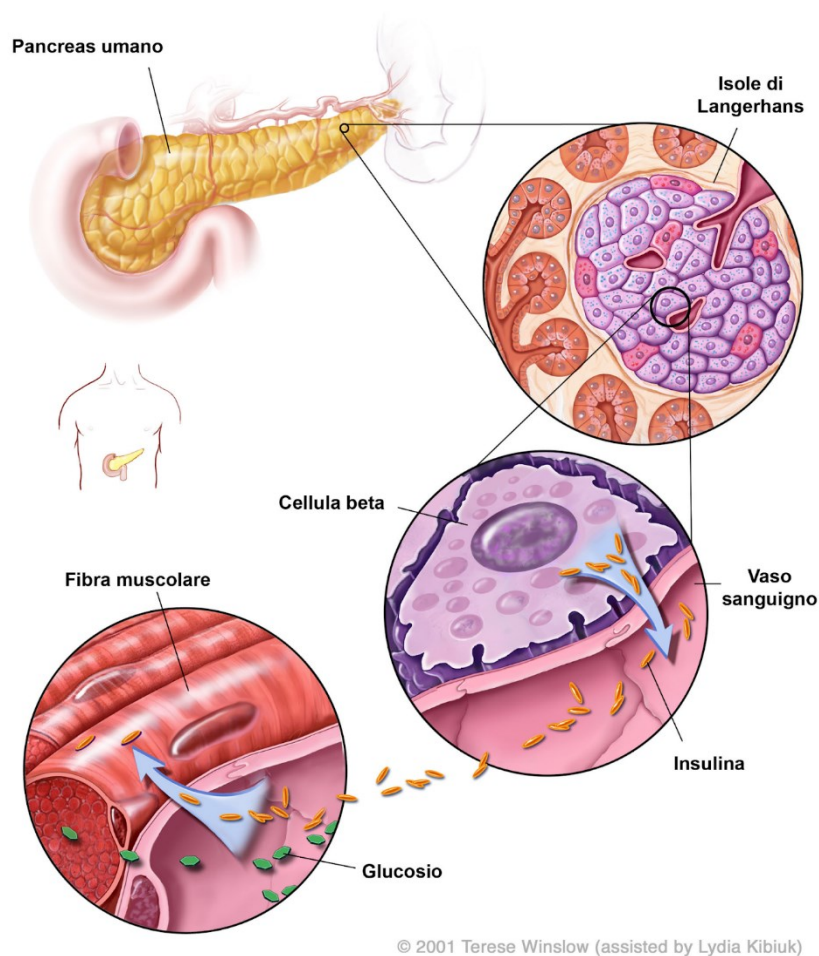


Figure 1: rappresentazione delle isole di Langerhans e beta-cellule [2]

Il primo precursore dell'insulina è il peptide preproinsulina, composto da ben 110 aminoacidi, il quale con l'aiuto della ribonucleoproteina citosolica (SRP) attraversa la membrana del reticolo endoplasmatico ruvido. Questo processo avviene attraverso il canale di conduzione del peptide dove attraverso una scissione di una parte della preproinsulina viene prodotta la proinsulina. Attraverso un processo che richiede una vasta gamma di proteine chaperone la proinsulina assume una conformazione tridimensionale ed in seguito viene trasportata dal reticolo endoplasmatico all'apparato del Golgi. Qui la proinsulina entra nelle vescicole secretorie non ancora mature e viene scissa producendo insulina e C-peptide. [3]

Si può quindi notare che il C-peptide viene rilasciato nel circolo sistemico in quantità equimolare all'insulina. Per questo la concentrazione plasmatica C-peptide ci può fornire una rappresentazione della secrezione di insulina da parte delle beta-cellule.

L'insulina è un ormone peptidico che viene prodotto come proormone inattivo e in seguito viene attivato prima della secrezione. Lo stimolo principale del rilascio di insulina è la

concentrazione plasmatica di glucosio. In genere la secrezione di insulina avviene quando la concentrazione di glucosio supera i 100 mg/dL. In particolare, il glucosio assorbito nell'intestino tenue raggiunge le cellule beta che lo captano attraverso i trasportatori GLUT-2. A causa dell'aumento del glucosio intracellulare vi è un aumento della sintesi di ATP, in seguito al quale si chiudono i canali  $K^+$  controllati da ATP causando la depolarizzazione della cellula, quindi i canali voltaggio-dipendenti del  $Ca^{+2}$  si aprono e l'ingresso di  $Ca^{+2}$  dà il via all'esocitosi dell'insulina. Il rilascio di insulina può essere inoltre stimolato da altri fattori come l'aumento della concentrazione di aminoacidi e l'aumento di attività parasimpatica diretta al tratto gastrointestinale ed al pancreas sia durante che dopo un pasto. Al contrario la secrezione di insulina viene inibita dall'attività simpatica, che per esempio aumenta nei momenti di stress. Un altro fattore importante per la stimolazione del rilascio di insulina è rappresentato dalle incretine GLP-1 e GIP, prodotte dall'ileo e dal duodeno in seguito all'ingestione di cibo. Infatti esse raggiungono la beta cellula prima dello stimolo del glucosio causando un rilascio anticipato di insulina che impedisce un improvviso aumento della glicemia nella fase di assorbimento dei nutrienti.[1]

I bersagli principali dell'insulina sono il fegato, il tessuto adiposo ed il muscolo scheletrico, le cui cellule come tipica risposta incrementano il metabolismo del glucosio. L'insulina abbassa la glicemia attraverso 4 meccanismi: attivando l'ingresso di glucosio nelle cellule insulino-sensibili, aumentando l'utilizzo e l'accumulo cellulare del glucosio, incrementando l'utilizzo degli aminoacidi e favorendo la sintesi dei grassi. [1]

### **1.3 Effetto dell'esercizio fisico sulla sensibilità all'insulina**

L'esercizio fisico può essere considerato uno strumento utile per combattere l'insulino-resistenza.[4] Con il termine insulino-resistenza si indica l'incapacità di una quantità di insulina (endogena o esogena) di far aumentare l'assorbimento e l'utilizzo del glucosio in un individuo quanto lo faccia in condizioni normali. Il processo molecolare che porta a questa condizione non è ancora noto. Solitamente l'insulino-resistenza occorre in pazienti che soffrono di "sindrome metabolica", nella quale l'insulino-resistenza è accompagnata da una serie di anomalie cardiovascolari e metaboliche.[5]

Per studiare gli effetti anatomici e/o fisiologici dell'esercizio fisico sull'organismo umano bisogna considerare sia gli effetti cronici che gli effetti acuti. In particolare, l'effetto

dell'esercizio fisico sulla sensibilità all'insulina è per lo più basato su un effetto acuto prolungato (PAE). [4]

È stato dimostrato da diversi studi che l'effetto acuto dell'esercizio fisico porta a miglioramenti nella tolleranza al glucosio e nella sensibilità all'insulina. Infatti, un singolo allenamento ad intensità moderata può aumentare l'assorbimento del glucosio di almeno il 40%. Questo è supportato dal fatto che, quando persone che svolgono abitualmente attività fisica smettono di allenarsi la loro sensibilità all'insulina diminuisce rapidamente.[5]

L'effetto acuto dell'esercizio fisico ha inizio durante l'esercizio stesso, attraverso l'aumento dell'assorbimento di glucosio da parte del muscolo scheletrico a causa della contrazione. Infatti durante la contrazione vi è un aumento della perfusione e della capillarizzazione del tessuto, indotta dall'esercizio, che permette un aumento dell'assorbimento di glucosio [4]. Si può inoltre notare come l'assorbimento del glucosio nel muscolo scheletrico in contrazione non dipenda dall'insulina. In particolare durante una contrazione i trasportatori di glucosio GLUT-4 vengono traslocati nella membrana cellulare aumentando di conseguenza l'assorbimento del glucosio anche in assenza di insulina. Questo meccanismo non è ancora noto nel particolare ma si sospetta che ioni  $Ca^{2+}$  e diverse proteine intracellulari siano coinvolte.[1] Attraverso questo meccanismo si raggiunge un assorbimento di glucosio che, a seconda del tipo di fibra muscolare, può anche superare l'assorbimento che si osserverebbe in risposta ad uno stimolo massimale da parte dell'insulina.

L'effetto acuto dell'esercizio fisico sulla sensibilità all'insulina include sia la fase iniziale appena descritta, che può durare fino a circa 30 min dal termine dell'esercizio, sia un effetto più duraturo, il quale può persistere fino a 72 ore dal termine dell'esercizio. In alcune situazioni, di conseguenza, l'effetto acuto può portare ad ottenere delle informazioni fuorvianti sullo stato di salute del soggetto. Questo può accadere, per esempio, se un soggetto normalmente sedentario svolge esercizio fisico prima di una visita medica come un test da carico orale di glucosio (OGTT). Infatti, in tale test, l'effetto acuto prolungato sulla sensibilità all'insulina potrebbe mascherare una lettura elevata in quanto l'effetto acuto non è 'continuo' nel tempo come invece lo sarebbe per un soggetto che svolge attività fisica abitualmente. Per questo se invece fosse una persona allenata a fare esercizio prima della visita la rappresentazione sarebbe accurata.[4]

Come scritto precedentemente, il PAE risulta essere l'effetto predominante in termini di sensibilità all'insulina. Da questo effetto traggono maggior beneficio soggetti che non

praticano esercizio abitualmente e soggetti con minore sensibilità all'insulina; ma anche soggetti allenati, aventi un'elevata sensibilità all'insulina, ne traggono beneficio. Infatti, possono recuperare la maggior parte della perdita indotta da un periodo in cui non viene fatto allenamento dopo una sola sessione di esercizio. [4]

La sensibilità all'insulina è inoltre migliorata dalla perdita di peso associata all'esercizio fisico, di conseguenza l'effetto acuto dell'esercizio fisico può essere amplificato dalla diminuzione del grasso corporeo.[5]

È possibile che in soggetti con 'sindrome metabolica' l'effetto cronico dell'esercizio fisico dipenda più dalla perdita di peso correlata all'esercizio che da quest'ultimo. Quindi per soggetti a rischio che non necessitano di o non possono perdere peso il PAE potrebbe essere l'unico effetto benefico dell'esercizio sulla sensibilità all'insulina.[4]

Quindi considerando quanto detto finora e il fatto che un esercizio moderato riduce la morbilità e la mortalità associata alle malattie cardiovascolari e al diabete, si può pensare che l'esercizio rappresenti una forma di terapia efficace contro la resistenza all'insulina e migliori la qualità della vita dei pazienti [5].

In particolare, possono essere prescritti determinati esercizi fisici, mirati a suscitare un PAE dell'esercizio, come alternativa ad un trattamento farmaceutico oppure in aggiunta ad esso, in casi in cui il trattamento sia necessario.[4]

Tuttavia, al momento, non è noto se l'esercizio fisico abbia degli effetti sulla secrezione e cinetica dell'insulina. Questi possibili effetti sono proprio quello che ci si propone di indagare in questa tesi.

## **1.4 Obiettivo della tesi**

L'obiettivo di questa tesi è valutare se e come l'esercizio fisico può avere impatto sulla secrezione e cinetica dell'insulina, in un gruppo di soggetti sani e normopeso, partendo dalle concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina e C-peptide ottenute in tre visite diverse. In particolare in tre giorni differenti i soggetti hanno consumato dei pasti specifici ad orari fissati e a seconda della visita hanno svolto o meno esercizio fisico a particolari orari. Nella visita NO EX i soggetti non hanno svolto attività fisica, in quella AM EX hanno svolto attività fisica mattutina e in quella PM EX hanno svolto attività fisica nella serale.

A tale fine si utilizzeranno dei modelli matematici basati su sistemi di equazioni differenziali descrittivi i processi fisiologici che governano il sistema di secrezione e cinetica dell'insulina in funzione della concentrazione di glucosio. In particolare verranno stimati, attraverso i metodi descritti nel capitolo 3, i parametri chiave della secrezione e cinetica dell'insulina in tre diverse condizioni sperimentali. Al termine i valori ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali verranno confrontati al fine di comprendere il possibile impatto dell'esercizio fisico su queste componenti.

# Capitolo 2:

# Database e protocollo

# Sperimentale

## 2.1 Database

In questa tesi è stato utilizzato parte del database proveniente da uno studio condotto a livello internazionale per valutare l'effetto di esercizio fisico svolto in diverse ore della giornata (mattina e sera) sulla glicemia notturna e al risveglio [6], costituito da 54 soggetti suddivisi in tre gruppi in base al peso e alla tolleranza al glucosio. Il primo gruppo è composto da 18 soggetti normopeso e sani (Non-Ob), il secondo da 18 soggetti obesi e sani (Ob) ed il terzo da 16 soggetti obesi con glucosio elevato a digiuno (Ob+IFG). Tutti i soggetti sono in età tra i 25 e i 65 anni, non fumano, non hanno subito alcun intervento chirurgico per perdere peso e il loro peso è stabile. Le donne partecipanti allo studio che assumevano la pillola anticoncezionale hanno sostenuto le visite nel periodo di assunzione della pillola. Sono state escluse dallo studio donne incinte.[6]

I dati demografici e antropometrici del database sono citati nella tabella sottostante sotto forma di media  $\pm$  deviazione standard (SD).

	OBESI SANI	OBESI IFG	MAGRI SANI
Età (anni)	42,5 $\pm$ 14,8	54,6 $\pm$ 5,5	45,7 $\pm$ 15,4
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	33,8 $\pm$ 4,4	33,5 $\pm$ 5,3	24,4 $\pm$ 2,0
Altezza (cm)	168,7 $\pm$ 9,3	167,6 $\pm$ 9,2	168,5 $\pm$ 8,7
Peso (kg)	95,8 $\pm$ 9,3	94,3 $\pm$ 17,2	69,6 $\pm$ 9,6
LBM (kg)	53,3 $\pm$ 12,6	51,2 $\pm$ 9,7	50,2 $\pm$ 10,0

Tabella 1: Dati demografici ed antropometrici del database [6]

Fra tutti i soggetti del database ci focalizzeremo sul primo gruppo tra quelli citati in precedenza, ovvero i soggetti magri sani, ossia aventi un BMI (indice di massa corporea)

inferiore a 26 kg/m<sup>2</sup>. Questi soggetti durante lo studio non assumevano farmaci ipoglicemizzanti e pochi assumevano statine o antidepressivi. [6]

## 2.2 Protocollo sperimentale

I soggetti, prima della fase di studio, sono stati sottoposti ad una fase di test e screening che comprendeva questionari, un test da carico orale di glucosio (OGTT) e una prova sotto sforzo. Inoltre, nei tre giorni precedenti ad un giorno di studio sono stati monitorati sia la loro dieta che il loro sonno. Per le 24 ore prima di una visita i soggetti non hanno consumato alcol e non hanno praticato esercizio fisico.

Durante il giorno di studio, ai soggetti sono stati serviti pasti specifici ad orari fissati. In particolare, la colazione alle 7:00-8:00, il pranzo alle 12:00-13:00 e la cena alle 18:00 e, in particolare, proprio da quest'ultima provengono i dati utilizzati nella tesi. La cena consisteva in un pasto contenente 10 kcal/kg di peso corporeo con 1g/kg di carboidrati (fino ad un massimo di 90 g per i soggetti Ob e Ob+IFG) con composizione pari a 40% carboidrati, 35% grassi e 25% proteine.

Terminata la cena, i soggetti hanno dormito dalle 22:00 alle 06:30 ed il loro sonno è stato monitorato. Sono stati estratti campioni di sangue dalle 17:40 alle 07:00. Durante la notte alle 1:00 è stato somministrato un bolo endovenoso (IV) di glucosio [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] seguito da un'infusione continua di glucosio [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] per 6 ore per calcolare la produzione endogena di glucosio (EGP).

Ogni soggetto è stato sottoposto a tre visite in diverse condizioni: nessun esercizio (NO EX), esercizio mattutino (AM EX) ed esercizio serale (PM EX). Nel caso della visita NO EX i soggetti non hanno praticato esercizio fisico nelle 48 ore precedenti alla notte in cui si sono svolte le misure. Diversamente nelle altre due visite i soggetti hanno svolto una camminata controllata su tapis roulant di 45 min al 60% di VO<sub>2</sub>max, rispettivamente alle ore 7:00 (AM EX) e alle ore 20:00 (PM EX). Tra un giorno di studio e l'altro sono state fatte trascorrere almeno tre settimane (Fig.2).[6]



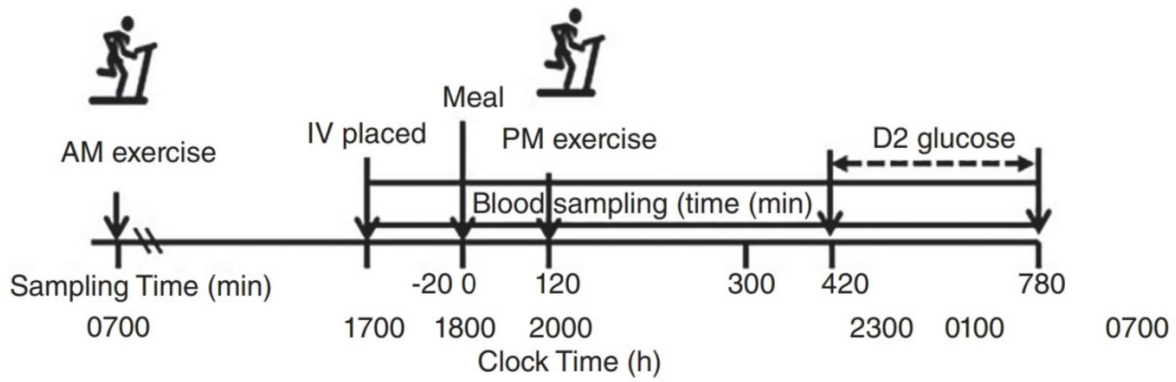
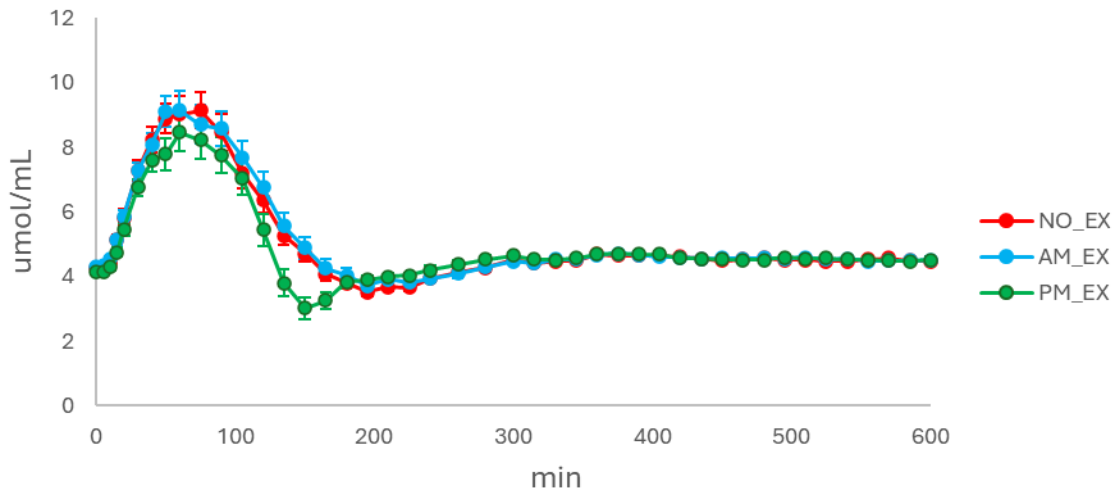


Figura 2: protocollo sperimentale [6]

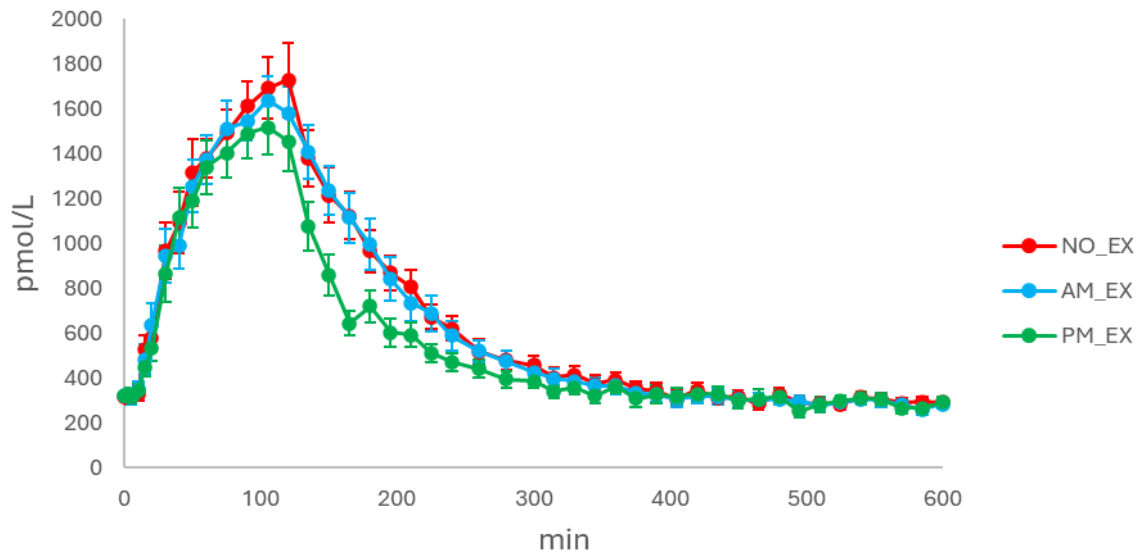
## 2.3 Dati

Come scritto precedentemente in questa tesi ci si focalizza sulle tre visite (NO EX, AM EX e PM EX) del gruppo di soggetti sani e normopeso. In particolare, verranno analizzati i dati di concentrazione plasmatica di glucosio, C-peptide ed insulina durante la cena delle tre visite (NO EX, AM EX, PM EX). Vengono riportati di seguito grafici rappresentati i dati di glucosio, C-peptide ed insulina del gruppo di soggetti considerato (Fig. 3).

### Dati Glucosio



### Dati C-peptide



### Dati insulina

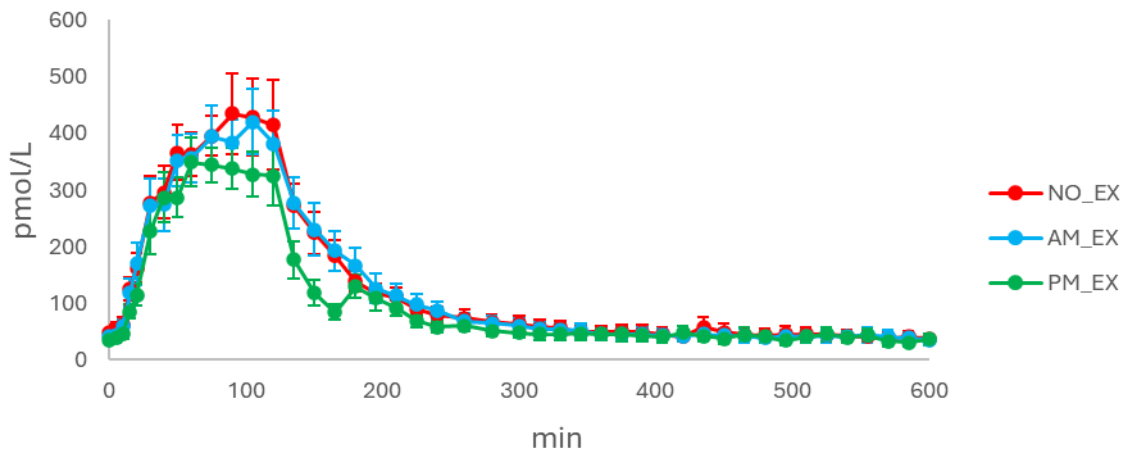


Figure 3: Concentrazioni plasmatiche medie di glucosio, C-peptide ed insulina nelle tre visite con barre d'errore rappresentanti i relativi errori standard (SE).

# Capitolo 3: Metodi

## 3.1 Modello Minimo Orale del C-peptide e Insulina

In questa tesi verranno utilizzati dei modelli matematici che descrivono la secrezione e cinetica dell'insulina e del C-peptide attraverso sistemi di equazioni differenziali, in tal modo questi modelli già testati e validati in letteratura, permettono di quantificare parametri normalmente non accessibili alla misura, se non mediante metodi più complessi ed invasivi, e/o non eticamente misurabili in soggetti umani.

In particolare sarà adoperato il come Modello Minimo Orale del C-peptide (OCMM), utilizzato per la quantificazione della secrezione insulinica (o funzione beta-cellulare), con l'aggiunta del Modello Minimo dell'Insulina (MMI), utilizzato per la quantificazione della cinetica ed estrazione epatica dell'insulina.

Questi modelli appartengono alla classe dei modelli compartimentali. Questo tipo di modelli si basa sul principio dell'equilibrio di massa, e sono formati da una quantità finita di compartimenti con specifiche interconnessioni rappresentanti flussi di materia (trasporto e/o trasformazione chimica). I compartimenti rappresentano siti in cui il materiale o sostanza sotto studio è assunta distribuita in modo omogeneo (ossia due misure differenti prese nello stesso istante e nello stesso compartimento sono ugualmente rappresentative) e si comporta in modo cinematicamente omogeneo (ossia ogni particella della sostanza sotto studio ha la stessa probabilità di seguire una delle possibili strade che consentono di lasciare il compartimento).

### 3.1.1 Modello Minimo Orale del C-peptide

Il Modello Minimo Orale del C-peptide (Fig. 4) è un modello che permette di descrivere la secrezione e cinetica del C-peptide nell'organismo umano durante un test del pasto misto, di conseguenza ci permette di stimare l'andamento della concentrazione plasmatica del C-peptide.

## C-PEPTIDE MINIMAL MODEL

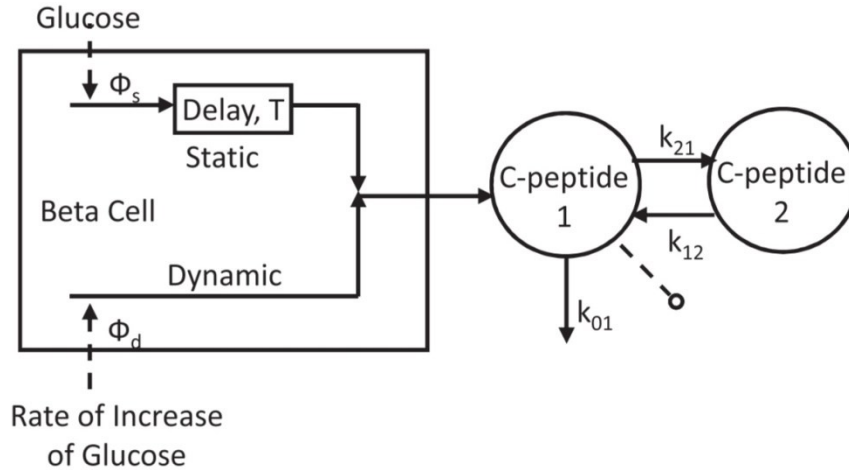


Figura 4: rappresentazione schematica del modello [7]

L'output del modello è, come accennato in precedenza, l'andamento della concentrazione plasmatica del C-peptide ottenuta usando come input l'andamento della concentrazione plasmatica del glucosio e la sua velocità di aumento (derivata non negativa), supposte note e prive di errore.

Le equazioni differenziali che compongono il modello sono:

$$\begin{cases} \dot{CP}_1 = -(k_{01} + k_{21}) \cdot CP_1(t) + k_{12} \cdot CP_2(t) + SR(t) & CP_1(0) = 0 \\ \dot{CP}_2 = -k_{12} \cdot CP_2(t) + k_{21} \cdot CP_1(t) & CP_2(0) = 0 \\ SR(t) = SR_s(t) + SR_d(t) \end{cases} \quad \text{Eq.1}$$

Dove:

- $CP_1$  e  $CP_2$  (pmol/L) rappresentano le concentrazioni over-basal di C-peptide rispettivamente nel compartimento accessibile e in quello periferico.

- $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) rappresentano i parametri relativi alla cinetica del C-peptide.

- $SR$  (pmol/L/min) esprime la secrezione over-basal di C-peptide normalizzata per il volume di distribuzione del compartimento accessibile. Corrisponde quindi alla secrezione normalizzata di insulina oltre il livello basale, dato che le beta-cellule producono la stessa quantità (equimolare) di C-peptide ed insulina.

SR ha due componenti, una componente dinamica (SRd) proporzionale al rateo di incremento del glucosio e una componente statica (SRs) rappresentante la riserva di insulina pronta al rilascio (Y(t)). Tale rilascio si verifica dopo un ritardo  $T = 1/\alpha$ . In formule:

$$\begin{aligned} SR_s(t) &= Y(t) \\ \dot{Y}(t) &= -\alpha \cdot [Y(t) - \beta \cdot (G(t) - h)] & Y(0) &= 0 \end{aligned} \quad \text{Eq.2}$$

Come si può notare dalla formula, SRs è controllata dalla concentrazione plasmatica di glucosio (G). SRs, inoltre, tende ad uno stato stazionario con costante di tempo pari a T. Si può infine notare che se la concentrazione di glucosio supera un certo livello di soglia h (mmol/L), lo stato stazionario è linearmente legato alla concentrazione di glucosio dal termine  $\beta$  ( $\text{min}^{-1}$ ).

SRd rappresenta invece la secrezione di insulina pronta al rilascio ed è proporzionale alla velocità di incremento del glucosio secondo il parametro  $k_d$  (adimensionale). Si può notare che questa componente è presente solo in caso di incrementi (derivata non negativa) della concentrazione di glucosio.

$$SR_d(t) = \begin{cases} k_d \cdot \dot{G}(t) & \text{se } \dot{G}(t) > 0 \\ 0 & \text{se } \dot{G}(t) \leq 0 \end{cases} \quad \text{Eq.3}$$

Definendo  $CP_{1b}$  la concentrazione basale di C-peptide nel compartimento accessibile si può calcolare la secrezione basale di insulina come:

$$SR_b = k_{01} \cdot CP_{1b} \quad \text{Eq.4}$$

Dal modello si possono inoltre identificare gli indici di reattività delle beta-cellule al glucosio  $\Phi_d$  (indice dinamico),  $\Phi_s$  (indice statico) e  $\Phi_b$  (indice basale):

$$\Phi_s = \beta \quad \Phi_d = k_d \quad \Phi_b = SR_b / G_b \quad \text{Eq.5}$$

È inoltre possibile definire un indice di reattività beta-cellulare al glucosio totale  $\Phi_{tot}$ .

$$\Phi_{tot} = \frac{\int_0^{\tau} [SR(t) + SR_b] dt}{\int_0^{\tau} G(t) dt} = \frac{\Phi_d \cdot (G_{max} - G_b) + \Phi_s \cdot \int_0^{\tau} [G(t) - h] dt + T \cdot \Phi_b \cdot G_b}{\int_0^{\tau} G(t) dt} \quad \text{Eq.6}$$

Dove  $\tau$  è il tempo in minuti dopo cui si assume che il sistema sia tornato allo stato stazionario dopo la perturbazione.

$\Phi_s$ ,  $\Phi_d$ ,  $T$  sono parametri macrofisiologici, ma possono avere un'interpretazione cellulare. In particolare,  $\Phi_d$  è legato all'esocitosi dell'insulina ad opera delle vescicole secretorie,  $\Phi_s$  riflette la traslocazione e maturazione dei grani di glucosio, e  $T$  rappresenta il ritardo tra la secrezione dell'insulina e lo stimolo del glucosio che permette la mobilitazione dei grani. [7]

### 3.1.2 Modello Minimo dell'Insulina

Un passo fondamentale per completare la descrizione della cinetica dell'insulina consiste nel quantificare la sua estrazione epatica (HE). Infatti l'insulina ed il C-peptide vengono rilasciati dalle beta-cellule nella stessa quantità (equimolare) in vena porta, passando poi attraverso il fegato che estrae e metabolizza circa il 50% dell'insulina secreta, mentre la concentrazione di C-peptide non viene alterata, infine poi raggiungendo la circolazione periferica.

Al fine di ottenere la frazione di insulina estratta dal fegato HE (%), risulta necessario quantificare simultaneamente il tasso di secrezione pancreatica dell'insulina (ISR misurato in pmol/min) ed il tasso di rilascio dell'insulina (IDR misurato in pmol/min) nel plasma dopo il suo passaggio attraverso il fegato:

$$HE(t) = \frac{ISR(t) - IDR(t)}{ISR(t)} = 1 - \frac{IDR(t)}{ISR(t)}$$

Eq.7

$$HE_{tot} = \frac{\int_0^{\tau} ISR(t) dt - \int_0^{\tau} IDR(t) dt}{\int_0^{\tau} ISR(t) dt}$$

Dove  $\tau$  (tempo di fine test) è il tempo al quale le concentrazioni di C-peptide, insulina e glucosio hanno raggiunto i valori pre-test dopo la perturbazione del sistema.

ISR può essere stimato dalla concentrazione plasmatica C-peptide, ottenuta da un test del pasto misto, attraverso il modello OCMM. Invece per stimare IDR si utilizzerà il modello minimo dell'insulina (IMM), sviluppato da Campioni et al.[8], integrato con OCMM, introdotto precedentemente (Fig. 5).

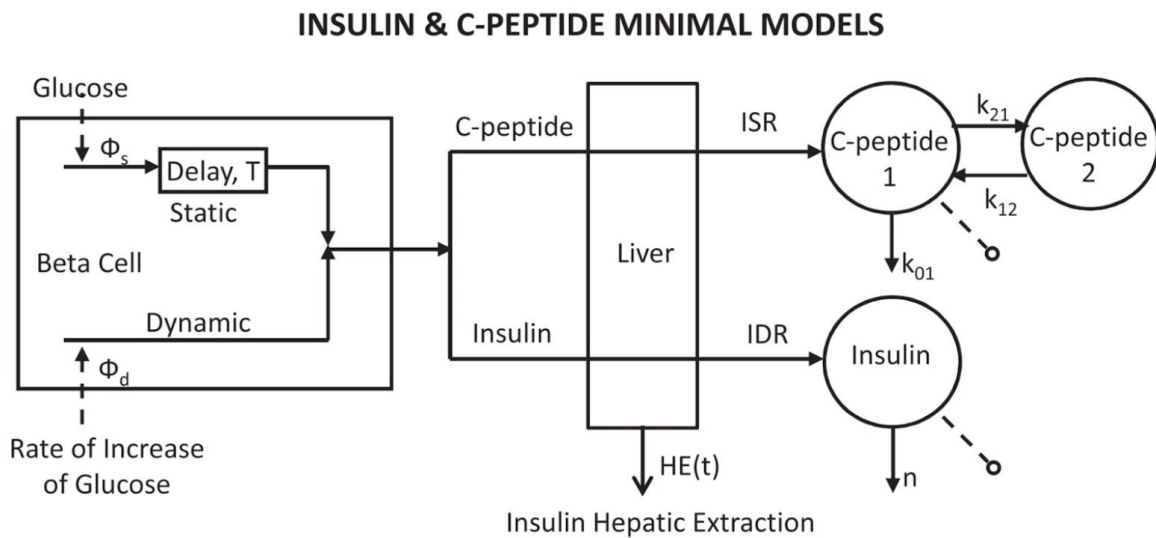


Figura 5: Modello Minimo Orale del C-peptide e dell'Insulina [7]

Si considera come ingresso del modello il flusso di secrezione di C-peptide/Insulina (ISR), stimato tramite OCMM, per ottenere in uscita la concentrazione di insulina plasmatica. Il Modello Minimo dell'Insulina è un modello mono-compartimentale a cinetica lineare usato per collegare l'IDR alla concentrazione plasmatica dell'insulina  $I$ (pmol/L):

$$\dot{I}(t) = -n \cdot I(t) + \frac{IDR(t)}{V_I} \quad I(0) = I_b \quad \text{Eq.8}$$

Dove  $I_b$  è la concentrazione basale di insulina,  $V_i$ (pmol/L) è il volume di distribuzione dell'insulina e  $n$ ( $\text{min}^{-1}$ ) è la costante frazionaria di eliminazione dell'insulina.

n è associata alla clearance dell'insulina tramite la formula:

$$CL = n \cdot V_i \quad \text{Eq.9}$$

Il modello inoltre prevede la descrizione di IDR in funzione di HE(t) e ISR (t):

$$\dot{I}(t) = -n \cdot I(t) + ISR(t) \cdot \frac{1 - HE(t)}{V_I} \quad I(0) = I_b \quad \text{Eq.10}$$

Dove HE(t) viene supposta tempo-variante e descritta come una funzione lineare a tratti con un numero finito di punti di spezzamento:

$$HE(t) = \begin{cases} HE_{i-1} + \frac{HE_i - HE_{i-1}}{t_i - t_{i-1}} \cdot (t - t_{i-1}) & t_{i-1} \leq t \leq t_i; \quad i = 1, 2, \dots, 6 \\ HE_0 = HE_b \end{cases} \quad \text{Eq.11}$$

Dove HE<sub>i</sub> sono parametri sconosciuti che rappresentano i valori di HE(t) ai tempi di campionamento. Ci si aspetta una variazione più rapida dei valori di HE nei primi momenti successivi alla perturbazione, quindi vengono scelti tempi di campionamento più vicini tra loro all'inizio e che tendono ad allontanarsi più ci si avvicina al tempo di fine test.

Attraverso un'analisi preliminare sono stati identificati sette punti di campionamento, come un buon compromesso tra la flessibilità del modello ed il numero di parametri stimati dai dati [8]. In particolare in questa tesi sono stati scelti come istanti di campionamento: 0, 15, 45, 90, 120, 160, 210, 300 min.

HE<sub>b</sub>, nell'equazione precedente, rappresenta l'estrazione epatica basale di insulina e può essere espressa in funzione dei valori basali di IDR ed ISR:

$$HE_b = \frac{ISR_b - IDR_b}{ISR_b} = 1 - \frac{I_b \cdot n \cdot V_I}{ISR_b} \quad \text{Eq.12}$$



Dove  $ISR_b$  viene determinata attraverso il OCMM, mentre  $IDR_b$  viene espresso in funzione di  $n, V_i$  e  $I_b$ . [8]

### 3.2 Stima parametrica

Per stimare i parametri ignoti presenti nelle equazioni del modello, indicati come elementi del vettore  $\mathbf{p} = [p_1, \dots, p_n]$ , il sistema è sottoposto a degli esperimenti input-output in cui viene osservato come il sistema risponde a diversi input. Quindi attraverso la stima parametrica si cerca di dare dei valori agli elementi di  $\mathbf{p}$  tali da far sì che la risposta del modello, anche detta predizione di modello, si discosti il meno possibile da quella del sistema.

Nel caso ideale la risposta di modello dovrebbe essere uguale al segnale misurato  $y(t)$ :

$$y(t) = g(t, \mathbf{p}) \quad \text{Eq.13}$$

Tuttavia il segnale misurato, a causa della strumentazione di misura, non è continuo come la predizione di modello ma è discreto formato da  $N$  misure  $\mathbf{z}$ , ciascuna potenzialmente affetta da un errore sconosciuto  $\mathbf{v}$ , spesso considerato additivo. Dunque, la misura  $k$ -esima può essere espressa nel caso scalare come:

$$z_k = y(t_k) + v_k = g(t_k, \mathbf{p}) + v_k \quad k = 1, 2, \dots, N \quad \text{Eq.14}$$

L'equazione precedente può essere riscritta in forma matriciale come:

$$\mathbf{z} = \mathbf{y} + \mathbf{v} = \mathbf{G}(\mathbf{p}) + \mathbf{v} \quad \text{Eq.15}$$

Dove  $\mathbf{z} = [z_1, \dots, z_N]^T$ ,  $\mathbf{G}(\mathbf{p}) = [g(t_1, \mathbf{p}), \dots, g(t_N, \mathbf{p})]^T$  e  $\mathbf{v} = [v_1, \dots, v_N]^T$

L'errore  $\mathbf{v}$  normalmente si può assumere a media nulla, deviazione standard nota e campioni mutualmente non correlati. Inoltre, date queste basi,  $\mathbf{v}$  può essere spesso considerato una variabile aleatoria con  $f_v(v)$  come funzione di densità di probabilità nota.

Con queste ipotesi, si può definire la matrice di covarianza di  $\mathbf{v}$  come:

$$\Sigma_v = \text{diag}\{ \sigma_1^2, \dots, \sigma_N^2 \} \quad \text{Eq.16}$$

In caso di campioni mutualmente non correlati.

In un contesto Bayesiano il vettore  $\mathbf{p}$  può essere considerato come una variabile aleatoria, di cui possiamo stimare una realizzazione con l'ausilio dei dati raccolti negli esperimenti input-output e le informazioni sul sistema conosciute a priori. Per fare questo sarà usato uno stimatore Bayesiano Massimo a Posteriori (MAP). Questo tipo di stimatore rappresenta un compromesso tra informazioni a priori e a posteriori. Le informazioni a priori sono rappresentate da quelle riguardanti i modelli sviluppati e quelle a posteriori sono derivate dagli esperimenti input-output. Nel caso in esame le informazioni a priori sui parametri della cinetica del C-peptide dell'insulina derivano rispettivamente dai modelli di popolazione sviluppati da Van Cauter [9] e da Campioni [8].

$f_{p|z}(\mathbf{p}|\mathbf{z})$  è la funzione densità di probabilità a posteriori ed esprime le aspettative (la previsione) che si hanno sul vettore  $\mathbf{p}$  una volta che siano noti i dati  $\mathbf{z}$  degli esperimenti input-output

Il vettore dei parametri stimati attraverso un estimatore MAP si ottiene:

$$\hat{\mathbf{p}} = \arg_p \max f_{p|z}(\mathbf{p}|\mathbf{z}) \quad \text{Eq.17}$$

Ovvero è il valore di  $\mathbf{p}$  per cui la funzione di densità di probabilità assume il valore massimo.

Ricordando il teorema di Bayes:

$$f_{p|z}(\mathbf{p}|\mathbf{z}) = \frac{f_{z|p}(\mathbf{z}|\mathbf{p}) \cdot f_p(\mathbf{p})}{f_z(\mathbf{z})} \quad \text{Eq.18}$$

Dove  $f_p(\mathbf{p})$  è la funzione densità di probabilità a priori associata al vettore dei parametri del modello e  $f_z(\mathbf{z})$  è la funzione di densità di probabilità del vettore dei dati  $\mathbf{z}$ .

Usando il teorema di Bayes nell'Eq. 18 e tralasciando il termine  $f_z(\mathbf{z})$ , in quanto non dipende da  $\mathbf{p}$ , si ottiene:

$$\hat{\mathbf{p}} = \arg_p \max f_{z|p}(\mathbf{z}|\mathbf{p}) \cdot f_p(\mathbf{p}) \quad \text{Eq.19}$$

Dove  $f_{z|p}(\mathbf{z}|\mathbf{p})$  è la funzione densità di probabilità di  $\mathbf{z}$  dato  $\mathbf{p}$  (likelihood) e dipende dal modello e dalla funzione di densità di probabilità dell'errore.

Dato che  $\mathbf{p}$  e  $\mathbf{v}$  sono assunti come variabili aleatorie indipendenti e presentano una distribuzione gaussiana si può vedere il problema della stima di  $\mathbf{p}$  come un problema di ottimizzazione.

Definendo  $\boldsymbol{\mu}_p$  e  $\boldsymbol{\Sigma}_p$  in ordine la media e la matrice di covarianza della distribuzione gaussiana di  $\mathbf{p}$ , si ottiene:

$$\hat{\mathbf{p}}_{MAP} = \arg_p \min [z - G(p)]^T \boldsymbol{\Sigma}_v^{-1} [z - G(p)] + (p - \boldsymbol{\mu}_p)^T \boldsymbol{\Sigma}_p^{-1} (p - \boldsymbol{\mu}_p) \quad \text{Eq.20}$$

Una volta ricavati i parametri, la deviazione standard ( $SD(\mathbf{p})$ ) e il coefficiente di variazione ( $CV(\mathbf{p})$ ) ottenuti dalla matrice di informazione di Fisher possono essere usati per capire quanto la stima dei parametri  $\mathbf{p}$  sia attendibile. Il CV infatti descrive quanto la stima sia precisa in termini relativi. La formula del CV per l'elemento i-esimo di  $\mathbf{p}$  è:

$$CV(\hat{p}_i) = 100 \cdot \frac{SD(\hat{p}_i)}{\hat{p}_i} \quad \text{Eq.21}$$

Per valutare l'affidabilità della stima ottenuta dal modello scelto si può considerare anche il vettore dei residui ( $\mathbf{r}$ ) e dei residui pesati ( $\mathbf{wr}$ ). I residui ( $\mathbf{r}$ ) rappresentano una stima degli errori  $\mathbf{v}$  a ciascuno dei quali viene assegnato un peso, generalmente il reciproco della deviazione standard dell'errore di misura del campione ( $\mathbf{v}$ ). I residui essendo una stima degli errori riflettono le assunzioni su quest'ultimi, quindi definendo i residui pesati come:

$$\mathbf{wr}_k = \mathbf{r}_k / \boldsymbol{\sigma}_k \quad \text{Eq.22}$$

Questi devono essere non correlati, a media nulla a meno di un valore dato dall'errore e avere un'ampiezza nell'intorno dell'intervallo  $[-1 ; +1]$ .

### 3.3 Modelli testati a confronto

In questa tesi si confronteranno tre identificazioni di parametri dello stesso modello ottenute sfruttando diverse ipotesi. L'obiettivo del confronto tra le identificazioni è quello di valutare attraverso il modello quali aspetti della cinetica dell'insulina e del C-peptide, in soggetti sani e normopeso, possono essere o meno alterati dall'esercizio fisico. Il modello applicato è il Modello Minimo Orale del C-peptide e dell'insulina (paragrafo 3.1). In particolare, per tutti i modelli sono stati stimati, indipendentemente per ogni visita, i parametri relativi alla secrezione di C-peptide/Insulina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $k_d$  e  $h$ ) ed alla estrazione epatica di insulina ( $HE_{15}$ ,  $HE_{45}$ ,  $HE_{90}$ ,  $HE_{120}$ ,  $HE_{160}$ ,  $HE_{210}$ ,  $HE_{300}$ ), mentre nelle varie identificazioni testate sono state effettuate diverse prove:

- Identificazione 1: tutte le cinetiche sono state lasciate libere di variare. Quindi sono stati stimati anche i parametri della cinetica ( $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) del C-peptide e, della cinetica dell'insulina (CL) per ciascuna visita. In totale quindi, considerando che 15 parametri del modello sono stati stimati separatamente per ogni visita (3 in totale), sono stati stimati 45 parametri.
- Identificazione 2: si assumono invariati i parametri relativi alla cinetica del C-peptide ( $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) mentre tutti gli altri parametri citati in precedenza sono liberi di variare. Quindi in questa identificazione vengono stimati 12 parametri per visita ed un unico set di parametri della cinetica del C-peptide, in totale  $12*3+3=39$  parametri.
- Identificazione 3: infine, si assumono invariati nelle tre visite sia i parametri relativi alla cinetica del C-peptide ( $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) che quelli della clearance post-epatica di insulina (CL). Questa volta vengono stimati 11 parametri per visita ed unico set di parametri della cinetica del C-peptide e della clearance post-epatica di insulina, in totale  $11*3+3+1=37$  parametri.

Le tre identificazioni sono avvenute per ogni soggetto nelle tre visite con l'utilizzo del software Matlab<sup>®</sup> R2022b. In seguito i dati ottenuti sono stati trascritti ed elaborati con l'ausilio di Microsoft Excel<sup>®</sup>.

Per valutare quale delle identificazioni fosse la migliore è stato impiegato il criterio di parsimonia detto Bayesian Information Criterion (BIC), anche conosciuto come criterio di Schwartz. Il BIC rappresenta una misura del compromesso dell'abilità nel descrivere i dati ed il numero di parametri utilizzati per ottenere il fit [10].

Quindi attraverso questo criterio si può capire quale delle tre identificazioni permette il miglior compromesso tra la complessità del modello e l'aderenza ai dati. Per ogni soggetto viene definito il parametro BIC:

$$\text{BIC} = \text{WRSS} + M \cdot \ln(N) \quad \text{Eq.23}$$

Dove WRSS è la somma dei quadrati dei residui nelle tre visite, M è il numero totale di parametri stimati ed infine N è il numero totale di campioni utilizzati

Viene scelto come identificazione migliore quella con l'indice BIC medio minore.

### 3.4 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata svolta con l'ausilio dei software Matlab<sup>®</sup> R2022b e Microsoft Excel<sup>®</sup>. I parametri stimati attraverso i metodi descritti in questo capitolo saranno riportati nel prossimo capitolo nella forma valore medio  $\pm$  deviazione standard (SD) ed il loro livello di imprecisione sarà indicato da CV(%). Il confronto tra i parametri delle tre visite (NO EX, AM EX, PM EX) è avvenuto, in ogni identificazione, attraverso ANOVA per misure ripetute, infatti le tre visite studiate sono state svolte sui medesimi soggetti. Nei casi in cui ANOVA identifichi una significatività si è svolto un confronto post-hoc con un test t di Student accoppiato a doppia coda. Infine è stata usata la correzione di Bonferroni per test multipli scegliendo  $\alpha$  critico pari a  $0.05 / m$  con m rappresentante il numero di test effettuati. Dato che i dati utilizzati provengono da tre visite sui medesimi soggetti ( $m = 3$ ) il p-value nei t-test è stato considerato statisticamente significativo se  $p < 0.017$ .

## Capitolo 4: Risultati

In questo capitolo sono riportati i parametri stimati attraverso i modelli descritti nel capitolo 3, partendo dai dati delle concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina e C-peptide ottenuti nelle tre visite descritte nel capitolo 2. I parametri ottenuti per ogni identificazione sono riportati in tabelle nella forma  $\text{media} \pm \text{deviazione standard (SD)}$  e la loro incertezza di stima è indicata sotto forma di coefficiente di variazione  $\text{CV}(\%)$ . Inoltre, per ogni identificazione, vengono riportati i grafici di dati vs. predizione media del modello, sia per C-peptide che per insulina, nelle tre visite. Di seguito ai vari grafici dei fit di C-peptide ed insulina si trovano grafici rappresentanti i corrispondenti residui pesati medi, completi di relative SD sotto forma di barre di errore. Infine vengono riportati grafici rappresentanti gli andamenti medi dell'estrazione epatica di insulina (HE) nelle tre visite e le relative SD usando barre di errore. Per HE, come riportato in precedenza, si sono usati i tempi di campionamento (0, 15, 45, 90, 120, 160, 210, 300) dove  $\text{HE}_{300}$  è stato assunto uguale al livello basale.

## 4.2 Identificazione 1

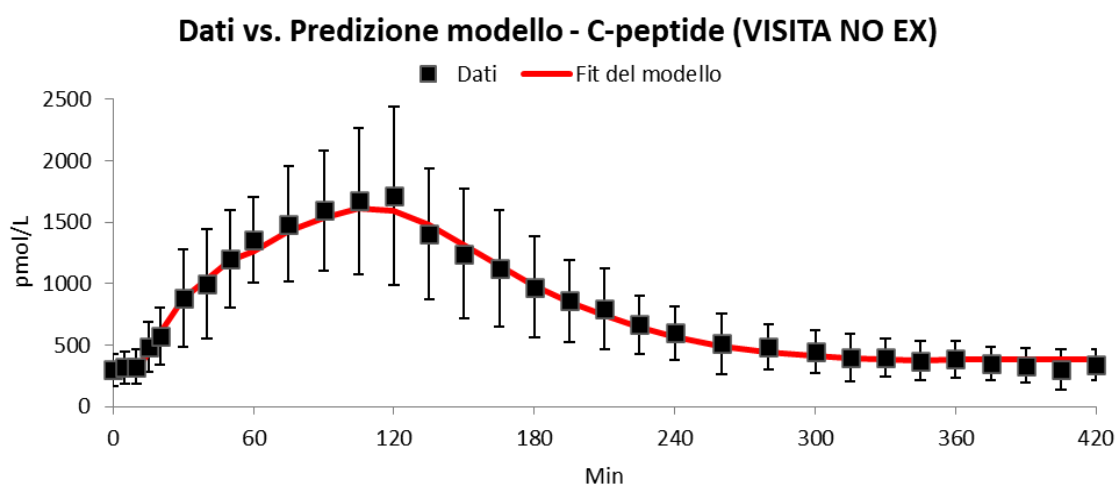
In questa identificazione tutti i parametri sono stati assunti indipendenti tra le 3 visite. Quindi si sono stimati i parametri relativi alla secrezione di C-peptide/insulina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $k_d$ ,  $h$ ), alla cinetica del C-peptide ( $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ), alla cinetica dell'insulina (CL) ed i valori dell'estrazione epatica singolarmente per ogni visita. Sono inoltre stati calcolati, usando le formule del capitolo 3, gli indici della responsività beta-cellulare ( $\Phi_b$ ,  $\Phi_d$ ,  $\Phi_s$ ,  $\Phi_{\text{tot}}$ ), il valore basale e totale dell'estrazione epatica ( $\text{HE}_b$  e  $\text{HE}_{\text{tot}}$ ). Si sono assunti costanti nelle tre visite i volumi di distribuzione del C-peptide e dell'insulina ( $V_c$ ,  $V_i$ ) stimati da modelli di popolazione a partire da parametri antropometrici. Vengono riportati nella tabella sottostante i parametri appena citati:

		NO EX	AM EX	PM EX
Indici della responsività beta-cellulare	$\Phi_b [10^{-9} \text{ min}^{-1}]$	$3.86 \pm 2.06$	$4.05 \pm 2.45$	$4.74 \pm 1.93$
	$\Phi_d [10^{-9}]$	$443.7 \pm 168.16$	$446.74 \pm 295.3$	$471.48 \pm 280.2$
	$\Phi_s [10^{-9} \text{ min}^{-1}]$	$27.80 \pm 17.26$	$27.826 \pm 19.65$	$36.28 \pm 23.30$
	$\Phi_{\text{tot}} [10^{-9} \text{ min}^{-1}]$	$8.68 \pm 4.865$	$8.226 \pm 3.75$	$8.29 \pm 2.74$

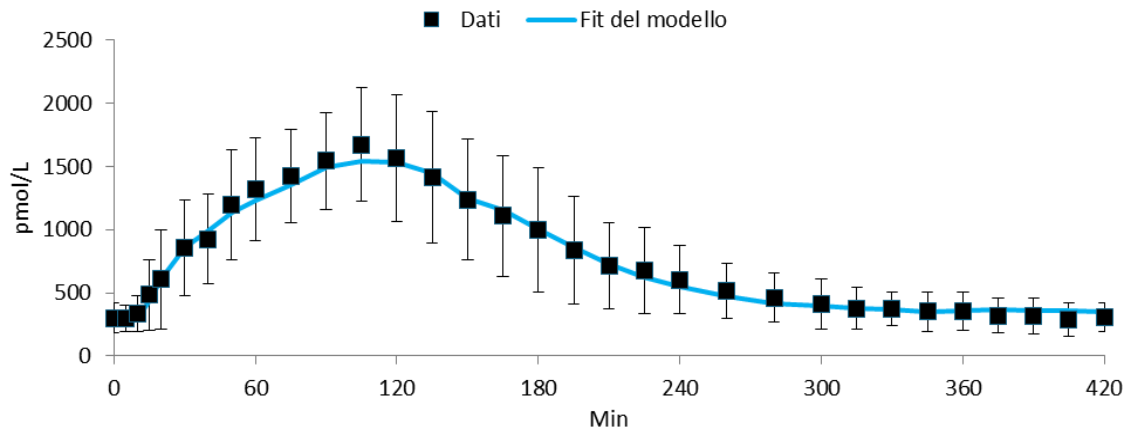
Secrezione di C-peptide / insulina	$\alpha$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.07 \pm 0.063$ (16%)	$0.05 \pm 0.04$ (16%)	$0.09 \pm 0.09$ (13%)
	$\beta$ [ $\text{pmol/L/min per mg/dL}$ ]	$1.54 \pm 0.96$ (17%)	$1.54 \pm 1.09$ (15%)	$2.01 \pm 1.3$ (13%)
	$k_d$ [ $\text{pmol/L/min per mg/dL/min}$ ]	$24.63 \pm 9.33$ (12%)	$24.8 \pm 16.4$ (13%)	$26.17 \pm 15.55$ (13%)
	$h$ [ $\text{mg/dL}$ ]	$82.6 \pm 5.4$ (1%)	$82.7 \pm 5.6$ (1%)	$82.4 \pm 7.5$ (1%)
Cinetica del C-peptide	$k_{01}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.055 \pm 0.02$ (13%)	$0.057 \pm 0.02$ (13%)	$0.0615 \pm 0.015$ (11%)
	$k_{21}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.05 \pm 0.02$ (23%)	$0.056 \pm 0.02$ (24%)	$0.066 \pm 0.024$ (19%)
	$k_{12}$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	$0.027 \pm 0.018$ (23%)	$0.029 \pm 0.019$ (24%)	$0.0253 \pm 0.017$ (31%)
	$V_c$ [L]	$4.064 \pm 0.271$		
Cinetica dell'insulina	$V_i$ [L]	$8.34 \pm 1.02$		
	CL [L/min]	$0.47 \pm 0.5$ (23%)	$0.442 \pm 0.446$ (25%)	$0.527 \pm 0.39$ (19%)
	$HE_b$ [%]	$80.8 \pm 16.5$	$85.5 \pm 12$	$82.3 \pm 13$
	$HE_{tot}$ [%]	$66.4 \pm 19$	$71.6 \pm 14.6$	$66.5 \pm 18$

Tabella 2: Media  $\pm$  SD (CV%) dei parametri relativi all'identificazione 1.

Di seguito vengono riportati i grafici relativi all'identificazione 1 come descritto precedentemente:



### Dati vs. Predizione modello - C-peptide (VISITA AM EX)



### Dati vs. Predizione modello - C-peptide (VISITA PM EX)

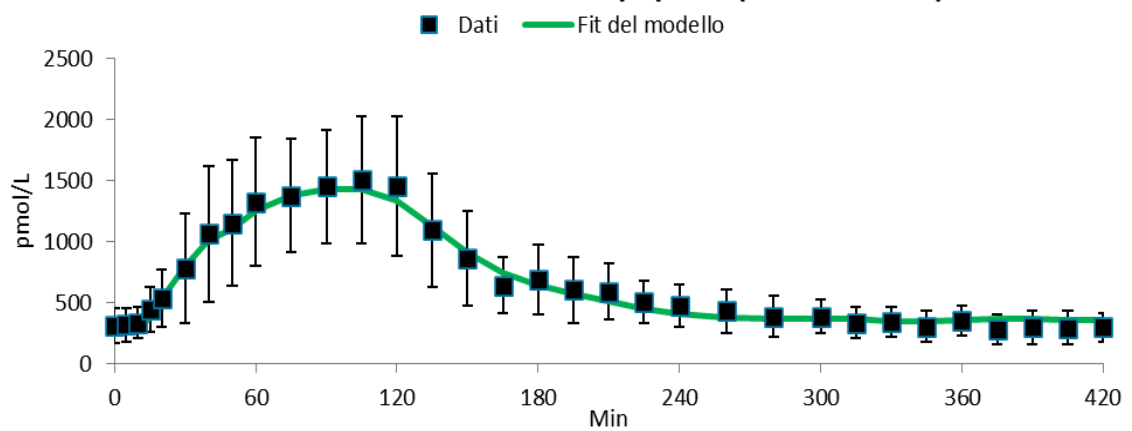
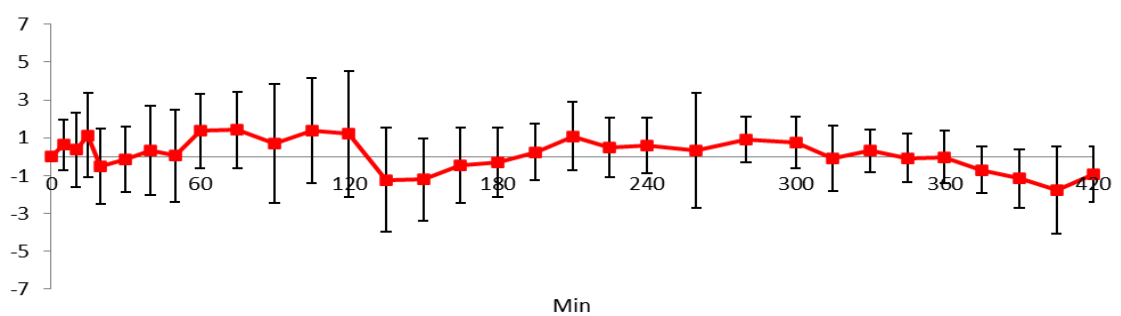


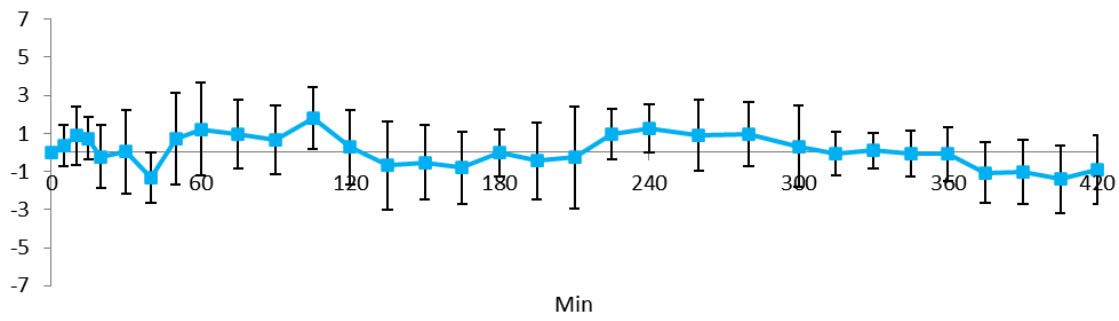
Figura 6: (Media  $\pm$  SD) dati vs. predizione del modello del C-peptide nelle tre visite.

### Residui pesati - C-peptide (VISITA NO EX)





### Residui pesati - C-peptide (VISITA AM EX)



### Residui pesati - C-peptide (VISITA PM EX)

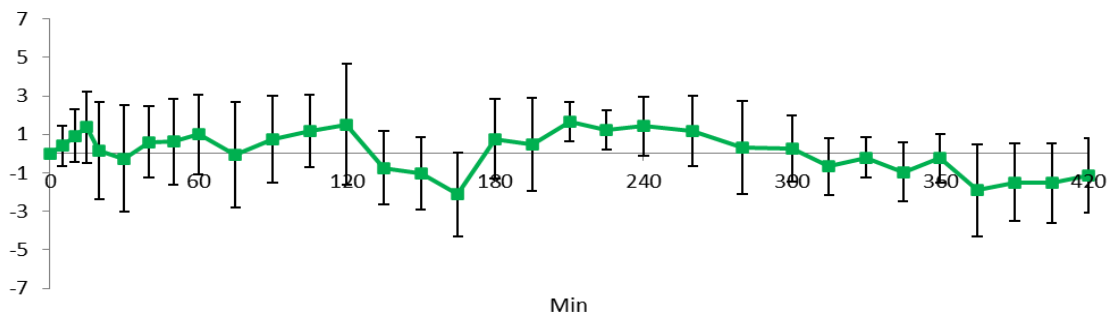
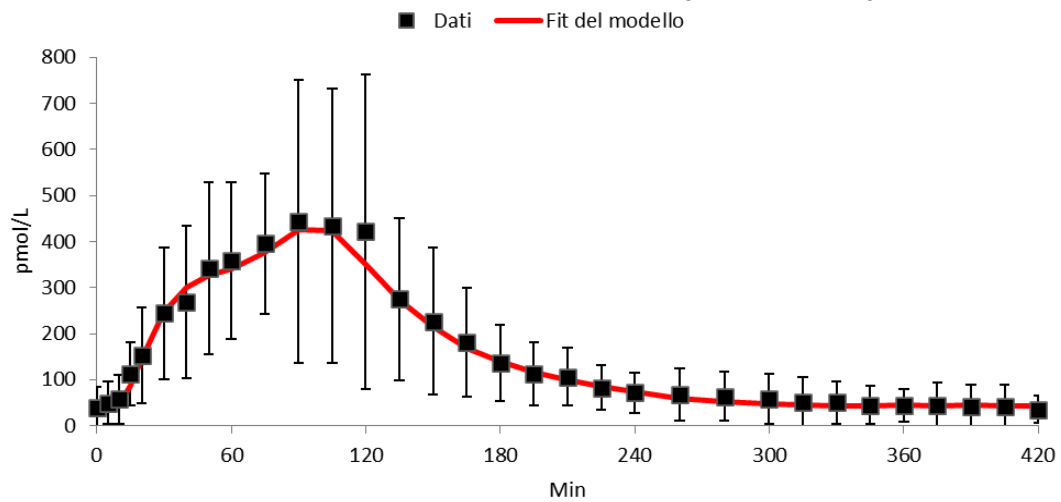


Figura 7: (Media  $\pm$  SD) residui pesati del modello del C-peptide.

### Dati vs. Predizione modello - Insulina (VISITA NO EX)



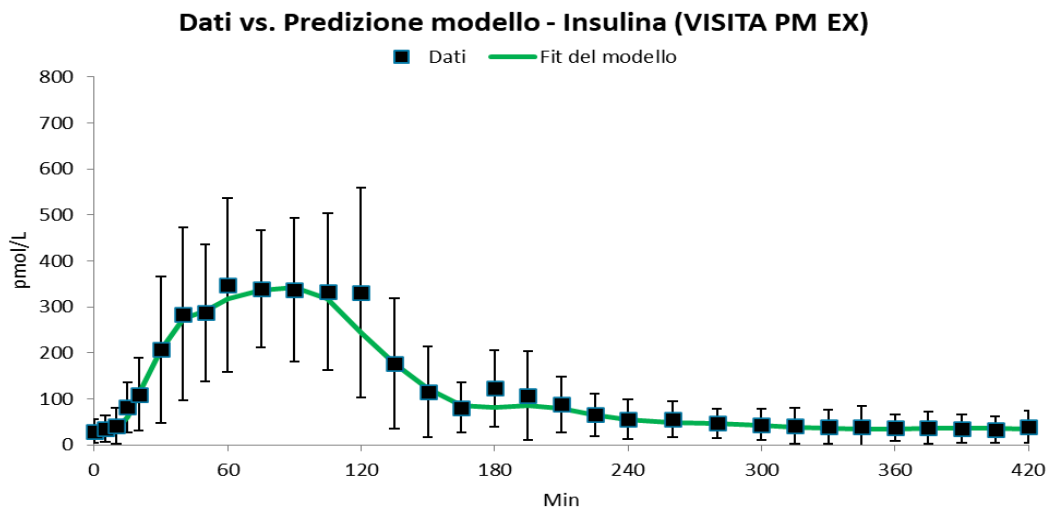
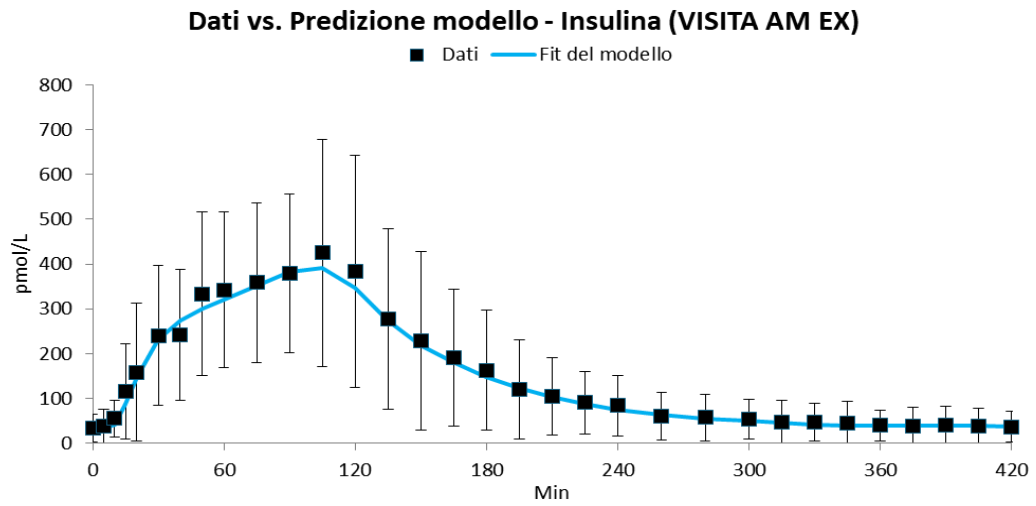
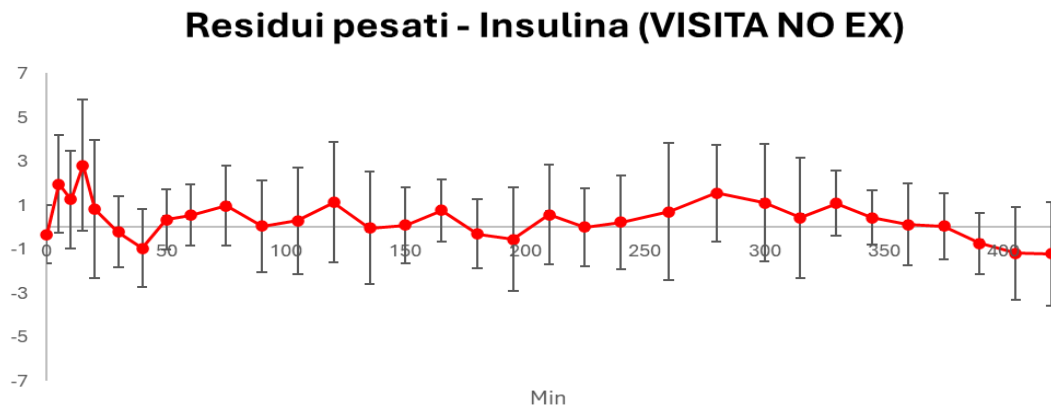
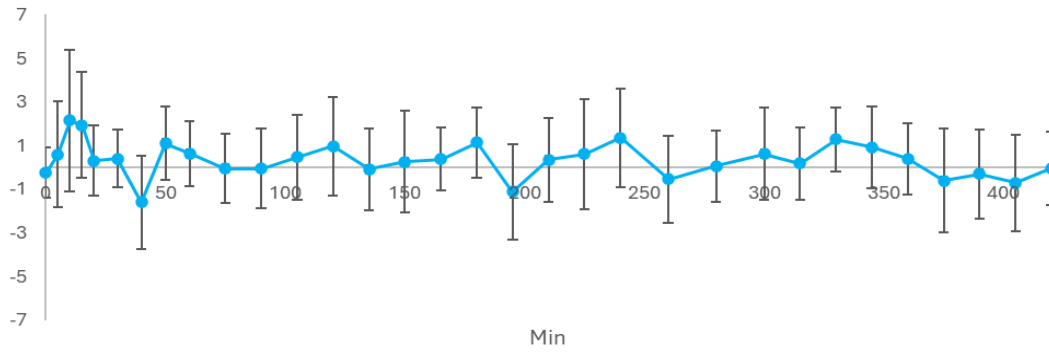


Figura 8: (Media  $\pm$  SD) dati vs. predizione del modello di insulina nelle tre visite.



### Residui pesati - Insulina (VISITA AM EX)



### Residui pesati - Insulina (VISITA PM EX)

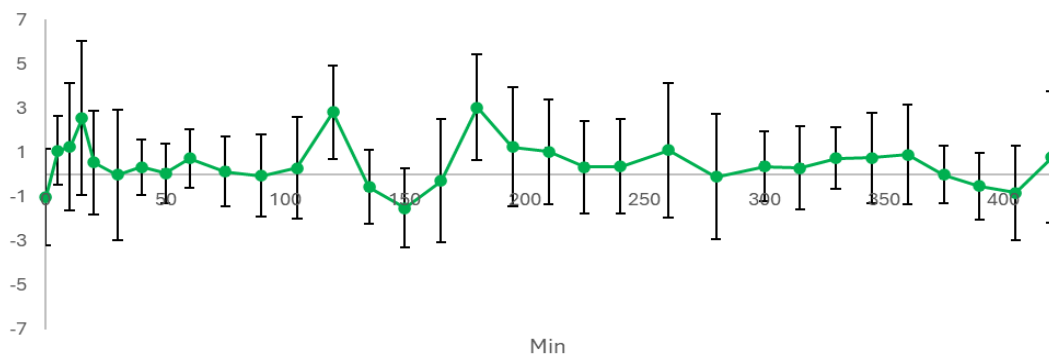
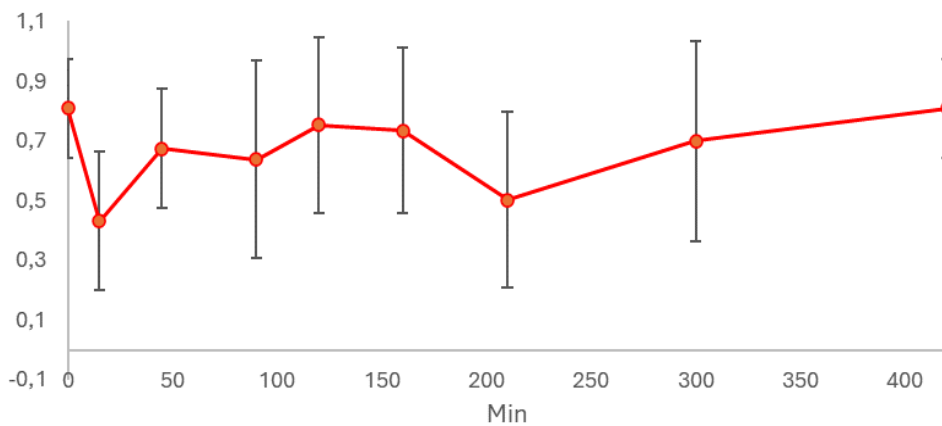


Figura 9: (Media  $\pm$  SD) residui pesati medi del modello dell'insulina.

### Estrazione epatica - Visita NO EX



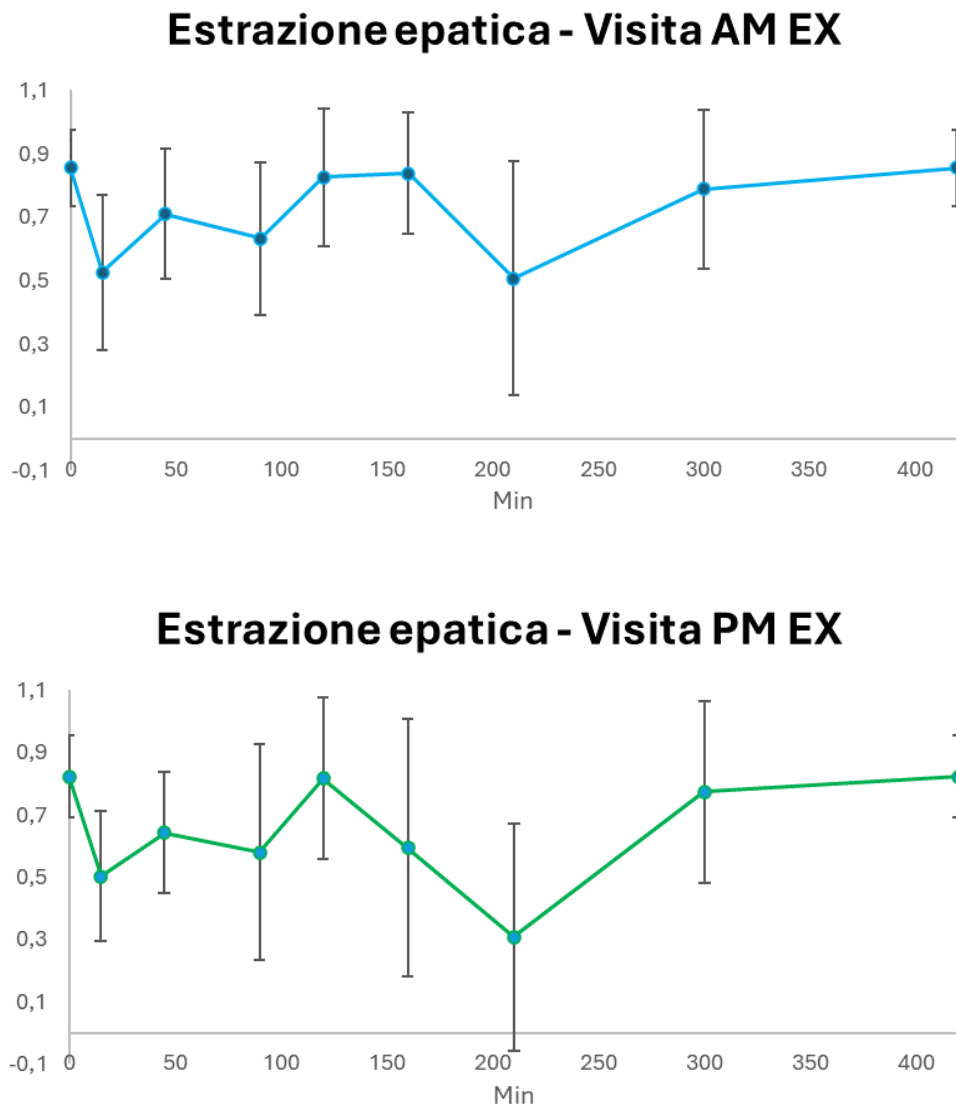


Figura 10: (Media  $\pm$  SD) dell'estrazione epatica dell'insulina stimata nelle tre visite.

## 4.2 Identificazione 2

Nella seconda identificazione si lavora nell'ipotesi che l'esercizio fisico non abbia alcun effetto sui parametri della cinetica del C-peptide, che vengono quindi considerati invariati. Di conseguenza i parametri considerati costanti per le tre visite in questo caso sono quelli della cinetica del C-peptide ( $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) ed i volumi di distribuzione del C-peptide e dell'insulina ( $V_c$ ,  $V_i$ ). Vengono invece stimati differenti per ogni visita, attraverso i metodi descritti nel capitolo 3, i parametri relativi alla secrezione di C-peptide/insulina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $k_d$ ,  $h$ ), alla cinetica dell'insulina (CL) e all'estrazione epatica. Come nell'identificazione 1, vengono calcolati gli

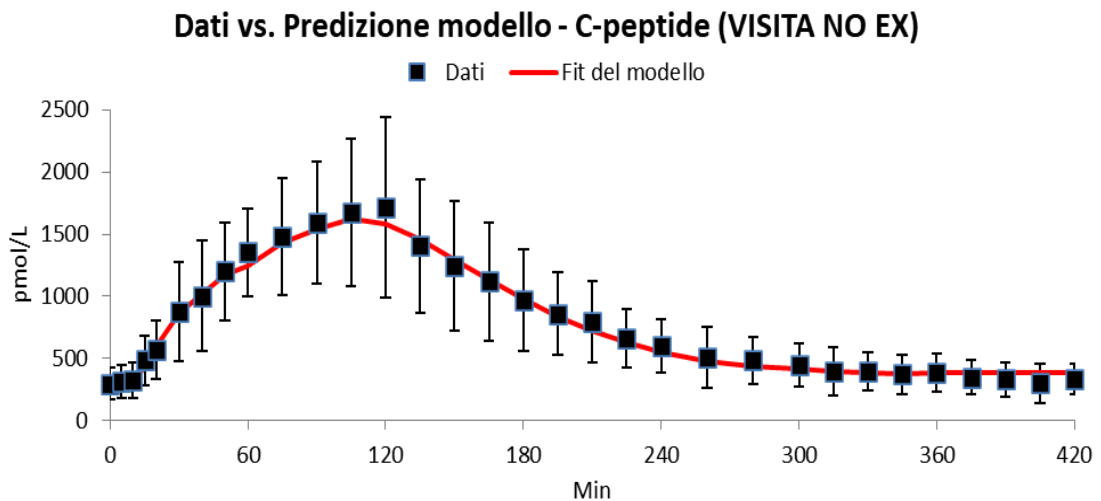
indici relativi alla responsività beta cellulare ( $\Phi_b$ ,  $\Phi_d$ ,  $\Phi_s$ ,  $\Phi_{tot}$ ), l'estrazione epatica basale e totale ( $HE_b$ ,  $HE_{tot}$ ). Vengono riportati nella tabella sottostante i parametri appena citati:

		NO EX	AM EX	PM EX
Indici della responsività beta-cellulare	$\Phi_b$ [ $10^{-9} \text{ min}^{-1}$ ]	4.75 ± 1.93	4.75 ± 2.11	5.1 ± 1.69
	$\Phi_d$ [ $10^{-9}$ ]	495.83 ± 168.16	480.8 ± 310.26	508.71 ± 311.9
	$\Phi_s$ [ $10^{-9} \text{ min}^{-1}$ ]	33.79 ± 16.46	33.35 ± 15.77	37.71 ± 21.7
	$\Phi_{tot}$ [ $10^{-9} \text{ min}^{-1}$ ]	10.19 ± 3.71	9.96 ± 3.93	8.97 ± 2.67
Secrezione di C-peptide / insulina	$\alpha$ [ $\text{min}^{-1}$ ]	0.06 ± 0.055 (11%)	0.054 ± 0.046 (11%)	0.083 ± 0.083 (11%)
	$\beta$ [pmol/L/min per mg/dL]	1.87 ± 0.914 (11%)	1.85 ± 0.87 (11%)	2.1 ± 1.2 (11%)
	$k_d$	27.52 ± 10.43	26.7 ± 17.22	28.24 ± 17.31

	[pmol/L/min per mg/dL/min]	(10%)	(12%)	(12%)
	h[mg/dL]	81.7 ± 4.56 (1%)	82.44 ± 5.26 (1%)	82.45 ± 6.95 (1%)
Cinetica del C-peptide	$k_{01}$ [min <sup>-1</sup> ]	0.068 ± 0.02 (9%)		
	$k_{21}$ [min <sup>-1</sup> ]	0.066 ± 0.02 (16%)		
	$k_{12}$ [min <sup>-1</sup> ]	0.023 ± 0.01 (13%)		
	$V_c$ [L]	4.064 ± 0.271		
Cinetica dell'insulina	$V_i$ [L]	8.34 ± 1.02		
	CL [L/min]	0.5 ± 0.48 (21%)	0.42 ± 0.35 (23%)	0.6 ± 0.47 (19%)
	HE <sub>b</sub> [%]	82.5 ± 16.7	84 ± 16.6	82.3 ± 15
	HE <sub>tot</sub> [%]	71.7 ± 20	74.7 ± 14.3	66.4 ± 21

Tabella 3: Media ± SD (CV%) dei parametri relativi all'identificazione 2

Di seguito vengono riportati i grafici relativi all'identificazione 2 come descritto precedentemente:



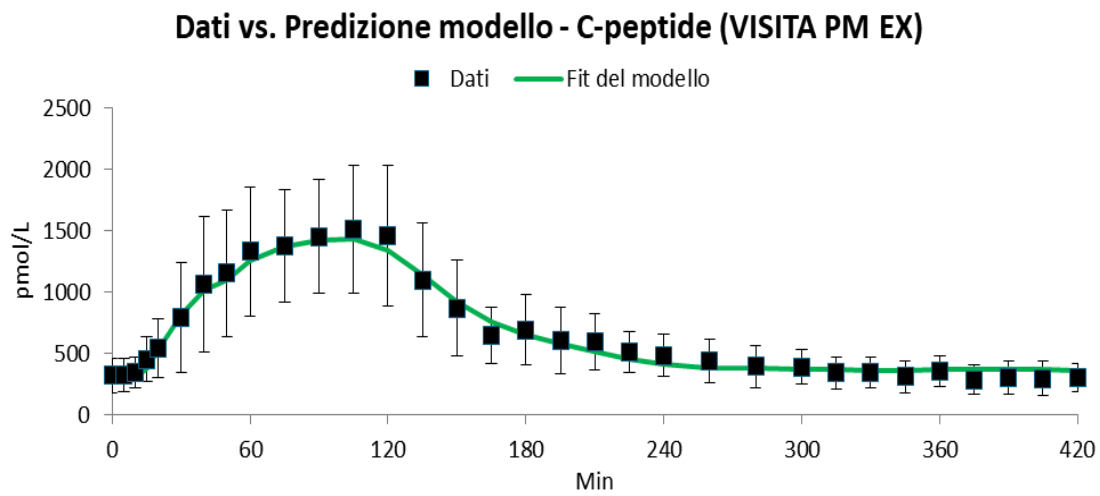
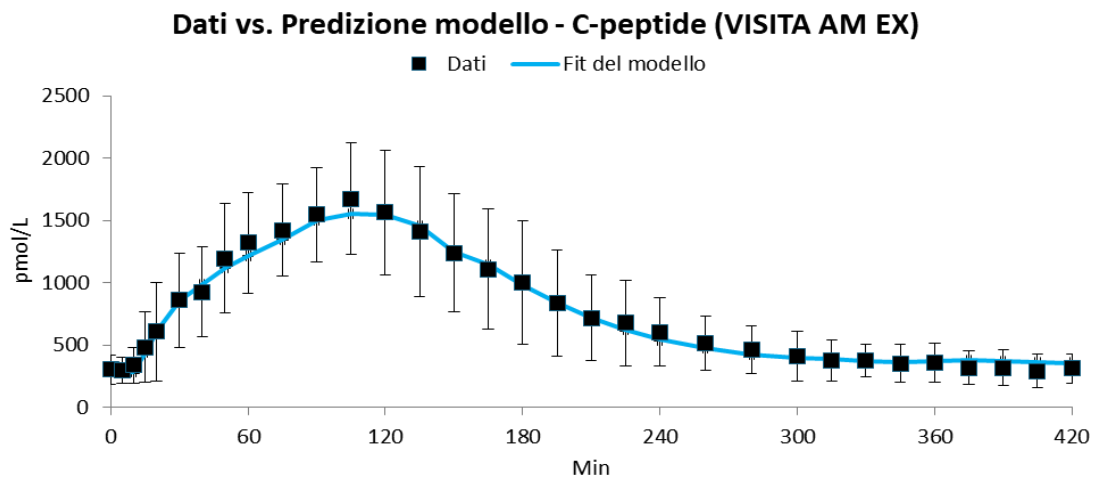
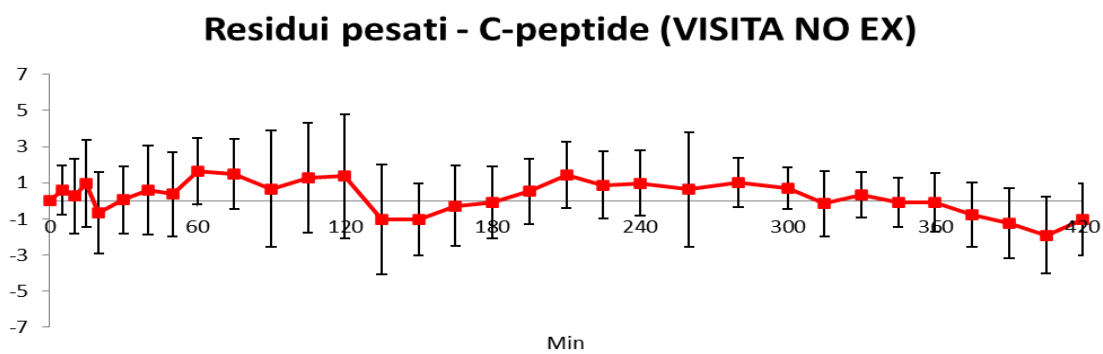
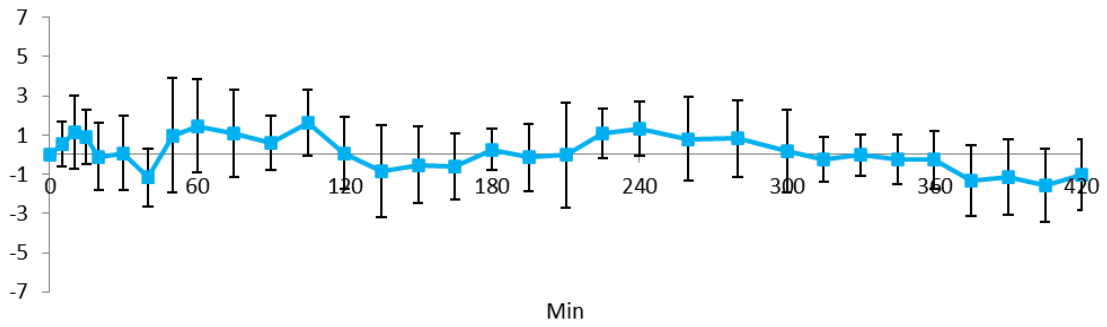


Figura 11: (Media  $\pm$  SD) dati vs. predizione del modello del C-peptide nelle tre visite.



### Residui pesati - C-peptide (VISITA AM EX)



### Residui pesati - C-peptide (VISITA PM EX)

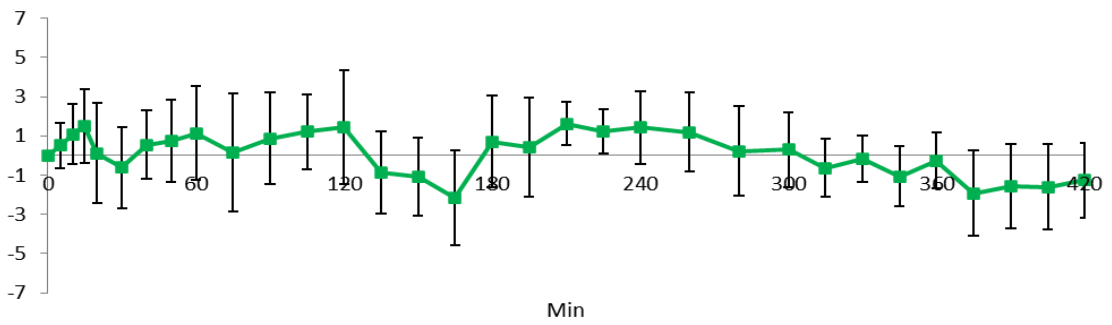
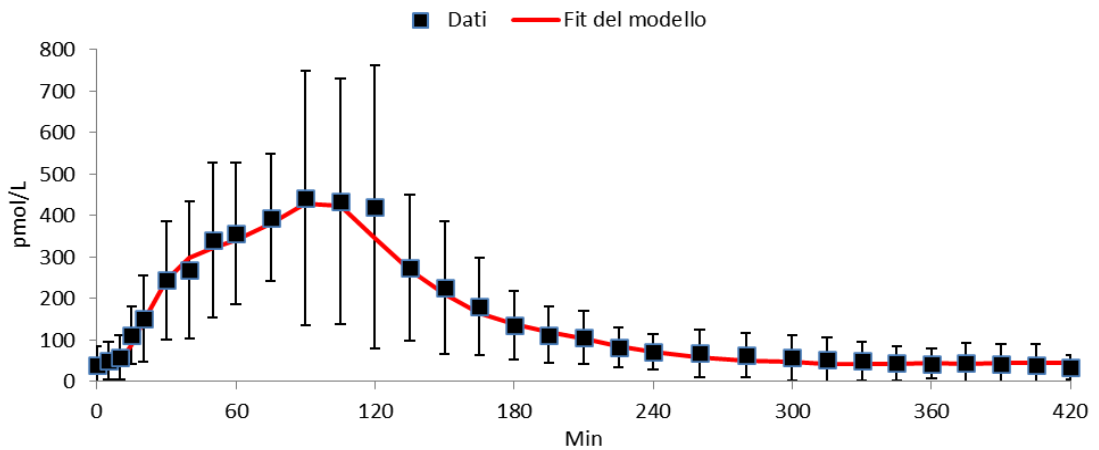


Figura 12: (Media  $\pm$  SD) residui pesati del modello del C-peptide.

### Dati vs. Predizione modello - Insulina (VISITA NO EX)





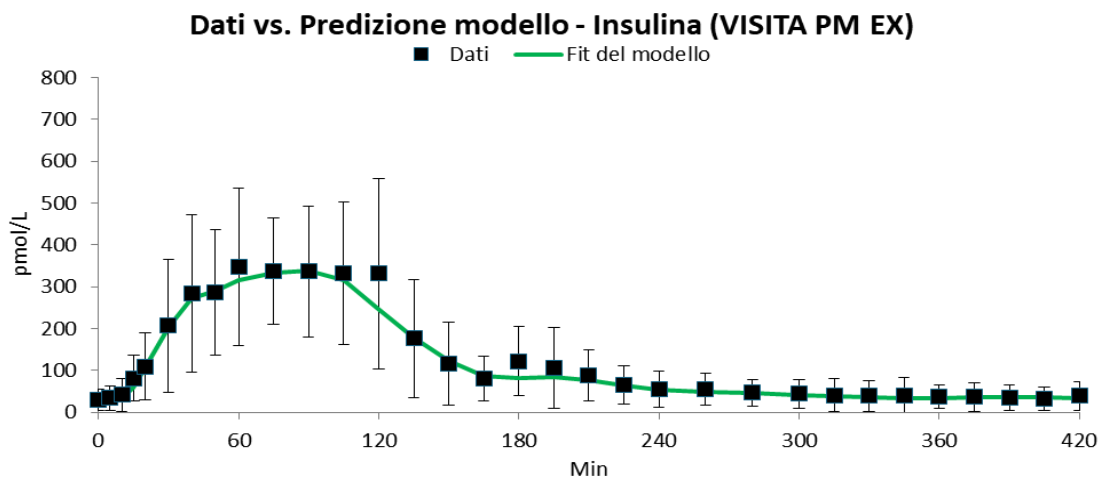
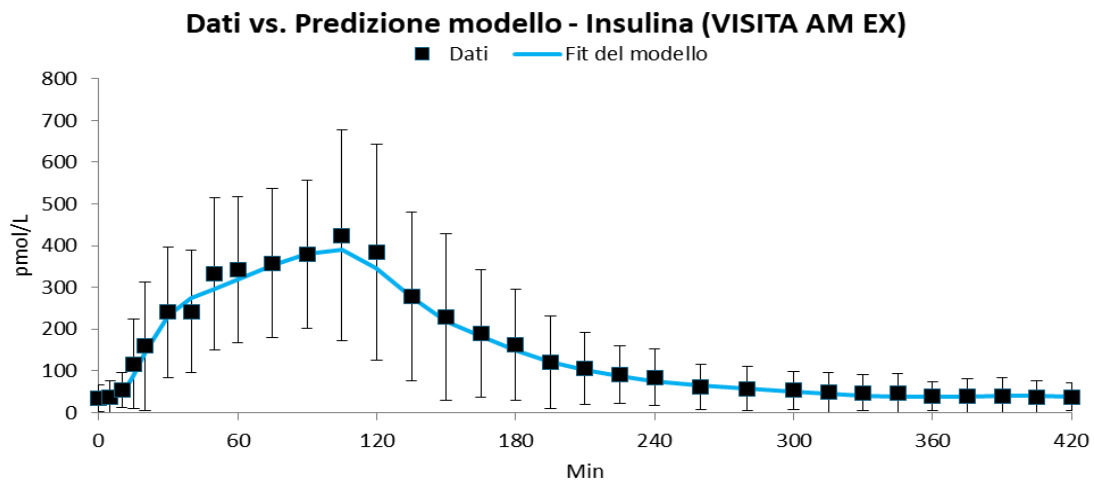
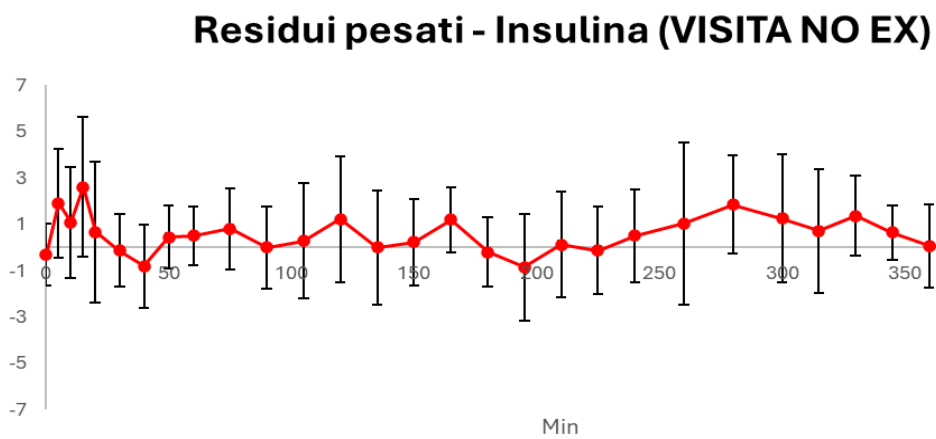
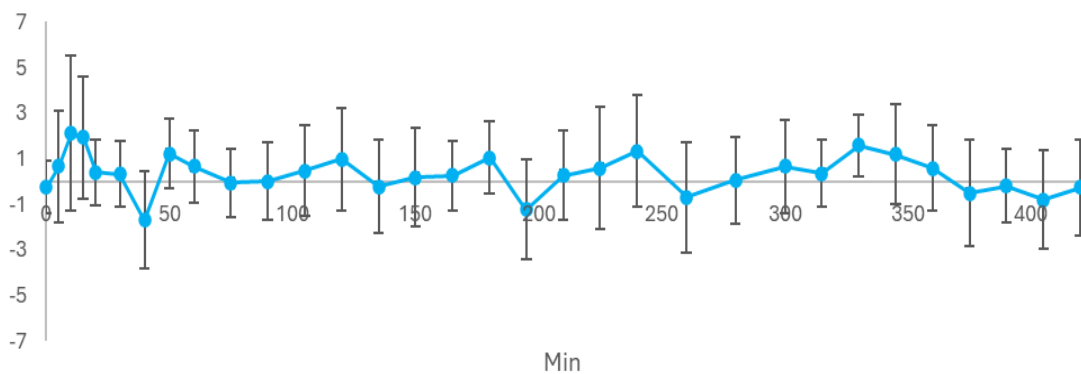


Figura 13: (Media  $\pm$  SD) dati vs. predizione del modello di insulina nelle tre visite.



### Residui pesati - Insulina (VISITA AM EX)



### Residui pesati - Insulina (VISITA PM EX)

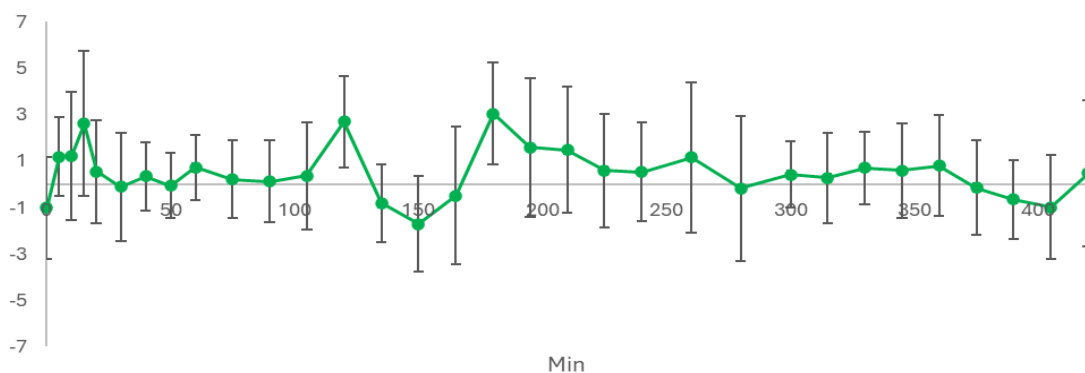
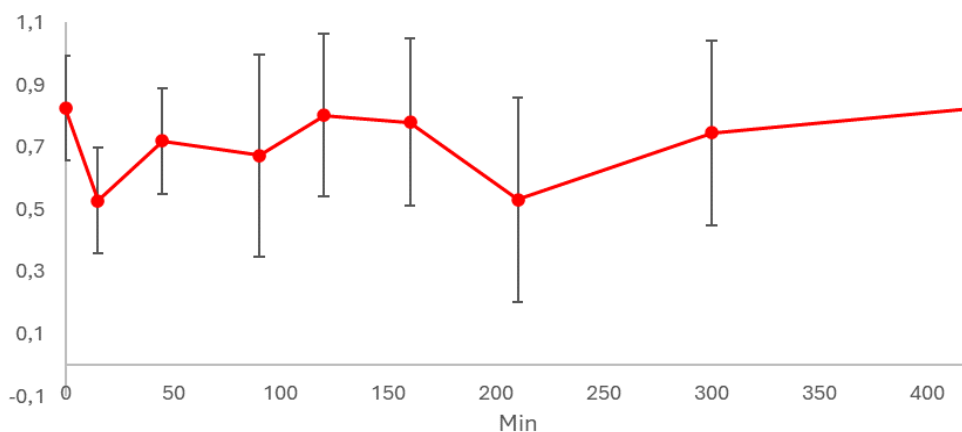
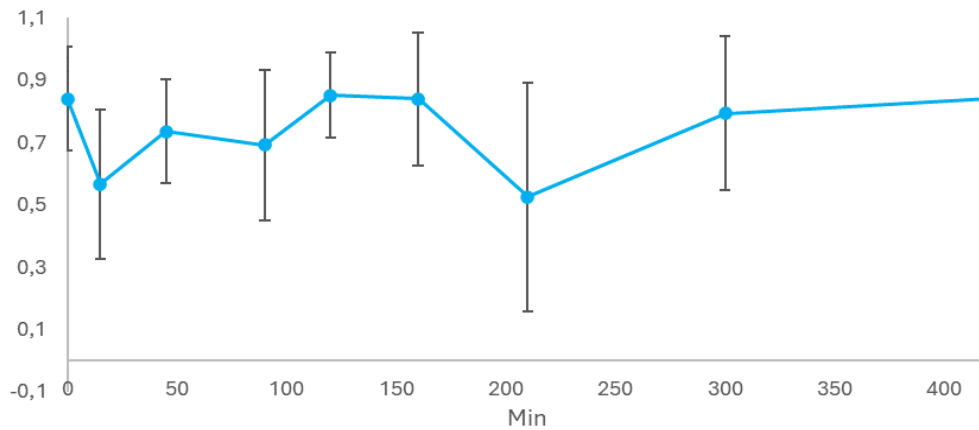


Figura 14: (Media  $\pm$  SD) residui pesati medi del modello dell'insulina.

### Estrazione epatica - Visita NO EX



### Estrazione epatica - Visita AM EX



### Estrazione epatica - Visita PM EX

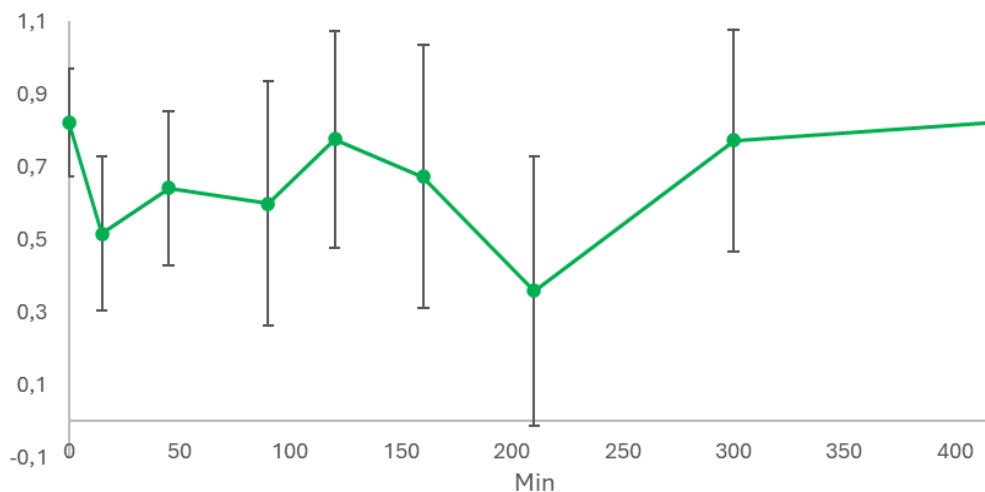


Figura 15: (Media  $\pm$  SD) dell'estrazione epatica dell'insulina stimata nelle tre visite.

## 4.3 Identificazione 3

Nell'ultima identificazione si lavora nell'ipotesi che l'esercizio fisico non abbia alcun effetto né sui parametri della cinetica del C-peptide ( $k_{01}$ ,  $k_{12}$ ,  $k_{21}$ ) né sulla clearance post-epatica (CL), che quindi vengono considerati fissati. Oltre ai parametri appena citati sono considerati costanti nelle tre visite anche i volumi di distribuzione del C-peptide e dell'insulina ( $V_c$ ,  $V_i$ ). Vengono invece stimati differenti per ogni visita i parametri relativi alla secrezione di C-peptide/insulina ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $k_d$ ,  $h$ ) e all'estrazione epatica. Anche in questo caso vengono calcolati gli indici relativi alla responsività beta cellulare ( $\Phi_b$ ,  $\Phi_d$ ,  $\Phi_s$ ,  $\Phi_{tot}$ ), l'estrazione epatica basale e totale ( $HE_b$ ,  $HE_{tot}$ ). Vengono riportati nella tabella sottostante i parametri appena citati:

		NO EX	AMEX	PM EX
Indici della responsività beta-cellulare	$\Phi_b [10^{-9} \text{ min}^{-1}]$	$4.236 \pm 2.043$	$4.25 \pm 2.25$	$4.7 \pm 2.52$
	$\Phi_d [10^{-9}]$	$468.74 \pm 191.9$	$441.24 \pm 247.6$	$462.20 \pm 244.17$
	$\Phi_s [10^{-9} \text{ min}^{-1}]$	$28.516 \pm 16.88$	$29.23 \pm 18.47$	$28.65 \pm 16.94$
	$\Phi_{\text{tot}} [10^{-9} \text{ min}^{-1}]$	$9.2 \pm 4.6$	$8.85 \pm 4.25$	$7.92 \pm 3.20$
Secrezione di C-peptide / insulina	$\alpha [\text{min}^{-1}]$	$0.07 \pm 0.067$ (12%)	$0.06 \pm 0.05$ (12%)	$0.08 \pm 0.07$ (18%)
	$\beta [\text{pmol/L/min per mg/dL}]$	$1.58 \pm 0.93$ (11%)	$1.62 \pm 1.02$ (11%)	$1.6 \pm 0.94$ (14%)
	$k_d [\text{pmol/L/min per mg/dL/min}]$	$26.02 \pm 10.65$ (10%)	$24.5 \pm 13.74$ (11%)	$25.6 \pm 13.55$ (12%)
	$h [\text{mg/dL}]$	$82.05 \pm 4.76$ (1%)	$82.93 \pm 5.9$ (1%)	$82.15 \pm 6.75$ (1%)
Cinetica del C-peptide	$k_{01} [\text{min}^{-1}]$	$0.063 \pm 0.028$ (9%)		
	$k_{21} [\text{min}^{-1}]$	$0.059 \pm 0.028$ (26%)		
	$k_{12} [\text{min}^{-1}]$	$0.033 \pm 0.03$ (14%)		
	$V_c [\text{L}]$	$4.064 \pm 0.271$		
Cinetica dell'insulina	$V_i [\text{L}]$	$8.34 \pm 1.02$		
	$CL [\text{L/min}]$	$0.465 \pm 0.35$		
	$HE_b [\%]$	$80.8 \pm 16.5$	$82.8 \pm 14$	$83.5 \pm 13$
	$HE_{\text{tot}} [\%]$	$66.4 \pm 19$	$67 \pm 16.7$	$70 \pm 14.4$

Tabella 4: Media  $\pm$  SD (CV%) dei parametri relativi all'identificazione 3

Vengono riportati di seguito i grafici relativi all'identificazione 3 come descritto precedentemente:

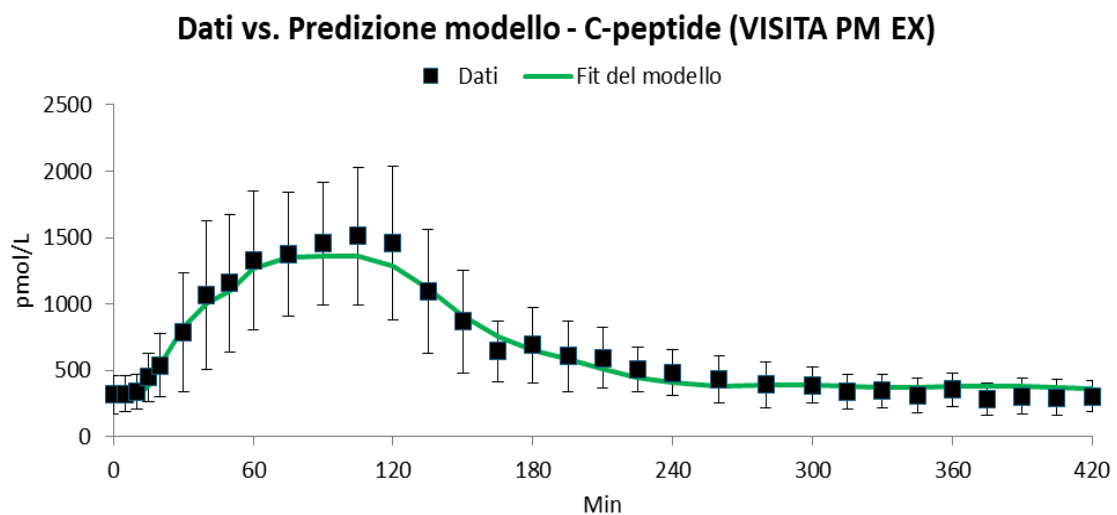
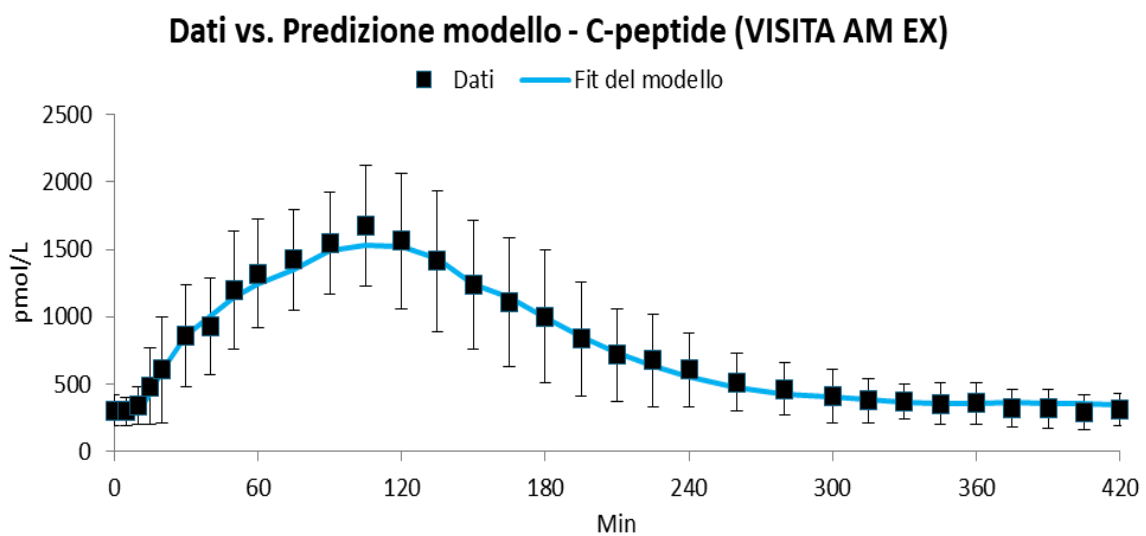
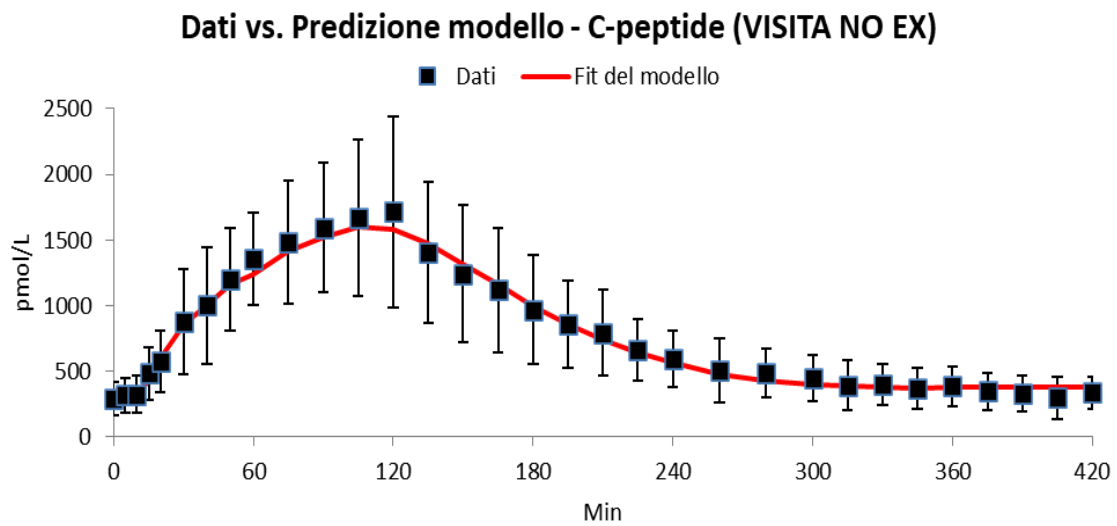
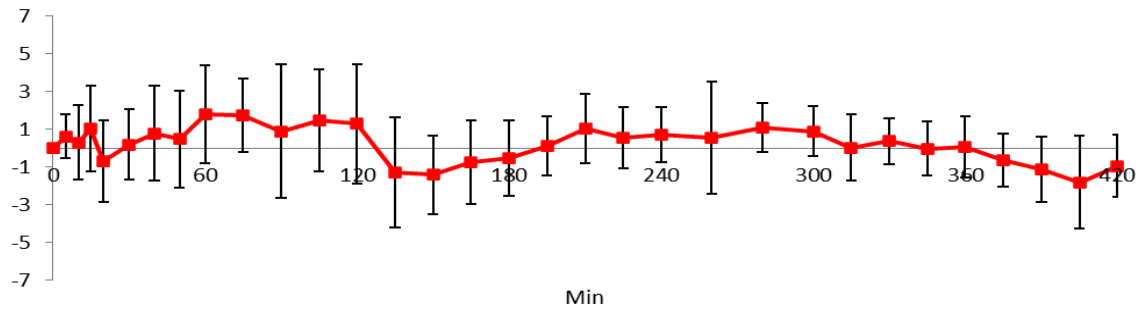
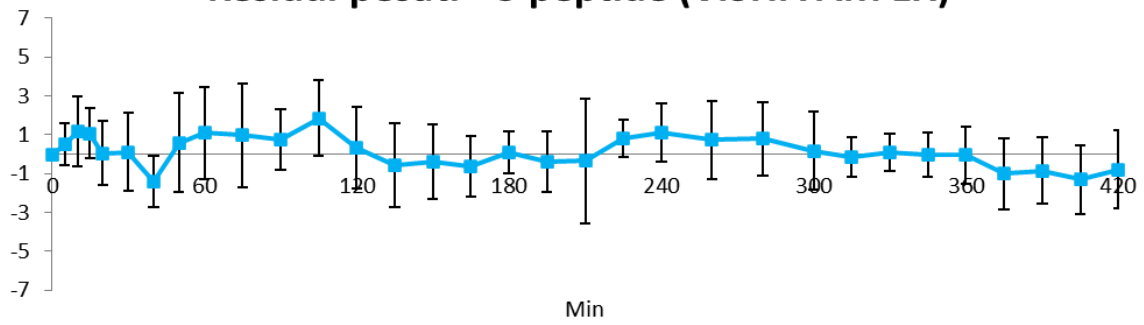


Figura 16: (Media  $\pm$  SD) dati vs. predizione del modello del C-peptide nelle tre visite.

### Residui pesati - C-peptide (VISITA NO EX)



### Residui pesati - C-peptide (VISITA AM EX)



### Residui pesati - C-peptide (VISITA PM EX)

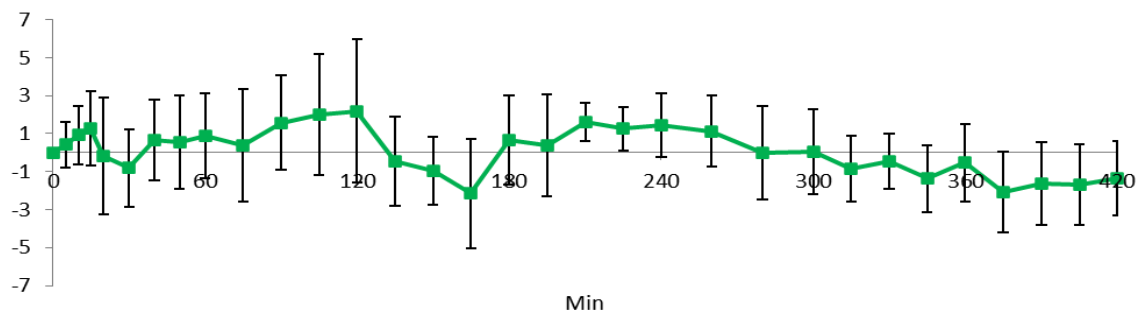


Figura 17: (Media  $\pm$  SD) residui pesati del modello del C-peptide.

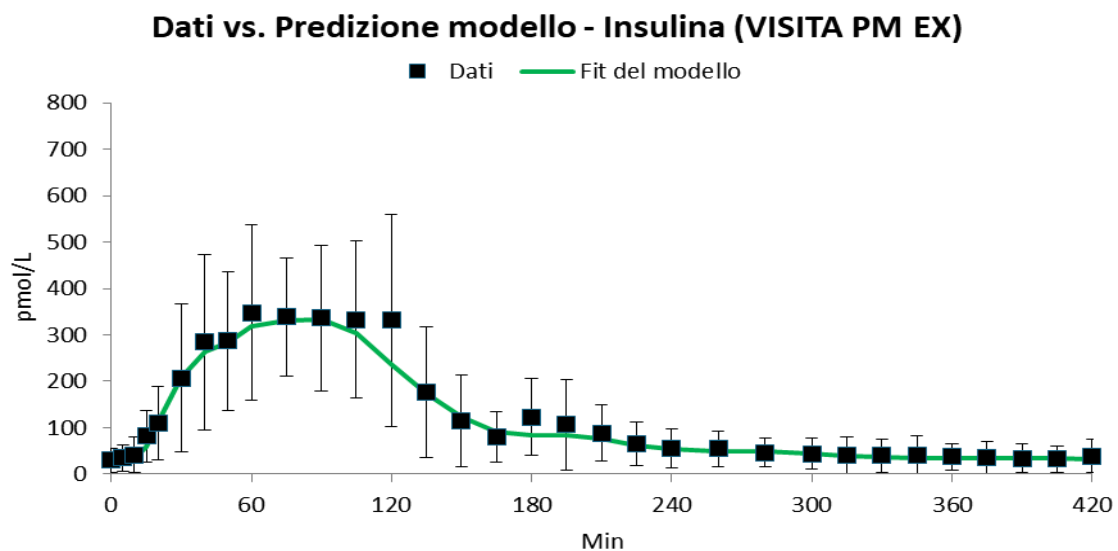
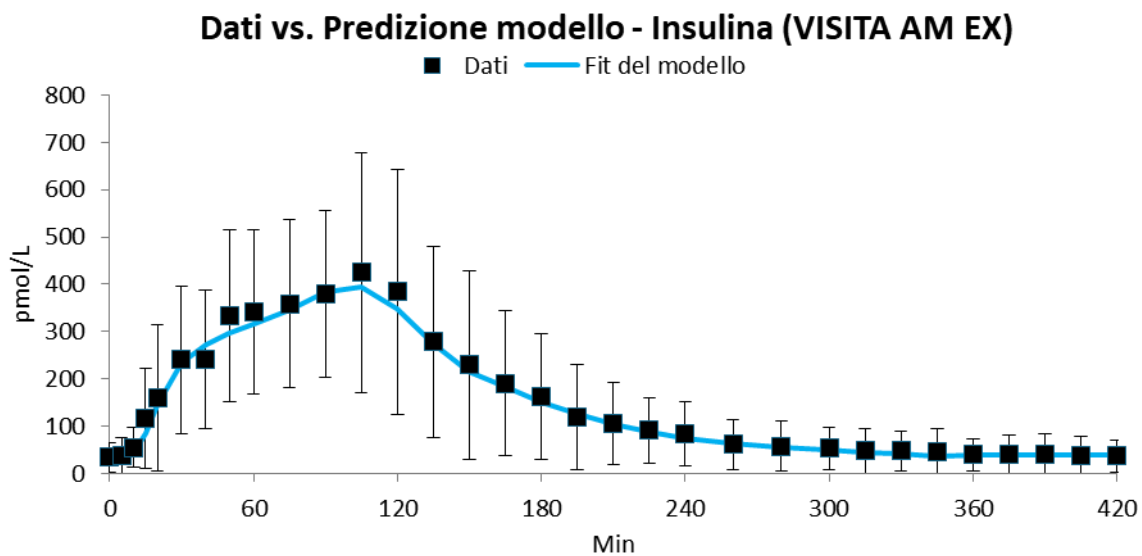
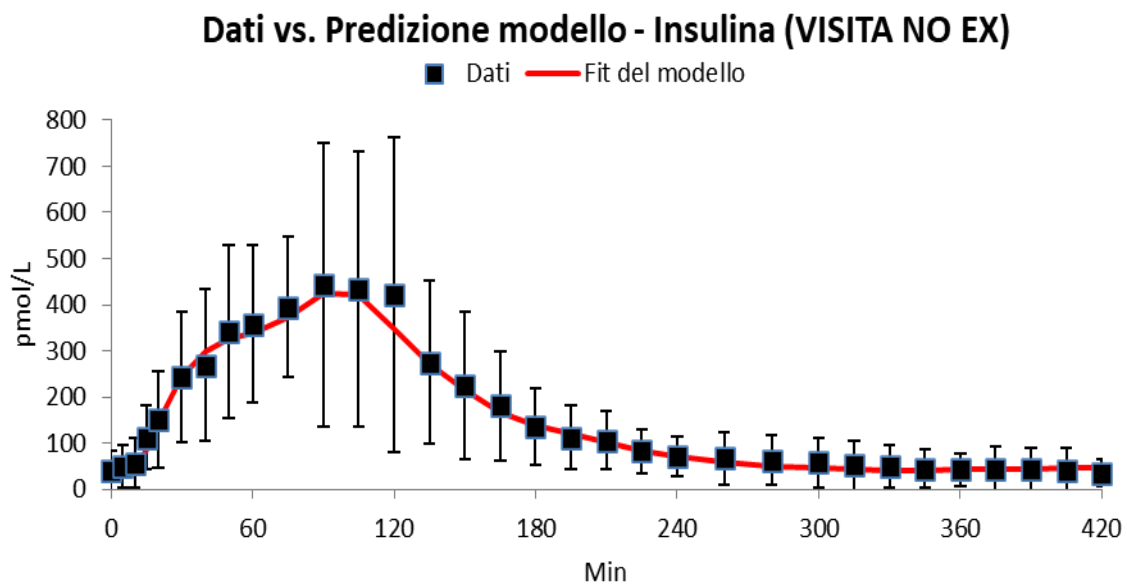


Figura 18: (Media  $\pm$  SD) dati vs. predizione del modello di insulina nelle tre visite.

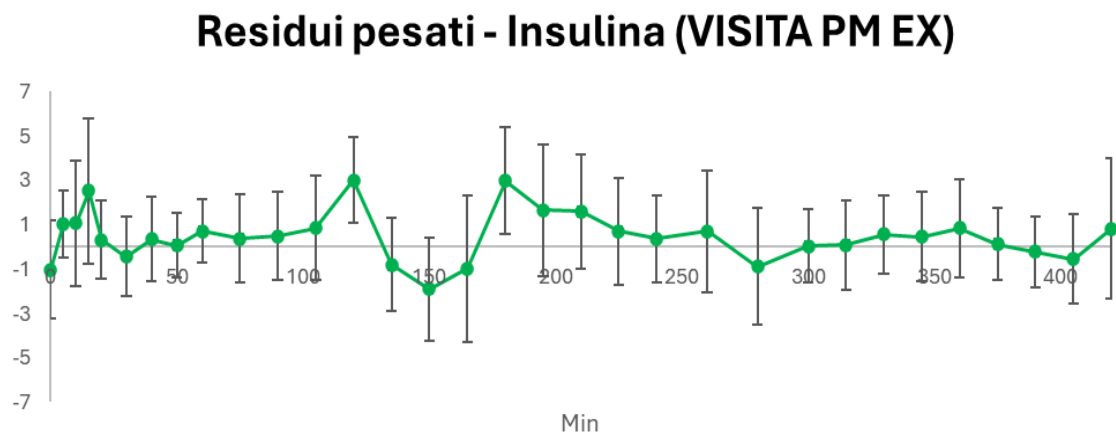
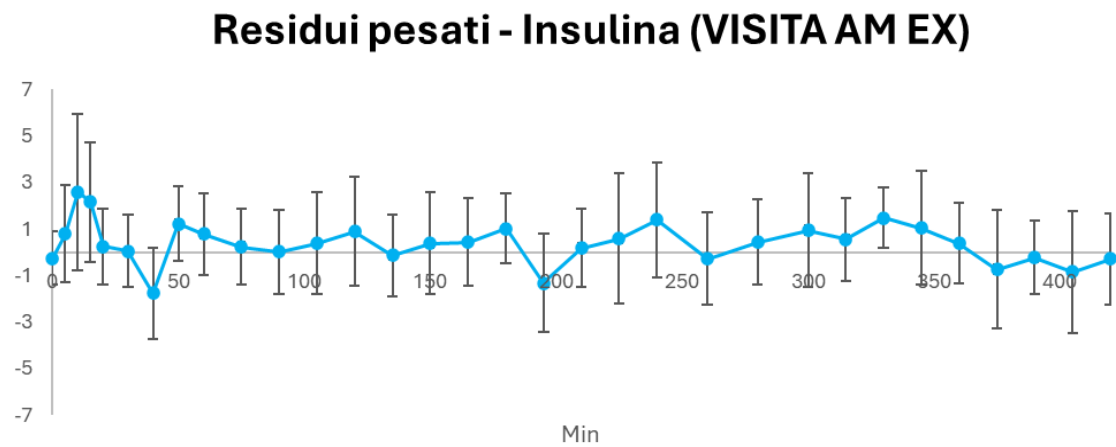
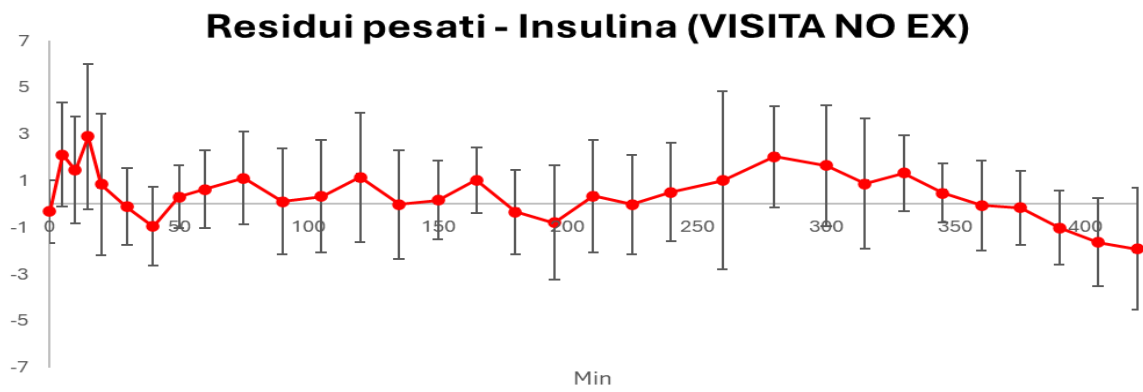
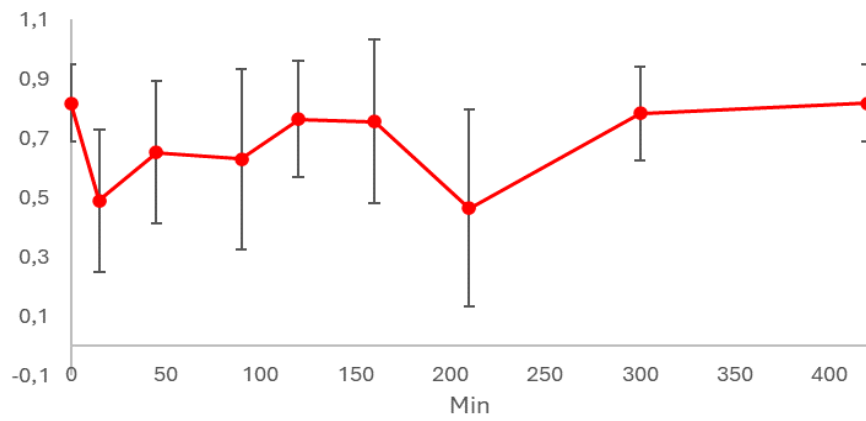


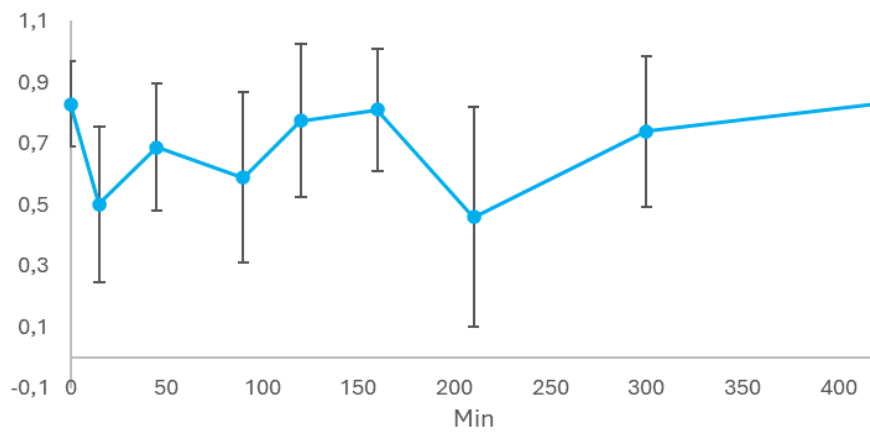
Figura 19: (Media  $\pm$  SD) residui pesati medi del modello dell'insulina.



### Estrazione epatica - Visita NO EX



### Estrazione epatica - Visita AM EX



### Estrazione epatica - Visita PM EX

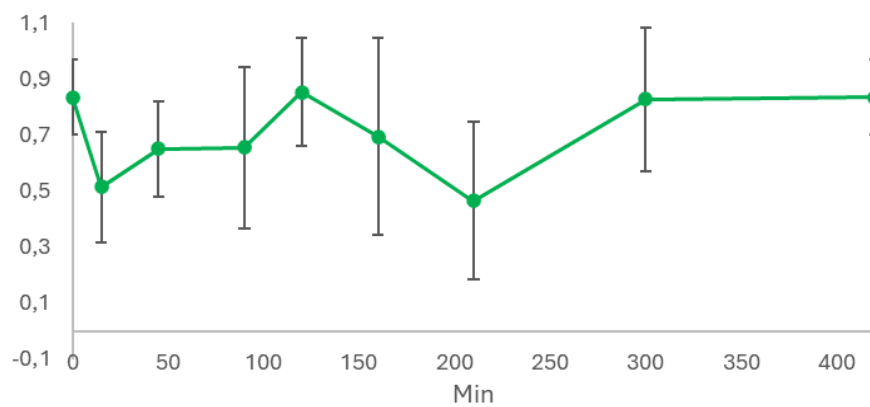


Figura 20: (Media  $\pm$  SD) dell'estrazione epatica dell'insulina stimata nelle tre visite.

#### 4.4 Selezione del modello

Come scritto nel paragrafo 3.3, l'identificazione che rappresenta il miglior compromesso tra la complessità del modello e l'aderenza ai dati è individuabile attraverso il criterio di parsimonia Bayesian Information Criterion (BIC). Nella forma  $\text{media} \pm \text{deviazione standard}$ , i coefficienti di BIC delle tre identificazioni sono rispettivamente:

$$\text{BIC 1} = 1132,36 \pm 441,28 \quad \text{BIC 2} = 1166,7 \pm 465,01 \quad \text{BIC 3} = 1202,61 \pm 477,63$$

Si può notare che il coefficiente BIC più basso è quello corrispondente alla prima identificazione, ovvero quella dove tutti i parametri del modello sono stati considerati indipendenti tra le 3 visite. Questo porta a pensare che ci possano essere delle differenze tra le visite. Si è in seguito svolto un test ANOVA per misure ripetute per ogni identificazione, su alcuni parametri del modello ( $\Phi_b$ ,  $\Phi_d$ ,  $\Phi_s$ ,  $\Phi_{\text{tot}}$ ,  $\text{HE}_b$ ,  $\text{HE}_{\text{tot}}$ ,  $k_{01}$ ,  $\text{CL}$ ), dove sono stati considerati statisticamente significativi i parametri aventi un  $p\text{-value} < 0.05$ . Il fine di questo test era determinare se tra le tre visite studiate (NO EX, AM EX, PM EX) ci fossero delle differenze statisticamente significative imputabili all'esercizio fisico.

Tuttavia, nessun parametro è risultato statisticamente differente tra le 3 visite. Questo significa che, per quanto riguarda i parametri studiati ( $\Phi_b$ ,  $\Phi_d$ ,  $\Phi_s$ ,  $\Phi_{\text{tot}}$ ,  $\text{HE}_b$ ,  $\text{HE}_{\text{tot}}$ ,  $k_{01}$ ,  $\text{CL}$ ), con la numerosità del database e la variabilità intra-soggettiva dei parametri stimata, o una differenza sistematica tra le visite, per es. dovuta all'esercizio, non è presente nei parametri studiati o, nel caso in cui sia presente, non c'è una sufficiente potenza statistica per evidenziare tale differenza.

# Capitolo 5: Conclusioni

In questa tesi, per valutare l'effetto dell'esercizio fisico sulla secrezione e cinetica dell'insulina in soggetti sani e normopeso, è stato usato il modello minimo orale del C-peptide e insulina. In particolare, si è lavorato partendo dai dati delle concentrazioni plasmatiche di glucosio, C-peptide ed insulina ottenuti in tre visite (NO EX, AM EX, PM EX) su 18 soggetti. Durante queste tre visite i soggetti hanno consumato pasti specifici ad orari fissati e hanno svolto o meno esercizio fisico a seconda della visita. Nella visita NO EX non è stato svolto esercizio fisico mentre nelle altre due visite è stato svolto esercizio fisico rispettivamente alla mattina (AM EX), prima della cena oggetto di studio, e alla sera (PM EX), dopo la cena oggetto di studio.

Sono state svolte diverse identificazioni del modello, assumendo alcuni parametri potessero essere più o meno affetti dall'esercizio fisico. Nella prima identificazione tutti i parametri sono stati liberi di variare, nella seconda sono stati liberi di variare tutti i parametri tranne quelli legati alla cinetica del C-peptide e nella terza oltre ai parametri legati alla cinetica del C-peptide è stata considerata fissata anche la clearance post-epatica di insulina.

In seguito usando il criterio di parsimonia Bayesian Information Criterion, la prima identificazione è stata selezionata come il migliore compromesso tra l'aderenza ai dati e la complessità del modello. Questo può far ipotizzare che l'esercizio fisico abbia impatto anche sulla cinetica dell'insulina e sulla cinetica del C-peptide. Si è poi svolto un test ANOVA per misure ripetute al fine di identificare quali fossero i parametri presentanti una differenza statisticamente significativa nelle tre visite. Il test, tuttavia, non ha evidenziato alcuna significatività statistica dei parametri nelle tre visite. Questo può portare ad ipotizzare che o non ci sia una effettiva differenza sistematica tra le visite studiate dovuta all'esercizio fisico o, almeno per quanto riguarda il caso di studio trattato in questo elaborato, non ci sia una potenza statistica sufficiente per identificarla dovuta alla numerosità del database e alla elevata variabilità intra-soggettiva dei parametri.

Ulteriori studi saranno necessari per testare le ipotesi avanzate in questo lavoro.

# Bibliografia

- [1] D. U. Silverthorn. Fisiologia umana. Un approccio integrato. Ottava edizione. s.l. Pearson. 2020. INSB 9788891909732
- [2] EuroStemCell. Diabete: come possono essere di aiuto le cellule staminali?. <https://www.eurostemcell.org/it/diabete-come-possono-essere-di-aiuto-le-cellule-staminali>
- [3] Fu Z, Gilbert ER, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013 Jan 1;9(1):25-53. PMID: 22974359; PMCID: PMC3934755.
- [4] DiMenna FJ, Arad AD. The acute vs. chronic effect of exercise on insulin sensitivity: nothing lasts forever. *Cardiovasc Endocrinol Metab.* 2020 Nov 19;10(3):149-161. doi: 10.1097/XCE.0000000000000239. PMID: 34386716; PMCID: PMC8352615.
- [5] Venkatasamy VV, Pericherla S, Manthuruthil S, Mishra S, Hanno R. Effect of Physical activity on Insulin Resistance, Inflammation and Oxidative Stress in Diabetes Mellitus. *J Clin Diagn Res.* 2013 Aug;7(8):1764-6. doi: 10.7860/JCDR/2013/6518.3306. Epub 2013 Jul 17. PMID: 24086908; PMCID: PMC3782965.
- [6] Kanaley JA, Porter JW, Winn NC, Lastra G, Chockalingam A, Pettit-Mee RJ, Petroski GF, Cobelli C, Schiavon M, Parks EJ. Temporal optimization of exercise to lower fasting glucose levels. *J Physiol.* 2023 Sep 21. DOI: 10.1113/JP285069. Epub ahead of print. PMID: 37732475.

- [7] Cobelli C, Dalla Man C, Toffolo G, Basu R, Vella A, Rizza R. The oral minimal model method. *Diabetes*. 2014 Apr;63(4):1203-13. DOI: 10.2337/db13-1198. PMID: 24651807; PMCID: PMC4179313.
- [8] M. Campioni, G. Toffolo, R. Basu, R. A. Rizza and C. Cobelli. Minimal model assessment of hepatic insulin extraction during an oral test from standard insulin kinetic parameters. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2009). 297: E941-E948. DOI: 10.1152/ajpendo.90842.2008
- [9] E. Van Cauter, F. Mestrez, J. Sturis, K.S. Polonsky. Estimation of insulin secretion rates from C-peptide levels. Comparison of individual and standard kinetic parameters for C-peptide clearance. *Diabetes* (1992), 41: 368-77. DOI: 10.2337/diab.41.3.368. PMID: 1551497.
- [10] Science Direct, Bayesian Information Criterion.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/social-sciences/bayesian-information-criterion>
- [11] G.M. Toffolo, M. Campioni, R. Basu, R.A. Rizza, C. Cobelli. A minimal model of insulin secretion and kinetics to assess hepatic insulin extraction. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2006), 290: 169-176. DOI: doi:10.1152/ajpendo.00473.2004. PMID: 16144811