

## **Prof. Vincenzo Varlaro**

Docente a contratto di Medicina Estetica

nel master Di Medicina Estetica e Terapia Estetica dell'Università di Camerino e Torino

Docente a contratto di Medicina Estetica

nel master di Medicina Estetica dell'Università di Roma Tor Vergata

Via Grazia Deledda, 81 – 00137 Roma - Tel. 3493131350 / 0774570118 – vincenzovarlaro@virgilio.it

# **LA BIORISTRUTTURAZIONE DEI TESSUTI (BIORIGENERAZIONE DEI TESSUTI) MEDIANTE INIEZIONI DI INSULINA UMANA RAPIDA LOW DOSE (A BASSO DOSAGGIO) (0.004 UI/ml) IN SOLUZIONE GLUCOSATA 5%**

(Legge n.94, 8 aprile 1998)

Art. 3 - Osservanza delle indicazioni terapeutiche autorizzate:

- 1.....;
2. .... il medico può, sotto la sua diretta responsabilità e previa informazione del paziente e acquisizione del consenso dello stesso, impiegare un medicinale prodotto industrialmente per un'indicazione o una via di somministrazione o una modalità di somministrazione o di utilizzazione diversa da quella autorizzata ovvero riconosciuta agli effetti dell'applicazione dell'articolo 1, comma 4, del decreto-legge 21 ottobre 1996, n. 536, convertito dalla legge 23 dicembre 1996, n. 648, qualora il medico stesso ritenga, in base a dati documentabili, che il paziente non possa essere utilmente trattato con medicinali per i quali sia già approvata quella indicazione terapeutica o quella via o modalità di somministrazione e purché tale impiego sia noto e conforme a lavori apparsi su pubblicazioni scientifiche accreditate in campo internazionale.

In base a tale norma è possibile utilizzare l'insulina off-label per gli effetti biologici ampiamente documentati in oltre 200 pubblicazioni scientifiche disponibili su "Pub Med.gov".

## **Nota storica**

L'insulina è un ormone che ha avuto e ha uno spazio importante nel mondo della terapia medica per il trattamento del diabete mellito di tipo 1.

Risale al 1916 la sua scoperta. Nicolae Paulescu, cattedratico di Fisiologia all'Università di Medicina e Farmacia di Bucarest (Romania) ricavò dal pancreas un liquido che iniettò in un cane con diabete. Paulescu osservò come questo liquido fosse capace di normalizzare la concentrazione di zuccheri nel sangue e ne pubblicò i risultati in quattro lavori scientifici che gli permisero di ottenere, nel 1922, il brevetto per la scoperta della pancreina.

Dall'altra parte dell'oceano, lo studioso canadese Frederick Grant Banting si immerse nella lettura degli studi diabete e sulle isole di Langerhans nel pancreas, venendo rapito dalla teoria secondo cui la molecola chiave della regolazione degli zuccheri nel sangue fosse da ricercare proprio nel secreto pancreatico, intercettò, anche le pubblicazioni di Paulescu.

Banting chiese a John James Richard Macleod, cattedratico di Fisiologia all'Università di Toronto, il supporto tecnico per identificare la molecola responsabile dell'effetto ipoglicemizzante osservato da Paulescu.

Il gruppo composto da Macleod, Banting, Charles Best (studente di medicina), James Bertrand Collip (biochimico) riuscì ad ottenere nel 1922, un estratto del pancreas purificato da sali e grassi.

Macleod introdusse il termine universale *insulina* per identificare la famosa soluzione acquosa che oggi è ritenuta essere il più importante farmaco salvavita per i diabetici. Nel 1923 a Banting e Macleod venne assegnato il premio Nobel in Fisiologia e Medicina per la scoperta ed estrazione dell'insulina, premio che i due ricercatori condivideranno con Best e Collip. Paulescu, giustamente non la prese bene.

Il riconoscimento ai ricercatori canadesi aprì una lunga polemica sulla paternità della scoperta dell'insulina.

Il Presidente del Comitato del Premio Nobel ricevette una lettera da Paulescu il quale, indignato, commentò come il premio era stato dato a persone che non lo meritavano e che la scoperta degli effetti fisiologici e terapeutici dell'estratto pancreatico (pancreatina) nel diabete gli apparteneva.

Banting e Macleod, in effetti, avevano sempre dichiarato di avere riprodotto in laboratorio quanto pubblicato da Paulescu, citandone spesso il lavoro e mettendo semplicemente in pratica quanto scoperto dal cattedratico rumeno.

Tutte le contestazioni e i nuovi lavori pubblicati da Paulescu sugli *Archives Internationales de Physiologie* furono inutili fino al 1969, quando il Comitato del Premio Nobel riconobbe la precedenza di Nicolae Paulescu nella scoperta del trattamento antidiabetico. Pur tuttavia, in base alle regole dello statuto del premio, non fu possibile riparare ufficialmente per cui Paulescu non ebbe mai il premio Nobel perché già attribuito per quella stessa ricerca.

Roif Luft, direttore del Comitato del Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina, in un articolo del 1971 (*Who discovered insulin*) ammise che effettivamente il Premio Nobel per la scoperta dell'insulina doveva essere attribuito a Paulescu, Banting, Macleod.

L'insulina è stata una scoperta importante per l'umanità, per permettere agli uomini di poter convivere con una patologia grave qual è il Diabete Mellito di tipo 1.

I diabetologi l'hanno quindi adottata per gestire l'euglicemia nei pazienti diabetici, sono stati gli specialisti che hanno avuto per molti anni l'esclusiva su questo farmaco. Poi l'insulina è entrata nel mondo dello sport e nelle palestre in virtù dei suoi effetti anabolizzanti sul tessuto muscolare.

È ritenuta una molecola doping nel mondo dello sport sia perché permette una espansione importante della massa muscolare, sia perché assicura un rapido recupero energetico: l'insulina facilita un veloce stoccaggio del glicogeno nel tessuto muscolare.

### **L'insulina low dose: un allargamento degli orizzonti terapeutici**

Negli ultimi anni si sono moltiplicate le pubblicazioni scientifiche in tema di ricerca sull'insulina; se ne contano a centinaia.

Oggi si sa che tutte le cellule dell'organismo hanno recettori per l'insulina: i cheratinociti, i melanociti, le cellule di Merkel, le cellule di Langerhans, i fibroblasti, le fibrocellule muscolari, gli adipociti, gli osteoblasti, gli osteoclasti, gli osteociti, i neuroni, le cellule del sistema immunitario (linfociti, macrofagi, neutrofili,...), gli eritrociti, le cellule endoteliali, le cellule staminali, le piastrine.

L'insulina è un *segnaletica di vita* essenziale per tutte le cellule. Sono tante le pubblicazioni effettuate sui vari tipi cellulari che tentano di svelare ulteriormente i meccanismi molecolari d'azione di tale straordinaria proteina.

I fiori hanno bisogno della linfa per vivere, le nostre cellule hanno bisogno anche di insulina per vivere. Esiste la linfa che tiene in vita i fiori ed esiste la linfa che tiene in vita le cellule dell'organismo.

La linfa che tiene in vita l'essere umano è costituita da tante molecole (insulina, glucagone, grelina, amilina, ormone polipeptidico pancreatico, somatostatina, GH, ACTH, TSH, FT3, FT4, estrogeni, androgeni, cortisolo, acetilcolina, serotonina, dopamina, GABA, acido glutammico, leptina,...).

Alla luce della ricerca della biologia molecolare che ci regala ogni giorno nuove perle di conoscenza, è giusto allargare gli orizzonti terapeutici dell'insulina.

I diabetologici la utilizzano per gestire l'euglicemia ma l'insulina non gestisce solo l'euglicemia, è un segnale molecolare di vita per tutte le cellule per cui è giusto andare oltre e cercare di sfruttarne gli effetti per attivare quelle vie di segnalazione intracellulari che garantiscono una ottimale vita biologica delle cellule, dell'organismo.

La natura insegna che le piante hanno bisogno di essere irrorate regolarmente altrimenti muoiono, la ricerca della biologia molecolare afferma che le nostre cellule hanno bisogno di insulina in continuo, tutti i giorni e per tutto il giorno.

La β-cellula pancreatica è un motore sempre acceso proprio per garantire questa una risorsa biologica determinante. L'insulina basale serve ad assicurare uno stato di buona salute all'organismo (segnali metabolici), l'insulina post-prandiale serve per assicurare riserve energetiche all'organismo: glucosio, acidi grassi, aminoacidi (Fig. 1).

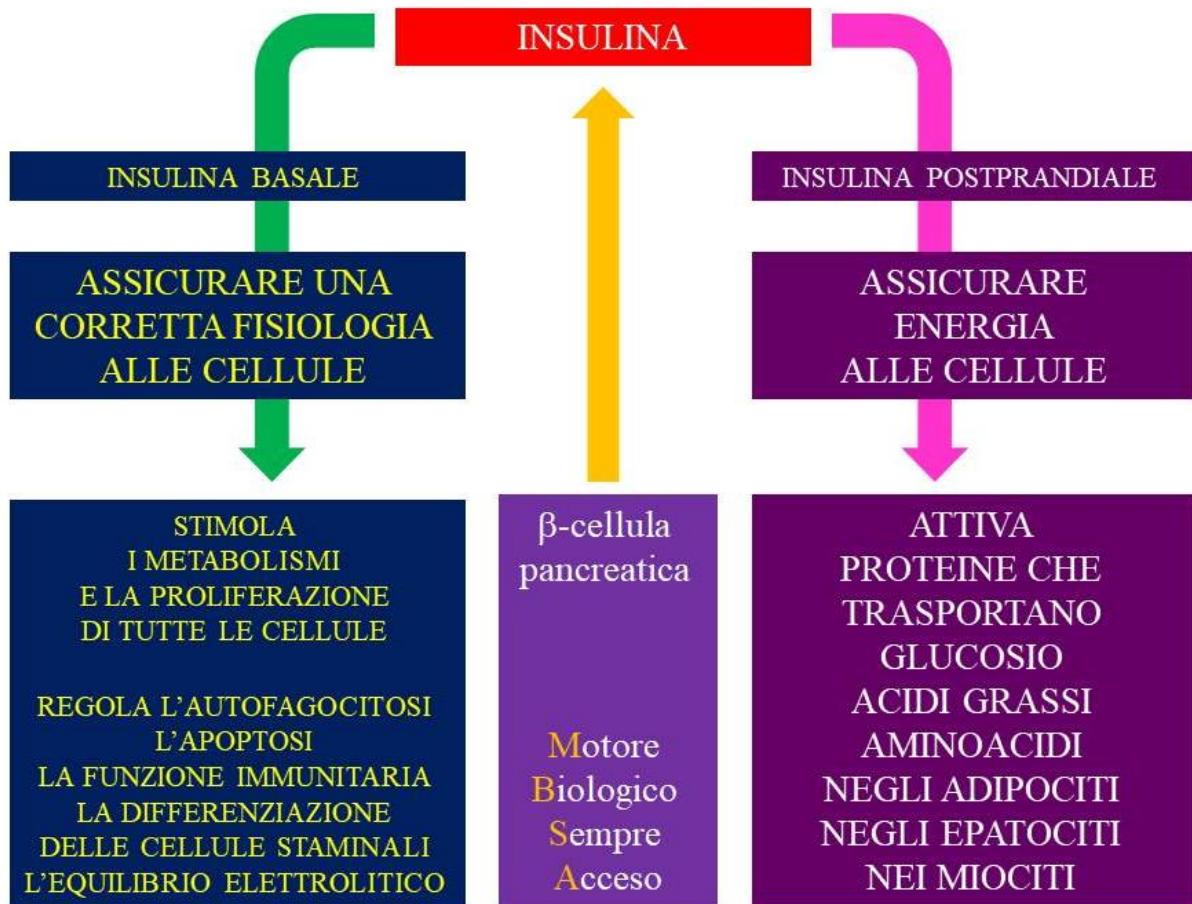


Figura 1 Funzioni dell'insulina

L'insulina è approdata nel mondo della medicina estetica, grazie all'intuizione del prof. Victor Garcia (Università autonoma di Barcellona, Spagna) mentre in Italia è arrivata grazie a un Caronte dei giorni nostri che traghetti da sempre scienza nel mondo della medicina estetica, il prof. Maurizio Ceccarelli.

La bioristrutturazione dei tessuti è diventata una procedura finalmente efficace grazie gli effetti farmacodinamici che l'insulina realizza a livello distrettuale e su tutti i livelli tissutali.

Ne beneficiano le cellule che abitano al piano attico dei tessuti (cheratinociti, ....), quelle che abitano al piano terra dei tessuti (osteoblasti, osteoclasti), quelle che abitano nei piani intermedi dei tessuti (fibroblasti, adipociti, miociti), quelle che stanno in panchina in tutti i tessuti (cellule staminali), quelle che se ne vanno a spasso (macrofagi, linfociti,...) per vigilare, per aiutare l'organismo a non essere sopraffatto dalle aggressioni, dalla cattiva manutenzione (macrofagi, linfociti,...).

In Medicina Estetica l'insulina è utilizzata *low dose*. a basso dosaggio per cui tale farmaco è diventato assolutamente maneggevole perché si adottano concentrazioni minime che non interferiscono con la glicemia sistemica, con l'insulinemia sistemica. Si sfruttano gli effetti distrettuali di tale proteina bioattiva che realizza una migliore segnalazione molecolare intracellulare, in qualche modo è un concreto *allargamento degli orizzonti* terapeutici di tale straordinario ormone.

## L'insulina low dose: una nuova risorsa per la terapia medica

L'insulina low dose nata grazie alla Medicina Estetica ma è una procedura di grande interesse per molte altre branche specialistiche: la diabetologia, la flebologia, l'oculistica, la dermatologia, l'odontoiatria, l'ortopedia (Fig. 2).

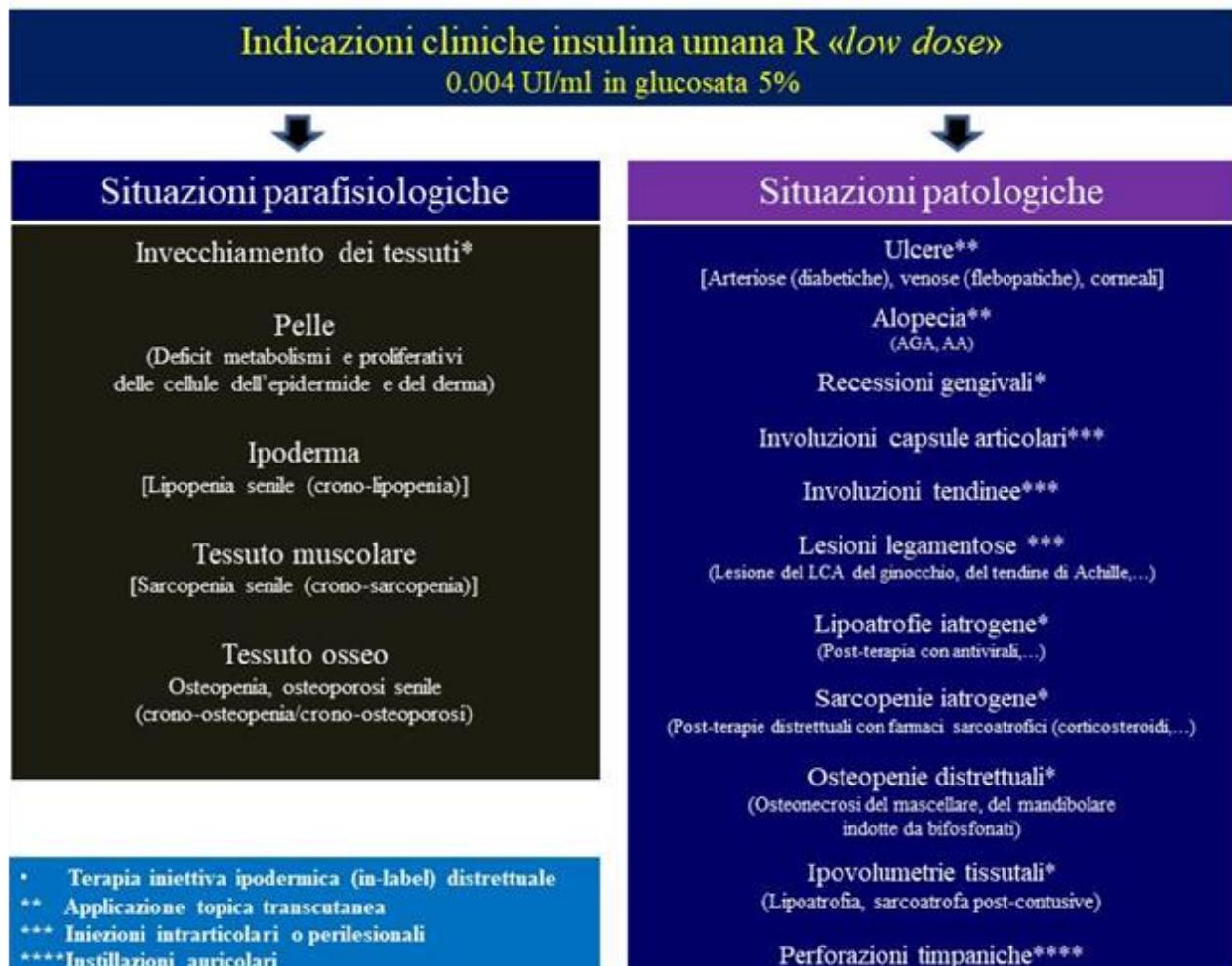


Figura 2

È una occasione di crescita ulteriore delle possibilità terapeutiche che si possono realizzare nell'interesse della salute dell'umanità. L'*insulina* è un ormone prodotto dal pancreas (Fig. 3).

Il pancreas è una ghiandola a doppia secrezione: esocrina ed endocrina. La produzione esocrina consiste in enzimi digestivi ( $\alpha$ -amilasi, lipasi) ed è realizzata dagli acini del parenchima pancreatico. La produzione endocrina consiste in ormoni ed è realizzata dalle isole di Langerhans: isole multicellulari (Fig. 4).

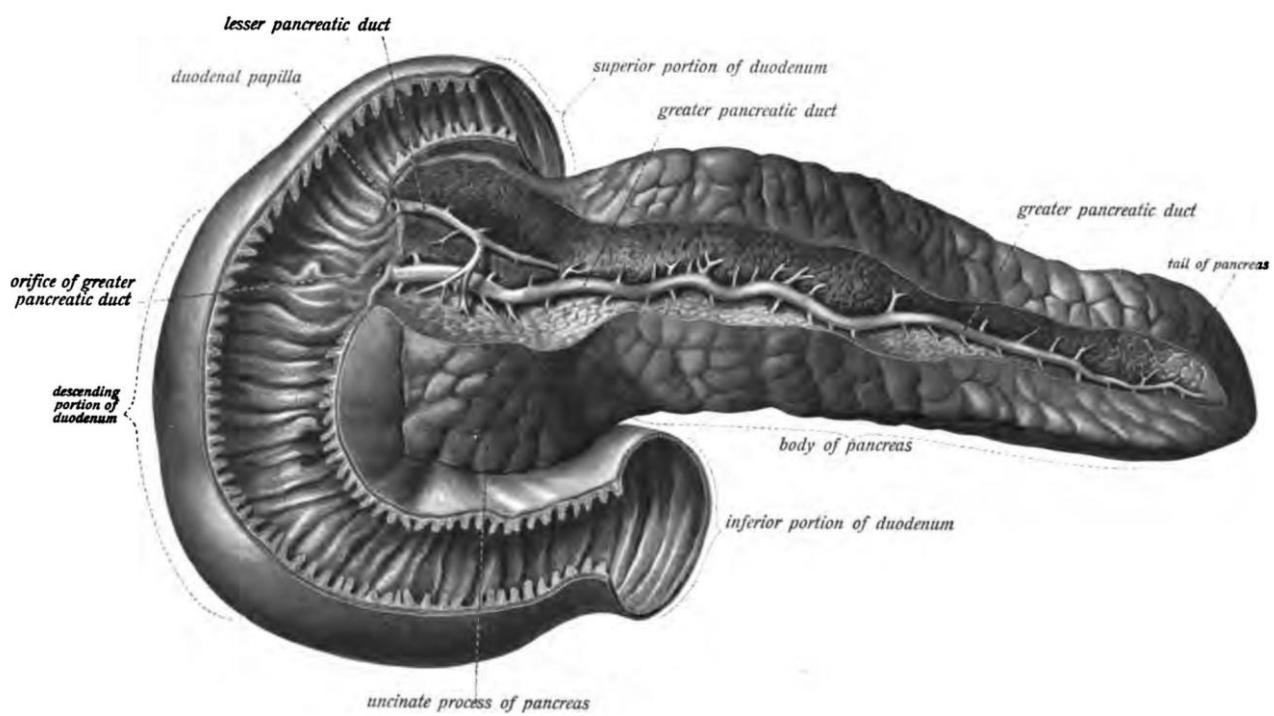


Figura 3 Pancreas (illustration from the 1906 edition of Sobotta's Atlas and Text-book of Human Anatomy)

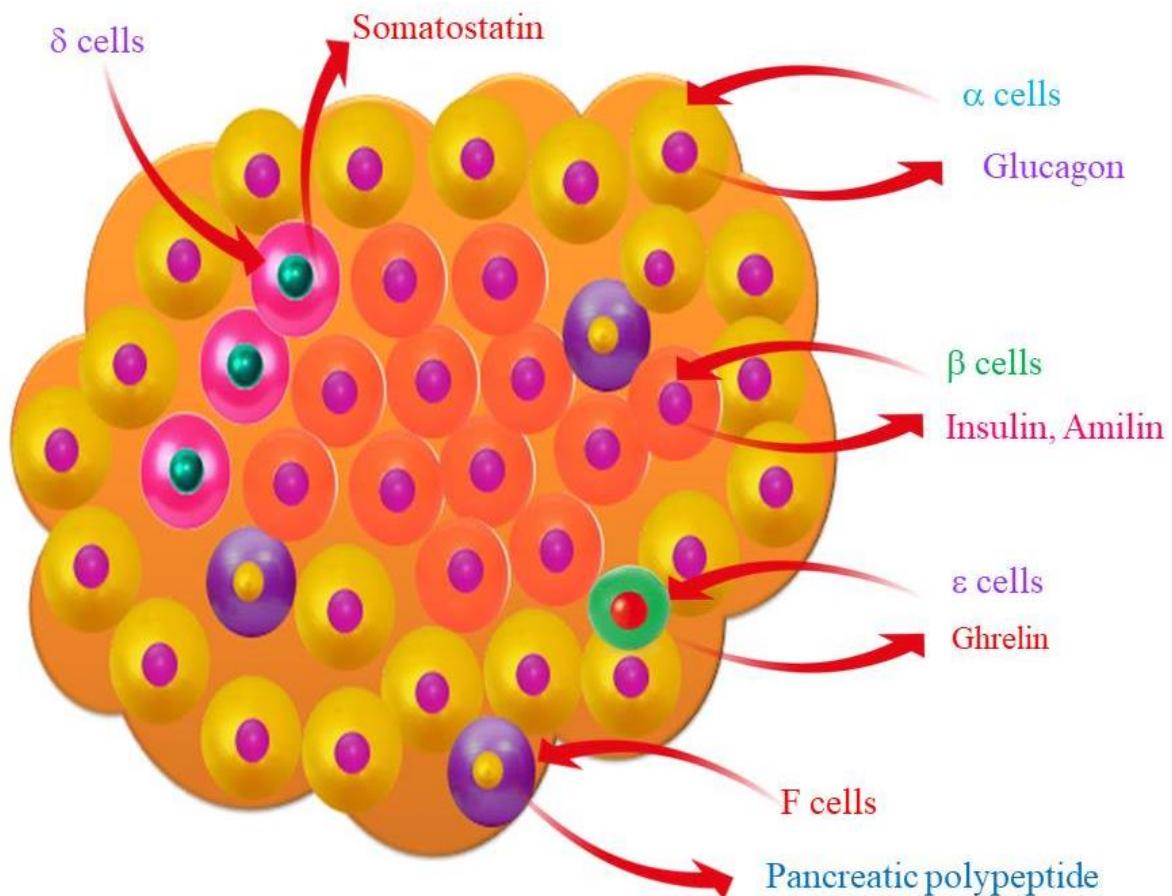


Figura 4 Isola pancreatică di Langerhans – By V. Varlaro

Le isole di Langerhans sono organizzate in cordoni di cellule collocate in una rete di capillari in cui il sangue scorre dal centro verso l'esterno. Rappresentano circa l'1-2% della massa del parenchima pancreatico. Sono costituite da almeno cinque tipi cellulari:

- Cellule  $\alpha$  (alfa): secernono glucagone (15-20% nei roditori, 40-60% negli umani);
- Cellule  $\beta$  (beta): secernono insulina ed amilina (65-80% nei roditori, ~40% negli umani);
- Cellule  $\delta$  (delta): secernono somatostatina (3-10%);
- Cellule F (effe): secernono peptide pancreatico (3-5%)
- Cellule  $\epsilon$  (epsilon): secernono grelina (1%).

La citoarchitettura delle isole di Langerhans differisce sostanzialmente con le diverse specie animali.

Le isole di Langerhans di un roditore sono caratterizzate da una predominante componente di cellule  $\beta$  (80%) distribuite al centro dell'agglomerato cellulare e da una minore componente di cellule  $\alpha$ ,  $\delta$ , PP,  $\epsilon$  distribuite alla periferia.

Le isole di Langerhans dell'uomo sono caratterizzate da una distribuzione di cellule  $\beta$  e  $\alpha$  più uniforme nell'ambito dell'agglomerato cellulare.

L'insulina è prodotta dalle cellule  $\beta$  delle isole pancreatiche di Langerhans. È formata da due catene peptidiche unite da due ponti solfuro: una catena A di 21 aminoacidi e una catena B di 30 aminoacidi.

È sintetizzata inizialmente come singolo polipeptide chiamato *preproinsulina* che contiene un *peptide di segnale* che indirizza la nascente catena del polipeptide al reticolo endoplasmatico ruvido (RER).

Quando il polipeptide è traslocato nel RER, il *peptide di segnale* viene fratturato formando la proinsulina.

Nel RER la proinsulina si piega nella conformazione corretta e si formano tre punti disolfuro.

Dopo 5-10 minuti il suo assemblaggio nel RER, la proinsulina è trasportata nella rete trans-Golgi (TGN). Il trasporto verso la TGN richiede circa 30 minuti. Nella rete TGN si formano i granuli immaturi.

La proinsulina, quindi subisce la maturazione in insulina attiva attraverso l'azione di endopeptidasi cellulari come le *convertasi pro-ormone* (PC1 e PC2) e la *exoproteasi carboxypeptidasi E*.

Le endopeptidasi, clivando la proinsulina, liberano un frammento chiamato *C-peptide* e due catene peptidiche: le catene B e A legate da due punti disolfuro.

L'insulina matura ottenuta è confezionata all'interno di granuli dove rimane in attesa di segnali metabolici atti a indurne l'esocitosi nella circolazione sanguigna.

Agisce su tutte le cellule dell'organismo attivando dei recettori specifici: *Insulin Receptor Substrate-1* (IRS-1).

L'insulina è un ormone polipeptidico piccolo (PM = 5734), è una molecola magica che realizza diversi effetti:

- Energetico: stimola l'ingresso del glucosio nella cellula per cui mette a disposizione della cellula un substrato che ossida (glicolisi) per formare ATP che in parte è utilizzata dalla cellula per le sue necessità, in parte è deviata verso lo stoccaggio in forma di trigliceridi (energia disponibile in casi di bisogno);
- Nutrizionale: stimola l'ingresso nella cellula di glucosio, acidi grassi, aminoacidi, sodio, potassio, anioni fosfato, ...;
- Metabolico: stimola l'attivazione di vie di segnalazione molecolari metaboliche [PI3K – PIP2-PIP3-PDK 1/2-AKT (PKB)] intervengono nella regolazione del metabolismo cellulare;
- Genetico: stimola l'attivazione di vie di segnalazione genetica (SOS-RAS-cRAF-MEK-ERK  $\frac{1}{2}$  e PI3K – PIP2-PIP3-PDK 1/2-AKT (PKB) che intervengono nella regolazione dell'espressione genica;
- Euglicemizzante: con la complicità della  $\alpha$ -cellula pancreatica che produce glucagone e della cellula epatica che stimola la glicogenosintesi e la gluconeogenesi, regola l'euglicemia.

L'insulina è sintetizzata e immagazzinata (stoccati) all'interno di granuli (vescicole) parcheggiati in prossimità della membrana interna della  $\beta$ -cellula pancreatica. Lì rimane in attesa di un segnale molecolare che ne attivi l'esocitosi nel torrente ematico.

Il segnale molecolare utile è quello del glucosio (aumento della glicemia). Quando tale segnale arriva, la membrana delle vescicole di stoccaggio dell'insulina si fonde con la membrana della  $\beta$ -cellula pancreatica grazie alla mediazione di un complesso di proteine (*fusion complex*), un *complesso facilitatore* della fusione, per cui l'insulina è esocitata all'esterno, nel sangue.

La  $\beta$ -cellula delle isolette pancreatiche di Langerhans è **un motore sempre acceso** che realizza un *numero di giri base* che garantisce l'insulinemia basale essenziale per regolare l'euglicemia e per garantire stimoli metabolici e genetici fisiologici a tutte le cellule). Pur tuttavia può *aumentare di giri* (iperglycemia) o *diminuire di giri* (ipoglycemia) secondo le necessità metaboliche dell'organismo e in complicità con la  $\alpha$ -cellula pancreatica che produce glucagone e della cellula epatica che promuove la glicogenosintesi e la gluconeogenesi.

La  $\beta$ -cellula pancreatica, la  $\alpha$ -cellula pancreatica, l'epatocita sono i tre tipi cellulari che principalmente gestiscono l'affare euglicemia.

L'euglicemia è necessaria per la sopravvivenza di tante cellule per le quali tale molecola è una risorsa di vita unica. Il cervello è un organo in cui abitano i neuroni che basano il loro equilibrio metabolico in modo rilevante sul glucosio. In assenza di glucosio, dopo pochi minuti le cellule celebrali morirebbero.

Per i neuroni il glucosio significa vita per almeno tre ragioni:

- Il cervello, a differenza dei muscoli, non ha la capacità di immagazzinare scorte di glucosio;
- Il glucosio ematico è l'unico carburante per i neuroni;
- Il cervello consuma una quantità costante di energia, a prescindere dalla sua attività (studiare o non studiare non modifica il consumo di calorie).

Le variazioni minime della glicemia mantengono acceso il motore metabolico della  $\beta$ -cellula pancreatica e della  $\alpha$ -cellula pancreatica per la sintesi basale di insulina e di glucagone mentre le variazioni elevate della glicemia (dopo un pasto ricco di carboidrati o dopo un digiuno prolungato) accelerano la sintesi di insulina o di glucagone quando rispettivamente aumenta o diminuisce la glicemia. L'ingresso del glucosio avviene attraverso dei trasportatori del glucosio (GLUT).

Alcuni di tali trasportatori sono gestiti direttamente dall'insulina: i GLUT-4 e si trovano a livello di adipociti e di tessuto muscolare striato (miociti, cardiomiociti). Tali tessuti, per tali ragioni sono definiti insulino-dipendenti.

Altri trasportatori non sono gestiti direttamente dall'insulina: i GLUT-2 ma solo indirettamente stimolando principalmente la glicogenosintesi. I GLUT-2 sono come delle porte sempre aperte in cui il glucosio può passare la sangue all'ambiente intracellulare e viceversa grazie al gradiente osmotico che si crea proprio in virtù della glicogenosintesi generata dall'insulina e della glicogenolisi generata dal marito, il signor glucagone.

La euglicemia è mantenuta senza la necessità di sintetizzare GLUT-4 per favorire l'ingresso del glucosio, la sintesi di GLUT-4 si realizza quando intervengono importanti variazioni della glicemia come l'iperglicemia post-prandiale.

Quando si è nelle condizioni di euglicemia, le regolazioni di tale condizione metabolica è gestita attraverso il GLUT-2 che sono presenti soprattutto nel fegato e anche nel tessuto adiposo, nel tessuto muscolare. I GLUT-2 non prevedono, per funzionare l'attivazione diretta dell'insulina. Si fanno attraversare in senso bidirezionale dal glucosio solo grazie al gradiente di concentrazione in glucosio tra l'ambiente extracellulare e intracellulare.

Se c'è più glucosio nel sangue e meno nella cellula epatica (gradiente extracellulare/intracellulare in glucosio a favore dell'ambiente ematico), il glucosio attraversa il GLUT-2 ed entra nella cellula (direzione extracellulare/intracellulare); una volta entrato nella cellula epatica, l'insulina promuove la glicogenosintesi (con consumo di glucosio e richiamo ulteriore di tale zucchero dal sangue nella cellula).

Quando la glicemia plasmatica si abbassa, si attiva l' $\alpha$ -cellula pancreatica che produce glucagone, stimola la glicogenolisi nella cellula epatica facendo aumentare la concentrazione intracellulare di glucosio.

Nel momento in cui i livelli di glucosio sono maggiori a livello intracellulare rispetto a quelli ematici (gradiente extracellulare/intracellulare in glucosio a favore dell'ambiente intracellulare) si verifica una migrazione del glucosio, sempre attraverso i GLUT-2 verso l'ambiente extracellulare, verso l'ambiente ematico.

L'insulina ha un marito, il glucagone, con cui un poco litiga, un poco va d'accordo, come accade sempre, in ogni coppia. E quando vanno d'accordo non potete immaginare quanta dolcezza lievita tra di loro tanto che fanno l'amore e insieme mettono al mondo le proteine (la stimolazione della protidosintesi la realizzano entrambi).

L'insulina ha un effetto ipoglicemizzante, stimolante la lipogenesi, stimolante la glicogenosintesi, il glucagone ha un effetto iperglicemizzante, stimolante la lipolisi, stimolante la glicogenolisi, insomma realizzano metabolismi opposti ma necessari per l'omeostasi cellulare, per l'omeostasi organica.

La signora insulina e il signor glucagone è bene che stiano a litigare perché è un *litigio utile* il loro per gestire l'omeostasi cellulare, per gestire l'euglicemia, per assicurare uno stato di buona salute con l'accortezza però che l'una (l'insulina) non deve prevalere sull'altro (il glucagone) e viceversa altrimenti si sfocia nella patologia. L'insulina stimola la protidosintesi e anche il glucagone stimola la protidosintesi, in questo vanno d'accordo,

Insulina e glucagone, insieme al GH, sono ormoni diventati noti oltre che nel mondo della scienza medica anche nel mondo dello sport, delle palestre in ragione dell'effetto anabolizzante di tali proteine sul tessuto muscolare.

Il termine anabolizzante ha una cattiva per colpa dell'utilizzo illecito di tale magnifica proteina e invece è un termine magico che indica *costruire*, costruire molecole, costruire proteine, costruire la vita perché noi siamo fatti di proteine.

È un termine magico che significa anche costruire grassi (trigliceridi), mettere a disposizione delle cellule quell'energia (ATP) che tiene acceso il loro motore. Una *Ferrari* senza carburante neanche partirebbe.

La signora insulina ha un marito, il signor glucagone, ma ha anche degli amanti, quali i signori cortisolo, GH, progesterone e dei tizi, i corticosteroidi che ogni tanto arrivano nei tessuti per curare, così dice il medico che li prescrive o li inietta.

E quando la signora insulina si trova di fronte a questi marcantoni (corticosteroidi esogeni) arrivati da chissà dove, vedendoli così ben attrezzati, cede alle loro *avance* e fa l'amore anche con loro. Un esempio? L'insulina e i corticosteroidi stimolano in perfetta sintonia la liposintesi. E, inoltre, questa signora insulina è proprio birichina perché è anche dedita al lesbismo, se la fa con gli estrogeni, con l'adrenalina, con la tiroxina. Insomma l'insulina è sposata con un ormone iperglicemizzante e ha come amanti tutte molecole iperglicemizzanti.

La quantità di insulina secreta dal pancreas dipende dalla velocità con la quale si innalza la glicemia, questa velocità dipende dalla quantità e dalla qualità dei carboidrati che si assumono. Gioca un ruolo importante l'indice glicemico [*Glycemic Index (GI)*], la capacità dei carboidrati contenuti negli alimenti di innalzare la glicemia.

Quando si assumono carboidrati a basso indice glicemico (*Low GI*) , la glicemia si innalza gradualmente, è secreta una quantità normale di insulina che riporta gradualmente la glicemia ai livelli precedenti, il cervello è ben nutrito in glucosio ed è perfettamente informato per ore (segnaletica di sazietà dell'insulina) per cui non richiede altro cibo. Quando si assumono carboidrati ad alto indice glicemico (*High*

*GI*), la glicemia subisce un brusco innalzamento; è secreta una notevole quantità di insulina che causa una repentina diminuzione della glicemia. In questo caso il cervello va in crisi perché gli manca il glucosio (la sua fonte di energia essenziale per vivere), quindi non si sente ben nutrito, non sta tranquillo, si fa prendere dalla paura come quando uno sta per affogare e allora richiede altro cibo (Fig. 5).

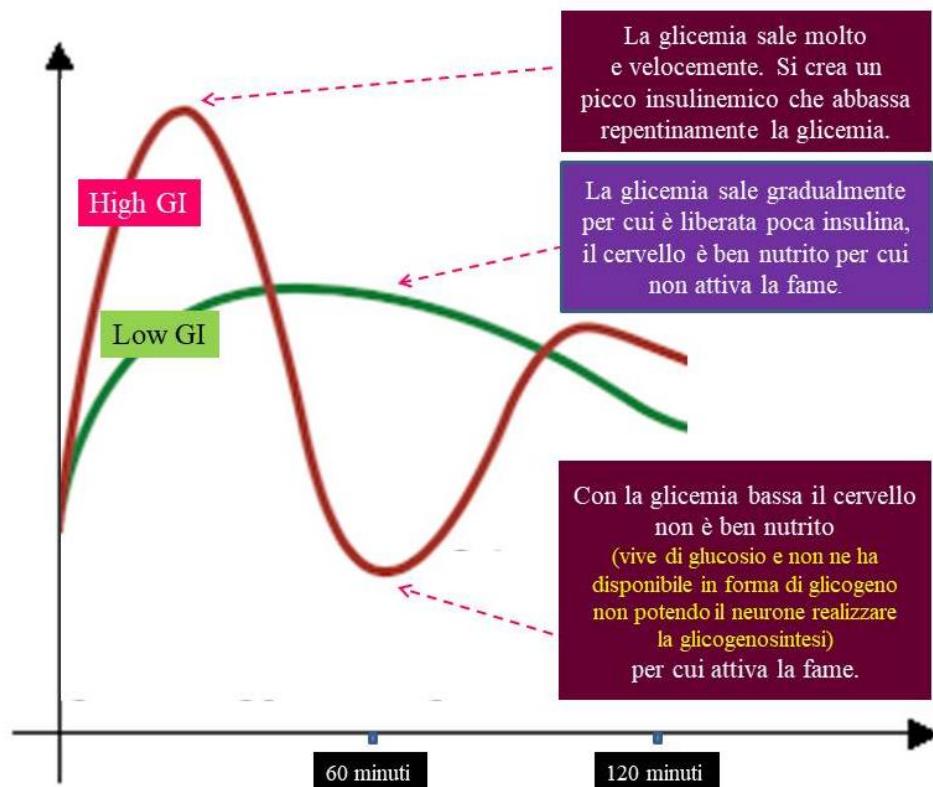


Figura 5

L'insulina è coinvolta insieme alla leptina, alla grelina nella regolazione del centro ipotalamico che regola l'intake alimentare.

Il fattore che stimola l'esocitosi dell'insulina è il glucosio che entra nelle cellule  $\beta$  del pancreas provviste di GLUT-2 facilmente (i GLUT-2 si fanno attraversare dal glucosio in entrambe le direzioni extracellulare/intracellulare e intracellulare/extracellulare, senza l'intervento dell'insulina che ne debba promuovere la funzione diretta). Quando aumenta la glicemia, grazie ad un gradiente osmotico (glicemia > glucosio intracellulare), il glucosio entra nella  $\beta$ -cellula pancreatică. Si attiva la glicolisi che porta alla produzione di ATP. L'aumento di ATP e il potassio intracellulare fanno chiudere i canali del potassio. In tal modo i  $K^+$  non possono essere estrusi all'esterno della cellula per cui aumenta la loro concentrazione intracellulare.

L'aumento intracellulare della concentrazione dei  $K^+$  determina la depolarizzazione della membrana del Reticolo Endoplasmico (RE), funziona anche da stoccaggio dei  $Ca^{++}$ , per cui è favorita l'apertura dei canali del calcio con incremento nel citosol degli ioni  $Ca^{++}$  che fuoriescono dal RE. Tali ioni mettono in moto il meccanismo molecolare dell'esocitosi che prevede l'intervento di un complesso di proteine (*fusion*

*complex) che media la fusione tra la membrana dei granuli in cui è stoccatà l'insulina e la membrana della  $\beta$ -cellula. Dopo la fusione delle due membrane si ha l'esocitosi dell'insulina nel circolo sanguigno (Fig. 6).*

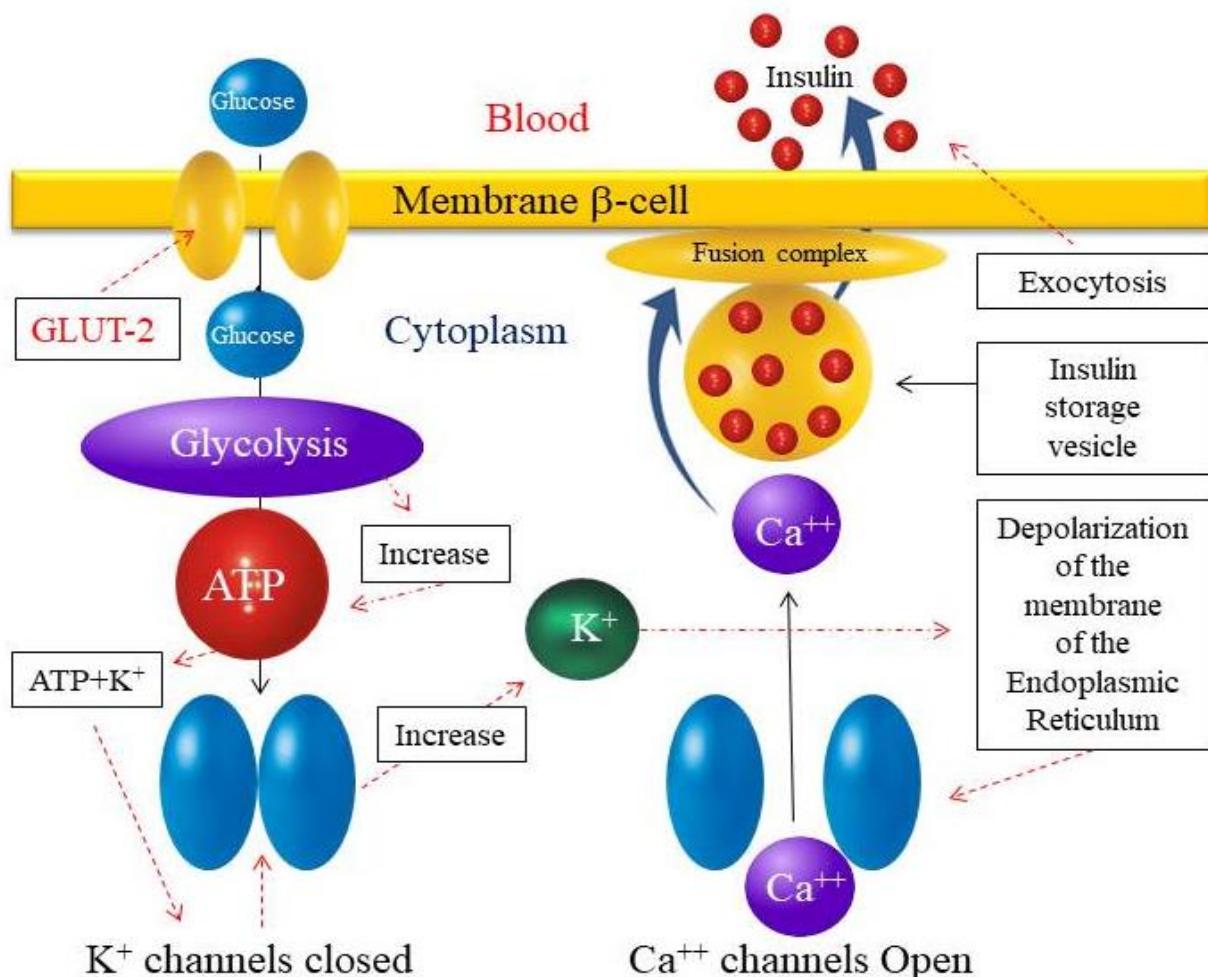


Figura 6

Quando la concentrazione di glucosio nel sangue è alta, come dopo un pasto, il pancreas secerne insulina che stimola il fegato a prelevare il glucosio dal sangue per immagazzinarlo in forma di glicogeno (glicogenosintesi).

La capacità del fegato di immagazzinare glucosio è limitata (circa 70 grammi), i carboidrati in eccesso sono convertiti in grassi e depositati nel tessuto adiposo.

L'insulina provoca, quindi una riduzione del livello del glucosio, dei livelli dei grassi e degli aminoacidi nel sangue determinando un accumulo di questi nei tessuti (glicogenosintesi, protidosintesi, liposintesi).

Nel fegato l'insulina stimola, la formazione di glicogeno, un polimero costituito da diverse molecole di glucosio legate chimicamente tra loro, il quale costituisce una riserva energetica utilizzabile nei periodi di digiuno; in tal modo gli organi e i tessuti hanno in qualunque momento della giornata un substrato energetico disponibile. Inoltre l'insulina favorisce la sintesi ed il deposito dei grassi nelle cellule adipose spingendo la cellula ad utilizzare i carboidrati come fonte energetica.

Il principale ormone antagonista dell'insulina è il glucagone che agisce a digiuno, quindi, nel momento in cui la concentrazione di glucosio nel sangue è bassa; svolge un'azione catabolica agendo principalmente sul fegato dove stimola la glicogenolisi e la gluconeogenesi, promuovendo, quindi, il rilascio di glucosio dalle sue scorte e la sua immissione in circolo; stimola, inoltre, il trasporto degli aminoacidi nella cellula epatica, substrati necessari per la gluconeogenesi epatica.

Il glucagone ha la funzione di mantenere le concentrazioni ematiche di glucosio entro valori fisiologici anche durante il digiuno.

A causa delle opposte azioni dell'insulina e del glucagone, lo stato del flusso delle sostanze nutritive del metabolismo nell'organismo dipende dalle quantità relative dei due ormoni.

Nello stato anabolico si registra un alto rapporto insulina-glucagone, in quello catabolico tale rapporto è basso. L'insulina realizza la sua azione agendo sul recettore IRS-1 (Fig. 7).

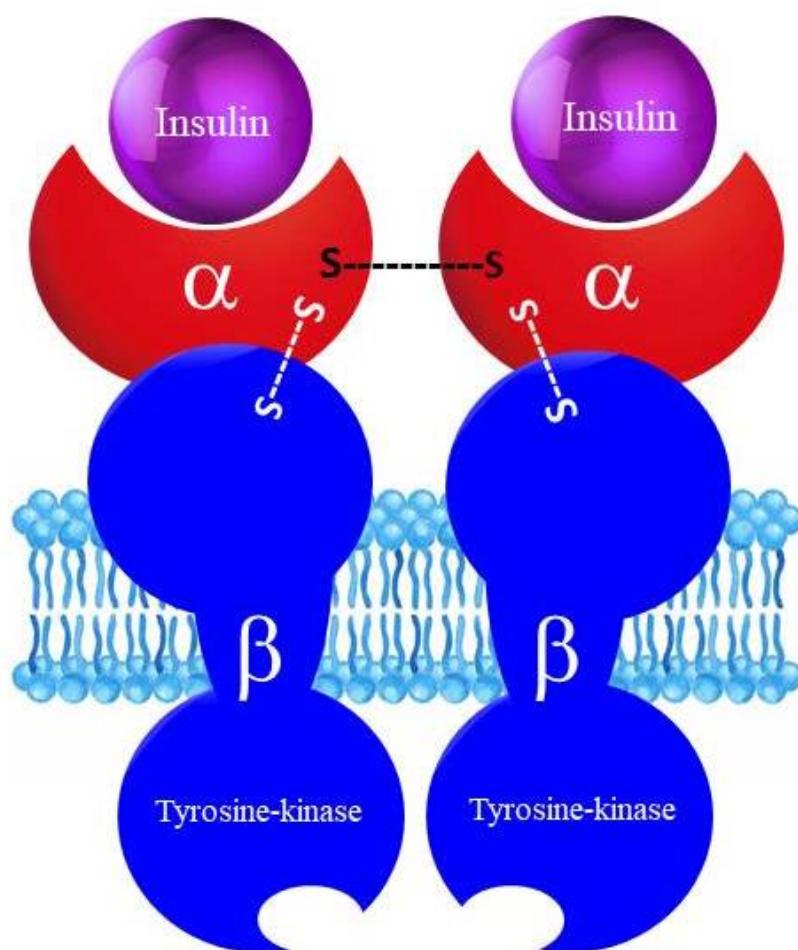


Figura 7 IRS-1 (Insulin Receptor Substrate-1): modello molecolare – By V. Varlaro

Il recettore dell'insulina appartiene alla famiglia dei recettori tirosinchinasici. È costituito da due subunità  $\alpha$  extracellulari (*dominio extracellulare*) legate da ponti

disolfuro (bersaglio della insulina) e da due *subunità β* intracellulari (*dominio intracellulare*) ad attività tirosinchinasica.

Il legame dell'insulina determina l'avvicinamento delle due subunità  $\beta$  e ne permette l'autofosforilazione. Immaginate due estremi di un fiammifero che strofinandosi l'uno con l'altro generano una fiamma.

In tal caso, quando le due subunità  $\beta$  si toccano avviene l'accensione di una sorta di fiamma metaforica, avviene l'attivazione di vie metaboliche [PI3K–PIP2-PIP3-PDK1/2-AKT (PKB)] e genetiche (SOS-RAS-cRAF-MEK-ERK 1/2) essenziali per la vita biologica delle cellule dell'intero organismo.

I recettori IRS-1 sono attivati anche da altri fattori di crescita: l'IGF-1 (somatomedina 1) e l'IGF-2.

Il Padre Eterno non confidando nella capacità dell'uomo di evolversi e non immaginando che avrebbe scoperto l'insulina e ritenendo il segnale molecolare dell'insulina, un *segnale irrinunciabile*, essenziale per la vita biologica delle cellule, creò dei fattori di crescita supplementari (IGF-1, IGF-2) per tutelare l'organismo.

Immaginando che la  $\beta$ -cellula pancreatica potesse anche ammalarsi, cosa che accade, Dio stabilì che in caso di necessità intervenissero altre cellule per assicurare tale segnale molecolare.

Forse Dio creò IFG-1 e IGF-2 perché non era sicuro di avere fatto un buon lavoro creando l'uomo, temeva di essere stato fallibile, chissà.

Mi immagino Dio come Geppetto che guarda il suo Pinocchio e che lo manipola per capire se potrà funzionare senza mai fare decolorare dal suo viso la perplessità.

L'IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*) e l'IGF-2 (*Insulin-like Growth Factor-2*) sono fattori di crescita simili all'insulina. Si tratta di proteine con una elevata somiglianza strutturale e funzionale con l'insulina.

Negli ultimi anni, le nuove tecnologie hanno consentito molti progressi nel definire l'asse funzionale dell'ormone della crescita (GH).

È stato scoperto che la secrezione di GH dall'ipofisi anteriore è regolata non solo dall'ormone di rilascio del GH (GHRH) e dalla somatostatina (ormone che inibisce la secrezione di GH) ma anche da altri peptidi ipotalamici chiamati *secretagoghi del GH* che sembrano agire in sinergismo con il GHRH inibendo la somatostatina. Uno di questi è la grelina.

L'interazione tra GHRH e somatostatina induce una secrezione pulsatile di GH che è massima durante la pubertà. Il GH (ormone della crescita, ormone della giovinezza) agisce su diversi tessuti inducendo la produzione di IGF-1 e IGF-2.

Gli organi principalmente coinvolti sono il fegato, il tessuto muscolare, il tessuto osseo, il tessuto adiposo (WAT/BAT) ma anche altri organi e cellule (polmoni, reni, tiroide, pelle, macrofagi, cellule emopoietiche) offrono un contributo metabolico utile per assicurare un tale tipo di molecola all'organismo (Fig. 8).

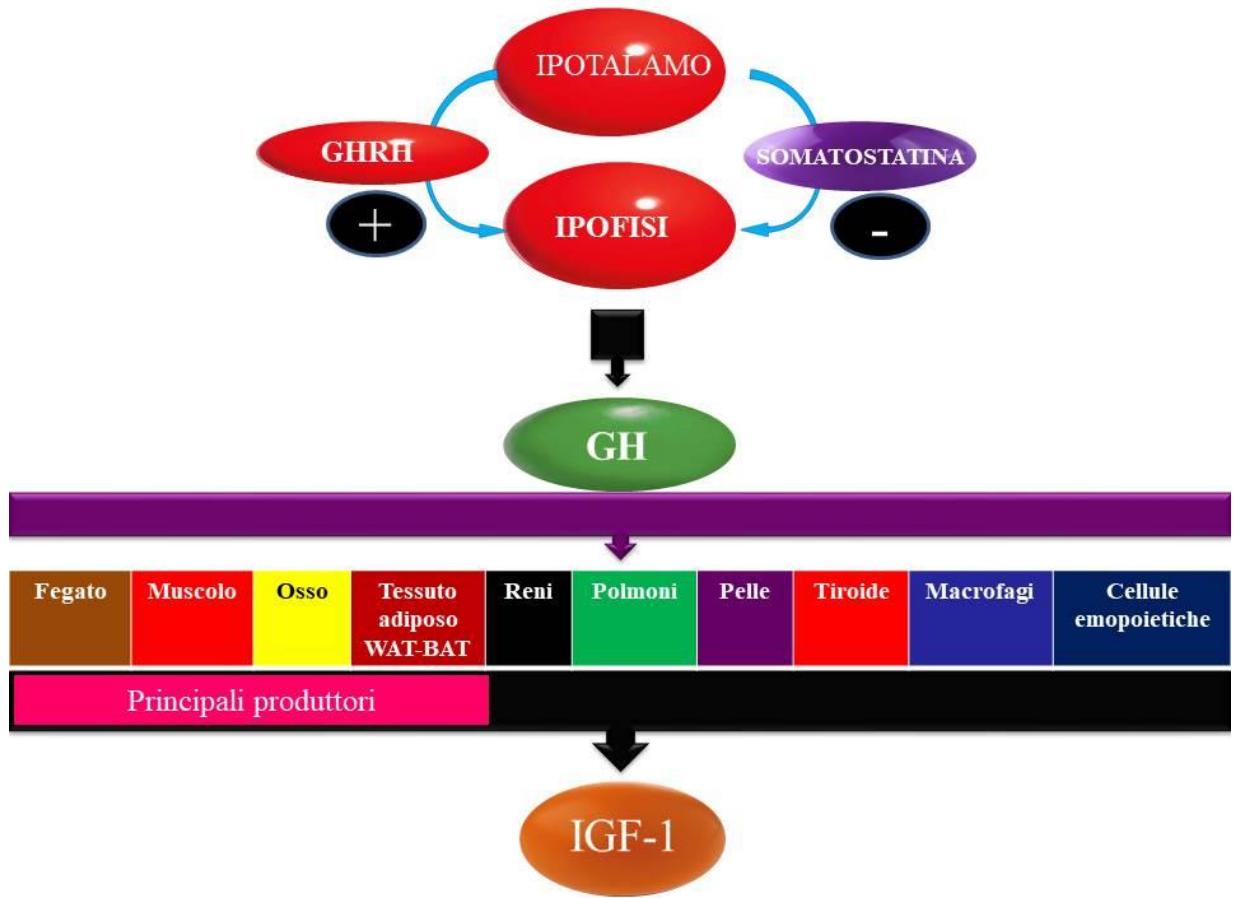


Figura 8 Effetti del GH sui tessuti in tema di sintesi di IGF-1

L'IGF-2, pur legando gli IRS-1, al momento non sembra sia capace di attivare segnalazioni intracellulari cosa che invece è certa per l'IGF-1 (Fig. 9).

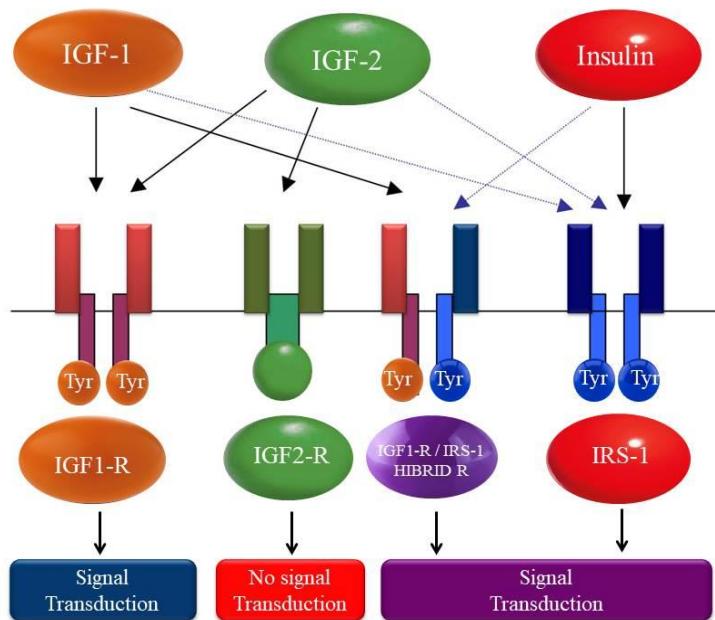


Figura 9 Effetti biologici dei recettori

L'IGF-1 è capace di legare i suoi recettori specifici IGF-1R e anche di legare i recettori IRS-1 dell'insulina e alcuni recettori ibridi, che possono essere legati sia dall'insulina, sia da IGF-1 (Fig. 10).

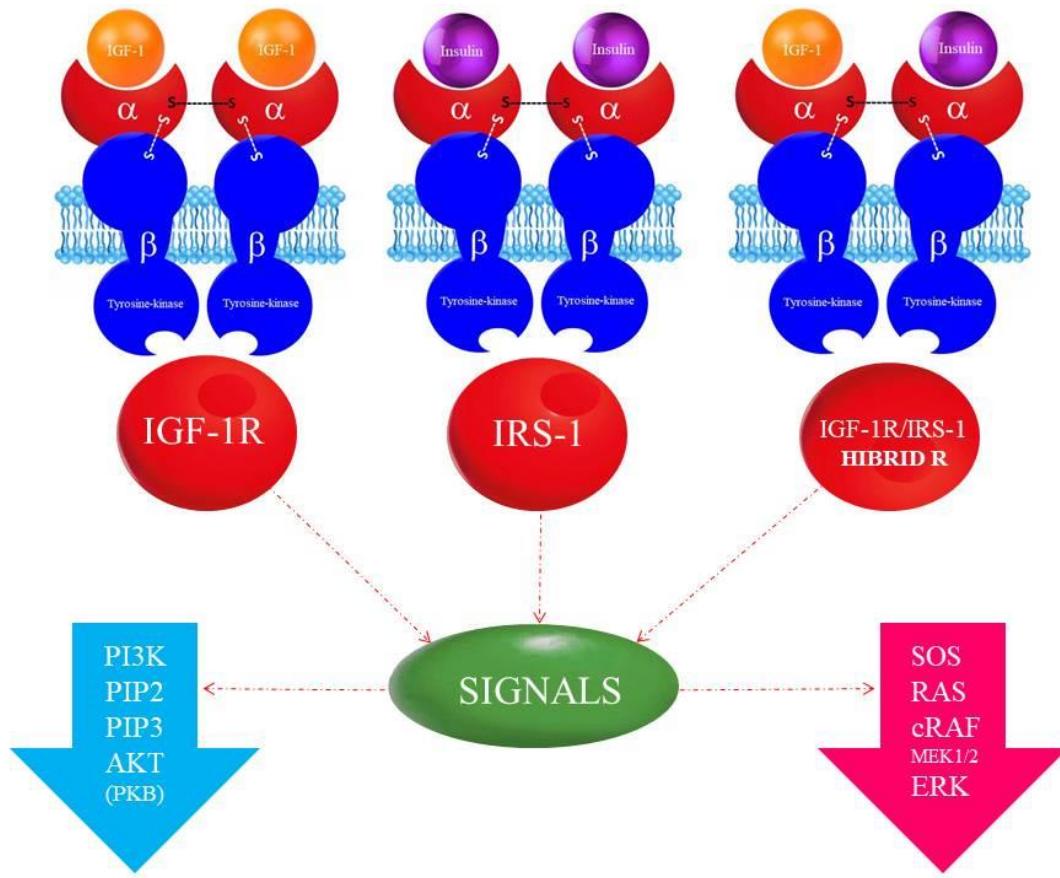


Figura 10 Recettori IGFR-1, IRS-1, IRS-1/IGFR-1 (HIBRYD)

La segnalazione attivata dalla insulina e da IGF-1 è analoga. Tutte le cellule sono provviste di recettori IRS-1 ma solo nel tessuto adiposo e nel tessuto muscolare tali recettori attivano la sintesi (*on demand*) dei GLUT-4 (Trasportatori del Glucosio di Tipo-4), la loro traslocazione nella membrana cellulare, la loro funzione di trasferire il glucosio all'interno delle cellule. L'obiettivo è di assicurare il glucosio agli adipociti e alle fibrocellule muscolari striate che svolgono funzioni cardine in termini di stoccaggio e consumo di energia (ATP).

Il glucosio è la molecola che fornisce energia alla maggior parte degli organismi. Le piante lo sintetizzano attraverso la *fotosintesi clorofilliana* sfruttando l'energia del sole. Immagazzinano il glucosio sotto forma di amido che poi lo utilizzano per ricavarne energia e per sintetizzare altre biomolecole come la cellulosa.

L'uomo non è in grado di produrre glucosio per cui lo deve assumere regolarmente con la dieta. Dalla sua degradazione, che inizia con la glicolisi, riceve energia sotto forma di ATP ed è per questo che è indispensabile rifornire continuamente in glucosio le cellule dell'organismo.

Mantenere la glicemia in un intervallo di normalità (65-110 mg/dl) significa assicurare all'organismo una condizione di adeguato rifornimento in glucosio.

Il glucosio arriva alle cellule attraverso il sangue ma ha, comunque bisogno di specifici trasportatori per attraversare la membrana cellulare che ha una struttura complessa.

I trasportatori del glucosio (GLUT) sono una famiglia di proteine di membrana che consentono la *diffusione facilitata* del glucosio, in concreto gestiscono il traffico di glucosio attraverso la membrana cellulare plasmatica.

I GLUT-4 hanno una struttura molecolare tale per cui cambiano alternativamente forma. In una prima fase il trasportatore ha un'apertura rivolta verso l'esterno che può, così, accogliere una molecola di glucosio e delle molecole di sodio. Poi, cambia conformazione per cui si apre verso l'interno rilasciando le molecole prima accolte che diventano, così disponibili, nel citosol per la vita metabolica della cellula (Fig. 11).

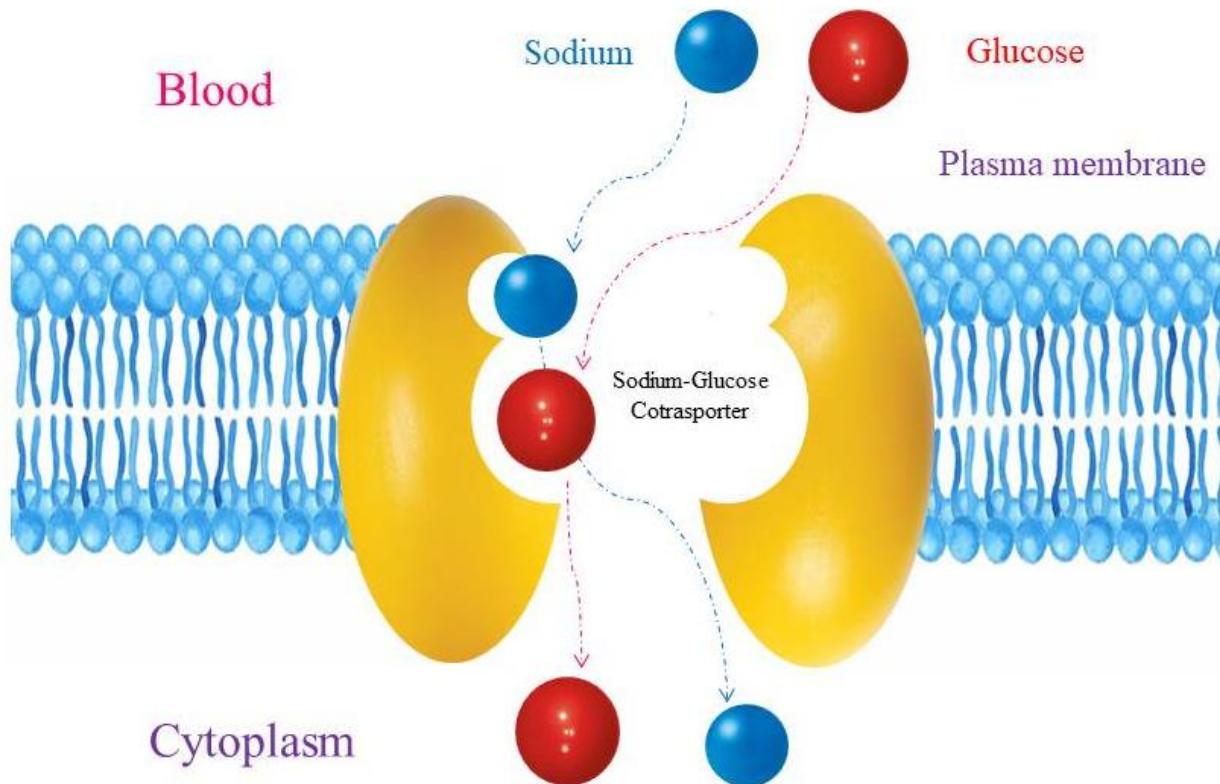


Figura 11 Co-trasporto di glucosio e sodio: modello molecolare - By V. Varlaro

Nel genoma umano sono codificati 14 tipi diversi di GLUT che trasferiscono glucosio e altri zuccheri a livello intracellulare.

I GLUT sono formati da segmenti ad  $\alpha$ -elica idrofobici disposti in modo tale da formare un canale internamente rivestito di residui aminoacidici idrofilici.

Nella loro funzione i GLUT coinvolgono il sodio, per cui realizzano un *co-trasporto* di sodio e di glucosio. Esistono diverse isoforme dei GLUT, ciascuna con specifiche caratteristiche di cinetica, di distribuzione tissutale, di funzione (Fig. 12).

Trasportatore di glucosio	Cellule in cui è espresso	Gene	Caratteristiche e ruolo
<b>GLUT 1</b>	Ubiquitario (particolarmente negli eritrociti)	SLC2A1	Consente l'assunzione basale del glucosio necessaria per la respirazione cellulare
<b>GLUT2</b>	Epatociti, cellule $\beta$ del pancreas, enterociti, cellule renali	SLCA2	Consente la rimozione del glucosio in eccesso dal sangue, la regolazione del rilascio di insulina, il transito del glucosio attraverso le membrane basali degli enterociti
<b>GLUT3</b>	Neuroni	SLCA3	Consente l'assunzione basale di glucosio
<b>GLUT4</b>	Adipociti, fibrocellule muscolari striate scheletriche (miociti) e cardiache (cardiomiociti)	SLCA3	Consente l'assunzione di glucosio in risposta all'azione dell'insulina
<b>GLUT5</b>	Cellule intestino tenue	SLC2A5	Consente il transito del fruttosio attraverso la membrana basale degli enterociti: maggiore affinità per il fruttosio rispetto al glucosio

Figura 12 Trasportatori del glucosio (GLUT)

I GLUT possono dipendere dall'effetto insulinico (GLUT insulino-dipendenti) o possono non dipendere dall'effetto insulinico (GLUT non insulino-dipendenti).

I GLUT-4 sono presenti nei tessuti *insulino-dipendenti (insulino-sensibili)* ovvero nel tessuto muscolare striato scheletrico (miociti), nel tessuto muscolare striato cardiaco (cardiomiociti), nel tessuto adiposo bianco (adipociti uniloculari), nel tessuto adiposo bruno (adipociti multiloculari). Sono GLUT regolati direttamente dall'insulina.

I GLUT-1 sono distribuiti all'interno di tutti i tessuti del corpo e sono responsabili, assieme ad altri GLUT, dell'assorbimento del glucosio *insulino-indipendente*. Sono indispensabili per il cervello e per i globuli rossi: tessuti *glucosio-dipendenti*.

I GLUT-1 sono anche noti come i *GLUT della sopravvivenza* perché assicurano i livelli minimi di glucosio utili alle cellule per sopravvivere.

I GLUT-1, come i GLUT-2 sono presenti in quantità minore nel tessuto muscolare striato scheletrico (miociti), nel tessuto muscolare striato cardiaco (cardiomiociti), nel tessuto adiposo (adipociti) dove riescono a fornire una quantità minima di glucosio senza l'intervento dell'insulina.

Servono per realizzare un'assunzione basale di glucosio e seguono una cinetica di saturazione che può essere paragonata a quella enzimatica di Michaelis-Menten (Km): il substrato è rappresentato dal glucosio extracellulare, il prodotto dal glucosio intracellulare.

La velocità del trasporto del glucosio dipende dalla concentrazione del substrato: più è alta, maggiore è la velocità del trasporto, fino a raggiungere quella massima quando il trasportatore è saturo.

I GLUT-1 hanno una Km bassa (circa 1.5 mM). Significa che hanno un'alta affinità per il substrato e che funzionano a velocità massimale anche quando i livelli del glucosio ematico scendono da 5 a 2-3 mM e questo per assicurare il rifornimento basale minimo vitale per le cellule. I GLUT-1 sono degli angeli della sopravvivenza.

I GLUT-2 sono presenti nelle cellule epatiche, nelle cellule  $\beta$  delle isole di Langerhans del pancreas, nelle cellule renali, nelle cellule dell'intestino tenue. Hanno una Km alta. Significa che funzionano a velocità sostenuta solo quando la concentrazione ematica del glucosio è elevata (dopo i pasti, dopo una terapia iperglicemizzante).

I GLUT-2 non funzionano durante il digiuno, quando la glicemia è bassa. Un meccanismo molecolare di questo tipo costituisce una ulteriore tutela della buona salute cellulare nei tessuti glucosio-dipendenti: cervello, globuli rossi.

Durante il digiuno, i GLUT-2 non si attivano per cui i livelli glicemici rimangono sufficienti a nutrire i tessuti *glucosio-dipendenti*.

Se i GLUT-2 durante il digiuno si attivassero i livelli glicemici si abbasserebbero a livelli critici per cui si ridurrebbe l'approvvigionamento in glucosio dei tessuti *glucosio-dipendenti* con gravi difficoltà metaboliche che potrebbero portare le cellule *glucosio-dipendenti* (neuroni, globuli rossi) a danni strutturali irreversibili ovvero alla morte cellulare.

I GLUT-2 possono operare in entrambe le direzioni (trasporto bidirezionale): possono favorire il passaggio del glucosio dalla cellula all'esterno se c'è la necessità e viceversa.

I GLUT-2 favoriscono l'ingresso del glucosio nelle cellule in modo che sia proporzionale al livello della glicemia.

Si ipotizza che questo meccanismo che opera a livello del fegato, del rene, delle cellule  $\beta$  delle isole di Langerhans del pancreas, dell'intestino tenue serva ad adattare la produzione di insulina ai livelli del glucosio ematico.

Oltre i GLUT-4, l'insulina attiva trasportatori degli acidi grassi (FATP4, FATP1,...), trasportatori degli aminoacidi [B(0)AT1 (SLC6A19), PEPT1 (SLC15A1), SNAT (SLC38), LAT1 (SLC7A5),...], trasportatori di ioni.

I trasportatori di molecole attraverso la membrana cellulare che possono essere attivati dall'insulina sono un mondo ancora tutto da esplorare,

Cristoforo Colombo (la ricerca scientifica) ha fatto salpare la sue navi dal Portogallo verso l'ignoto solo da pochi giorni. Per scoprire l'America il viaggio della ricerca sarà certamente più lungo di quello realizzato dalle tre caravelle colombiane.

L'insulina, agendo sugli IRS-1 attiva l'interruttore e il recettore trasmette l'energia all'interno della cellula affinché si accenda quella lampadina metaforica che è costituita delle vie di segnalazione metaboliche e genetiche essenziali per l'attività biologica di tutte le cellule dell'organismo:

cheratinociti, melanociti, cellule di Merkel, cellule di Langerhans, fibroblasti, fibrocellule muscolari, adipociti, osteoblasti, osteoclasti, osteociti, neuroni, cellule del sistema immunitario (linfociti, macrofagi, neutrofili,...), eritrociti, piastrine, cellule endoteliali.

Ma non in tutte le cellule si realizzano gli stessi metabolismi. La luce che si accende nelle cellule ha sfumature diverse a seconda del tipo cellulare. L'effetto diretto dell'insulina [attivazione IRS1, sintesi dei GLUT-4, traslocazione dei GLUT-4, trasferimento dei GLUT-4 dal citosol verso la membrana cellulare (traslocazione), fusione della membrana della vescicola con GLUT-4 con la membrana cellulare, formazione del complesso di fusione (*fusion complex*), inserimento del GLUT-4 nella struttura delle membrane cellulari, attivazione funzionale del GLUT-4] si realizza solo a livello di adipociti e di fibrocellule muscolari striate (miociti, cardiomiociti) ma non in altre cellule che non sono capaci di sintetizzare GLUT-4.

In tutte le cellule, invece si attivano segnalazioni molecolari intracellulari di tipo metabolico e genetico essenziali per l'esistenza della vita sulla Terra.

Senza i segnali molecolari dell'insulina, di IGF-1, di IGF-2 non ci sarebbe la vita.

Una volta legato IRS-1, il segnale coinvolge diverse altre proteine. Quando l'insulina si lega a IRS-1, il recettore si autofosforila. Ed è fosforilata, a catena, una proteinachinasi: la PI3K (fosfatisilinositolo-3-chinasi) che a sua volta fosforila PIP2 (un fosfolipide di membrana) e via via a cascata ne sono coinvolte altre.

Immaginate due teste di un fiammifero che autostrofinandosi (autofosforilazione) si accendono e che poi la fiamma accende a cascata altre teste di fiammifero (diverse ma capaci di dare luogo alla fiamma), una dopo l'altra; insomma tanti fiammiferi in sequenza che si accendono uno dopo l'altro. IRS-1 attivato permette di aggiungere gruppi fosfato su altre proteine. E questo permette la propagazione a cascata della segnalazione molecolare intracellulare. La PI3K, a sua volta aggiunge un gruppo fosfato al PIP2 (fosfatidilinositolo 4-5-bifosfato). Si forma PIP3 (fosfatidilinositolo 3-4-5-trifosfato).

Il PIP3 è un messaggero intracellulare determinante che realizza l'attivazione di proteine chinasi quali le PKD1 e 2 che a loro volta promuovono ulteriori attivazioni a cascata coinvolgendo l'AKT [proteinachinasi B (PKB)].

Dall'AKT si sfioccano tutta una serie di metabolismi che generano vita nella cellula.

L'AKT me la immagino come un boccio che poi si apre in tanti petali colorati in modo diverso, i petali della vita.

I petali sarebbero i metabolismi, colorati in modo diverso per le differenze tra i vari metabolismi. Uno degli effetti innescati da PIP3 è la sintesi (*on demand*) dei GLUT-4 che sono stipati in vescicole.

Poi l'insulina ne determina la traslocazione (una sorta di transumanza biologica) verso la membrana cellulare. Tali vescicole, sempre grazie al segnale molecolare dell'insulina, si fondono (fusione mediata da un complesso di tre

proteine (*fusion complex*) con la membrana cellulare per cui i GLUT-4 si strutturano nella membrana cellulare per permettere il co-trasporto di glucosio e sodio.

L'insulina non solo regola la fusione delle due membrane (della vescicola che contiene i GLUT-4 e della membrana cellulare) ma stimola anche la sintesi delle proteine del complesso di fusione.

La via di segnalazione PI3K-PIP2-PIP3-PDK 1/2 - AKT (PKB) è quella segnalazione intracellulare con cui l'insulina trasmette informazioni sia per favorire il metabolismo intracellulare (via di segnalazione metabolica), sia per trasmettere informazioni al DNA (via di segnalazione genetica) per sintetizzare macromolecole (proteine ad attività enzimatica,...) che realizzano l'attività metabolica (Fig. 13).

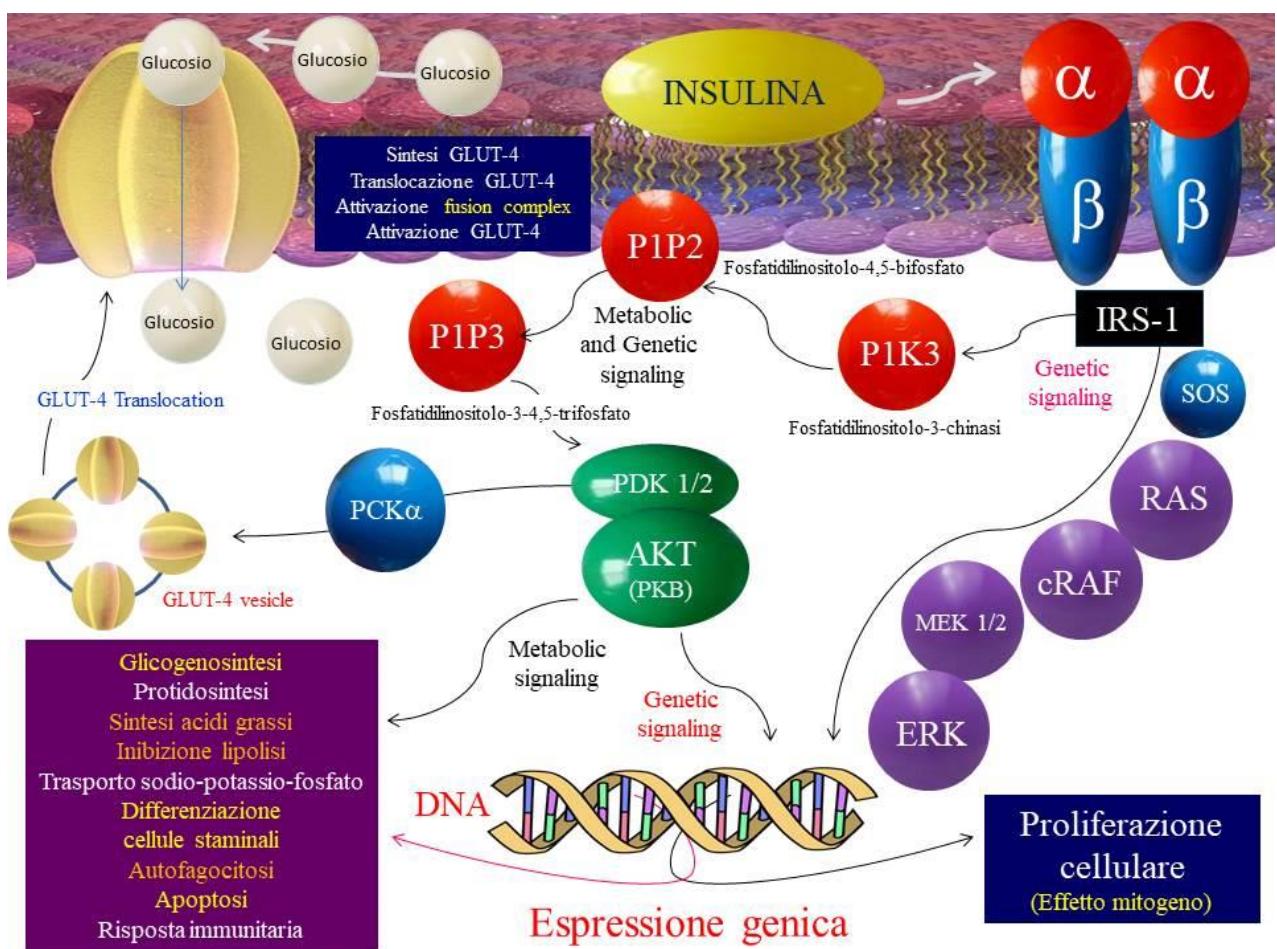


Figura 13 Insulin pathway – By V. Varlaro

PIP 3 avvia, quindi sia una segnalazione metabolica, sia una segnalazione genetica.

L'insulina attiva un'altra via di segnalazione molecolare, quella SOS-RAS-cRAF-MEK<sup>1/2</sup>-ERK (via di segnalazione genetica) con cui l'insulina trasmette informazioni al DNA per favorire la proliferazione cellulare. L'insulina è uno dei principali mitogeni dell'organismo.

Quando l'insulina si lega a IRS-1, il recettore si autofosforila. Sono reclutate le proteine Shc e Grb2 che funzionano da adattatori. Le Shc si legano al recettore fosforilato e sono a loro volta fosforilate, riconoscono e legano il dominio SH2 di Grb2 mentre il dominio SH3 di Grb2 lega e attiva la proteina SOS che è portata nelle vicinanze della membrana plasmatica dove può legarsi a RAS che, grazie a una proteina che cede il gruppo guanilico (GNRp), sostituisce il GDP con il GTP e si attiva.

La proteina SOS, quindi funziona da *fattore di scambio nucleotidico* (GEF).

A questo punto RAS attivata si lega all'N-terminale di una proteina Ser/Thr-kinasi chiamata c-RAF, attivandola. Esistono tre isoforme della proteina RAF. RAS può legare tutte e tre le isoforme con un'affinità diversa.

RAF fosforila due residui di serina delle proteinchinasi MEK1 e MEK2 (chinasi con specificità doppia) capaci di fosforilare sia residui di serina, sia residui di tirosina. Infine, MEK fosforila le MAP-chinasi-K (MAPK) (ERK-1 e ERK-2), attivandole.

L'attivazione di RAS, così come quella di tutte le altre proteine facenti parte della superfamiglia delle GTPasi, è accelerata dal *fattore di scambio dei nucleotidi guaninici* (GEF), il quale si lega a RAS permettendo il distacco del GDP. Poiché la concentrazione cellulare di GTP è nettamente superiore a quella del GDP, il GTP si lega liberamente alle proteine RAS lasciate "vuote" permettendo il rilascio di GEF.

La disattivazione di RAS, invece, è regolata dalla proteina GAP (*GTPase Activating Proteins*) che la defosforila.

RAS, quando attiva, provoca la proliferazione e la crescita cellulare. La sua iperattivazione (aumentata e prolungata) causa tumori solidi e leucemie.

La proteina c-RAF è espressa in tutti i tipi di tessuto, la a-RAF è espressa in alcuni organi (rene,...), la b-RAF è concentrata nel sistema nervoso e nelle cellule del midollo osseo.

L'*insulina* è da considerare una vera *chiave molecolare* che permette al glucosio, agli acidi grassi, agli aminoacidi, agli ioni potassio, agli anioni fosfato, agli ioni sodio di entrare nella cellula. È *l'ormone che permette alla cellula di nutrirsi, di approvvigionarsi in energia* (Fig. 14).

La funzione dell'insulina non è solo quella nutrizionale e regolatoria dei livelli ematici della glicemia ma anche quella di svolgere un ruolo centrale nell'attività metabolica di tutte le cellule che abitano nell'organismo.

Gli effetti dell'insulina sono diversi:

- Favorisce il nutrimento cellulare non solo in glucosio ma anche in acidi grassi, aminoacidi, ioni potassio, anioni fosfato, ioni sodio.
- Regola l'espressione genica favorendo l'attività proliferativa cellulare (effetto mitogeno).
- Induce la sintesi di glicogeno: quando i livelli di glucosio sono elevati, l'insulina stimola la glicogenosintesi mediante l'attivazione di un enzima esochinasi che aggiunge un gruppo fosfato al glucosio formando, così, un tipo di molecola che non può uscire dalla cellula epatica e muscolare, per cui ne indirizza il destino verso la glicogenosintesi.

- Induce l'assorbimento di potassio: la sintesi di tanto glicogeno rende i tessuti più ricchi di acqua (il glicogeno richiama acqua a livello intracellulare). La conseguenza di un aumento dell'acqua intracellulare è il trasporto all'interno della cellula, di ioni potassio. Se aumenta l'insulina, aumenta la sintesi di glicogeno nei tessuti per cui aumenta la captazione intracellulare degli ioni potassio e si abbassa la potassiemia.
- Inibisce la gluconeogenesi e la glicogenolisi.
- Inibisce la lipolisi agendo sulla lipasi ormone sensibile.
- Favorisce l'esterificazione degli acidi grassi e perciò la lipogenesi.
- Inibisce la proteolisi.
- Stimola la protidosintesi: è favorita la captazione degli aminoacidi.
- Riduce il senso di fame: interviene, insieme alla leptina, alla colecistochinina, alla grelina, al glucagone nella regolazione dell'assunzione alimentare.
- Stimola l'attività metabolica complessiva di tutte le cellule.
- Interviene nella autofagocitosi e nell'apoptosi.
- Stimola la differenziazione delle cellule staminali.
- Interviene nella regolazione del sistema immunitario (le cellule immunitarie hanno recettori per l'insulina).

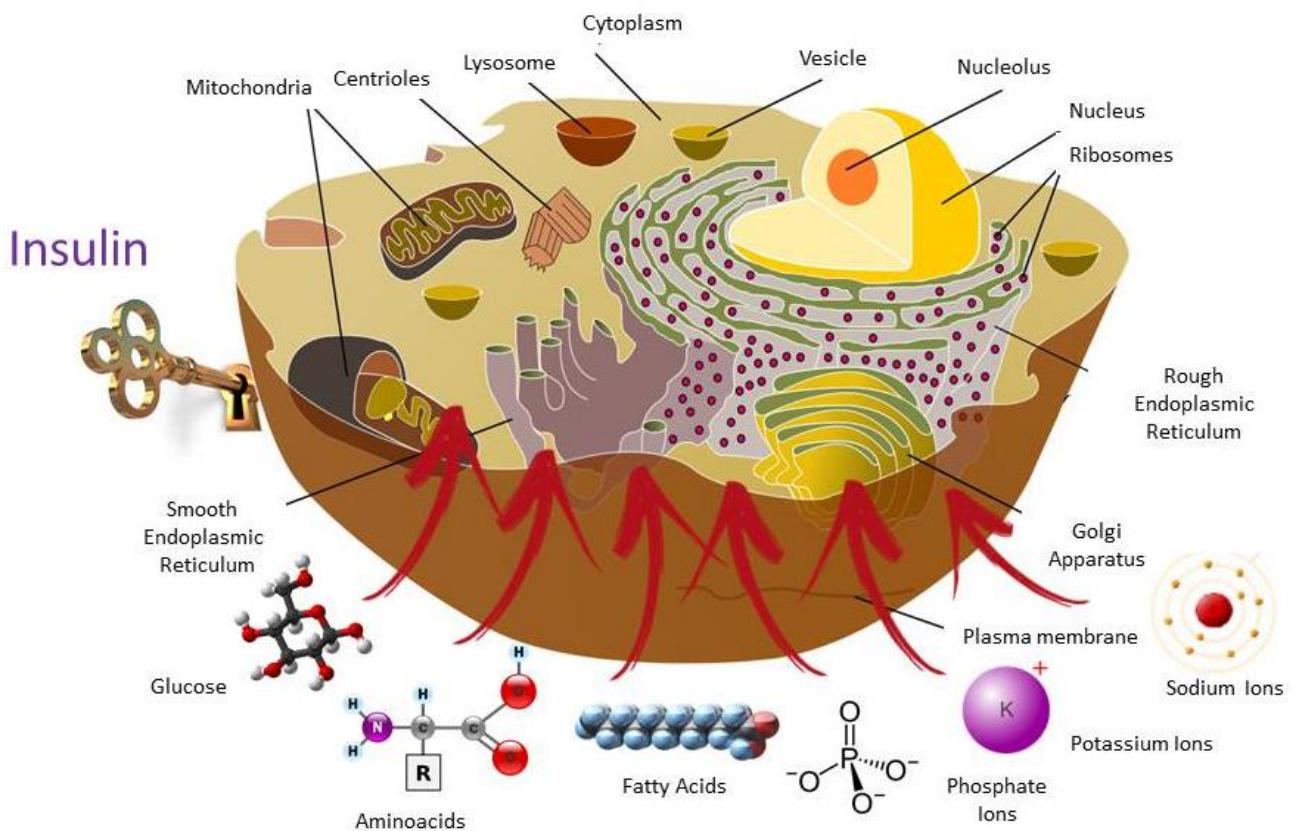


Figura 14

L'insulina è un miele dolce per tutte le cellule. Ha un ruolo cardine nella vita metabolica di tutte le cellule. Una produzione fisiologica di insulina e un *effetto insulinico* fisiologico costituiscono la base della buona salute dell'organismo.

Se la cellula non riesce a nutrirsi correttamente va incontro a gravi difficoltà metaboliche per cui l'intero organismo va incontro a gravi disfunzioni.

Se una cellula non riesce a realizzare i giusti metabolismi, la giusta attività proliferativa si complica tutto e allora il cielo diventa grigio e non si vede più la luce del sole. E accade che da una situazione fisiologica si passi ad una situazione patologica.

Tutti i tessuti sono sensibili all'insulina perché tutte le cellule hanno recettori per l'insulina ma non tutti i tessuti hanno i GLUT-4 (tessuti insulino-dipendenti).

Il tessuto adiposo, il tessuto muscolare striato scheletrico e cardiaco hanno il privilegio di assumere glucosio principalmente per un intervento diretto dell'insulina (tessuti insulino-dipendenti) grazie alla presenza, appunto dei GLUT-4 realizzando l'approvvigionamento energetico quando la glicemia sale (fase postprandiale) (Fig. 15).

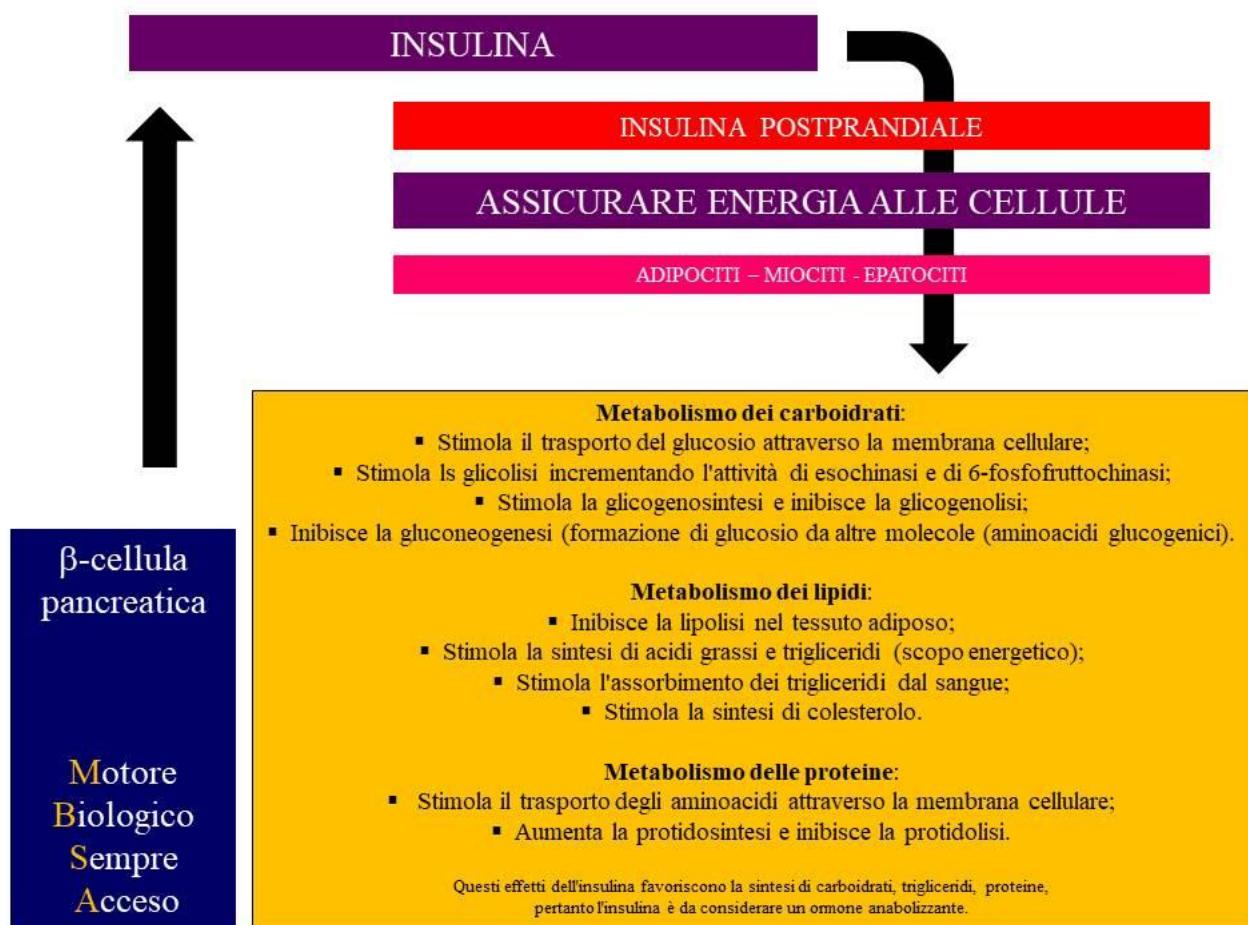


Figura 15 Alcuni metabolismi promossi dall'insulina a livello di adipociti, miociti, epatociti.

E hanno il privilegio di assumerlo indirettamente, grazie alla presenza di trasportatori non gestiti dall'insulina come i GLUT-1, i GLUT-2.

L'epatocita si rifornisce perfettamente in glucosio grazie ai GLUT-1, ai GLUT-2 (non beneficiano degli effetti diretti dell'insulina).

Per quanto concerne la gestione dell'euglicemia, l'insulina interviene direttamente nella regolazione attivando i GLUT-4 a livello di adipociti e fibrocellule muscolari striate e interviene indirettamente promuovendo, in diverse cellule (epatica,

miociti,...) la glicogenosintesi, metabolismo che comporta consumo intracellulare di glucosio con conseguente richiamo di glucosio dal sangue: è così che il glucosio attraverso i GLUT-2 entra nella cellula per essere destinato a formare macromolecole di glicogeno.

Il glucosio in eccesso è utilizzato per formare trigliceridi, il glucosio che entra nelle cellule è sempre troppo ecco perché in parte è consumato con la glicolisi e in parte è deviato verso la biosintesi dei trigliceridi (proprietà obesogena).

L'insulina ha una sua funzione biologica *agganciata* ai fattori di crescita insulino-simili IGF-1 e IGF-2. È soprattutto uno dei due tessuti insulino-dipendenti che mantiene le relazioni: il tessuto adiposo. Forse anche il tessuto muscolare ma al momento non è chiaro. Certamente il tessuto adiposo bianco ha una relazione con IGF-1 e IGF-2.

L'insulina, infaticabile proteina anabolizzante, costruttrice di macromolecole, stimola la sintesi di trigliceridi (lipogenesi).

La lipogenesi porta all'ipertrofia degli adipociti. Quando il volume dell'adipocita supera il 170% di quello iniziale, inizia a liberare molecole di IGF-1. L'insulina in tutto questo si fa aiutare probabilmente da uno dei suoi amanti, il GH, che stimola il tessuto adiposo a produrre GH. Non si sa se lo coinvolge con una mail, con un bisbiglio, con delle parole *sdolcinate sussurate al telefono* ma quel bellimbusto del GH non gli fa mancare il suo supporto per cui interviene) (Fig. 16).

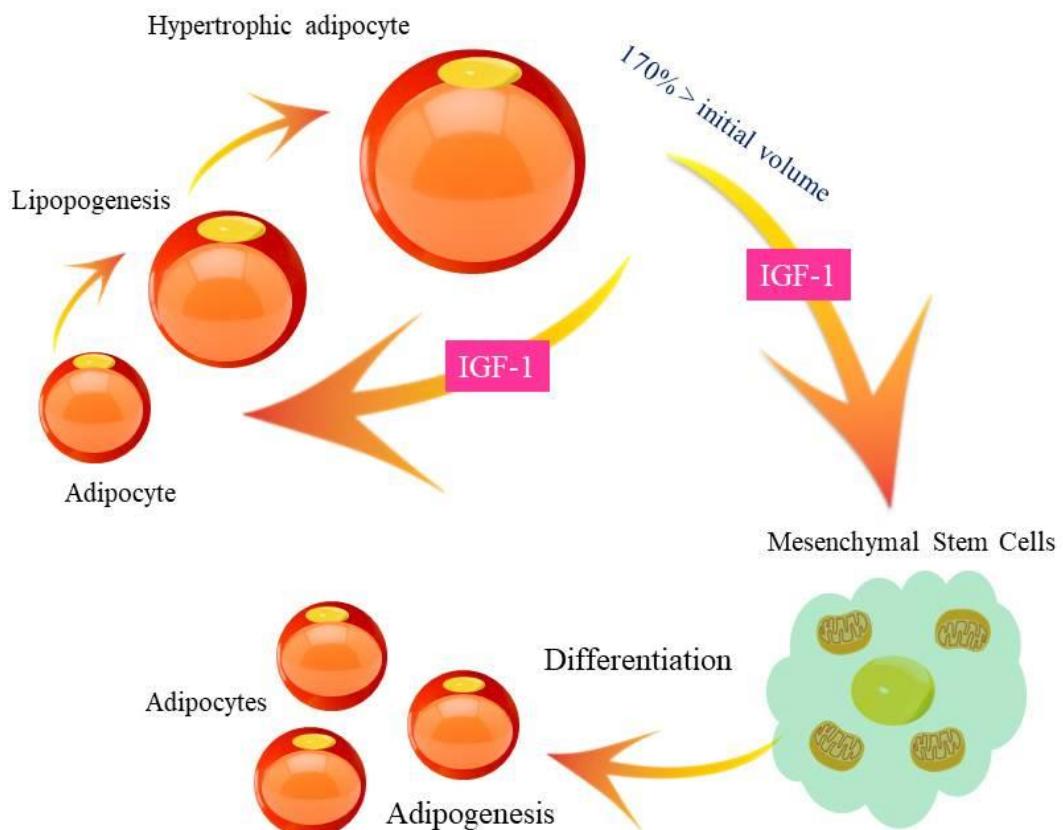


Figura 16 Adipocita: processo di differenziazione delle MSC in adipociti - By V. Varlaro

IGF-1 stimola le cellule staminali mesenchimali [*Mesenchymal Stem Cells (MSC)*] a differenziarsi in nuovi adipociti (adipogenesi).

Inizialmente l'insulina promuove la liposintesi per cui la cellula adiposa diventa grossa (ipertrofia dell'adipocita). Quando il tessuto adiposo libera IGF-1 inizia la differenziazione delle MSC in nuovi adipociti per cui avviene un aumento numerico del patrimonio adipocitario. La mia mente mi porta sempre dove vuole il mio cuore, è sempre così e oggi mi porta verso la leggerezza.

Ecco perché mentre scrivo, l'adipocita ipertrofico l'ho immagino come una donna gravida con un pancione enorme e gli adipociti neoformati per differenziazione dalle MSC come tanti bambini festosi che però non sono figli del marito di insulina (Glucagone) ma dell'amante (GH). L'intrigo amoroso è sempre presente, anche nella biologia. E sperando che Glucagone non si accorga del tradimento, il tessuto adiposo incrementa ulteriormente il suo patrimonio energetico.

Il mio giudizio verso la signora insulina forse deve essere più benevolo. L'ho dipinta come una libertina, una lussuriosa, l'ho disegnata forse troppo negativamente perché lei fa tutto questo nell'interesse dello stato di buona salute delle cellule, dell'organismo. Dai intendiamola così la situazione.

A tal punto il tessuto adiposo è costituito da cellule adipose ipertrofiche e da cellule adipose di dimensioni normali.

A livello di epidermide l'insulina stimola l'attività metabolica e proliferativa di tutte le cellule che abitano in tale piano attico dei tessuti: cheratinociti (producono acido ialuronico, acetilcolina,...), cellule di Merkel (esplicano effetti sensitivi), cellule di Langerhans (presentano l'antigene alle plasmacellule), melanociti (producono la melanina, l'ombrello biologico che si apre in risposta agli insulti delle radiazioni ultraviolette), cellule staminali.

A livello di derma l'insulina stimola l'attività metabolica e proliferativa di tutte le cellule che abitano in tale piano intermedio dei tessuti: fibroblasti (producono acido ialuronico, collagene, elastina, fibronectina, enzimi, acetilcolina,...), cellule endoteliali, cellule staminali.

A livello di ipoderma l'insulina stimola l'attività anabolica degli adipociti, l'attività metabolica delle cellule staminali, l'attività mitotica delle cellule endoteliali, delle cellule staminali.

A livello di tessuto muscolare l'insulina stimola l'attività anabolica e proliferativa delle fibrocellule muscolari, delle cellule staminali, delle cellule endoteliali.

A livello di tessuto osseo l'insulina stimola l'attività anabolica e proliferativa degli osteoblasti, degli osteoclasti, degli osteociti, delle cellule endoteliali, delle cellule staminali.

L'insulina è utile per realizzare terapie bioristrutturanti (biorigeneranti) epidermogenetiche, matrigenetiche, lipogenetiche, adipogenetiche, miogenetiche, osteogenetiche, angiogenetiche.

## **Protocollo terapeutico pratico**

### *Premessa*

Somministrando quantità totali di insulina pari a 0.4 UI/ml non sono state documentate interferenze con la glicemia basale (70 - 110 mg/dl), con l'insulinemia basale (4 - 24 microunità/ml). Quantità minime totali di insulina (meno di mezza unità di insulina) non sono in grado di attivare la sintesi dei GLUT-4 per cui non è turbata l'euglicemia. Tale valore quantitativo di insulina somministrabile (0.4 UI totali) è la soglia massima utilizzabile per cui rappresenta la soglia massima di sicurezza.

Il sanitario non deve mai iniettare più di 0.4 UI totali di insulina rapida. E quando si somministra la quantità massima (0.4 UI totali), per una ulteriore cautela, è bene effettuare un piccolo carico glicemico (fare mangiare, prima del trattamento una caramella, un cioccolatino).

**La soglia massima di insulina R (soglia massima di sicurezza) che si può somministrare senza interferenze sistemiche è pari a **0.04 UI/ml**.**

Il glucosio si utilizza nella concentrazione del 5%. Tale tipo di concentrazione determina una osmolarità pari a 278 mOsM. Si tratta di una soluzione isosmotica. L'osmolarità intracellulare ed extracellulare è pari a 280 mOsM. Un tale tipo di soluzione non altera nei tessuti gli equilibri osmotici tra gli ambienti intracellulari e extracellulari.

La presenza del glucosio nella soluzione è importante per diverse ragioni:

- Attiva localmente, nelle cellule adipose e nelle fibrocellule muscolari, la sintesi di GLUT-4, l'aggregazione in vescicole di tali trasportatori del glucosio, la translocazione delle vescicole contenenti i GLUT-4 verso la membrana cellulare, la fusione delle vescicole con la membrana cellulare (approvvigionamento in glucosio e sodio);
- Attiva localmente, nelle cellule adipose e nelle fibrocellule muscolari, il trasporto di aminoacidi e acidi grassi (approvvigionamento in aminoacidi, acidi grassi, potassio, anioni fosfato);
- Rifornisce tutte le cellule (cheratinociti, melanociti, cellule di Merkel, cellule di Langerhans, cellule staminali, fibroblasti, adipociti, fibrocellule muscolari, osteoblasti, osteociti, osteoclasti, cellule endoteliali, cellule immunitarie,...), tramite i GLUT-2, di substrato utile per essere integrato nella costruzione di macromolecole (proteine nei muscoli, trigliceridi negli adipociti).
- Fornisce localmente alle cellule adipose energia (glicolisi) che è immagazzinata in forma di trigliceridi.
- Fornisce localmente energia (glicolisi) per le attività metaboliche di tutte le cellule ottimizzando i processi di protidosintesi, di liposintesi, mitotici.

Si adotta una concentrazione di soluzione insulinica glucosata terapeutica pari a 0.004 UI/ml (Fig. 17).

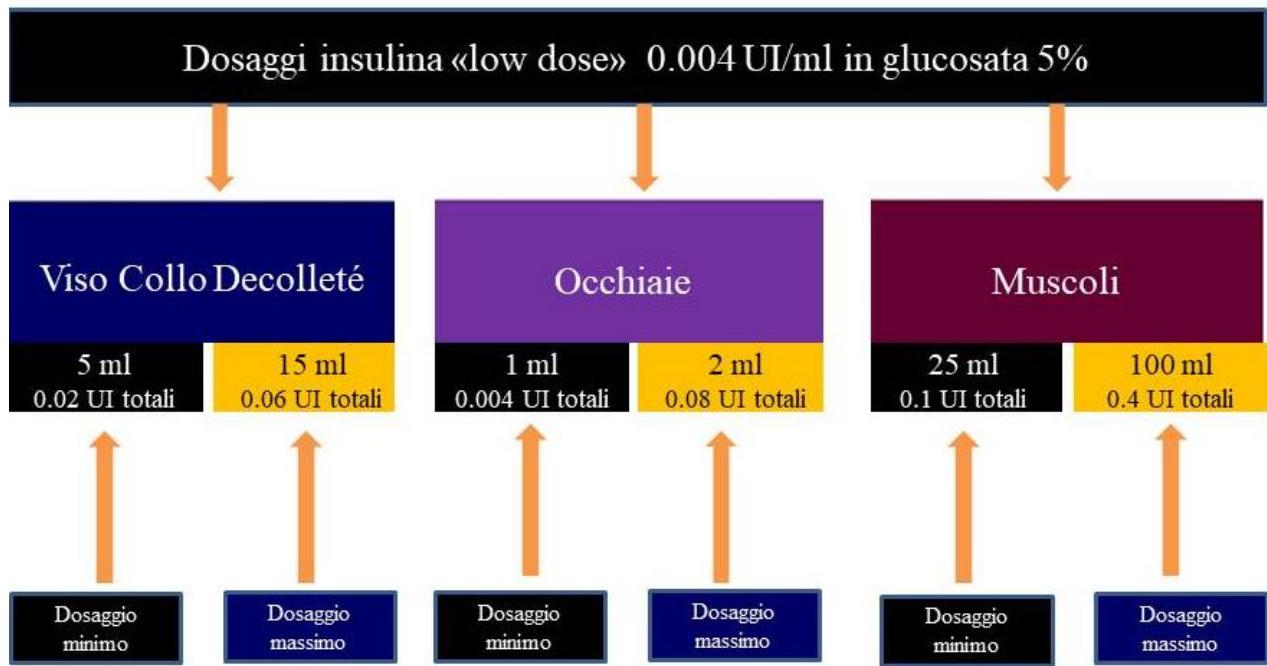


Figura 17 Dosaggi per situazioni cliniche di Medicina Estetica

Il dosaggio complessivo varia a seconda delle situazioni cliniche da 1 ml (0.004 UI/ml) fino a 0.4 UI/ml (Fig. 17).

#### *Preparazione della soluzione glucosata 5% e insulina R 0.004 UI/ml*

Si preleva 1 ml di insulina umana R (100 UI/ml) (fl. 10 ml 100 UI/ml) (Fig. 18) e si aggiunge a 499 ml di soluzione di sodio cloruro 0.9% (dal flacone da 500 ml è stato eliminato 1 ml di sodio cloruro 0.9%) (Fig. 19).



Figura 18 Insulina R 100 UI/ml (fl 10 ml)

Si ottiene una soluzione di insulina umana R pari a 0.2 UI/ml. Con tale prima diluizione si è passato da 100 UI/ml a 0.2 UI/ml.

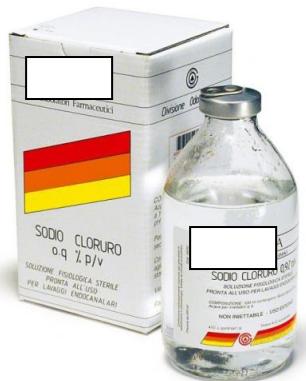


Figura 19 Sodio cloruro 0.9%

Si procede ad una seconda diluizione. Si prende un flacone da 100 ml di soluzione glucosata 5% (Fig. 20).



Figura 20 Glucosio 5% flacone 100 ml

Si prelevano ed eliminano 2 ml: in tal modo nel flacone rimangono 98 ml di soluzione glucosata 5%.

Si aspirano 2 ml di soluzione di insulina umana R 0.2 UI/ml in una siringa da 5 ml e si aggiungono ai 98 ml di soluzione glucosata 5%. Si realizza, in concreto una seconda diluizione. Si ha, in tal modo la soluzione terapeutica, l'*insulina R low dose*, una *soluzione di insulina umana R 0.004 UI/m in glucosata 5%*.

Qualora si volessero utilizzare flaconi di glucosata 5% da 250 ml o da 500 ml, si devono preliminarmente prelevare ed eliminare rispettivamente, dalla glucosata 5% da 250 ml, 5 ml, per cui nel flacone rimangono 245 ml, dalla glucosata 5% da 500 ml, 10 ml per cui nel flacone rimangono 490 ml. Aggiungendo 5 ml di soluzione insulinica 0.2 UI/ml a 245 ml di glucosata 5% oppure aggiungendo 10 ml di soluzione insulinica 0.2 UI/ml a 490 ml di soluzione glucosata 5% si arriva sempre alla concentrazione terapeutica utile: *soluzione di insulina umana R 0.004 UI/ml in glucosata 5%*.

L'azione dell'insulina umana R (fl. 10 ml 100 UI/ml) si protrae per 5-8 ore. I primi trigliceridi sono sintetizzati già dopo 45 minuti e tale processo anabolico si protrae, per 5-8 ore.

Normalmente per trattare viso, collo, decolleté, la pratica più comune che si realizza in un ambulatorio di medicina estetica, per una biorigenerazione dei tessuti, si utilizzano da 5 ml a 15 ml di insulina low dose, vale a dire una quantità di insulina che varia da 0.02 UI totali a 0.06 UI totali.

## **Eventi avversi**

Si possono verificare eventi avversi: eritema, edema, allergie sistemiche: orticaria, edema della glottide, shock anafilattico (il rischio che si corre con tutti i farmaci). È controindicata nei soggetti in cui è nota l'allergia alla insulina. Al momento, i trattamenti effettuati in Europa sono oltre i 300.000, qualcuna stima che si sia certamente oltre il milione di trattamenti effettuati, non si è mai verificato un evento avverso se non quello realizzabile dal traumatismo dell'ago: qualche ecchimosi.

Io stesso ho istituito un

**Osservatorio eventi avversi da insulina low dose**  
**vincenzovarlaro@virgilio.it**

e non ho mai ricevuto comunicazioni di eventi avversi verificatesi fino ad oggi in Italia e in alcuni paesi europei dove ho fatto formazione (Grecia, Turchia, Svizzera).

Nei diabetici è descritta una rara lipoatrofia nell'area di iniezione dell'insulina. Le cause sono l'utilizzo di insulina animale (poco diffusa), il traumatismo quotidiano perpetrato per anni (3-4 iniezioni al giorno per anni) (nessun diabetico che utilizza l'insulina per infusione ha mai patito situazioni di lipoatrofia a conferma che il traumatismo e la mancata rotazione dei siti di iniezione e degli aghi giocano un ruolo centrale in tale tipo di evento avverso). Un Autore, tira in ballo la formazione di IGE. Per colpa dell'insulina low dose le plasmacellule produrrebbero IGE che innescherebbero la degranulazione dei mastociti e quindi, la liberazione di istamina che realizzerebbe l'infiammazione che farebbe degenerare i tessuti nella lipoatrofia. Se invece di parlare, tale Autore si sedesse ad una scrivania e studiasse, saprebbe che se si libera istamina l'organismo lo esplicita chiaramente come minimo con una paupula eritematosa, pruriginosa o anche come una situazione di orticaria, di edema di Quincke (angioedema), di shock anafilattico.

## **Note sulla tecnica iniettiva**

La tecnica iniettiva è ipodermica, è realizzata *in-label* mentre il farmaco è utilizzato, per quanto concerne le indicazioni cliniche di interesse per la Medicina Estetica, *off-label*. Tutte le insuline rapide possono essere utilizzate. È importante, però ottimizzare l'effetto terapeutico iniettivo distrettuale e adottare l'insulina rapida con una durata di effetto maggiore.

L'insulina lispro R (fl 10 ml 100 UI/ml) ha una durata di azione di 2-4 ore mentre l'insulina umana R (fl 10 ml 100 UI/ml) ha una durata d'azione di 5-8 ore.

La scelta del farmaco ricade indiscutibilmente sull'insulina rapida umana che ha un effetto farmacodinamico ben più protratto nel tempo (5-8 ore) di quello realizzabile dall'insulina lispro (2-4 ore) anche se, in concreto, si possono utilizzare tutte le insuline rapide. Si utilizzano aghi 30 G da 13 mm. La frequenza dei trattamenti è settimanale per 8-10 sedute, poi quindicinale o mensile secondo le diverse situazioni cliniche.

Le aree trattabili sono il viso, il collo, il decolleté, le braccia, le mani e tutte le regioni che devono essere recuperate dal punto di vista volumetrico (Figg. 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

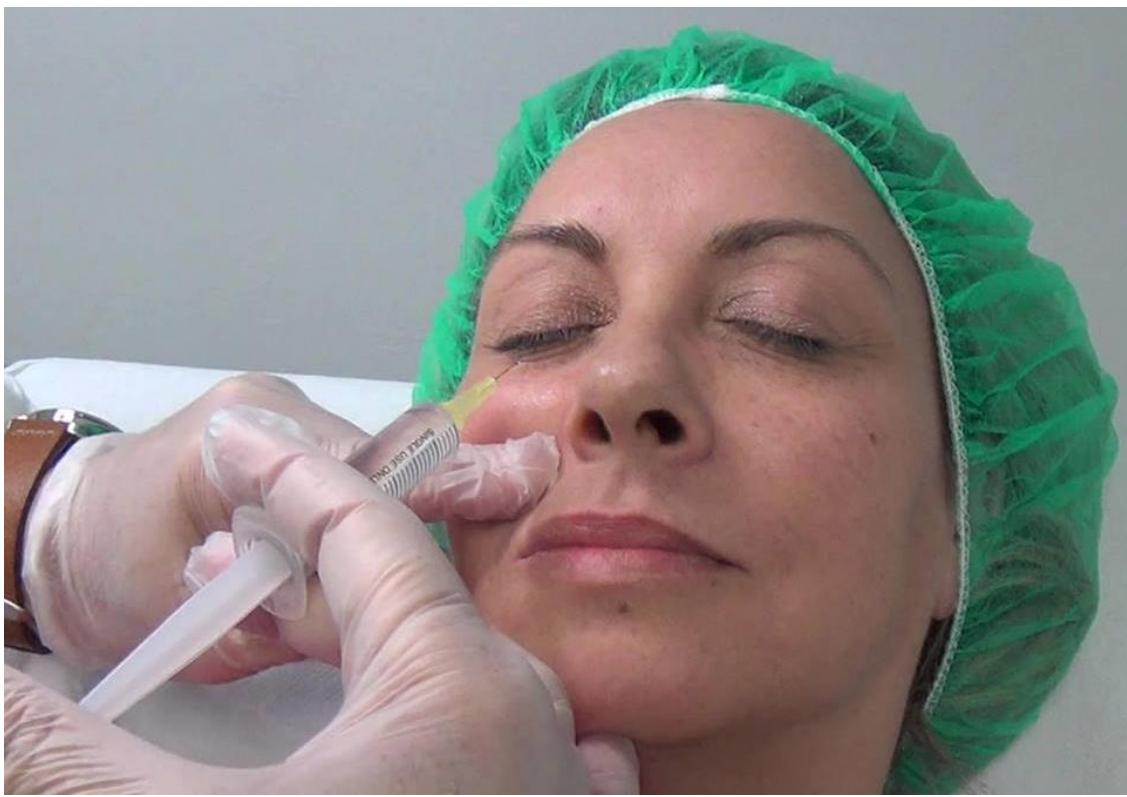


Figura 21



Figura 22

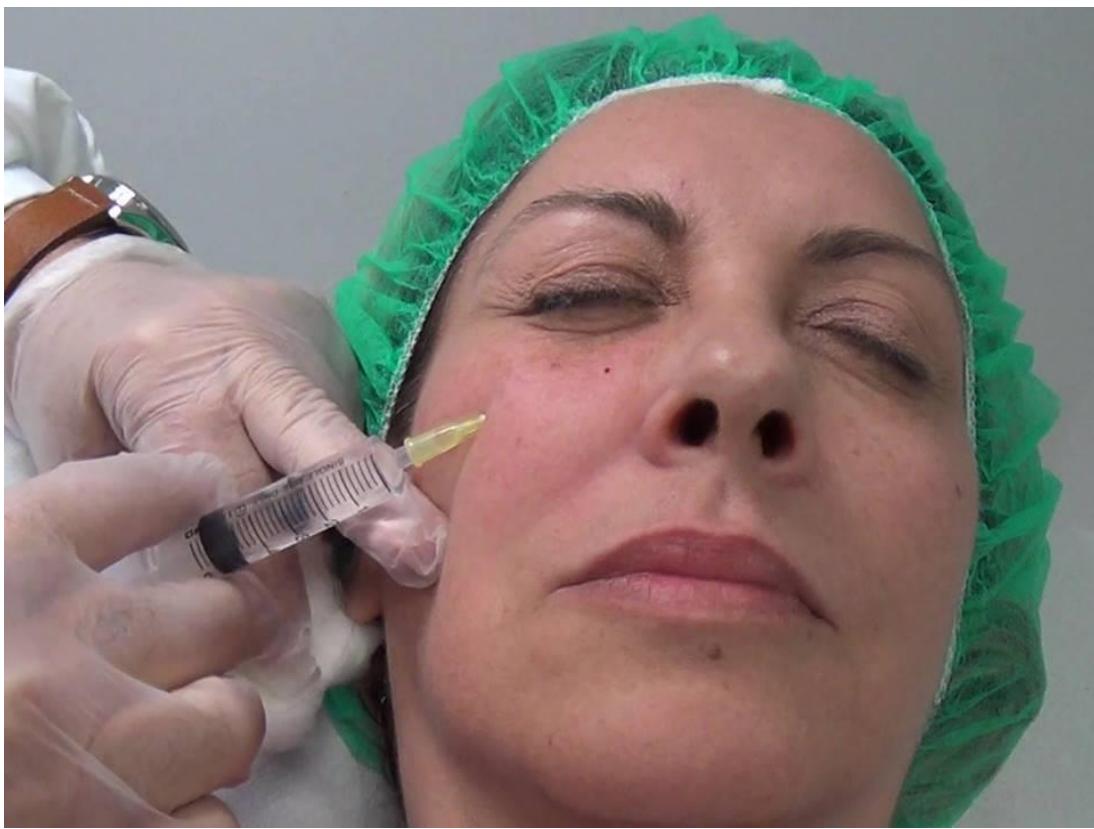


Figura 23

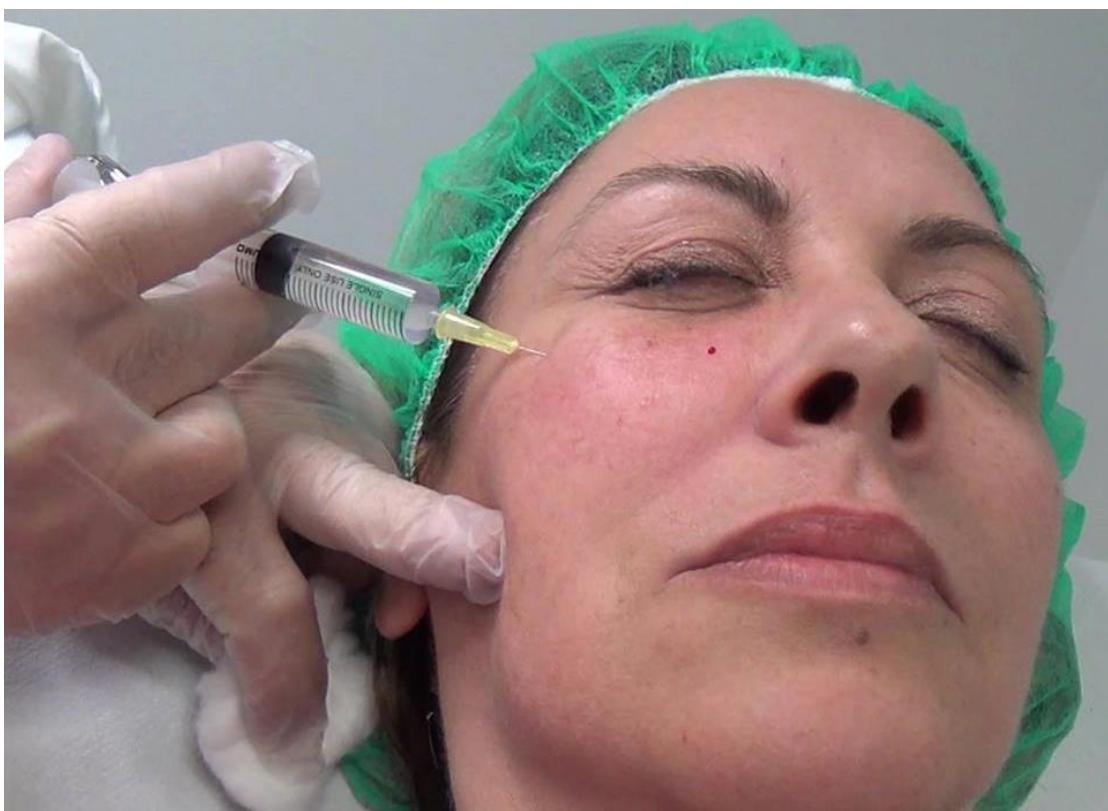


Figura 24

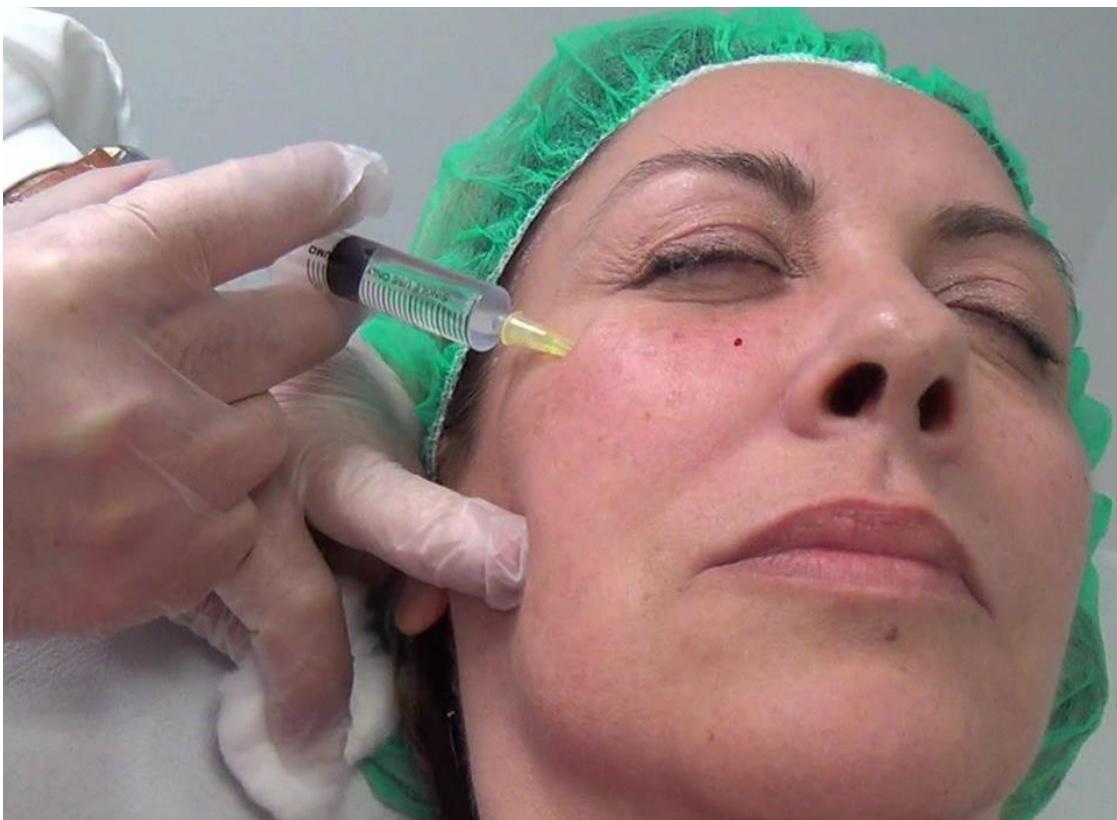


Figura 25

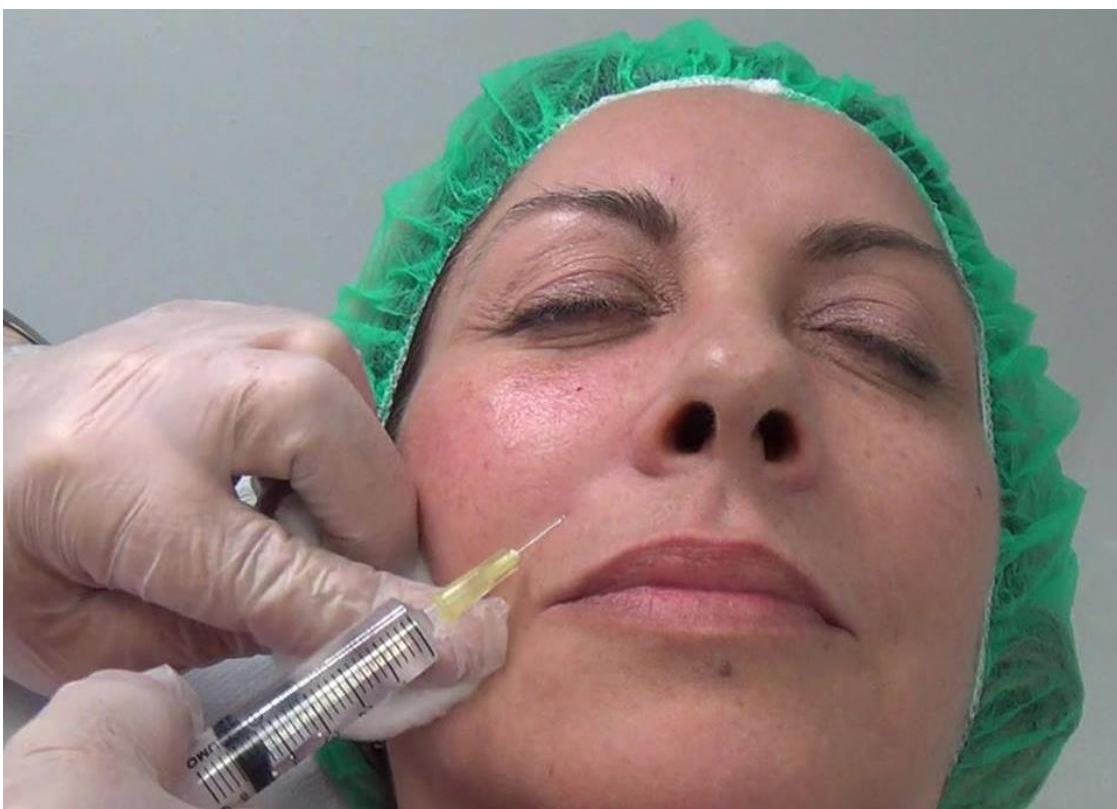


Figura 26



Figura 27

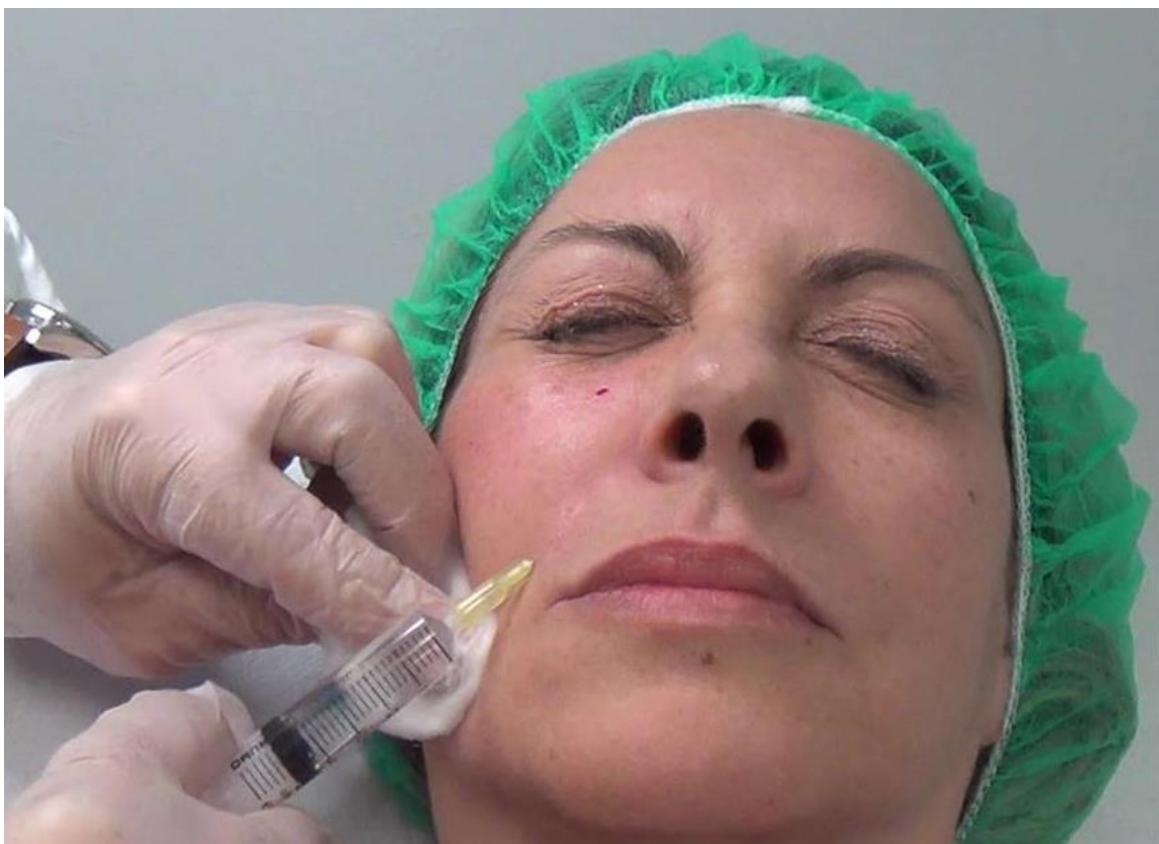


Figura 28

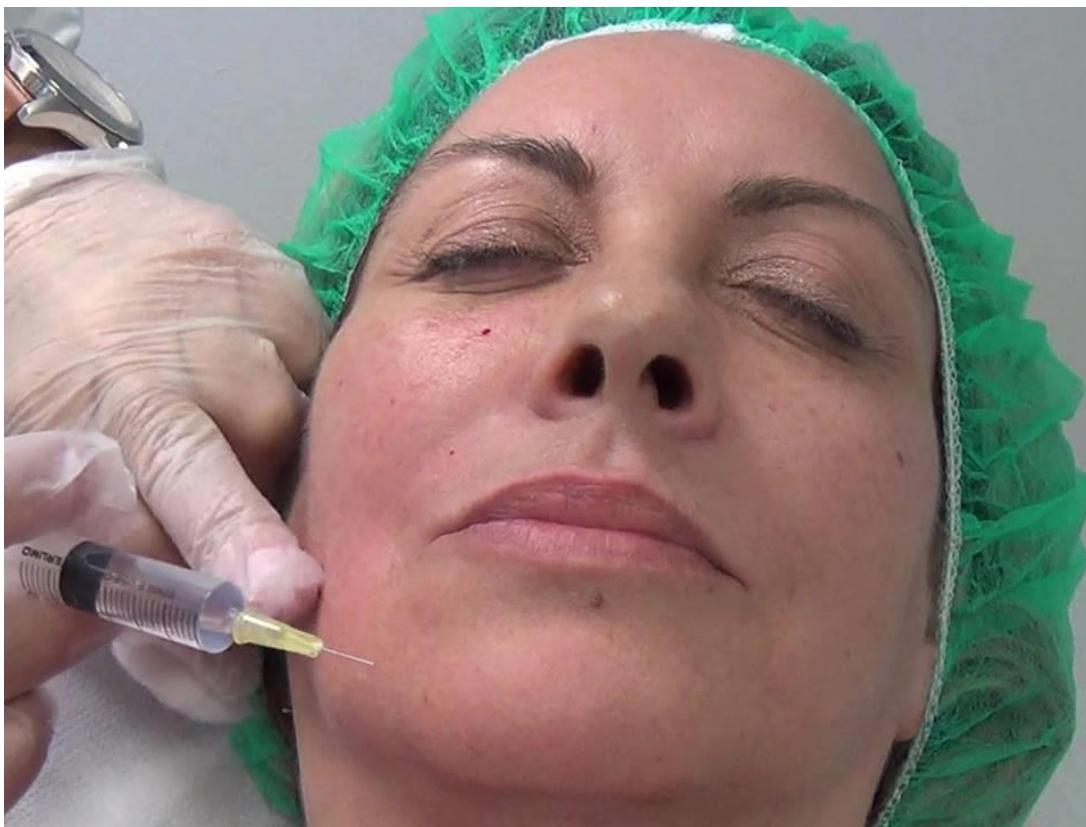


Figura 29

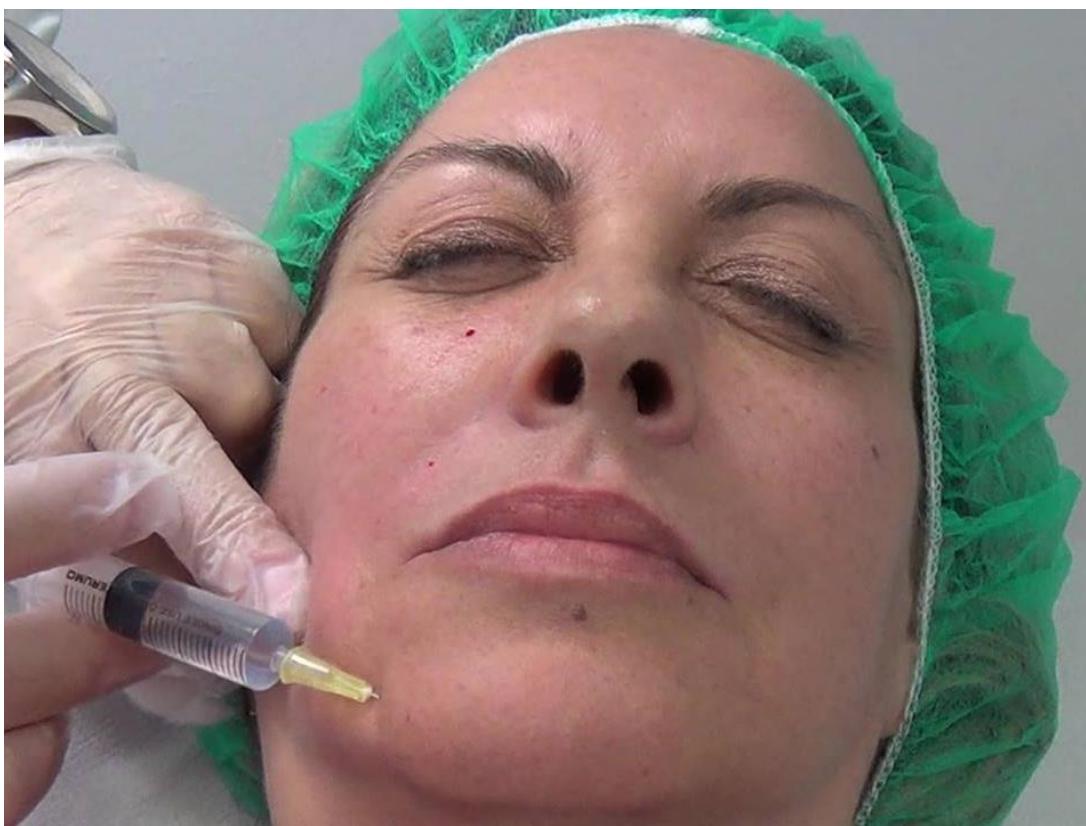


Figura 30

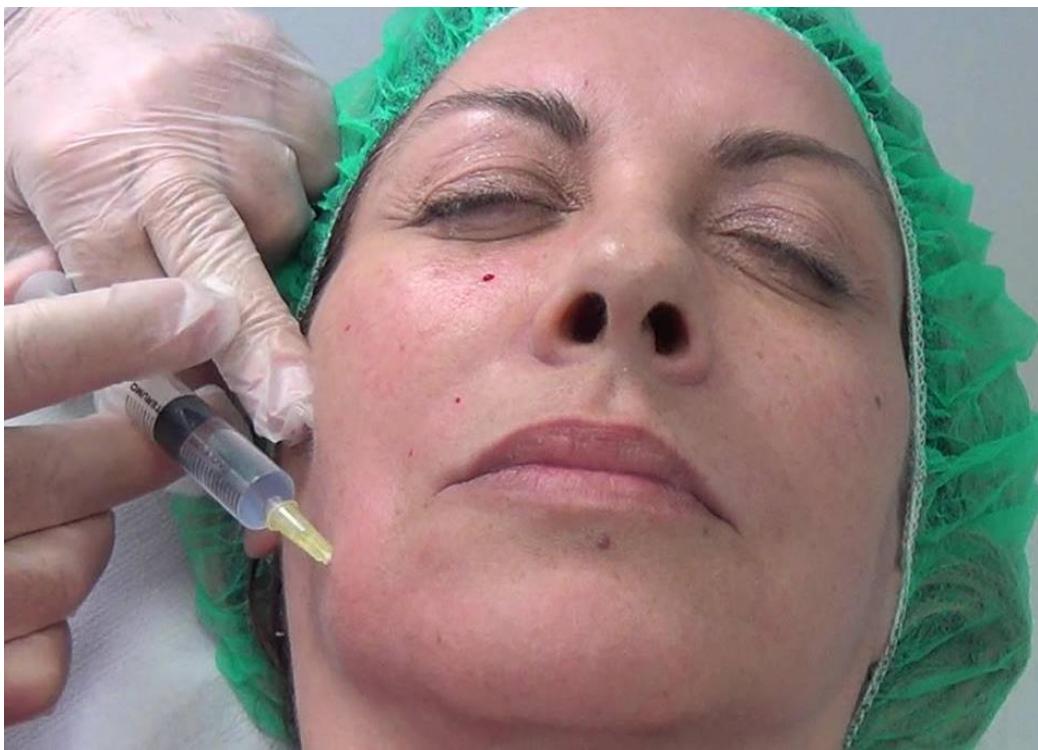
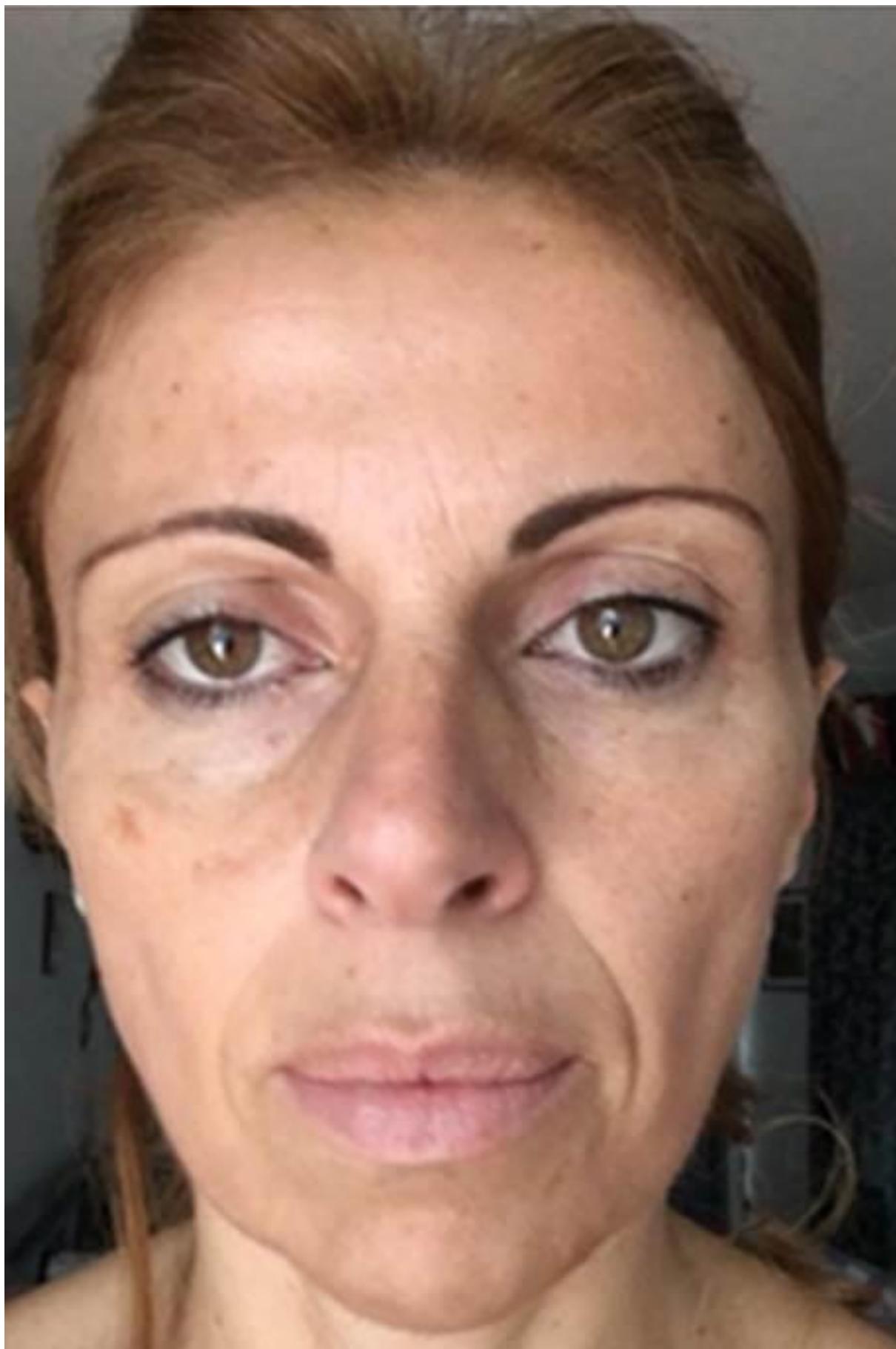


Figura 31

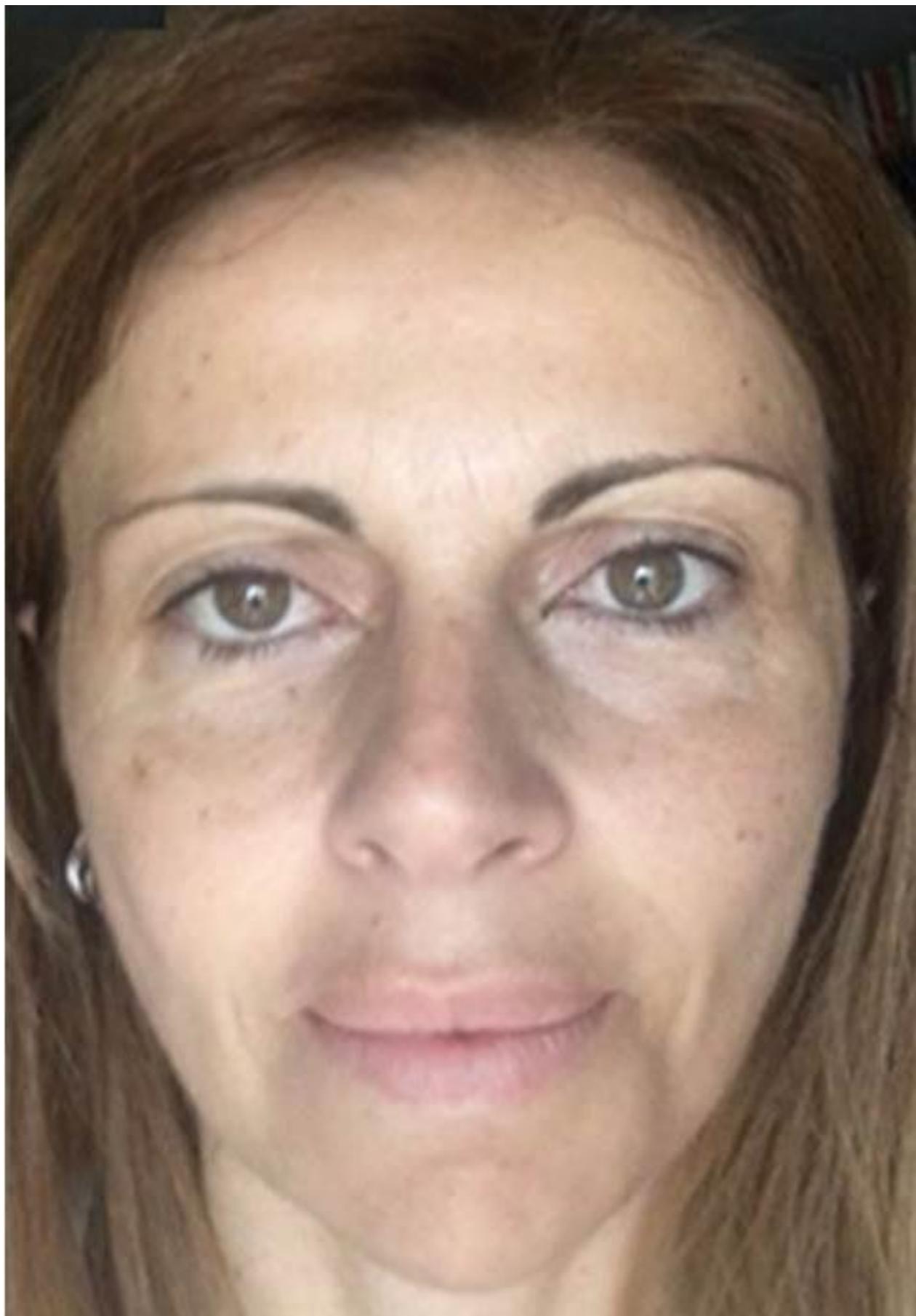


Figura 32

Gli effetti clinici sono evidenti già dopo 10-20 trattamenti (Figg. 33, 34, 35, 36, 37, 38).



Basale 33



Dopo 34 Post-20 trattamenti

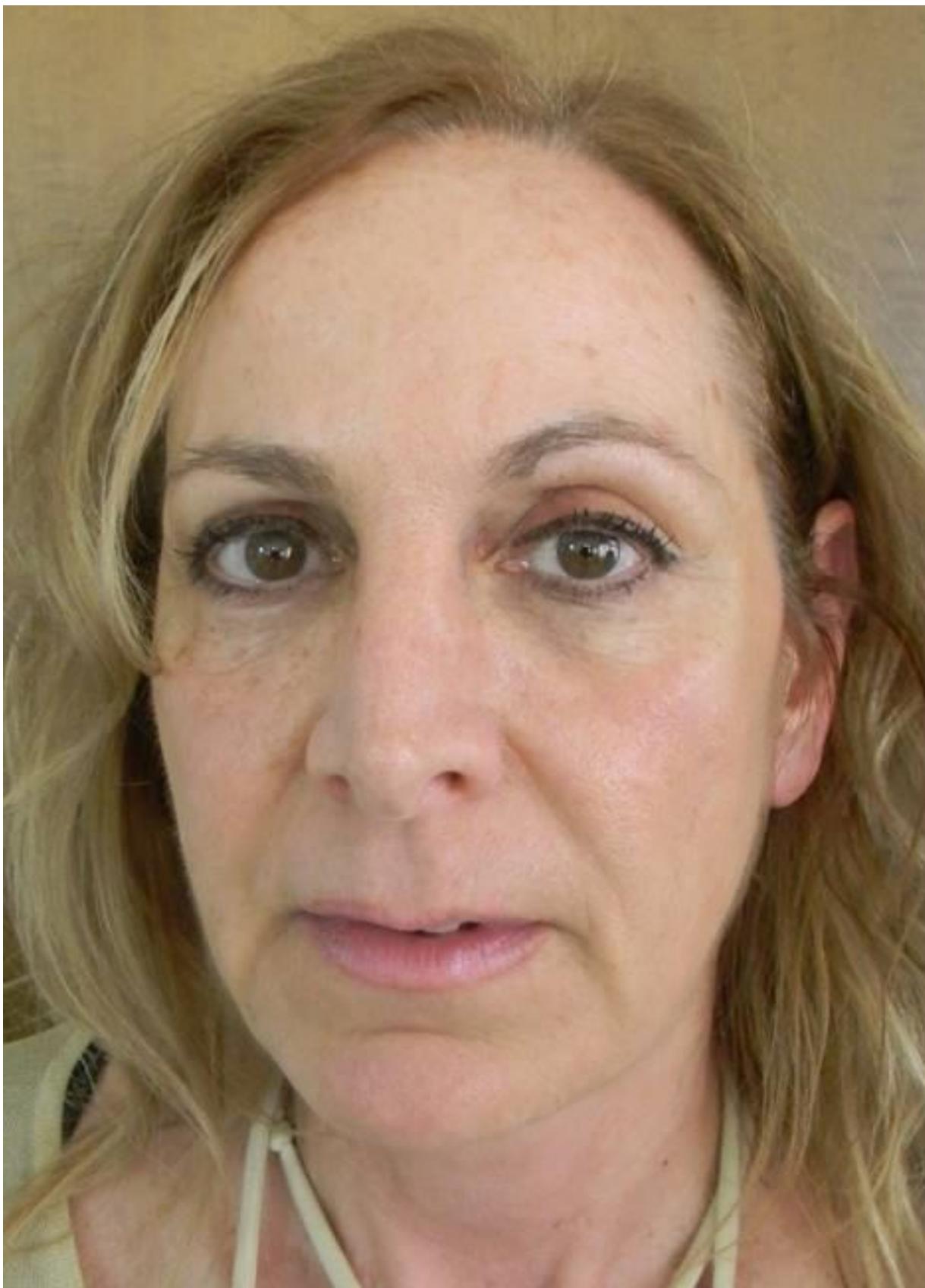


Figura 35 Basale

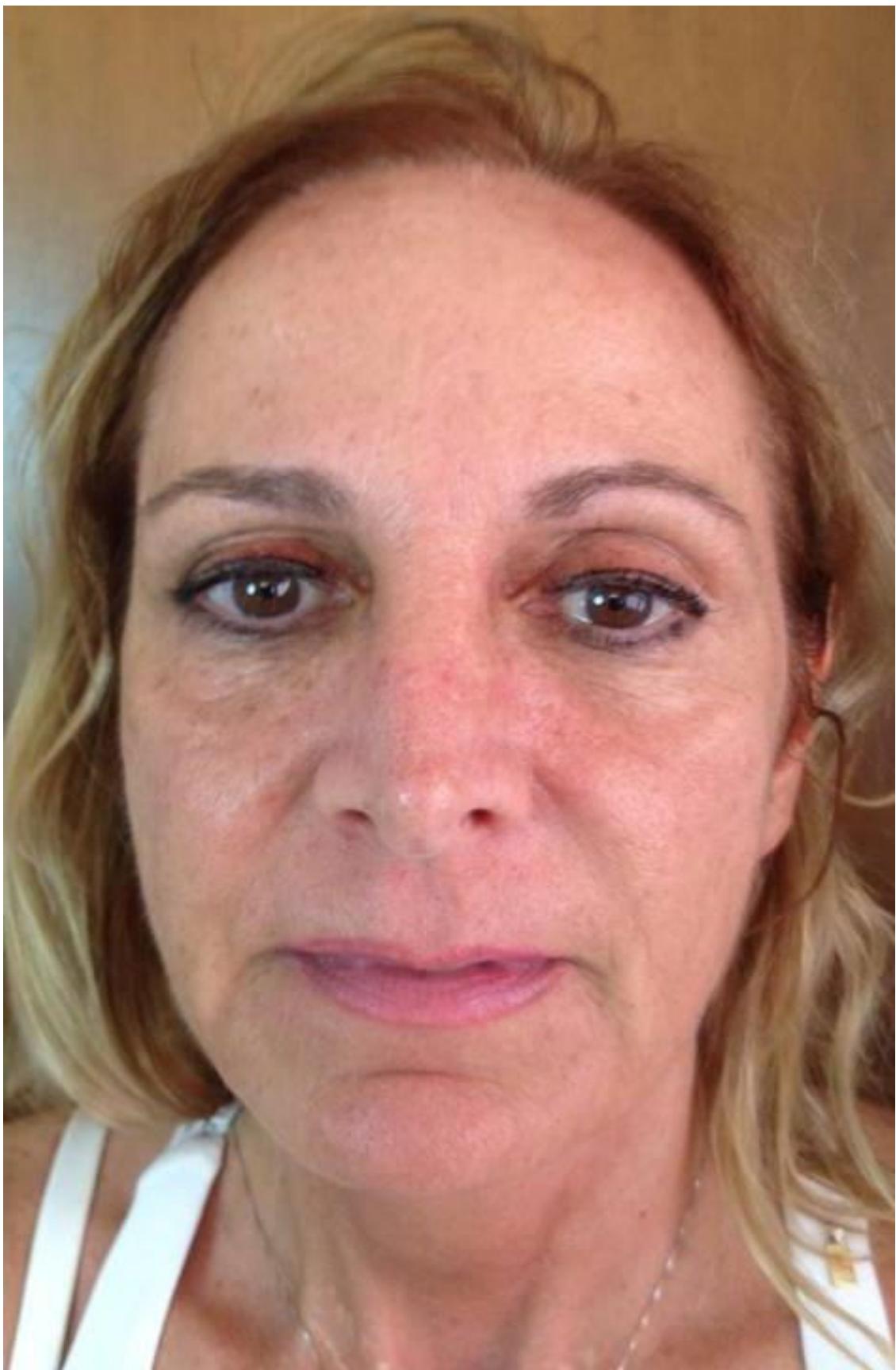


Figura 36 Post-20 trattamenti



Figura 37 Basale

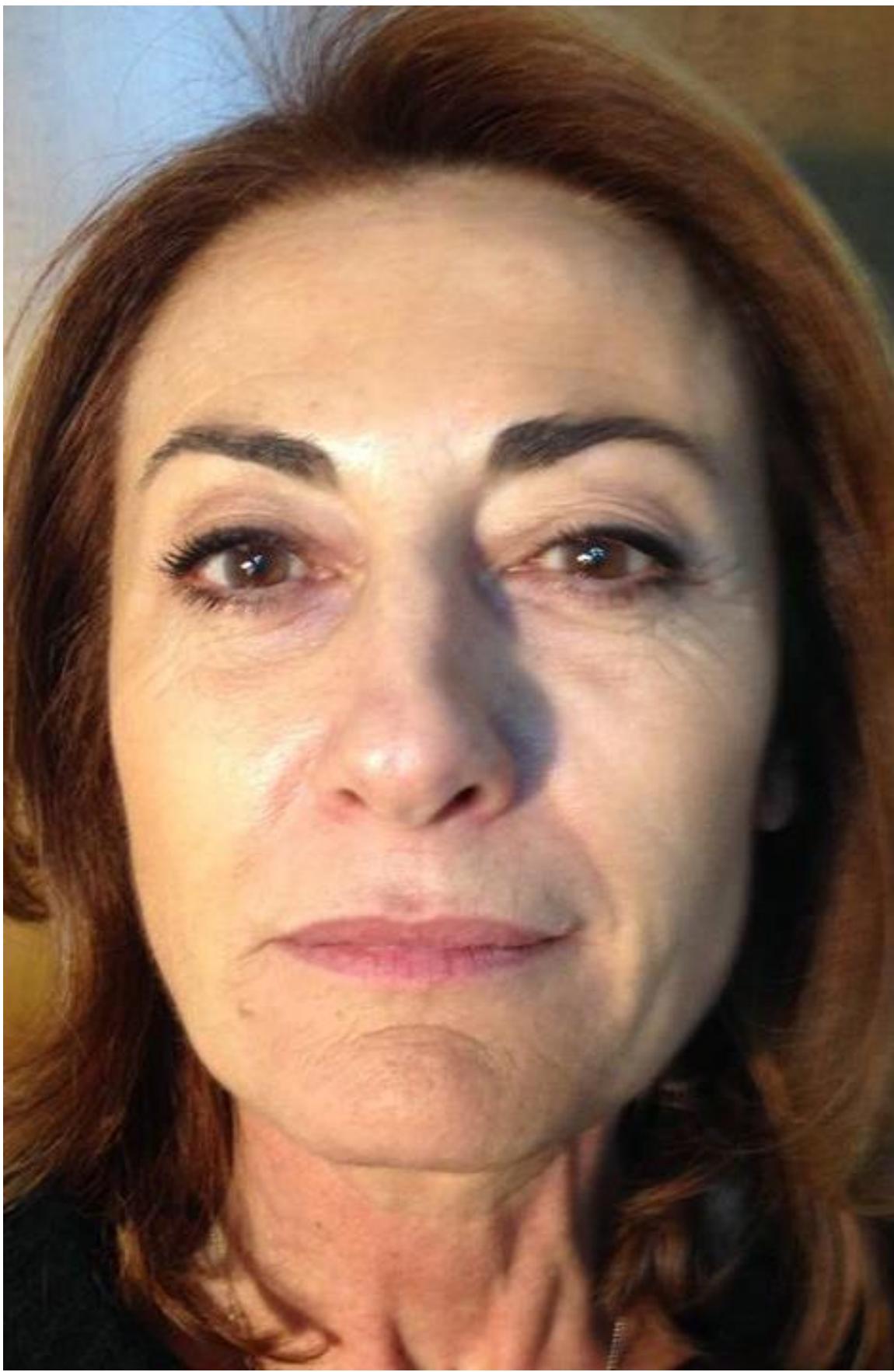


Figura 38 Post-20 trattamenti

## Applicazioni topiche

L'insulina low dose (0.004 UI/ml) si può utilizzare mediante applicazioni topiche per trattare le ulcere distrofiche mediante applicazioni topiche (Fig. 39).



Figura 39 Ulcera venosa

Si esegue l'applicazione topica della soluzione di *insulina low dose* sull'ulcera (10-20 ml, 2 volte al giorno).

L'insulina low dose si può utilizzare per trattare le recessioni gengivali (Fig. 40).



Figura 40 Recessione gengivale

Si esegue l'applicazione topica della soluzione di *insulina low dose* sulla gengiva in sofferenza mediante un pennellino (5-10 ml, 2 volte al giorno).

## Referenze bibliografiche

Br J Dermatol - 1984 Jul;111 Suppl 27:232-4.

**Insulin receptors in cultured human keratinocytes**

P Verrando, J P Ortonne

Endocrinology - 1989 Feb;124(2):964-70.

**Stimulation of collagen formation by insulin and insulin-like growth factor I in cultures of human lung fibroblasts**

R H Goldstein 1, C F Poliks, P F Pilch, B D Smith, A Fine

Metabolism- Volume 53, Issue 6, June 2004, Pages 710-715

**Direct effects of high glucose and insulin on protein synthesis in cultured cardiac myocytes and DNA and collagen synthesis in cardiac fibroblasts**

TakeshiTokudome, Takeshi Horiob, Fumiki Yoshihara, Shin-ichi Suga, Yuhei Kawano, MasakazuKohno, KenjiKangawa

Arthritis Rheum - 2003 Mar;48(3):798-806.

**Selective stimulation of collagen synthesis in the presence of costimulatory insulin signaling by connective tissue growth factor in scleroderma fibroblasts**

Elizabeth Gore-Hyer 1, Jaspreet Pannu, Edwin A Smith, Gary Grotendorst, Maria Trojanowska

Invest Ophthalmol Vis Sci . 2006 Dec; 47(12):5260-6.

**Stimulation of collagen synthesis by insulin and proteoglycan accumulation by ascorbate in bovine keratocytes in vitro**

Kurt Musselmann 1, Bradley Kane, Bridgette Alexandrou, John R Hassell

Gerontology - . 1998;44(3):144-8. doi: 10.1159/000021998.

**Insulin stimulates collagen synthesis in vascular smooth muscle cells from elderly patients**

A Ruiz-Torres 1, J Melón, F J Muñoz

Journal of Cellular Physiology -1992 Aug;152(2):389-96.

**Insulin-like growth factor-I (IGF-i) stimulates protein synthesis and collagen gene expression in monolayer and lattice cultures of fibroblasts**

Philippe Gillery Armelle Leperre François-Xavier Maquart Jacques-Paul Borel

Respiratory Research volume 14, Article number: 102 (2013) Cite this article

**Role of IGF-1 pathway in lung fibroblast activation**

Chi F Hung, Maryam G Rohani, Sung-soon Lee, Peter Chen & Lynn M Schnapp

Pediatric Research volume 60, pages389–394(2006)Cite this article

**Insulin-like Growth Factor-I Signaling Mechanisms, Type I Collagen and Alpha Smooth Muscle Actin in Human Fetal Lung Fibroblasts**

Anne Chetty, Gong-Jee Cao & Heber C Nielsen

J Cell Physiol - 1979 Oct;101(1):129-38.

**Insulin stimulation of glucose entry in cultured human fibroblasts**

B V Howard, D M Mott, R M Fields, P H Bennett

Cell Cycle - 2009 Jul 1;8(13):2024-30.

**Insulin stimulates fibroblast proliferation through calcium-calmodulin-dependent kinase II**

Sara Monaco 1, Maddalena Illario, Maria Rosaria Rusciano, Giovanni Gragnaniello, Gaetano Di Spigna, Eleonora Leggiero, Lucio Pastore, Gianfranco Fenzi, Guido Rossi, Mario Vitale

Diabetes 1974 May; 23(5): 443-448.

**Insulin Action on the Cultured Human Fibroblast: Glucose Uptake, Protein Synthesis, RNA Synthesis**

Wilfred Y Fujimoto, Robert H Williams

Diabetologia volume 20, pages186–189(1981)Cite this article

**Insulin-stimulated glucose uptake, leucine incorporation into protein, and uridine incorporation into RNA in skin fibroblast cultures from patients with diabetes mellitus**

R. H. Eckel, W. Y. Fujimoto

BMC Cell Biology volume 10, Article number: 1 (2009)

**Cell and molecular mechanisms of keratinocyte function stimulated by insulin during wound healing**

Yan Liu, Melissa Petreaca, Min Yao & Manuela Martins-Green

J Clin Invest. 2014 Apr 1; 124(4): 1465–1467.

**Insulin, osteoblasts, and energy metabolism: why bone counts calories**

Ryan C. Riddle and Thomas L. Clemens

Author information Copyright and License information Disclaimer

Journal of Clinical Investigation - May 2020 - 130(6)

**Insulin-stimulated lipogenesis gets an epigenetic makeover**

Clarence R. Manuel, Rebecca A. Haeusler

Endocrinology, Volume 122, Issue 5, 1 May 1988, Pages 2084–2089,

**Role of Insulin in Growth Hormone-Stimulated 3T3 Cell Adipogenesis**

Seth Guller et al.

J Clin Endocrinol Metab - . 2010 Aug;95(8):3848-57.

**Insulin stimulates human skeletal muscle protein synthesis via an indirect mechanism involving endothelial-dependent vasodilation and mammalian target of rapamycin complex 1 signaling**

Kyle L Timmerman 1, Jessica L Lee, Hans C Dreyer, Shaheen Dhanani, Erin L Glynn, Christopher S Fry, Micah J Drummond, Melinda Sheffield-Moore, Blake B Rasmussen, Elena Volpi

Annals of Biomedical Engineering volume 38, pages1647–1654(2010)

**IGF-1 and BMP-2 Induces Differentiation of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells into Chondrocytes-Like Cells**

Chunhou An, Yang Cheng, Quan Yuan & Jianjun Li

Molecular Medicine Reports- January 24, 2019

**Insulin-like growth factor I promotes adipogenesis in hemangioma stem cells from infantile hemangiomas**

Fan Wang Honghong Li Yin Lou Juan Xie Dongsheng Cao Xueying Huang

Stem Cells Journals - 23 May 2015

**IGF1 Promotes Adipogenesis by a Lineage Bias of Endogenous Adipose Stem/Progenitor Cells**

Li Hu Guodong Yang Daniel Hägg Guoming Sun Jeffrey M. Ahn Nan Jiang Christopher L. Ricupero June Wu Christine Hsu Rodhe Jeffrey A. Ascherman Lili Chen Jeremy J. Mao

Diabetes 2006 Oct; 55(10): 2863-2870.

**Insulin Restores Metabolic Function in Cultured Cortical Neurons Subjected to Oxidative Stress**

Ana I. Duarte, Teresa Proença, Catarina R. Oliveira, Maria S. Santos and A. Cristina Rego

Front Endocrinol (Lausanne). 2020; 11: 62.

**Mechanisms of Macrophage Polarization in Insulin Signaling and Sensitivity**

Lucie Orliaguet, Elise Dalmas, Karima Drareni, Nicolas Ventecler and Fawaz Alzaid

Mol Cell Biol - 2001 Jan;21(1):319-29.

**Essential role of insulin receptor substrate 1 in differentiation of brown adipocytes**

M Fasshauer 1, J Klein, K M Kriauciunas, K Ueki, M Benito, C R Kahn

Bone . 1998 Sep;23(3):181-6. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00095-7.

**Insulin receptor expression in primary and cultured osteoclast-like cells**

D M Thomas 1, N Udagawa, D K Hards, J M Quinn, J M Moseley, D M Findlay, J D Best

Mol Cells. 2017 May 31; 40(5): 371–377.

**Up-Regulation of RANK Expression via ERK1/2 by Insulin Contributes to the Enhancement of Osteoclast Differentiation**

Ju Hee Oh, Na Kyung Lee