

THE RESEARCH INSTITUTE, THE HOSPITAL FOR SICK CHILDREN,
TORONTO - CANADA

(Director: W. STANLEY HARTROFT)

VARIACIONES DIURNAS DE LA ELIMINACIÓN DE INSULINA EN ORINA *

JUAN J. GAGLIARDINO

Durante los últimos años, han sido varios los trabajos que han vuelto a llamar la atención sobre la presencia de insulina en orina. El magnífico trabajo de MIRSKY y colaboradores⁹, demostrando que sólo el 1% de la insulina producida en las 24 hs aparecía en la orina, pareció cerrar toda especulación fisiopatológica.

El advenimiento de técnicas inmunológicas para determinación de insulina^{10,14} ha permitido, gracias al extraordinario incremento de sensibilidad que las caracteriza, retomar estos estudios. Así por ejemplo JØRGENSEN⁶ pudo demostrar en clínica un marcado paralelismo entre los niveles plasmáticos y urinarios de insulina. Similares resultados han sido obtenidos en ratas, durante pruebas de tolerancia a la glucosa oral o tolbutamida³. MAC ARTHUR, estudiando los valores absolutos de insulina en orina de 24 hs obtuvo interesantes resultados⁸ demostrando en orina de hermanos sanos de diabéticos cantidades de esta hormona superiores a los de la población general. Recientemente, RUBENSTEIN y colaboradores¹² determinaron los valores correspondientes al clearance de insulina, resultados que fueron posteriormente reproducidos por CHAMBERLAIN y colaboradores¹.

DIURNAL VARIATIONS OF INSULIN IN URINE. The presence of insulin in urine has attracted the attention of several investigators during the last years. The findings of MIRSKY et al.⁹ that only 1% of the insulin produced during the day appeared in the urine, seemed to terminate any possible physiopathological speculation.

The development of immunological techniques with high sensitivity for insulin determination^{10,14} has opened new possibilities in this field. By means of these techniques JØRGENSEN⁶ has demonstrated in patients a parallelism between the urinary and plasma levels of insulin. Similar results were obtained in rats, during the performance of an oral glucose load or the tolbutamide test³. MAC ARTHUR, studying the absolute values of insulin in the urine collected during a 24 hrs period in healthy diabetic siblings⁸, found higher levels than in the normal population. Recently, RUBENSTEIN et al.¹² determined the insulin clearance values. Similar studies were performed by CHAMBERLAIN et al.¹.

Key-words: Diurnal variations; Food intake; Glucose load; Insulin; Tolbutamide test.

** Este trabajo fue costado por el Medical Research Council de Canada, Grant MT-1202.*

Data di arrivo in Redazione 10-7-1968.

Acta diabet. lat. 6, 197, 1969.

Este último trabajo, presentando valores inferiores a la unidad para el clearance de insulina, explica la razón de los valores tan bajos que ya MIRSKY encontrara en su comunicación original.

Por lo general estos trabajos han considerado los valores de la hormona en el volumen recogido durante las 24 hs o durante breves periodos como en el caso de la determinación de los clearances. Sin embargo, hay que reparar en dos hechos que son ahora bien aceptados. Es conocido que los niveles circulantes de insulina son distintos durante el ayuno y durante el período post-prandial, y que los valores obtenidos durante el día son diferentes a los obtenidos durante la noche⁷. Recientemente fueron publicados los primeros resultados referentes al ritmo circadiano de eliminación de insulina³. Dada la importancia que ello puede representar, desde el punto de vista fisiopatológico, se ha creído oportuno ampliar algunos detalles de dicho trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 20 ratas Wistar machos de alrededor de g 230 de peso. Los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales para la recolección de orina.

El recinto en el que se encontraban las jaulas estaba con una temperatura constante de 24°C y una humedad de aproximadamente 40%. La luz del cuarto permanecía encendida de 8 a 17 hs y se apagaba automáticamente durante el resto del día.

El alimento ofrecido a las ratas consistió en una mezcla de partes iguales (p/v) de purina de ratas molida y agua corriente. La consistencia final pastosa impide en gran parte la caída de alimento sobre el frasco colector de orina. La mitad de los animales (10 ratas) tuvieron acceso al alimento durante el período de luz (8 a 17 hs) y se los denominó DF. Las otras 10 ratas restantes sólo tuvieron acceso durante el período de oscuridad (17 a 8 hs) denominándolas NF.

Antes de comenzar la recolección de orina se mantuvo en este regimen a los animales durante 10 días, tiempo que se observó como necesario para que los animales tuvieran una ingesta más o menos constante y un incremento de peso diario similar en ambos grupos (fig. 1).

En ambos grupos la orina se recolectó diariamente durante 3 días consecutivos en 2 períodos: de 8 a 17 hs y de 17 a 8 hs. Dicha

The latter present values below one and explain the low values reported by MIRSKY in his original communication.

Generally, these papers have considered the insulin values obtained in the urine collected during 24 hrs or within short periods, as in the case of the insulin clearance determination. However, there are two facts to be considered which are now accepted. The circulating levels of insulin are lower during the fasting period than after food ingestion and their values also differ during the day and the night⁷. Recently, preliminary results on the circadian rhythm of elimination of insulin in urine were published³. Since this could be an important physiopathological point, it has been considered of interest to extend those results.

MATERIAL AND METHODS

Twenty Wistar male albino rats, weighing about g 230, were employed. The animals were kept singly in metabolic cages for urine collection.

The temperature of the room was maintained constant at 24°C with approximately 40% humidity. The lights were automatically switched on and off at 8 a.m. and 5 p.m. respectively.

The animals were given a food prepared from equal parts (W/V) of ground rat chow (Purina) and tap water. This mixture had a final consistence that prevented the food from dropping into the urine collection bottles. Half of the animals (10 rats) had free access to the food during the hours of light (8 a.m. to 5 p.m.) and were called DF. The rest of the rats (10) were given food only during the dark period (5 p.m. to 8 a.m.) and were called NF.

Before any urine was collected, all animals were maintained under the above mentioned conditions for 10 days, because this was the period required for a regular food ingestion and body weight increase (fig. 1).

In both groups the urine was collected daily for 3 days in two periods: from 8 a.m. to 5 p.m. and from 5 p.m. to 8 a.m. The urine

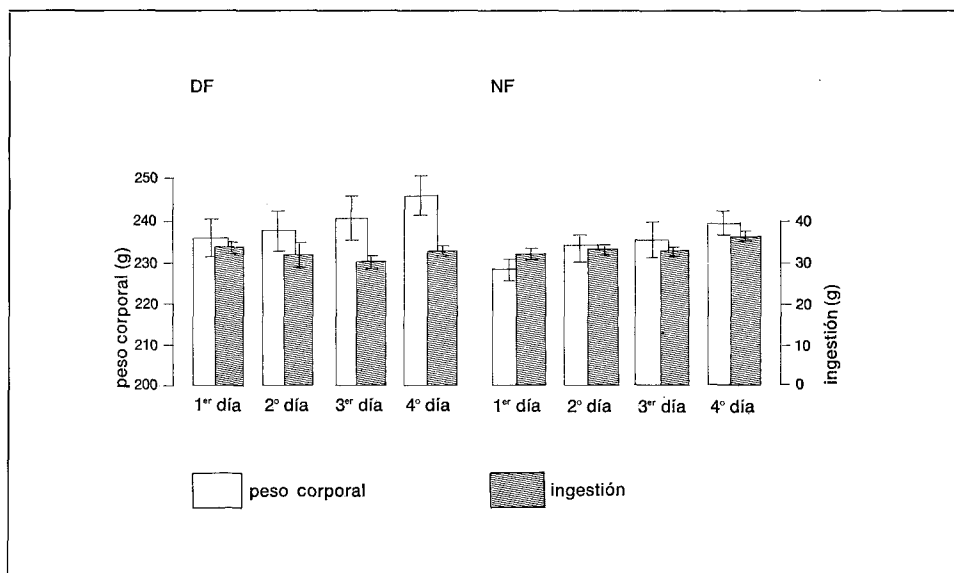


Fig. 1 - Se representa en barras el promedio \pm standard error de la ingesta y el peso corporal diario. The bars represent the mean \pm standard error of daily food ingestion and body weight.

recolección se hizo en recipientes de plástico con el agregado de unas gotitas de merthiolate. Inmediatamente de retirados los recipientes se determinó el volumen y el total se centrifugó (2.000 rpm, 2 min). El supernadante se ajustó a pH $7,4 \pm 0,2$ y se diluyó 1 : 2,5 en buffer de borato pH 7,5 con el agregado de 1% de albúmina bovina (fracción V de Cohn cristalizada).

Al final de los 3 días de recolección de orina se extrajo sangre de todos los animales utilizando un capilar colocado en el plexo retro-orbitario, a las 12 y a las 21 hs. En esta forma durante la primera extracción el grupo DF llevaba 4 hs, de ingestión y NF 4 hs de ayuno. La situación opuesta se logró en la extracción de las 21 hs. Se determinaron los niveles de glucosa e insulina en sangre y de insulina en la orina, utilizando el método de glucosa-oxidasa⁴ y el del doble anticuerpo de MORGAN y LAZAROW respectivamente¹⁰.

RESULTADOS

La reproducibilidad del método inmunológico para la determinación de insulina ha sido demostrada en un trabajo previo³.

La cantidad de insulina eliminada en la orina ha sido expresada en $\mu\text{U}/\text{h}$, ya que es la forma que mejor representa

was collected in plastic bottles with the addition of a few drops of merthiolate. The samples were measured before centrifugation (2,000 rpm for 2 min). The supernatant was separated and adjusted to pH 7.4 ± 0.2 , diluted 1 : 2.5 in borate buffer pH 7.5 with the addition of 1% albumin (fraction V from bovine plasma) and kept frozen.

Three days after the urine collection a blood sample was drawn from all animals through a capillary tube from the retro-orbital plexus at 12 (noon) and at 9 p.m. At this time, the DF at noon were in the 4th h of their feeding period and the NF group in the 4th h of their fasting period. The opposite situation was present for each group at 9 p.m. Serum glucose levels were determined by means of the glucose-oxidase method⁴ and the serum and urine insulin levels by the double antibody immunoassay of MORGAN and LAZAROW¹⁰.

RESULTS

The reproducibility of the immunoassay for urine insulin determination has been previously reported³.

The amount of insulin eliminated in the urine has been expressed in $\mu\text{U}/\text{h}$ because it is the best way to show

lo que ocurre con la hormona. Este valor se obtiene empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\mu\text{U/ml} \times \text{volumen de orina}}{\text{horas de colección}}$$

La fig. 2 representa los valores obtenidos en el grupo NF durante el período diurno y nocturno respectivamente durante 3 días consecutivos. Fácilmente puede apreciarse que la insulina eliminada durante el período 17 a 8 hs es significativamente mayor que la correspondiente al período 8 a 17 hs.

La fig. 3 representa valores obtenidos en el grupo DF. Puede apreciarse que los valores diurnos y nocturnos en este grupo no son significativamente diferentes.

En las figs 4 y 5 han sido representados los valores correspondientes de glucosa e insulina plasmática a las 12 y

what happens with the hormone. This value was obtained by means of the following formula:

Fig. 2 represents the values obtained in the NF group during the day and night period for the 3 successive days. It can be seen that the values obtained from 5 p.m. to 8 a.m. are significantly higher than those obtained from 8 a.m. to 5 p.m.

Fig. 3 shows the values obtained in the DF group. These values are not significantly different in both collecting periods.

The serum insulin and glucose levels obtained at 12 (noon) and at 9 p.m. are represented in figs 4 and 5, respectively.

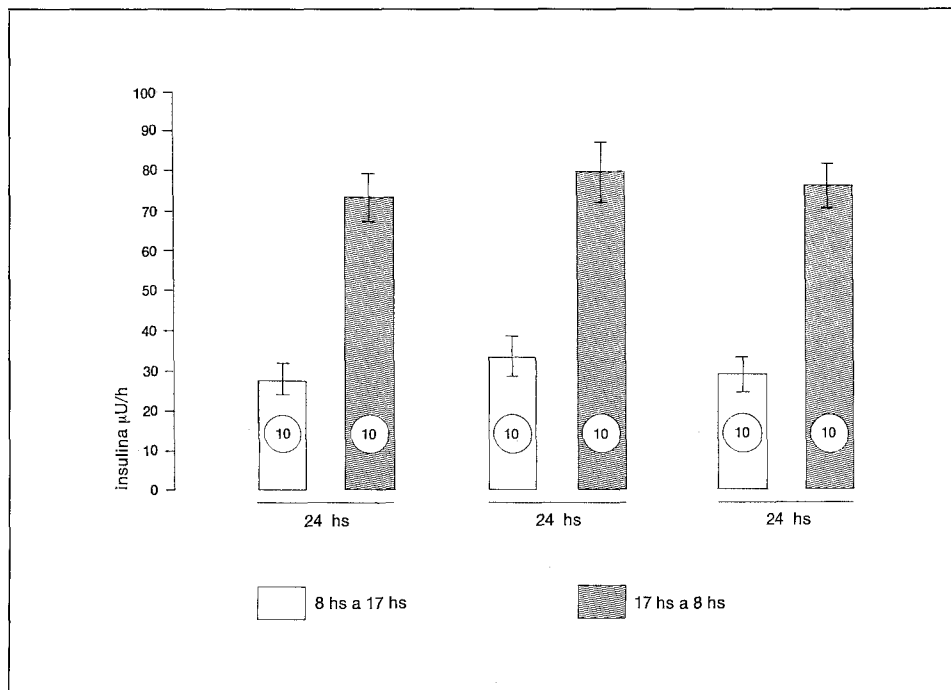


Fig. 2 - Se representan 3 días de recolección de orina en el grupo alimentado durante el período 17 a 8 hs.

The figure represents 3 days of urine collection in the group fed during the period from 5 p.m. to 8 a.m.

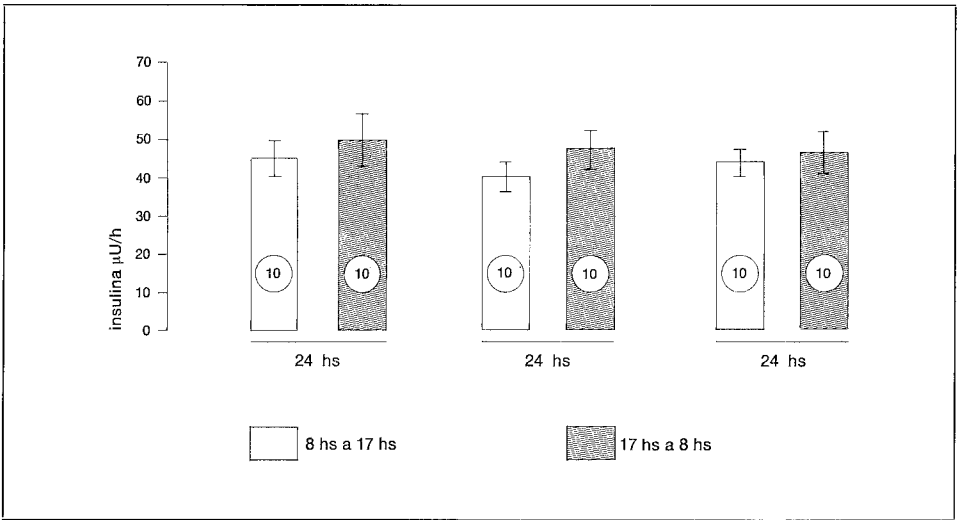


Fig. 3 - Se representan 3 días de recolección de orina en el grupo alimentado durante el período 8 a 17 hs.

The figure represents 3 days of urine collection in the group fed during the period from 8 a.m. to 5 p.m.

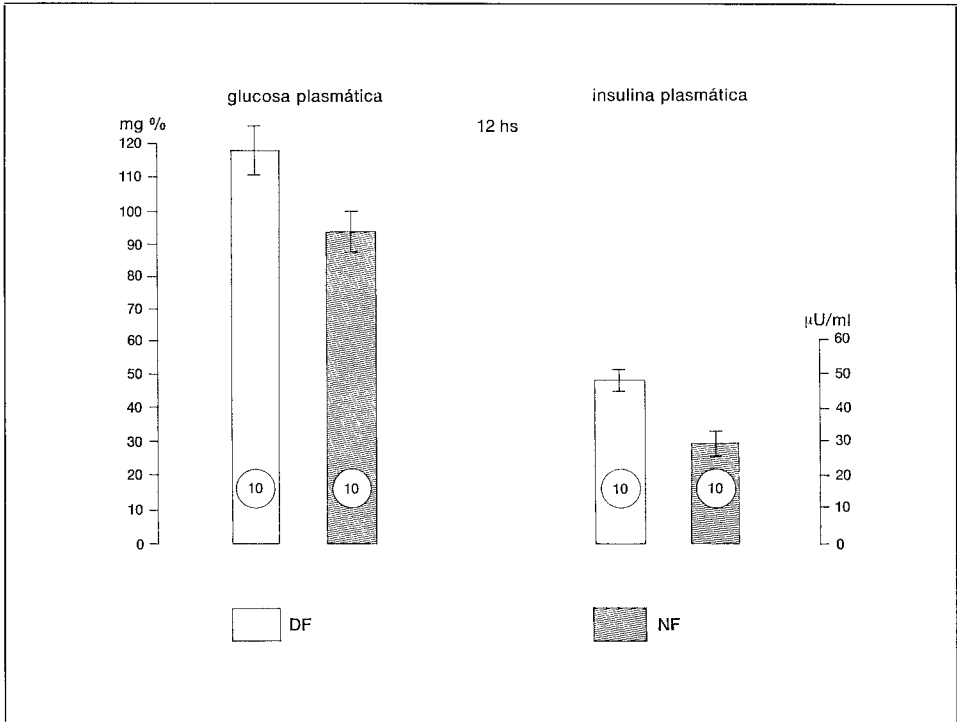


Fig. 4 - Se representan los valores de glucosa e insulina plasmática en el grupo DF y NF a las 12 hs.

The figure represents the plasma glucose and insulin levels in the group DF and NF at 12 (noon).

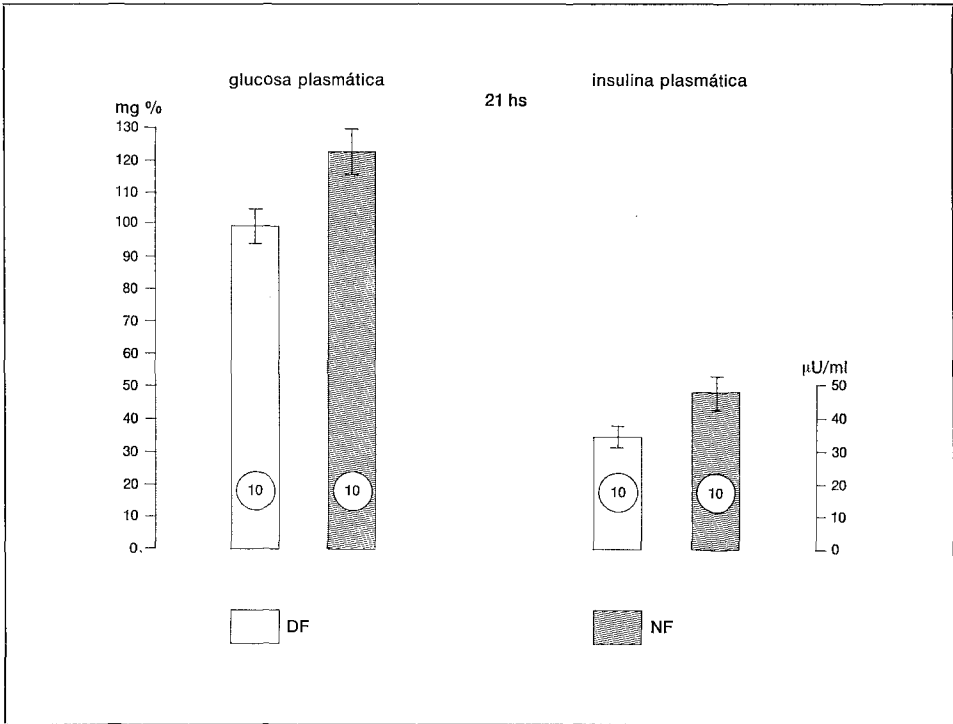


Fig. 5 - Se representan los valores de glucosa e insulina plasmática en el grupo DF y NF a las 21 hs. The figure represents the plasma glucose and insulin levels in the group DF and NF at 9 p.m.

21 hs respectivamente. Mientras que los valores de ayuno son estadísticamente menores que los del periodo post-absorbtivo, no hay diferencia entre los valores de los mismos durante el grupo DF y NF.

Although in both groups the fasting serum insulin levels are significantly lower than those of the non-fasting period, the difference between these values during day and night, either in the fasting or in the non-fasting period, is not significant.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este experimento indican la existencia de un ritmo circadiano en la eliminación de insulina por la orina como fue sugerido previamente³. Queda bien demostrado este ritmo en el grupo NF, en el cual se ha respetado el hábito nocturno de ingestión de la rata. Cuando se invierte el horario de ingestión del animal (DF) aún después que éste ya ingiere una cantidad de alimento similar al del otro grupo (NF) dicho ritmo desaparece.

DISCUSSION

The present results indicate the existence of a circadian rhythm in the elimination of insulin in urine, as has been previously suggested³. This rhythm can be clearly noted in the group NF in which it follows the usual habit with which rats are fed. Conversely, when that habit of food intake was altered (DF), the circadian rhythm was abolished.

Los resultados encontrados en sangre son algo diferentes. Mientras que la diferencia entre los valores de insulina plasmática durante el período post-abortivo y el ayuno son significativamente diferentes, no hay diferencia entre los diurnos y nocturnos de dichos periodos. En este aspecto, los resultados obtenidos en plasma no reflejarían la existencia del ritmo circadiano hallado en orina. Cabe acotar que la diferencia podría deberse a que: mientras los valores plasmáticos sólo demuestran lo acontecido en un instante determinado, los valores de orina representan la homeostasis de varias horas. Sin embargo es probable que con algún otro diseño experimental, se pueda también encontrar en el plasma el mencionado ritmo, como lo demostraron HOET y colaboradores⁷ en clínica.

El ritmo circadiano de eliminación de insulina urinaria, se agrega a los descriptos para otras hormonas como somatotrofina⁵, ACTH¹¹ y foliculo estimulante².

Desde el punto de vista experimental esto obliga a considerar cuidadosamente cualquier modelo experimental en el cual por diversas razones no se respete el horario habitual de ingestión de la rata. Es lógico pensar que si los valores plasmáticos de insulina cambian, aquellos fenómenos que sean insulino dependientes, también lo hagan. Por consiguiente estas observaciones deben ser tenidas en cuenta al planear un determinado experimento.

Desde el punto de vista clínico las posibilidades son otras. Se hace necesario investigar en clínica la existencia del ritmo hallado en ratas. Si se lo encuentra, podría ser este un dato de real valor diagnóstico. En efecto ha sido descripto que la alteración del ritmo normal del ACTH¹¹, es un signo precoz de alteración del lóbulo anterior de hipófisis. Homologando este hecho a la insulina y a la célula β , quizás la alteración del ritmo pudiera servir para detectar cambios en el funcionamiento del páncreas.

The results obtained on the serum insulin levels are slightly different. Although the difference between fasting and non-fasting serum insulin levels is significant, there is no difference between these values during day and night, either in the fasting or in the non-fasting period in both groups. In this aspect the serum values would not reflect the changes found in the urine. This difference could be explained by the assumption that the serum insulin levels only represent the events of a very short period while the urine values represent the homeostasis for several hours. However, it is possible that with a different experimental design the circadian rhythm might be noticeable also in the serum insulin levels as shown by HOET et al.⁷ in human subjects.

The diurnal variation in urine is yet another one to be added to the circadian rhythm previously described for other hormones such as growth hormone⁵, ACTH¹¹ and FSH².

From the experimental point of view, these results have shown the necessity to consider carefully any experimental design in which the feeding habits of the rat have been changed. If the serum insulin levels fluctuate, we can assume that those insulin-dependent phenomena will follow the insulin changes. These observations have therefore to be considered when an experiment is planned.

From the clinical point of view the application of the existence of the circadian rhythm is different. It is necessary to investigate this rhythm in human subjects, since it could be important for the clinical diagnosis. Since the modification of the ACTH rhythm¹¹ is an early sign of an altered anterior pituitary or adrenal function, a similar conclusion may be true for the pancreatic β -cell.

Esta probabilidad está siendo investigada activamente ahora en nuestro laboratorio. Aún cuando en el terreno de la especulación, estas posibilidades obligan a incrementar los estudios en este campo de la investigación.

This possibility is now actively investigated in our laboratory and could open a new approach in the clinical field.

CONCLUSIÓN

En la rata normal, respetando el hábito de alimentación nocturno del animal, la eliminación de insulina por la orina sigue un ritmo circadiano. Dicho ritmo es abolido cuando se invierte dicho hábito, administrándose el alimento durante el día. De esto resulta que la eliminación de insulina urinaria tiene un doble regulador: período de luz-oscuridad y horario de ingesta de alimento.

CONCLUSION

In the normal rat, following its natural habit of food ingestion, the insulin in urine is eliminated in a circadian rhythm. This rhythm is abolished by changing the period of food ingestion from the night to the day. It may be concluded that insulin elimination in urine is regulated by two major factors: day or night period and time of food ingestion.

RIASSUNTO

È stato studiato l'effetto della luce e del periodo di ingestione del cibo sull'eliminazione di insulina nelle urine. Si può dimostrare l'esistenza di un ritmo circadiano e la presenza di due fattori di regolazione per questa eliminazione. Vengono presentate alcune ipotesi concernenti questi fenomeni.

RESUME

On a étudié l'effet de la lumière et de la période d'ingestion des aliments sur l'élimination d'insuline par les urines. On peut démontrer l'existence d'un rythme circadien et la présence de deux facteurs de régulation pour cette élimination. On présente quelques hypothèses concernant ces phénomènes.

RESUMEN

Se estudió el efecto que sobre la eliminación de insulina urinaria ejercen los períodos de luz-oscuridad y el horario de administración del alimento. Se demuestra la existencia de un ritmo circadiano de eliminación de dicha hormona, describiéndose dos reguladores del mismo. Se hacen especulaciones fisiopatológicas acerca de su significado.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde der Effekt des Lichtes und der Einnahme-Periode der Nahrung auf die Insulinausscheidung im Harn untersucht. Man kann das Dasein eines circadianen Rhythmus und die Anwesenheit von zwei Regulierungsfaktoren fuer diese Ausscheidung nachweisen. Es werden einige Hypothesen betr. diese Phaenomene aufgestellt.

SUMMARY

The effect of light and the period of food ingestion upon insulin elimination in urine has been studied. The existence of a circadian rhythm and the presence of two regulating factors for this elimination can be shown. Some speculations concerning these phenomena are presented.

BIBLIOGRAFIA

- 1) CHAMBERLAIN M. J., STIMMLER L.: The Renal Handling of Insulin - J. clin. Invest. 46, 911, 1967.
- 2) FAIMAN C., RYAN R. J.: Diurnal Cycle in Serum Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone in Men - Nature 215, 857, 1967.
- 3) GAGLIARDINO J. J.: Physiological Variations of Insulin Output in Urine - Metabolism 17, 139, 1968.
- 4) HUGGETT A. S. G., NIXON D. A.: Use of Glucose Oxidase, Proxidase, and O-Dianisidine in Determination of Blood and Urinary Glucose - Lancet 2, 368, 1957.
- 5) HUNTER W. M., RIGAL W. M.: The Diurnal Pattern of Plasma Growth Hormone Concentration in Children and Adolescents - J. Endocr. 34, 147, 1966.
- 6) JØRGENSEN K. R.: Immunoassay of Insulin in Human Urine - Acta Endocr. (Kbh.) 51, 1, 1966.
- 7) LAMBERT A. E., HOET J. J.: Diurnal Pattern of Plasma Insulin Concentration in the Human - Diabetologia 2, 69, 1965.
- 8) MAC ARTHUR R. G., STIMMLER L.: Urinary Insulin Excretion in Healthy Children and in Siblings of Childhood-Onset Diabetics - Lancet 1, 1236, 1966.
- 9) MIRSKY A., PODORE C. J., WACHMAN J., BROH-KAHN R. H.: The Urinary Excretion of Insulin by Normal and Diabetic Subjects - J. clin. Invest. 27, 515, 1948.
- 10) MORGAN C. R., LAZAROW A.: Immunoassay of Insulin: Two Antibody System. Plasma Insulin Levels of Normal, Sub-Diabetic and Diabetic Rats - Diabetes 12, 115, 1963.
- 11) NICHOLS C. T., TYLER F. H.: Diurnal Variation in Adrenal Cortical Function - Ann. Rev. Med. 18, 313, 1967.
- 12) RUBENSTEIN A. H., LOWY C., WELBORN T. A., RUSSELL FRASER T.: Urine Insulin in Normal Subjects - Metabolism 16, 234, 1967.
- 13) SORGE F., MENTSEL G., SCHUMAN G., BRENDL A., PFEIFFER E. F.: Sekretionsrhythmik von ACTH und Cortison im Blute von Stoffwechselgesunden, Paradiabetikern und Fettsüchtigen - Abstract no. 119 of the First Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Montecatini Terme, 1965.
- 14) YALOW R. S., BERSON S. A.: Immunoassay of Endogenous Plasma Insulin in Man - J. clin. Invest. 29, 1157, 1960.

JUAN J. GAGLIARDINO

*Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas
de la Universidad Nacional de La Plata y Comisión de
Investigación Científica de la Provincia de Buenos Aires
Calle 60 y 120, La Plata, Buenos Aires - Argentina*

Traduzione a cura dell'A.