

Pioglitazone riduce il contenuto epatico di grasso ed aumenta la captazione di glucosio a livello splancnico nei pazienti con diabete di tipo 2.

Mandeep Bajaj, Swangjit Suraamornkul, Thongchai Pratipanawatr,
Lou J. Hardies, Wilailak Pratipanawatr, Leonard Glass, Eugenio Cersosimo,
Yoshinori Miyazaki, and Ralph A. DeFronzo

Sommario

Sono stati studiati gli effetti del pioglitazone sulla captazione di glucosio a livello splancnico (CSG), sulla produzione endogena di glucosio (PEG) e sul contenuto epatico di grasso in 14 pazienti con diabete di tipo 2 (età 50 ± 2 anni; BMI $29,4 \pm 1,1$ Kg/m²; HbA1c $7,8 \pm 0,4\%$). Il contenuto epatico di grasso (risonanza magnetica spettroscopica) e la CSG (tecnica del clamp insulinico combinato con carico orale di glucosio) sono stati determinati prima e dopo terapia con pioglitazone 45 mg/die per 16 settimane.

I partecipanti allo studio sono stati sottoposti a clamp insulinico euglicemico della durata di 7 ore ($100 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) e, 3 ore dopo l'inizio del clamp insulinico, hanno assunto un carico orale di glucosio di 75 g.

Dopo l'ingestione di glucosio, nel corso del clamp insulinico, la velocità di infusione di glucosio allo steady-state, veniva adeguatamente diminuita in modo da mantenere l'euglicemia. La CSG è stata calcolata sottraendo, dal carico orale di glucosio, l'integrale della diminuzione della velocità di infusione durante le 4 ore successive all'assunzione orale di glucosio.

Il 3-[³H] glucosio è stato somministrato per infusione durante le prime 3 ore del clamp insulinico per determinare la velocità di PEG e di scomparsa del glucosio (R_d).

Il pioglitazone ha ridotto la glicemia a digiuno (da $10 \pm 0,7$ a $7,5 \pm 0,6$ mmol/l, $p < 0.001$) e l'HbA1c (da $7,8 \pm 0,4$ a $6,7 \pm 0,3\%$, $p < 0.001$) a dispetto dell'incremento di peso (da 83 ± 3 a 86 ± 3 Kg, $p < 0.001$).

Durante le 3 ore di clamp insulinico precedenti la assunzione di glucosio, il pioglitazone ha migliorato la R_d ($6,9 \pm 0,5$ rispetto a $5,2 \pm 0,5$ mg · kg⁻¹ · min⁻¹, $p < 0.001$) e la soppressione della PEG, mediata dall'insulina, (da $0,21 \pm 0,04$ a $0,06 \pm 0,02$ mg · kg⁻¹ · min⁻¹, $p < 0.01$).

Dopo il trattamento con pioglitazone, il contenuto epatico di grasso ha mostrato un decremento, passando da $19,6 \pm 3,6$ a $10,4 \pm 2,1\%$ ($p < 0.005$) e la CSG è aumentata da $33,0 \pm 2,8$ a $46,2 \pm 5,1\%$ ($p < 0.005$).

Il trattamento del diabete di tipo 2 con pioglitazone:

1. riduce il contenuto epatico di grasso e migliora la soppressione, insulino-mediata, della PEG;
2. aumenta la captazione splancnica e tissutale periferica del glucosio.

Il miglioramento della captazione splancnica e tissutale periferica del glucosio ed il potenziamento della PEG contribuiscono al miglioramento del controllo glicemico in pazienti con diabete di tipo 2.

Diabetes 52: 1364-1370, 2003

INTRODUZIONE

I tessuti splancnici giocano un ruolo cruciale nel mantenimento della normale omeostasi del glucosio (1). L'iperglicemia, la concentrazione plasmatica di acidi grassi liberi (FFA) e la via di somministrazione del glucosio, tutti esercitano effetti indipendenti sulla captazione di glucosio a livello splancnico (CSG). Quando il glucosio viene somministrato per via endovenosa, la conseguente iperglicemia accresce la CSG in maniera proporzionale all'incremento della concentrazione plasmatica di glucosio così che la clearance del glucosio splancnico rimane invariata (2, 3). Questo effetto di massa dell'iperglicemia sull'aumento della CSG è dipendente dal mantenimento dei livelli di insulina nella vena porta (2-5, 8). L'insulina, di per sé, non incrementa la CSG (2, 5). Studi di De Fronzo e colleghi (3, 5) negli esseri umani e di Cherrington e colleghi (6, 7) nei cani hanno dimostrato che la via di somministrazione gastrointestinale/portale determina lo specifico effetto di aumentare la CSG. Pertanto, dopo ingestione di glucosio, la velocità di captazione relativa di glucosio, così come quella assoluta, da parte dei tessuti splancnici è significativamente maggiore degli effetti combinati dell'iperinsulinemia e dell'iperglicemia determinate dalla somministrazione, per via endovenosa, di insulina e glucosio (5, 6). Nelle persone con diabete di tipo 2, è stata dimostrata una diminuzione della CSG dopo ingestione di un carico orale di glucosio (3, 9-11). Studi recenti hanno dimostrato che anche la concentrazione plasmatica degli FFA gioca un ruolo importante nella regolazione della CSG. In esseri umani non diabetici (12, 13) un rialzo acuto della concentrazione degli FFA determina insulino-resistenza periferica (nel muscolo) ed un concomitante aumento (12) o una tendenza all'aumento (13) della captazione splancnica (nel fegato) di glucosio dopo ingestione/infusione di un carico di glucosio. Al contrario, nei soggetti con diabete di tipo 2, gli aumentati livelli degli FFA inducono una insulino-resistenza periferica ma non determinano un aumento della CSG dopo carico orale di glucosio. Anzi, la CSG è ridotta in risposta ad una elevata concentrazione di FFA (14). Questo effetto inibitorio da parte degli aumentati livelli plasmatici di FFA sulla CSG potrebbe, in parte, rendere conto del peggioramento della captazione splancnica (nel fegato) di glucosio susseguente all'ingestione di glucosio. È ben documentato che i disturbi del metabolismo degli FFA sono caratteristici dei soggetti con diabete di tipo 2 (1, 15-17) i quali mostrano livelli plasmatici di FFA aumentati nel corso della giornata (17) e tassi di lipolisi incrementati (1, 15-17). Studi recenti hanno suggerito che l'aumento del contenuto epatico di grasso è un forte fattore predittivo di insulino-resistenza epatica in pazienti con diabete di tipo 2 (18-21). I meccanismi responsabili dell'incremento del contenuto epatico di grasso non sono chiari. E' stato suggerito che il fegato grasso sia il risultato di un'accelerata mobilizzazione degli acidi grassi dagli estesi depositi viscerali con un loro accumulo nel fegato (22).

Una diminuzione dell'ossidazione epatica degli acidi grassi è stata suggerita come causa dell'aumento del contenuto epatico di grasso (23). In alternativa, l'aumento del contenuto epatico di grasso potrebbe semplicemente riflettere una eccessiva introduzione di grassi con la dieta. Qualunque sia il meccanismo, le conseguenze a livello metabolico dell'incremento del contenuto epatico di grasso sulla CSG non sono state studiate nei pazienti con diabete di tipo 2.

I tiazolidinedioni sono largamente utilizzati per trattare pazienti con diabete di tipo 2. Questi farmaci agiscono legandosi ai recettori PPAR γ che sono principalmente localizzati negli adipociti (24). Nei pazienti con diabete di tipo 2, la terapia con tiazolidinedioni è associata ad una riduzione dei livelli plasmatici degli FFA circolanti e del loro turnover (25), ad uno spostamento della distribuzione del grasso dai depositi viscerali a quelli sottocutanei (26-28), ad una diminuzione del contenuto epatico di grasso (29) e ad un miglioramento dell'insulino-sensibilità periferica (29). In ogni caso, nessuno studio pregresso ha esaminato se la diminuzione del contenuto epatico di grasso e/o la concentrazione plasmatica degli FFA siano correlate al miglioramento della CSG conseguente al trattamento con tiazolidinedioni in pazienti con diabete di tipo 2.

Il presente studio è stato ideato per valutare l'effetto della terapia con pioglitazone sul contenuto epatico di grasso e sulla concentrazione plasmatica di FFA, sulla CSG dopo ingestione di glucosio e sulla sensibilità all'insulina nel tessuto epatico e periferico in pazienti con diabete di tipo 2. Il contenuto epatico di grasso è stato determinato utilizzando la spettroscopia a protoni. Per quantificare la CSG, abbiamo usato una tecnica combinata, sviluppata nel nostro laboratorio (3, 5) e successivamente modificata da Ludvik ed altri (30), di carico orale di glucosio associato al clamp insulinico.

DISEGNO DELLO STUDIO E METODI

Pazienti

14 pazienti con diabete di tipo 2 (9 uomini e 5 donne; età 50 ± 2 anni; 11 ispano-americani, 1 caucasico, 1 afro-americano ed 1 asio-americano; durata del diabete 4 ± 1 anno) hanno preso parte allo studio. 4 soggetti erano in trattamento con una dose stabile di sulfanilurea da almeno 3 mesi prima dello studio e 10 pazienti erano in trattamento soltanto con dieta. I pazienti che in precedenza avevano assunto insulina, metformina o un altro tiazolidinedione nei 3 mesi precedenti lo studio venivano esclusi. I criteri di inclusione comprendevano l'età tra i 30 ed i 70 anni, peso corporeo stabile da almeno 3 mesi prima dello studio e glicemia a digiuno (FPG) tra 7,0 e 14,5 mmol/l. Tutti i pazienti erano in buone condizioni di salute, senza evidenze di malattia cardiaca, epatica, renale o altra qualsivoglia patologia, sulla base dell'anamnesi, esame clinico esami ematochimici ed urinari di screening. Nessuno dei soggetti praticava esercizio fisico pesante e nessuno stava assumendo farmaci noti per modificare il metabolismo glucidico. Tutti i soggetti hanno dato il loro consenso informato scritto prima della partecipazione allo studio. Il Board Istituzionale di Revisione dell'Health Science Center dell'Università del Texas sito a San Antonio aveva approvato il protocollo.

Disegno dello studio

3 settimane prima dello studio, tutti i soggetti si sono incontrati con un dietista e sono stati istruiti a seguire una dieta di mantenimento del peso, composta per il 50% da carboidrati, 30% di grassi e 20% di proteine. Durante la settimana precedente l'inizio del trattamento con pioglitazone, tutti i soggetti hanno effettuato la misurazione della FPG, dei FFA e dell'insulina (media di 3 valori prelevati con intervalli di 15 minuti). Nello stesso momento, venivano prelevati campioni di sangue per i test di funzionalità epatica, i lipidi plasmatici a digiuno e l'HbA_{1c}; il contenuto in grassi del fegato veniva determinato mediante spettroscopia protonica e veniva effettuato un clamp insulinico euglicemico combinato con carico orale di 75 g di glucosio per quantificare la CSG. Tutte le determinazioni sono state effettuate alle 8.00 del mattino dopo 10-12 ore di digiuno notturno. I soggetti trattati con sulfanilurea interrompevano il loro trattamento 48 ore prima dell'inizio dello studio. Dopo il completamento di questi esami i pazienti iniziavano la terapia con 45 mg/die di pioglitazone per 16 settimane. Durante il trattamento con pioglitazone, i soggetti tornavano ogni 2 settimane al Clinical Research Center alle 8.00 del mattino, dopo digiuno notturno, per misurare la concentrazione di FPG, il peso corporeo e la pressione arteriosa. I lipidi plasmatici a digiuno (colesterolo totale, trigliceridi, colesterolo HDL e colesterolo LDL) venivano misurati mensilmente.

L'HbA1c è stata determinata 2 volte nel corso dell'ultima settimana di trattamento con il pioglitazone. In ciascuna visita veniva rinforzata l'aderenza alla dieta. Dopo 16 settimane di trattamento con pioglitazone, tutti i soggetti si sono sottoposti ad una ripetizione del carico di glucosio combinato al clamp insulinico per quantificare la CSG e dell'esame spettroscopico per la determinazione del contenuto di grasso epatico.

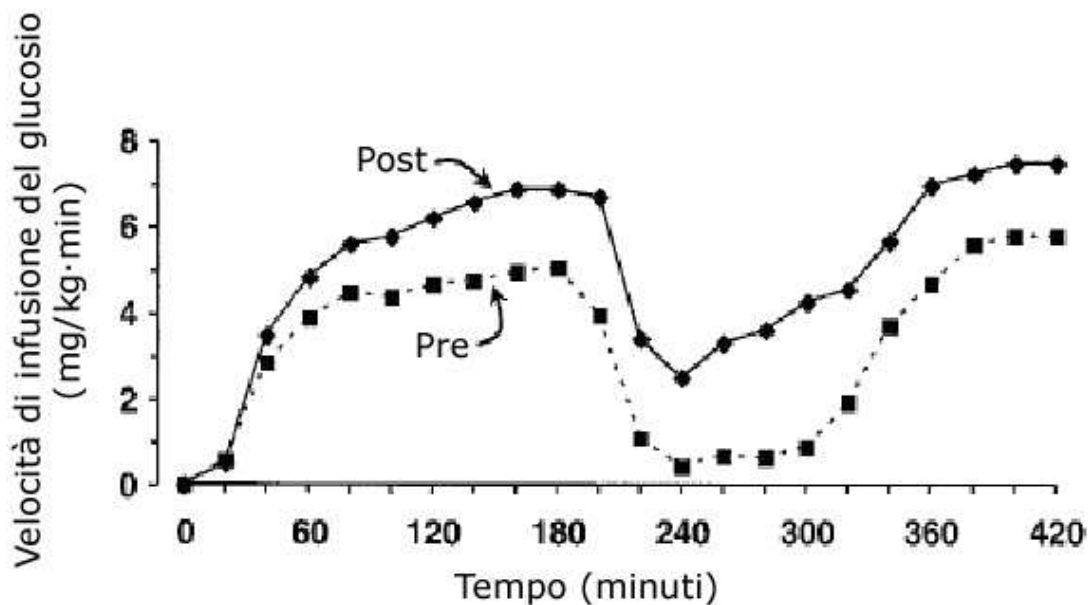
Carico orale di glucosio-clamp insulinico

I soggetti venivano accolti al General Clinical research Center alle 18.00 la sera prima dell'inizio dello studio e consumavano un pasto standard di mantenimento del peso (55% di carboidrati, 30% di grassi e 15% di proteine) tra le 18.30 e le 19.00. Dopo le 20.00 i soggetti evitavano di assumere cibi o bevande (tranne acqua). Alle 22.00 un catetere veniva inserito nella vena antecubitale e veniva iniziata un'infusione lenta e variabile di insulina ($8-12 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) in modo da ridurre e poi mantenere la concentrazione di glucosio a $\sim 5,6 \text{ mmol/l}$.

Alle 8.00 del giorno successivo, un secondo catetere veniva inserito in maniera retrograda in una vena del dorso della mano per i prelievi di sangue e la mano veniva fatta mettere in una scatola riscaldata (60° C) per tutta la durata dell'esame. Si iniziava ad effettuare un clamp insulinico euglicemico ($100 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) che proseguiva per 7 ore. Venivano prelevati campioni di sangue arterioso ogni 5 minuti per la determinazione del glucosio plasmatico e veniva somministrata una infusione di glucosio al 20% in modo da mantenere la concentrazione plasmatica di glucosio a $\sim 5,6 \text{ mmol/l}$ (31). Durante i primi 180 minuti del clamp insulinico euglicemico veniva somministrata anche una infusione marcata ($25 \mu\text{Ci}$) continua ($0,25 \mu\text{Ci}/\text{min}$) di $3\text{-}[^3\text{H}]\text{glucosio}$ per determinare la produzione endogena di glucosio (PEG). L'infusione di glucosio triziato veniva interrotta dopo 180 minuti, al momento della ingestione del carico orale di glucosio. L'insulina, il glucosio ed il $3\text{-}[^3\text{H}]\text{glucosio}$ venivano infusi attraverso la vena antecubitale. Venivano prelevati campioni di sangue per la determinazione dell'insulina plasmatici ogni 15-30 minuti nel corso del test.

Figura 1

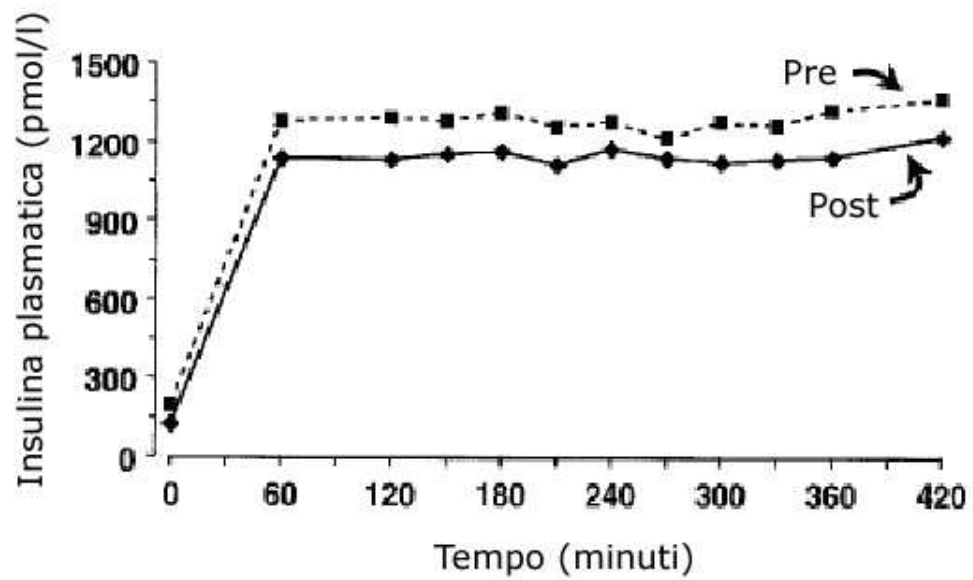
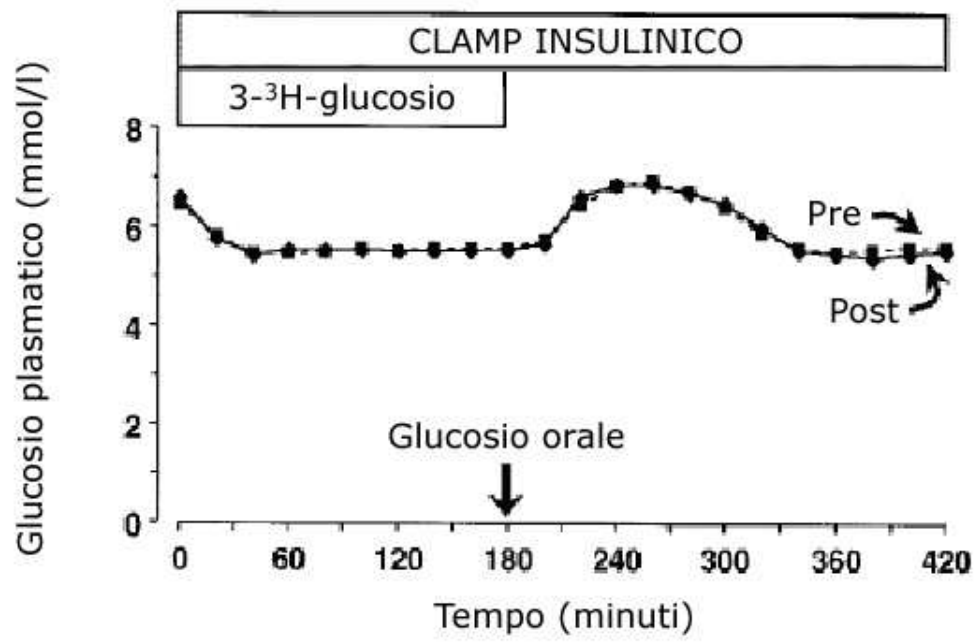
Velocità di infusione del glucosio durante il test combinato di carico orale di glucosio e clamp insulinico ($100 \text{ mU m}^{-2} \text{ min}^{-1}$) prima (pre) e dopo (post) trattamento con pioglitazone



I campioni di sangue per la determinazione del 3- ^3H glucosio venivano prelevati ogni 5-10 minuti durante il clamp insulinico euglicemico nell'intervallo di tempo compreso tra 150 e 180 minuti. Durante l'intervallo del clamp insulinico compreso tra 150 e 180 minuti, la velocità di infusione del glucosio esogeno richiesto per mantenere l'euglicemia si manteneva costante (Fig. 1). Dopo 3 ore dall'inizio del clamp insulinico (alle 11.00) i pazienti ingerivano 75 g di glucosio in 5 minuti di tempo. Non appena il glucosio orale veniva assorbito la velocità di infusione esogena (endovena) di glucosio veniva adeguatamente ridotta in modo da mantenere l'euglicemia (Fig. 1). Dopo l'ingestione di glucosio, la concentrazione plasmatica di glucosio si alzava lievemente ($\sim 1 \text{ mmol/l}$) durante il periodo di tempo compreso tra 180 e 300 minuti nei test effettuati prima del trattamento con pioglitazone (Fig. 2), anche quando la velocità di infusione del glucosio esogeno era ridotta a zero. Dopo il trattamento con il pioglitazone, le concentrazioni plasmatiche di glucosio sono state confrontate proprio focalizzandosi su questo incremento in ciascun paziente. Entro 3 - 3,5 ore dall'ingestione di glucosio, la velocità di infusione del glucosio esogeno ritornava quella o eccedeva quella rilevata a 180 minuti, indicando il completo assorbimento del carico orale di glucosio (Fig. 1).

Figura 2

Concentrazioni plasmatiche di glucosio ed insulina durante il test combinato di carico orale di glucosio e clamp insulinico prima (pre) e dopo (post) trattamento con pioglitazone



Contenuto epatico di grasso

(risonanza magnetica protonica spettroscopica)

Una spettroscopia localizzata del fegato con risonanza magnetica nucleare ^1H (MRS) è stata acquisita con scanner 1.9 T MRI (Prestige Elscint, Elscint, Haifa, Israel) utilizzando una bobina per il corpo sia in trasmissione che in ricezione. Per la localizzazione MRS del fegato è stato effettuato una scansione iniziale T1-pesata con risonanza magnetica anatomica ad eco rotazionale secondo i seguenti parametri: tempo di ripetizione (TR)/tempo di eco (TE)/ θ = 130 ms/15 ms/160°; spessore della sezione = 7 mm; campo visivo = 44 x 45 cm; numero delle eccitazioni = 1 e matrice di immagine = 100 x 256. E' stata scelta la sezione con le dimensioni più ampie del fegato per lo studio della MRS. Le MRS per la quantificazione dell'acqua e del grasso sono state realizzate mediante sequenza spettroscopica con risoluzione a punti (PRESS) (32). I parametri di imaging della PRESS erano i seguenti: TR/TE/ θ = 1500 ms/54ms/90°; numero di medie = 2 e punti data = 512. Per la scansione è stato selezionato un volume di 3 x 3 x 3 cm (voxel) nei lobi sinistro, destro anteriore e destro posteriore del fegato in modo da fornire una distribuzione più generalizzata del grasso nell'ambito del fegato. Durante la misurazione il soggetto giaceva supino all'interno del foro del magnete. Il tempo totale di scansione era di \sim 60 minuti. Durante le MRS venivano scansionate, nello stesso soggetto, aree identiche del fegato sia negli esami pre che post-trattamento utilizzando immagini con punti anatomici di repere.

Dopo l'allargamento di linea e l'aggiustamento della fase e del basale, sono state misurate l'area di picco dell'acqua (S_w) a 4.47 ppm e la risonanza del grasso (S_f) a 1.4 ppm. La quantificazione del contenuto di grasso è stata effettuata mettendo a confronto l'area di risonanza del grasso con quella dell'acqua non soppressa. I dati spettroscopici sono stati analizzati utilizzando il software del sistema operativo Elscint. La percentuale del grasso epatico è stata calcolata dividendo per 100 il rapporto tra S_f e la somma di $S_w + S_f$. Questa tecnica è altamente riproducibile, con un CV di $< 2\%$ quando gli stessi soggetti vengono studiati a distanza di 8 giorni. Il contenuto di grasso epatico è strettamente correlato ($r = 0.89$) con il contenuto di grasso determinato mediante tecniche istologiche in esseri umani che si sottopongono a biopsie epatiche, sebbene i valori assoluti delle 2 metodologie non siano identici (33).

Determinazioni analitiche

La concentrazione plasmatica di glucosio è stata determinata con il metodo della glucosio-ossidasi (Beckam Instruments; Fullerton, CA). La concentrazione plasmatica di insulina è stata misurata con metodo radioimmunologico (Diagnostic Product Corporation, Los Angeles, CA). L'attività specifica del glucosio triziato è

stata determinata su campioni di plasma deproteinizzati con bario/zinco, come descritto in precedenza (15). La concentrazione plasmatica di FFA è stata determinata con metodo di quantificazione enzimatico colorimetrico (Wako Chemicals, Nuess, Germany).

Calcoli

Durante il clamp insulinico euglicemico e prima dell'ingestione di glucosio (0 – 180 min) la velocità di comparsa del glucosio nell'intero organismo (R_a) è stata calcolata utilizzando l'equazione di Steele ed un volume di distribuzione di 250 ml/kg.

La PEG è stata calcolata sottraendo alla misura (derivata dal tracciante triziato) del R_a la velocità di infusione del glucosio esogeno. La velocità di scomparsa insulinomediata di glucosio (R_d) dell'intero organismo è stata calcolata aggiungendo la velocità di PEG residua alla velocità di infusione del glucosio esogeno. L'infusione di glucosio triziato è stata interrotta a 180 minuti e la PEG, in questo studio, non è stata determinata durante il periodo di tempo compreso tra 180 e 420 minuti (dopo l'assunzione del carico orale di glucosio).

La captazione splancnica di glucosio è stata calcolata nel modo seguente: la velocità di infusione del glucosio esogeno dopo ingestione del carico orale di glucosio è stata sottratta alla velocità di riferimento dell'infusione del glucosio esogeno per ottenere il decremento della velocità di infusione di glucosio esogeno. La velocità di riferimento per l'infusione di glucosio, a sua volta, è stata calcolata facendo la media della velocità di infusione durante il periodo di tempo compreso tra 150 e 180 minuti (prima, quindi, della ingestione orale di glucosio) e tra 380 e 420 minuti. Il decremento integrato della velocità di infusione dopo l'ingestione di glucosio è stato moltiplicato per il peso del paziente e per l'intervallo di tempo in modo da calcolare la quota di glucosio che esce dal letto splancnico. Quest'ultima, a sua volta, è stata sottratta al carico orale di glucosio assunto (75 g) in modo da ottenere la CSG. Precedenti studi (9, 30, 35) hanno dimostrato che l'assorbimento di glucosio dal tratto gastrointestinale, dopo la sua ingestione, si completa entro 3 – 3,5 ore e questo dato è confermato, nel presente studio, dal rapido incremento della velocità di infusione del glucosio esogeno che si osserva a 380 minuti in tutti i soggetti e che è uguale o superiore alla velocità di infusione preesistente al carico orale di glucosio (cioè a 150 – 180 minuti). Questa procedura di calcolo ipotizza che la PEG al momento della combinazione del carico orale di glucosio con il clamp insulinico ($100 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) sia trascurabile, il che è documentato dal glucosio triziato durante il clamp insulinico prima della ingestione di glucosio. La combinazione della iperinsulinemia farmacologica e dell'iperglicemia nella vena porta, che segue l'ingestione orale di glucosio, assicura la completa soppressione della produzione epatica di glucosio. In queste condizioni, il bilancio netto di glucosio splancnico e la CSG sono sinonimi.

Analisi statistica

I calcoli statistici sono stati effettuati con StatView per Windows, versione 5.0 (SAS Institute, Cary, NC). I valori prima e dopo il trattamento sono stati confrontati utilizzando il t test appaiato. E' stata utilizzata l'analisi di regressione lineare o logaritmica (per i dati distribuiti in maniera non lineare) per esaminare le relazioni tra l'insulino-sensibilità epatica e la CSG rispetto al contenuto di grasso nel fegato. E' stata utilizzata l'analisi multivariata dove appropriata per esaminare l'impatto dei cambiamenti simultanei dei parametri sperimentali sulla CSG. I dati sono presentati come media \pm ES. E' stato considerato statisticamente significativo un valore di $p < 0.05$.

RISULTATI

Parametri metabolici

I parametri metabolici sono riportati nella Tabella 1. Dopo 16 settimane di trattamento con il pioglitazone, la concentrazione di FPG diminuisce significativamente da 10,0 a 7,5 mmol/l e l'HbA1c si abbassa da 7,8 a 6,7% ($p < 0.001$), a dispetto di una diminuzione del 45% della concentrazione di insulina a digiuno. Le concentrazioni di trigliceridi plasmatici a digiuno ($p < 0.02$) e di FFA plasmatici a digiuno ($p < 0.01$) diminuiscono in maniera significativa dopo il trattamento con pioglitazone. Il colesterolo totale, il colesterolo HDL ed il colesterolo LDL non si modificano in maniera significativa. Si osservano diminuzioni significative delle aspartico ed alanino-transaminasi sieriche dopo il trattamento con pioglitazone.

Tabella 1

Dati antropometrici e di laboratorio al basale e dopo trattamento di 16 settimane con pioglitazone

	Basale	Finale	Valore di p
Peso corporeo (kg)	83.0 ± 3.0	86.0 ± 3.0	< 0.001
BMI (kg/m ²)	29.4 ± 1.1	30.4 ± 1.1	< 0.001
HbA1c (%)	7.8 ± 0.4	6.7 ± 0.3	< 0.001
Glicemia a digiuno (mmol/l)	10.0 ± 0.7	7.5 ± 0.6	< 0.001
Insulinemia a digiuno (pmol/l)	66 ± 12	36 ± 6	< 0.01
FFA a digiuno (μmol/l)	699 ± 57	571 ± 55	< 0.01
Colesterolo totale (mg/dl)	203 ± 9	195 ± 8	
Colesterolo LDL (mg/dl)	125 ± 8	123 ± 7	
Colesterolo HDL (mg/dl)	45 ± 3	47 ± 4	
Trigliceridi (mg/dl)	163 ± 23	124 ± 17	0.02
AST (UI/I)	27 ± 2	22 ± 1	0.01
ALT (UI/I)	28 ± 3	22 ± 2	0.02

I dati sono espressi come media ± ES

AST = Aspartico-transaminasi (valori normali: 13-47 UI/I)

ALT = Alanino-transaminasi (valori normali: 5-40 UI/I)

Carico orale di glucosio abbinato al clamp insulinico: concentrazioni di glucosio plasmatico, insulina e FFA.

Le concentrazioni plasmatiche di glucosio successive alla infusione notturna di insulina sono simili, nel corso del test del carico orale di glucosio abbinato al clamp insulinico, prima e dopo trattamento con pioglitazone ($6,4 \pm 0,2$ vs. $6,5 \pm 0,1$ mmol/l). Durante le 3 ore iniziali del clamp insulinico, le concentrazioni di glucosio plasmatico allo steady state sono simili prima e dopo trattamento con pioglitazone ($5,6 \pm 0,1$ vs. $5,6 \pm 0,1$ mmol/l). Dopo l'ingestione di glucosio, le concentrazioni di glucosio plasmatico sono simili prima e dopo il trattamento con pioglitazone (Fig. 2). Da 180 a 300 minuti c'è un piccolo incremento nella concentrazione di glucosio plasmatico che è simile nei test sia prima che dopo trattamento con pioglitazone ($\Delta = 0,9 \pm 0,2$ vs. $\Delta = 0,9 \pm 0,2$ mmol/l). La concentrazione plasmatica di glucosio ritorna a $\sim 5,6$ mmol/l e rimane costante a questo livello tra 300 e 420 min ($5,6 \pm 0,1$ vs. $5,6 \pm 0,1$ mmol/l) prima e dopo terapia con il pioglitazone (Fig. 2).

Le concentrazioni plasmatiche di insulina (Fig. 2) non differiscono significativamente durante i 180 minuti di clamp insulinico euglicemico ($1,294 \pm 104$ vs. $1,154 \pm 98$ pmol/l) o durante il carico orale di glucosio abbinato al clamp insulinico (180 – 420 minuti) (Fig. 2) prima e dopo trattamento con pioglitazone. Nel periodo di tempo tra 180 e 420 minuti, quando la concentrazione di glucosio plasmatici si alza leggermente, non c'è alcun incremento nella concentrazione di insulina plasmatica. Durante il periodo compreso tra 150 e 180 minuti del clamp insulinico, la soppressione della concentrazione degli FFA plasmatici è significativamente aumentata dopo trattamento con pioglitazone (121 ± 17 vs. 169 ± 20 $\mu\text{mol/l}$, $p < 0.05$).

Metabolismo glucidico durante il carico orale di glucosio-clamp insulinico

L'andamento nel tempo della velocità di infusione endovenosa del glucosio esogeno è mostrato in Figura 1. Durante i test effettuati nel corso del clamp insulinico prima e dopo il trattamento con pioglitazone, la velocità di infusione del glucosio aumenta continuamente durante i 150 minuti iniziali e raggiunge un plateau tra 150 e 180 minuti. La velocità di infusione del glucosio è significativamente più elevata durante il periodo di tempo compreso tra 150 e 180 minuti del clamp insulinico euglicemico dopo trattamento con pioglitazone ($6,9 \pm 0,5$ vs. $5,0 \pm 0,5$ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.001$).

Dopo l'ingestione di glucosio, c'è una repentina diminuzione della velocità di infusione di glucosio che è richiesta per mantenere lo stato di euglicemia (Fig. 1). A 380 minuti, la velocità di infusione ritorna quella precedente il carico orale di glucosio in tutti i soggetti, indicando un completo assorbimento di quest'ultimo. Durante l'intervallo tra 180 e 420 minuti del carico orale di glucosio abbinato al clamp insulinico euglicemico, la velocità di infusione del glucosio è

significativamente aumentata in seguito al trattamento con pioglitazone ($5,3 \pm 0,5$ vs. $2,9 \pm 0,5$ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.001$).

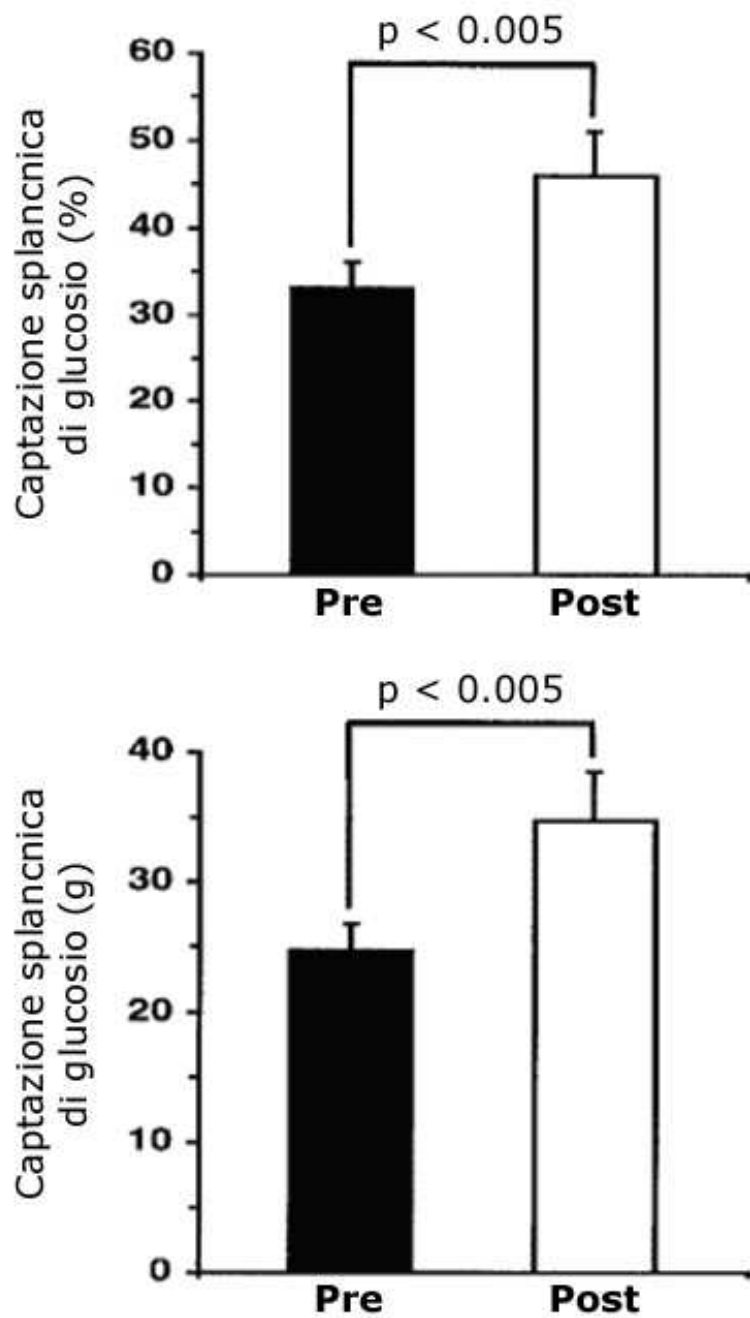
La soppressione della PEG mediata dall'insulina, che si determina durante il periodo tra 150 e 180 minuti del clamp insulinico euglicemico, è significativamente aumentata dopo trattamento con pioglitazone ($0,06 \pm 0,02$ vs. $0,21 \pm 0,04$ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, rispettivamente, $p < 0.001$). Dopo trattamento con pioglitazone la velocità di eliminazione del glucosio da parte dell'intero organismo (R_d) è significativamente aumentata tra 150 e 180 minuti ($6,9 \pm 0,5$ rispetto a $5,2 \pm 0,5$ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, $p < 0.001$).

CSG

La CSG durante il carico orale di glucosio abbinato al clamp insulinico è significativamente aumentata dopo trattamento con pioglitazone ($34,7 \pm 3,8$ vs. $24,7 \pm 2,1$ g, $p < 0.005$). La quota percentuale di glucosio trattenuta dai tessuti splancnici è anch'essa significativamente più elevata dopo terapia con pioglitazone ($46,2 \pm 5,1$ vs. $33,0 \pm 2,8\%$, $p < 0.005$) (Fig. 3). L'incremento della CSG è correlato con la diminuzione dell'HbA1c ($r = 0,57$, $p < 0.05$). Non c'è alcuna correlazione significativa, invece, tra l'aumentata CSG e sia la diminuzione della concentrazione plasmatica degli FFA ($r = 0,32$, $p > 0.05$) che la diminuzione del contenuto epatico di grasso ($r = 0,02$, $p > 0.05$).

Figura 3

CSG (quantità assoluta e percentuale del carico di glucosio ingerito) durante il test combinato di carico orale di glucosio e clamp insulinico prima (pre) e dopo (post) trattamento con pioglitazone

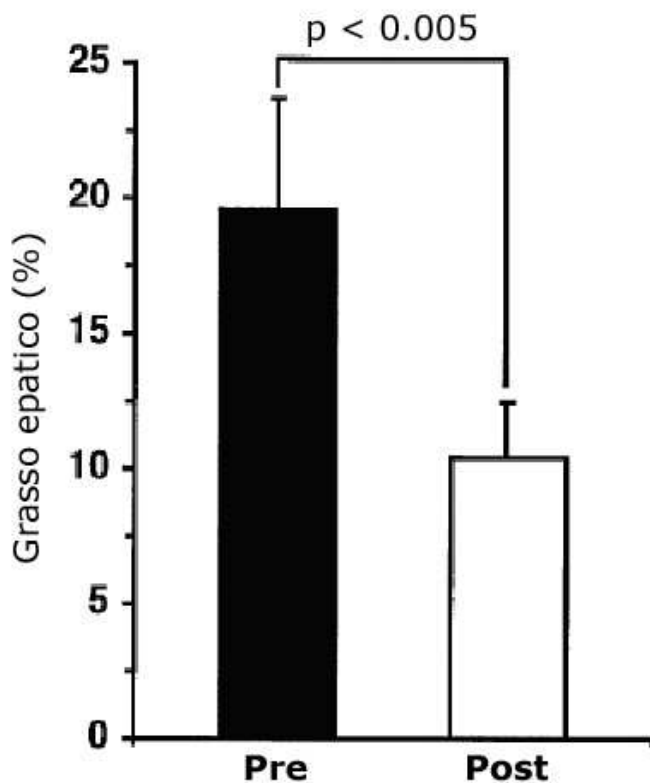


Contenuto epatico di grasso

La terapia con pioglitazone ha comportato una diminuzione del 47% (Fig. 4) del contenuto epatico di grasso (da $19,6 \pm 3,6$ a $10,4 \pm 2,1\%$, $p < 0.005$), a dispetto di un incremento del peso corporeo ($\Delta = 3.0$ Kg). La diminuzione del contenuto epatico di grasso è associata ad un significativo miglioramento dei parametri di funzionalità epatica, comprese entrambe le transaminasi (Tabella 1). Prima del trattamento con pioglitazone, il contenuto epatico di grasso è correlato positivamente con la PEG nel periodo compreso tra 150 e 180 minuti del clamp insulinico euglicemico ($r = 0,65$, $p < 0.01$). La PEG è completamente soppressa dopo terapia con pioglitazone. Preso nel complesso, il contenuto epatico di grasso prima e dopo trattamento con pioglitazone si correla ancora positivamente con la PEG durante il clamp insulinico ($r = 0,63$, $p < 0.001$).

Figura 4

Contenuto epatico di grasso prima (pre) e dopo (post) trattamento con pioglitazone



DISCUSSIONE

Nel presente studio abbiamo utilizzato la tecnica del carico orale di glucosio accoppiato al clamp insulinico (3, 30) e la spettroscopia protonica per valutare gli effetti del pioglitazone sulla CSG e sul contenuto epatico di grasso in pazienti con diabete di tipo 2. La maggior parte dei nostri pazienti erano di ceppo Ispano-Americano. Sebbene i difetti metabolici degli Ispano-Americani con diabete di tipo 2 siano considerati simili a quelli dei Caucasici (36), bisognerebbe essere cauti nell'extrapolare le conclusioni del presente studio ad altri gruppi etnici, dal momento che 11 su 14 partecipanti erano, appunto, di etnia Ispano-Americana. I risultati dimostrano che la CSG, successiva all'ingestione di glucosio, è significativamente aumentata dopo 16 settimane di terapia con pioglitazone in pazienti con diabete di tipo 2, mentre il contenuto epatico di grasso decresce del 47%. La diminuzione del contenuto epatico di grasso è associata ad un miglioramento della funzionalità epatica, come evidenziato dalla diminuzione delle transaminasi (aspartico-transaminasi e alanino-transaminasi). Il trattamento con pioglitazone è, inoltre, associato ad una diminuzione della FPG e della concentrazione degli FFA, con un miglioramento della insulino-sensibilità periferica ed epatica e con una soppressione insulino-mediata della lipolisi.

I meccanismi mediante i quali il pioglitazone diminuisce il contenuto epatico di grasso non sono chiari. La riduzione del contenuto epatico di grasso osservata nel presente studio avviene a dispetto di un significativo incremento del peso corporeo (3.0 Kg). I tiazolinedioni esercitano i loro effetti metabolici legandosi ed attivando i PPAR γ (24, 37). L'attivazione dei PPAR γ determina una differenziazione dei preadipociti in cellule adipose mature e determina l'induzione di enzimi chiave coinvolte nella lipogenesi (26, 38, 39). Questo ha come risultato la formazione di adipociti periferici più piccoli e più insulino-sensibili (38, 39) ed uno spostamento dei depositi di grasso dal compartimento viscerale a quello sottocutaneo (26,28). Precedenti studi del nostro laboratorio (40) hanno dimostrato che l'aumento di peso conseguente al trattamento con pioglitazone è associato a significativi incrementi dei depositi adiposi sottocutanei sia superficiali che profondi dell'addome. Sia il grasso viscerale che quello epatico diminuiscono in maniera significativa durante il trattamento con pioglitazone, sebbene la diminuzione del grasso viscerale non si correla con quella del grasso epatico. Coerentemente agli effetti in vitro ed in vivo sugli animali (24, 38, 39), la terapia con pioglitazone è associata, nel presente studio, ad una diminuzione della concentrazione plasmatica a digiuno degli FFA e migliora la soppressione insulino-mediata delle concentrazioni plasmatiche degli FFA durante il clamp insulinico, suggerendo una aumentata sensibilità degli adipociti all'insulina. Si potrebbe ipotizzare che la diminuzione della concentrazione plasmatica degli FFA circolanti (e del glucosio) siano il risultato di una

ridistribuzione dei trigliceridi dal fegato agli adipociti periferici. I livelli di substrato circolante (FFA e glucosio) giocano un ruolo importante nella sintesi epatica di trigliceridi (41). Il pioglitazone provoca una marcata riduzione delle concentrazioni plasmatiche a digiuno sia degli FFA che del glucosio e ci si aspetterebbe che ciò provochi una diminuzione della sintesi epatica di trigliceridi. Coerentemente con questo dato, i pazienti diabetici trattati con pioglitazone presentano una diminuzione significativa della concentrazione a digiuno dei trigliceridi (Tabella 1). I tiazolidinedioni sono anche agenti proliferativi dei perossisomi e, pertanto, essi incrementano l'ossidazione dei grassi (42, 43) Se fosse il pioglitazone a stimolare l'ossidazione dei grassi nel fegato, ciò potrebbe contribuire alla diminuzione del contenuto epatico di grasso. Si dovrebbe evidenziare, però, che precedenti studi del nostro laboratorio non hanno dimostrato un significativo incremento dell'ossidazione dei lipidi dopo terapia con pioglitazone in pazienti con diabete di tipo 2 (26). D'altro canto, la calorimetria indiretta misura l'ossidazione lipidica dell'intero organismo e non può esaminare l'ossidazione lipidica di specifici tessuti, come ad esempio il fegato. La diminuzione del contenuto epatico di grasso potrebbe essere responsabile del miglioramento della funzionalità epatica, come evidenziato dalla diminuzione significativa dei livelli di aspartico-transaminasi ed alanino-transaminasi (Tab. 1). Si dovrebbe mettere in evidenza che il troglitazone, un altro tiazolidinedione, ha mostrato di migliorare la funzionalità epatica in pazienti affetti da steatoepatite non alcolica (44). L'infiltrazione di grasso e la steatonecrosi sono ben documentate in individui insulino-resistenti (45) ed in pazienti con diabete di tipo 2 (46, 47). Nel presente studio solo 2 soggetti avevano valori elevati di alanino-transaminasi (48 e 47 UI/l, rispettivamente). In entrambi questi soggetti la alanino-transaminasi è diminuita fino a valori normali dopo il trattamento con pioglitazone. Questi risultati sollevano la possibilità che il pioglitazone, così come altri tiazolidinedioni, possa essere utile nel trattamento della steatonecrosi epatica non alcolica.

Coerentemente con precedenti studi, il trattamento con pioglitazone migliora la sensibilità periferica all'insulina del 33% nei pazienti con diabete di tipo 2. Si dovrebbe notare, comunque, che nel presente studio la sensibilità all'insulina è stata misurata a livelli farmacologici di iperinsulinemia. Precedenti studi del nostro laboratorio hanno dimostrato che il miglioramento della sensibilità all'insulina, quando misurata a livelli fisiologici di iperinsulinemia è molto esiguo e non può spiegare l'importante miglioramento del test orale di tolleranza al glucosio (26, 27). Una potenziale spiegazione di questi risultati apparentemente contraddittori è che i tiazolidinedioni aumentano la CSG, che pesa per circa 1/3 nell'eliminazione del carico di glucosio ingerito (4, 5). Al contrario, in condizioni fisiologiche di iperinsulinemia ed euglicemia, i tessuti splancnici non aumentano la loro captazione di glucosio al di sopra di quella presente in condizioni basali post assorbimento (2,

4, 5). I risultati del presente studio supportano questa ipotesi. Infatti, dopo 16 settimane di trattamento con pioglitazone, la captazione splancnica (principalmente epatica) di un carico orale di glucosio da 75 g viene incrementata di 10 g (passando da 24,7 a 34,7 g).

Non abbiamo osservato una correlazione significativa tra l'incremento nella CSG e la diminuzione del contenuto epatico di grasso. Comunque, l'incremento della CSG si correla positivamente con la diminuzione della HbA1c susseguente al trattamento con il pioglitazone ($r = 0,57$, $p < 0.05$). Nel fegato, il trasporto di glucosio e la sua fosforilazione sono mediate dai GLUT2 e dalla glucochinasi, rispettivamente. In studi su animali, è stato dimostrato che l'iperglicemia cronica fa diminuire l'attività della glucochinasi e che il ripristino dello stato euglicemico si traduce in una normalizzazione della sua attività (48). I risultati del presente studio suggeriscono che il miglioramento dell'iperglicemia cronica ottenuto mediante il trattamento con pioglitazone in pazienti con diabete di tipo 2 determina un miglioramento della CSG. La tecnica del carico orale di glucosio abbinato al clamp iperglicemico era stata sviluppata originariamente dai nostri laboratori per quantificare la CSG (3, 5). Più recentemente, Ludvik ed al. (30) hanno modificato questa tecnica, somministrando il carico orale di glucosio durante un clamp insulinico euglicemico. Questa modifica ha il vantaggio di fornire concentrazioni insuliniche plasmatiche più riproducibili (Fig. 2), dal momento che la concentrazione plasmatica arteriosa di glucosio è mantenuta a livelli di euglicemia. Tuttavia, anche se noi riduciamo la velocità di infusione del glucosio fin quasi a zero dopo la somministrazione del glucosio per bocca, osserviamo un aumento molto piccolo della concentrazione plasmatica di glucosio nel periodo compreso tra 180 e 300 minuti (periodo che segue l'ingestione del glucosio) prima del trattamento con il pioglitazone. Dopo la terapia con pioglitazone, le concentrazioni plasmatiche di glucosio nel periodo di tempo compreso tra 180 e 300 minuti del test sono state confrontate individualmente con questa iperglicemia in ciascun paziente diabetico. È da rilevare che le concentrazioni plasmatiche di insulina, in risposta a questo piccolo incremento delle concentrazioni di glucosio, non sono aumentate rispetto ai valori antecedenti al carico orale di glucosio sia prima che dopo la terapia con pioglitazone. La tecnica del carico orale di glucosio accoppiato al clamp insulinico ha i vantaggi aggiuntivi di non essere invasiva, di poter essere ripetuta nel tempo per poter seguire le variazioni della CSG e di aggirare i problemi di introduzione in circolo del tracciante e di assenza di steady state che ci sono con la tecnica del doppio tracciante. Entrambe le tecniche (carico orale di glucosio accoppiato al clamp iperglicemico e carico orale di glucosio accoppiato al clamp insulinico) sono state validate mediante un confronto diretto con la tecnica del catetere venoso epatico (3, 5, 30)

La tecnica del carico orale di glucosio accoppiato con il clamp insulinico presuppone che l'assorbimento del carico orale (75 g) sia completo entro 4 ore e che la PEG sia

completamente o quasi completamente soppressa. Rispetto al primo presupposto, diversi studi hanno dimostrato che un carico orale di glucosio, comparabile con quello impiegato nel nostro studio, è completamente assorbito entro 3 – 3,5 ore (9, 30, 35). Ciò è stato confermato nel nostro studio dal ritorno della velocità di infusione di glucosio esogeno, durante il periodo compreso tra 380 e 420 minuti, a valori che sono uguali o superiori a quelli riscontrati a 180 minuti, cioè immediatamente prima dell'ingestione del carico orale di glucosio. Un importante presupposto della tecnica del carico orale di glucosio accoppiato al clamp insulinico per misurare la CSG è che la PEG sia completamente soppressa. Perciò, noi abbiamo scelto una velocità di infusione dell'insulina elevata ($100 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$) che determina concentrazioni farmacologiche di insulina plasmatica, con il risultato di avere la quasi completa soppressione della PEG. Dal momento che la PEG è stata per lo più completamente soppressa negli ultimi 30 minuti del clamp insulinico euglicemico, dal momento che la concentrazione plasmatica di insulina è rimasta costante dopo l'ingestione di glucosio e dal momento che l'iperglicemia a livello portale (che segue l'ingestione del carico orale di glucosio) avrebbe dovuto determinare l'ulteriore inibizione della produzione epatica di glucosio (2, 4, 8), si può ragionevolmente ritenere che essa sia rimasta soppressa durante le 4 ore seguenti l'ingestione di glucosio. Un secondo vantaggio della alta velocità di infusione dell'insulina è che essa aumenta l'eliminazione periferica del glucosio a livelli sufficientemente alti da permettere la riduzione della velocità di infusione del glucosio esogeno, prevenendo così l'iperglicemia che segue l'ingestione di glucosio. Dovrebbe essere enfatizzato che né gli aumenti fisiologici né quelli farmacologici delle concentrazioni plasmatiche di insulina hanno alcun effetto stimolatorio sulla CSG negli esseri umani (2, 4, 5). L'effetto di massa dell'iperglicemia nell'aumento della CSG è, comunque, dipendente dai livelli di insulina mantenuti a livello portale (2).

Dal momento che noi abbiamo effettuato un clamp insulinico euglicemico ad alte dosi ($100 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$), la PEG è soppressa per almeno il 90% durante il clamp insulinico prima del trattamento con pioglitazone. Tuttavia abbiamo osservato una correlazione significativa ($r = 0,65$, $p < 0,01$) tra il contenuto epatico di grasso e la PEG. La terapia di 16 settimane con pioglitazone causa un significativo miglioramento della soppressione insulino-mediata della PEG. A causa della soppressione completa della PEG dopo il trattamento con pioglitazone, non è stata riscontrata una correlazione significativa tra la PEG ed il contenuto epatico di grasso. Comunque, se si analizzano complessivamente i risultati pre e post trattamento con pioglitazone, siamo in grado di dimostrare una correlazione significativa ($r = 0,63$, $p < 0,001$) tra il contenuto epatico di grasso e la PEG. Questi risultati sono coerenti con quelli di precedenti studi che mostrano come il peggioramento della soppressione della PEG da parte dell'insulina sia fortemente

correlato con l'aumento del contenuto epatico di grasso in pazienti con diabete di tipo 2 (21).

In sintesi, i risultati di questo studio dimostrano che il trattamento con pioglitazone potenzia la CSG dopo ingestione di glucosio, fa diminuire il contenuto epatico di grasso e migliora i test di funzionalità epatica in pazienti con diabete di tipo 2. La diminuzione del contenuto epatico di grasso dopo trattamento con pioglitazone è associata ad una aumentata insulino-sensibilità epatica. Il miglioramento della captazione splancnica e periferica di glucosio ed il potenziamento della soppressione della PEG, dopo trattamento con pioglitazone, contribuiscono al miglioramento del controllo glicemico in pazienti con diabete di tipo 2.

RINGRAZIAMENTI

Questo lavoro è stato supportato in parte da finanziamenti di Takeda North America, National Institutes of Health Grant DK-24092 e da un premio di merito della Veterans Administration.

Gli autori desiderano ringraziare gli infermieri del General Clinical Research Center per la loro diligente cura nei confronti dei nostri pazienti e specialmente Patricia Wolff, RN, Norma Diaz, BSN, James King, RN e John Kincade, RN per aver eseguito i test del clamp insulinico. Ringraziamo vivamente l'assistenza tecnica di Kathy Camp, Cindy Munoz e Sheila Taylor. La signorina Lorrie Albarado e la signorina Elva Chapa hanno provveduto ad un competente supporto di segreteria nella preparazione di questo manoscritto.

BIBLIOGRAFIA

1. DeFronzo RA: Pathogenesis of type 2 diabetes: metabolic and molecular implications for identifying diabetes genes. *Diabetes Rev* 5:177–269, 1997
2. DeFronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Felig P, Wahren J: Regulation of splanchnic and peripheral glucose uptake by insulin and hyperglycemia in man. *Diabetes* 32:35–45, 1983
3. Ferrannini E, Wahren J, Felig P, DeFronzo RA: Role of fractional glucose extraction in the regulation of splanchnic glucose metabolism in normal and diabetic man. *Metabolism* 29:28–35, 1980
4. DeFronzo RA, Gunnarsson R, Bjorkman O, Olsson M, Wahren J: Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76:149–155, 1985
5. DeFronzo RA, Ferrannini E, Hendler R, Wahren J, Felig P: Influence of hyperinsulinemia, hyperglycemia, and the route of glucose administration on splanchnic glucose exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75:5173–5177, 1978
6. Adkins BA, Myers SR, Hendrick GK, Williams PE, Stevenson RW, Cherrington AD: Importance of the route of intravenous glucose delivery to hepatic glucose balance in the conscious dog. *J Clin Invest* 79:557–565, 1987
7. Myers SR, Biggers DW, Neal DW, Cherrington AD: Intraportal glucose delivery enhances the effects of hepatic glucose load on net hepatic glucose uptake in vivo. *J Clin Invest* 88:158–167, 1991
8. Ferrannini E, Simonson DC, Katz LD, Reichard G, Bevilacqua S, Barrett EJ, Olsson M, DeFronzo RA: The disposal of an oral glucose load in patients with non-insulin dependent diabetes. *Metabolism* 37:79–85, 1988
9. Ludvik B, Nolan JJ, Roberts A, Baloga J, Joyce M, Bell JM, Olefsky JM: Evidence for decreased splanchnic glucose uptake after oral glucose administration in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 100:2354–2361, 1997
10. Mitrakou A, Kelley D, Venerman T, Jenssen T, Pangburn T, Reilly J, Gerich J: Contribution of abnormal muscle and liver glucose metabolism to postprandial hyperglycemia in NIDDM. *Diabetes* 39:1381–1390, 1990
11. Basu A, Basu R, Shah P, Vella A, Johnson CM, Nair KS, Jensen MD, Schwenk WF, Rizza RA: Type 2 diabetes impairs splanchnic uptake of glucose but does not alter intestinal glucose absorption during enteral glucose feeding: additional evidence for a defect in hepatic glucokinase activity. *Diabetes* 50:1351–1362, 2001
12. Bajaj M, Berria R, Pratipanawatr T, Kashyap S, Pratipanawatr W, Belfort R, Cusi K, Mandarino L, DeFronzo RA: Free fatty acid-induced peripheral insulin

- resistance augments splanchnic glucose uptake in healthy humans. *Am J Physiol* 283:E346–E352, 2002
13. Shah P, Vella A, Basu A, Basu R, Adkins A, Schwenk WF, Johnson CM, Nair KS, Jensen MD, Rizza RA: Effects of free fatty acids and glycerol on splanchnic glucose metabolism and insulin extraction in nondiabetic humans. *Diabetes* 51:301–310, 2002
 14. Bajaj M, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Kashyap S, Cusi K, Mandarino L, DeFronzo RA: Free Fatty acids reduce splanchnic and peripheral glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:3043–3048, 2002
 15. Groop LC, Bonadonna RC, Del Prato S, Ratheiser K, Zyck K, DeFronzo RA: Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependant diabetes mellitus: evidence for multiple sites of insulin resistance. *J Clin Invest* 84:205–213, 1989
 16. Groop LC, Saloranta C, Shank M, Bonadonna RC, Ferrannini E, DeFronzo RA: The role of free fatty acid metabolism in the pathogenesis of insulin resistance in obesity and non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 72:96–107, 1991
 17. Reaven GM: The fourth musketeer: from Alexandre Dumas to Claude Bernard. *Diabetologia* 38:3–13, 1995
 18. Banerji MA, Buckley MC, Chaiken RL, Gordon D, Lebovitz HE, Kral JG: Liver fat, serum triglycerides and visceral adipose tissue in insulinsensitive and insulin-resistant black men with NIDDM. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19:846–850, 1995
 19. Kawasaki T, Hashimoto N, Kikuchi T, Takahashi H, Uchiyama M: The relationship between fatty liver and hyperinsulinemia in obese Japanese children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 24:317–321, 1997
 20. Goto T, Onuma T, Takebe K, Kral JG: The influence of fatty liver on insulin clearance and insulin resistance in non-diabetic Japanese subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* 19:841–845, 1995
 21. Ryysy L, Hakkinen A, Goto T, Vehkavaara S, Westerbacka J, Halavaara J, Yki-Jarvinen H: Hepatic fat content and insulin action on free fatty acids and glucose metabolism rather than insulin absorption are associated with insulin requirements during insulin therapy in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 49:749–758, 2000
 22. Wahrenberg H, Lonnqvist F, Arner P: Mechanisms underlying regional differences in lipolysis in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84:458–467, 1989
 23. Kelley DE, Mandarino LJ: Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination. *Diabetes* 49:677–683, 2000

24. Spiegelman BM: PPAR- γ : adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 47:507–514, 1998
25. Miyazaki Y, Glass L, Triplitt C, Matsuda M, Cusi K, Mahankali A, Mahankali S, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Effect of rosiglitazone on glucose and non-esterified fatty acid metabolism in type II diabetic patients. *Diabetologia* 44:2210–2219, 2001
26. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Glass L, Mahankali S, Ferrannini E, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Improved glycemic control and enhanced insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects treated with pioglitazone. *Diabetes Care* 24:710–719, 2001
27. Miyazaki Y, Mahankali A, Matsuda M, Mahankali S, Hardies J, Cusi K, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Effect of pioglitazone on abdominal fat distribution and insulin sensitivity in type 2 diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87:2784–2791, 2002
28. Mori Y, Murakawa Y, Okada K, Horikoshi H, Yokoyama J, Tajima N, Ikeda Y: Effect of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* 22:908–912, 1999
29. Mayerson AB, Hundal RS, Dufour S, Lebon V, Befroy D, Cline GW, Enocksson S, Inzucchi SE, Shulman GI, Petersen KF: The effects of rosiglitazone on insulin sensitivity, lipolysis, and hepatic and skeletal muscle triglyceride content in patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 51:797–802, 2002
30. Ludvik B, Nolan JJ, Roberts A, Baloga J, Joyce M, Bell JM, Olefsky JM: A noninvasive method to measure splanchnic glucose uptake after oral glucose administration. *J Clin Invest* 95:2232–2238, 1995
31. DeFronzo R, Tobin J, Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214–E223, 1979
32. Bottomley PA: Spatial localization in NMR spectroscopy in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 508:333–348, 1987
33. Petersen KF, West AB, Reuben A, Rothman DL, Shulman GI: Noninvasive assessment of hepatic triglyceride content in humans with ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Hepatology* 24:114–117, 1996
34. Steele R: Influence of glucose loading and of injected insulin on hepatic glucose output. *Ann N Y Acad Sci* 82:420–430, 1959
35. Kuyumjian J, Kalant N: Absorption of an oral glucose load in the dog. *Horm Metab Res* 18:587–589, 1986
36. Haffner SM, Miettinen H, Stern MP: Insulin secretion and resistance in nondiabetic Mexican Americans and non-Hispanic whites with a parental history of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 81:1846–1851, 1996

37. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA: An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 270:12953–12956, 1995
38. Hallakou S, Doare F, Fougelle F, Kergoat M, Guerre-Millo M, Berthault MF, Dugail I, Morin J, Auwerx J, Ferre P: Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in obese Zucker *fa/fa* rat. *Diabetes* 46:1393–1399, 1997
39. Lambe KG, Tugwood JD: A human peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma is activated by inducers of adipogenesis, including thiazolidinedione drugs. *Eur J Biochem* 239:1–7, 1996
40. Miyazaki Y, Hardies LJ, Wajcberg E, Glass L, Triplitt C, Bajaj M, Cersosimo E, Mandarino LJ, DeFronzo RA: Effect of pioglitazone on liver fat content, abdominal fat distribution and insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus (Abstract). *Diabetes* 51(Suppl. 2):A69, 2002
41. Greenfield M, Kolterman O, Olefsky J, Reaven GM: Mechanism of hypertriglyceridaemia in diabetic patients with fasting hyperglycaemia. *Diabetologia* 18:441–446, 1980
42. Adams M, Montague CT, Prins JB, Holder JC, Smith SA, Sanders L, Digby JE, Sewter CP, Lazer MA, Chatterjee VKK, O’Rahilly S: Activators of peroxisome proliferator-activated receptor gamma have depot-specific effects on human preadipocyte differentiation. *J Clin Invest* 100:3149– 3153, 1997
43. Chao L, Marcus-Samuels B, Mason MM, Moitra J, Vinson C, Arioglu E, Gavrilova O, Reitman ML: Adipose tissue is required for the antidiabetic, but not for the hypolipidemic, effect of thiazolidinediones. *J Clin Invest* 106:1221–1228, 2000
44. Caldwell SH, Hespdenheide EE, Redick JA, Iezzoni JC, Battle EH, Sheppard BL: A pilot study of thiazolidinedione, troglitazone, in nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 96:519–525, 2001
45. Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore JN: Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 120:1183–92, 2001
46. Silverman JF, Pories WJ, Caro JF: Liver pathology in diabetes mellitus and morbid obesity: clinical, pathological, and biochemical considerations. *Pathol Annu* 24:275–302, 1989
47. Creutzfeldt W, Frerichs H, Sickinger K: Liver diseases and diabetes mellitus. *Prog Liver Dis* 3:371–407, 1970
48. Nawano M, Oku A, Ueta K, Umebayashi I, Ishirahara T, Arakawa K, Saito A, Anai M, Kikuchi M, Asano T: Hyperglycemia contributes insulin resistance in

hepatic and adipose tissue but not skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol*
278:E535—E543, 2000