

Rassegna

OGTT e IVGTT: due test a confronto per la valutazione dell'insulino-sensibilità e della funzione beta cellulare

RIASSUNTO

Il test orale (OGTT) e quello endovenoso (IVGTT) di tolleranza al glucosio sono fra i più impiegati in studi metabolici. Questi test vengono soprattutto usati per ottenere con un solo esperimento informazioni relative a insulino-sensibilità e insulino-secrezione (funzione beta cellulare) in un singolo individuo. In questa rassegna i due test sono messi a confronto sia da un punto di vista metodologico, mettendo in luce le semplicità o le difficoltà della loro esecuzione, ma soprattutto cercando di evidenziare il significato fisiologico dei parametri ottenuti. In particolare si è visto che mentre IVGTT e OGTT possono essere usati scambievolmente per la misura della sensibilità, per quanto riguarda la funzione beta cellulare, invece, ci sono vari *caveat* da tener presente. I due test infatti, forniscono informazioni differenti sullo stato della beta cellula, in quanto nell'OGTT la secrezione di insulina è indotta non solo dallo stimolo glicemico (come nell'IVGTT), ma anche dall'effetto che sulle beta cellule hanno gli ormoni gastrointestinali. Infine, mettendo a confronto i possibili risultati, si è cercato di dare alcuni suggerimenti sull'uso più consono dei due test.

SUMMARY

Comparison of insulin sensitivity and beta cell function from the oral and the intravenous glucose tolerance test
The oral (OGTT) and intravenous (IVGTT) glucose tolerance tests are the most widely used experiments in metabolic studies. These tests allow, with a single experiment, the assessment in a single individual of the two main processes involved in glucose tolerance: insulin resistance/sensitivity and beta cell function. This review compares the two tests from a methodological point of view (highlighting both the simple and the difficult aspects of their performance) and overall it tries to show the physiological meaning of the parameters that emanate from the tests. In particular, IVGTT and OGTT can be interchangeably used for the assessment of insulin sensitivity, whilst, as concerns beta cell function, there are several aspect to take into account. The two tests in fact provide different information about the status of the beta cell, because in the OGTT, insulin

G. Pacini, A. Mari

Istituto di Ingegneria Biomedica (ISIB), Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Padova

Corrispondenza: dott. Giovanni Pacini, ISIB-CNR, corso Stati Uniti 4, 35127 Padova
e-mail: giovanni.pacini@isib.cnr.it

G It Diabetol Metab 2007;27:220-226

Pervenuto in Redazione il 17-06-2007
Accettato per la pubblicazione il 18-07-2007

Parole chiave: test metabolici, azione insulinica, insulino-resistenza, insulino-secrezione, modelli matematici, metodologie di ricerca

Key words: metabolic tests, insulin action, insulin resistance, insulin secretion, beta cell function, mathematical models, research methods

secretion is affected not only by the glucose stimulation (as in the IVGTT), but also by the effect that gastrointestinal hormones elicit on the beta cell. Finally, by comparing the potential results from the tests, suggestions on their most proper exploitation are provided.

Introduzione

È comunemente accettato che la tolleranza al glucosio dipende dall'interazione fra insulino-sensibilità e insulino-secrezione e che il progressivo deterioramento di questi due processi conduce all'intolleranza ai carboidrati e al diabete di tipo 2. Indipendentemente da quale processo precede l'altro, il che è ancora oggetto di discussione, la valutazione quantitativa della sensibilità e della funzione beta cellulare è di fondamentale importanza nello studio sui disordini metabolici e molti test sperimentali sono stati concepiti a questo fine^{1,2}. In questi test, la complessità sperimentale e dell'analisi di dati varia considerevolmente. Per la misura della sensibilità insulinica, per esempio, il metodo più accurato è quello del *glucose clamp*, il cui valore (M-value) fornisce la misura "vera" di sensibilità³. Tuttavia, il clamp è una procedura sperimentale complessa, costosa e richiede personale particolarmente esperto. Nella routine quotidiana, o quando si devono eseguire test su popolazioni numerose, si adottano altri metodi più semplici che però forniscono misure adeguate. Questa rassegna mira a fare un breve resoconto comparativo dell'uso di due dei più comuni e semplici test impiegati per la valutazione della sensibilità all'insulina e della funzione beta cellulare. I due test sono il test da carico orale di glucosio (OGTT) e quello da carico endovenoso (IVGTT). Per ogni test abbiamo discusso le caratteristiche e le limitazioni salienti. Particolare attenzione viene devoluta ai metodi adottati per estrarre informazioni di carattere clinico/fisiologico dall'analisi dei dati sperimentali. Dati i vincoli di spazio, alcuni metodi di analisi più vecchi, meno comunemente usati o non sufficientemente convalidati non sono stati considerati.

Test

OGTT

Il test da carico orale di glucosio consiste nel somministrare al paziente del glucosio per via orale (usualmente 75 grammi) e prelevare campioni di sangue nelle 2-3 ore successive (vedi Appendice *Protocolli*). Data la sua semplicità, il suo potere diagnostico (raccomandato dall'American Diabetes Association) e il fatto che rappresenta il modo fisiologico di assumere carboidrati, l'OGTT è un test molto usato per studi che coinvolgono un largo numero di soggetti⁴.

Recentemente, si è iniziato a somministrare insieme al glucosio per via orale anche quantità note di proteine e grassi per simulare un pasto (*meal test*) allo scopo di rappresentare una situazione ancora più vicina alla realtà quotidiana. Tutti i

metodi di analisi e le considerazioni presentate per l'OGTT valgono anche per il *meal test*.

IVGTT

Il test da carico endovenoso consisteva inizialmente in un'iniezione in vena di un bolo di glucosio (usualmente 0,3 grammi per chilo di peso) con campioni di sangue prelevati frequentemente durante le tre ore di durata del test (questa procedura sperimentale viene definita il metodo IVGTT-classico). Successivamente, la dinamica del test è stata aumentata con una infusione per 5 minuti di insulina (dose 0,03-0,05 U/kg) iniziata 20 minuti dopo il bolo di glucosio (metodo IVGTT-modificato). Le procedure sperimentali sono riportate in dettaglio in letteratura^{5,6} e riassunte in Appendice. In entrambi i test vengono misurati per ogni campione la concentrazione di glucosio, insulina e possibilmente C-peptide.

Sensibilità insulinica

Generalità

L'insulino-sensibilità quantifica l'abilità dell'insulina di abbassare la concentrazione del glucosio nel sangue promuovendone l'utilizzazione periferica da parte dei tessuti muscolari e adiposo e inibendone la produzione epatica. La sensibilità è quindi un processo dai diversi aspetti e in teoria non può essere rappresentato da un singolo valore. Tuttavia, dopo l'introduzione del *glucose clamp*³, si è comunemente accettato di rappresentare la sensibilità come la scomparsa di glucosio a un determinato livello di concentrazione di insulina: questo può essere rappresentato da un singolo valore, che è appunto la *misura* della sensibilità. Nel caso del *glucose clamp* questo è considerato il valore di riferimento contro il quale tutti i valori derivati dagli altri metodi devono essere confrontati.

Analisi dei dati

Per l'analisi dei dati IVGTT di glucosio e insulina è stato sviluppato il modello minimo della scomparsa di glucosio che fornisce il classico indice di sensibilità S_I ⁶. Questo parametro si è rivelato molto importante ed è stato utilizzato per quantificare la sensibilità insulinica in moltissimi studi nelle più diverse patologie. Uno studio *ad hoc* ha dimostrato l'equivalenza della stima della sensibilità ottenuta negli stessi soggetti sia con test classico sia con quello insulino-modificato⁵. Comunque, l'indice S_I ottenuto sia dal test classico sia da quello modificato è stato ampiamente validato contro la sensibilità ottenuta dal *glucose clamp*⁷.

La sensibilità all'insulina da OGTT può essere calcolata sfruttando specifici modelli matematici o usando particolari formule (empiriche o con substrato fisiologico) che, data la loro semplicità in termini di facilità di uso, costo e calcolo, sono di gran lunga le più sfruttate. Le formule più usate per l'insulino-sensibilità da dati OGTT sono quella di Matsuda &

DeFronzo (ISComp[®]), di Stumvoll et al. (MCRest[®]) e di Mari et al. (OGIS¹⁰). Anche tutti questi indici sono stati validati contro il clamp e utilizzati in studi dove si doveva analizzare lo stato metabolico di un soggetto.

Confronto fra test

La domanda che quindi ci si pone è se sia possibile usare indistintamente l'IVGTT o l'OGTT per ottenere un indice di sensibilità da poter usare per caratterizzare una data popolazione. Ricordando che comunque i metodi sopra riportati sono stati confrontati con e validati contro il gold standard *glucose clamp*, è opportuno far notare che esistono studi nei quali soggetti normali o con particolari patologie sono stati sottoposti ai due test. Quali esempi riportiamo tre studi: uno su diabetici di tipo 2 analizzati prima e dopo l'assunzione di un prodotto naturale (Caiapo) con presunte proprietà antidiabetiche o di placebo¹¹; un altro su donne che avevano sviluppato diabete gestazionale in gravidanza¹² e un terzo in soggetti con steatoepatite non alcolica NASH^{13,14}. Nel primo caso sia la S_I dal modello minimo sia OGIS hanno dimostrato un significativo aumento della sensibilità dopo assunzione di Caiapo, mentre nel gruppo placebo sono entrambi rimasti virtualmente gli stessi. Nel caso del post-diabete gestazionale, sia OGIS sia S_I sono stati usati per suddividere la popolazione in pazienti post-GDM insulino-resistenti e insulino-sensibili per poter valutare possibili differenze nel contenuto di grasso intramiocellulare¹⁵. In figura 1 viene mostrato come l'IVGTT e l'OGTT forniscano le stesse informazioni sulla sensibilità insulinica in soggetti con NASH. Questi risultati ulteriormente confermano la capacità di OGTT e IVGTT di fornire validi indici di sensibilità insulinica. Ne consegue inoltre che non ci sono particolari controindicazioni sulla possibilità di usare i due test indistintamente.

Secrezione di insulina e funzione beta cellulare

Generalità

L'insulina viene secreta dalle cellule beta pancreatiche. L'ormone rilasciato sotto stimolazione del glucosio o di altri secretagoghi entra nella vena porta, attraversa il fegato e si distribuisce nella circolazione periferica. Gli epatociti degradano circa il 50% dell'insulina che passa per il fegato sia al primo passaggio (dalla vena porta), sia successivamente quando l'insulina periferica ricircola nel fegato. In generale, le misure di insulina che comunemente si ottengono sono quelle periferiche, quindi si valuta la "secrezione" non da misure dirette; in altre parole, si valuta la comparsa post-epatica di ormone nel circolo sistemico. Siccome è qui che l'insulina, soprattutto in condizioni postprandiali, agisce a livello di tessuto muscolare e adiposo, la misura post-epatica è comunque informativa. D'altro canto, si assume che la clearance epatica dell'insulina non vari significativamente durante un test, quindi si può considerare che la comparsa post-epatica sia proporzionale al rilascio beta cellulare.

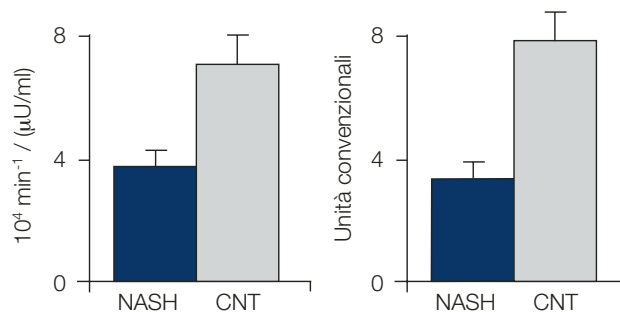


Figura 1 Confronto fra la determinazione dell'insulino-sensibilità con IVGTT e OGTT in soggetti con steatoepatite non alcolica (NASH) e controlli sani (CNT). Il pannello di sinistra rappresenta l'indice S_I ottenuto dall'IVGTT con l'analisi dal modello minimo; quello di destra l'indice di Matsuda calcolato su dati OGTT. I grafici sono stati disegnati sulla base dei risultati dei lavori di Pagano e Musso^{13,14}.

Per misure di secrezione beta cellulare (pre-epatica) è necessario sfruttare il C-peptide (anch'esso comunque misurato in periferia) che, rilasciato equimolarmente con l'insulina, non subisce apprezzabili estrazioni dal fegato. L'uso combinato di insulina e C-peptide permette quindi una "globale" quantificazione della dinamica dell'insulina: dalla sua produzione a livello pancreatico e comparsa nel circolo sistemico, alla sua degradazione epatica.

Analisi dei dati

Ci sono diversi metodi per misurare la funzione beta cellulare da IVGTT e OGTT, ma non esiste un gold standard contro cui confrontarli, come si fa con il *glucose clamp* per la sensibilità. Questo è dovuto alla complessità della risposta beta cellulare che non può essere valutata da un singolo test. La misura esatta si potrebbe avere solo cateterizzando la vena porta e dando un tracciante per calcolarne il flusso sanguigno, ma chiaramente questo non può essere fatto routinariamente nell'uomo. Per cui, le misure che otteniamo sono in qualche modo utili per confronti fra classi di pazienti, ma nessuna è in grado di fornire una misura esatta della secrezione in quanto tale.

Per quanto riguarda l'IVGTT, la misura più comunemente usata è la "risposta acuta di insulina al glucosio" (AIRg), che viene calcolata facendo la media della concentrazione di insulina nei campioni da 5 a 10 min da cui si sottrae il valore basale. Talvolta è anche usata l'area incrementale sotto la curva (AUC) di insulina (AUC_{INS}). Tuttavia, queste sono misure della comparsa in periferia di insulina; se si è misurato il C-peptide, l'analogo indice (ACPRg) fornisce informazioni sul rilascio diretto dalla beta cellula. Questi indici forniscono informazioni sulla prima fase di secrezione/comparsa, mentre per la seconda fase bisogna fare ricorso all'AUC di C-peptide (AUC_{CP} , assoluta o incrementale) nell'intervallo di tempo di riferimento, che può essere per esempio dai 20 min in poi. L'altro approccio è quello di sfruttare appositi modelli matematici che descrivono sia l'insulina sia il C-peptide¹⁶.

Tuttavia, usando sia l' AUC_{CP} sia i modelli, bisogna considerare che la somministrazione di insulina esogena potrebbe interferire con il rilascio endogeno.

La prima fase di rilascio dipende dall'ampiezza dell'incremento di glucosio dopo il bolo. Però, siccome la dose di glucosio è standardizzata (0,3 g/kg), si assume che AIRg e ACPRg non richiedano normalizzazione al picco di glucosio. D'altro canto, su soggetti normali, gli indici sono dipendenti dalla sensibilità all'insulina (vedi avanti), così questi indici per sé potrebbero non essere buoni indicatori della funzione beta cellulare: il confronto fra popolazioni con diverse sensibilità potrebbero condurre a inappropriate conclusioni. Inoltre, un altro punto critico della valutazione della funzione beta cellulare dall'IVGTT è che la prima fase, sebbene molto importante, non è il solo modo con cui la beta cellula risponde allo stimolo e quindi non è sufficiente a caratterizzare in modo soddisfacente la funzione pancreatico.

È noto che la funzione beta cellulare si adatta alla insulino-resistenza per mantenere una normale tolleranza ai carboidrati¹⁷⁻¹⁹. Ne è derivato che la funzione beta cellulare non può essere determinata in maniera corretta se non si aggiustano i parametri di tale funzione secondo il grado di insulino-resistenza. L'approccio più comunemente usato è il cosiddetto *disposition index*, derivato nell'IVGTT dal prodotto fra AIRg e S_I e basato sull'assunto che l'adattamento della beta cellula all'insulino-resistenza segue una precisa legge iperbolica²⁰.

Nell'OGTT indici di secrezione sono ancora le AUC di insulina e C-peptide, ma, per la valutazione della funzione beta cellulare, la concentrazione di insulina deve essere normalizzata al livello di glucosio, che chiaramente non è standardizzato. Sono stati sviluppati perciò indici empirici che legano i livelli di glucosio e insulina. La formula più usata è l'indice insulino-glicemico, calcolato come il rapporto fra la differenza di concentrazione di insulina a 30 min e quella basale con la corrispondente differenza di glucosio. A questo indice, sebbene assai usato, non può essere data una chiara interpretazione fisiologica. Nell'OGTT, più che nella prima parte dell'IVGTT, gioca un ruolo molto significativo l'estrazione epatica, che risulta un fattore confondente per interpretare la funzione beta cellulare dalle misure di insulina. Ovviamente, per ovviare a questo, si può sfruttare il C-peptide²¹. Un altro problema sovente incontrato con l'indice insulino-glicemico è quello dei valori negativi (quando il glucosio o l'insulina a 30 min sono minori dei basali) o estremamente elevati (quando il glucosio a 30 min è solo leggermente superiore al basale). Per ovviare a queste situazioni estreme, si preferisce fare i rapporti fra le AUC_{INS} e AUC_{CP} incrementali e la AUC di glucosio (AUC_G), invece che fra le concentrazioni²².

L'OGTT comporta una più complessa risposta beta cellulare, comprendendo non solo la prima fase, ma anche tutti quei processi propri del rilascio più lento di insulina, quali la dose-risposta al glucosio, il potenziamento, l'attivazione di meccanismi da parte di ormoni gastrointestinali. Per poter rappresentare gran parte di questi processi è necessario ricorrere all'uso di modelli matematici^{23,24} che rappresentano la fisiologia del sistema glucosio-insulina all'interno della beta cellula (produzione) o dopo il rilascio (cinetica). Analizzando dati di glucosio e insulina (e talvolta di C-peptide), i modelli

forniscono parametri caratteristici delle relazioni fra concentrazione di glucosio e secrezione di insulina^{24,25}. I modelli sono strumenti rilevanti per interpretare dati OGTT, ma richiedono in pratica personale esperto e software specializzato. Per quanto riguarda la relazione funzione beta cellulare/insulino-resistenza, c'è stato per l'OGTT un certo abuso di differenti *disposition indices*, molti intrinsecamente inesatti. È necessario, infatti, tener presente vari aspetti, fra cui il fatto che i due parametri da mettere in relazione (qualunque sia la forma matematica di questa relazione) siano indipendenti, cioè non intrinsecamente correlati, come sono per esempio l'indice Matsuda per la sensibilità (che ha nella sua formula la AUC_{INS}) e il rapporto AUC_{INS}/AUC_G , quale indice di funzione beta cellulare. Il prodotto Matsuda Index $\times AUC_{INS}/AUC_G$ è quindi inappropriato. Un altro punto importante è la verifica della relazione fra i due indici non correlati; questa deve essere una specifica funzione matematica (non necessariamente un'iperbole), trovata nella popolazione di controllo, che dovrà essere poi applicata anche a tutti gli altri soggetti^{19,26}.

Confronto fra test

L'IVGTT fornisce una stima della risposta a uno stimolo glicemico diretto e noto della prima fase beta cellulare. Questa dipende dal complesso equilibrio fra esocitosi e riempimento del pool labile da pool precursori nei quali sono coinvolti molti e complessi processi biochimici. La risposta di prima fase a uno stimolo endovenoso dipende poi dal livello di glucosio al momento della iniezione di glucosio²⁷ con una progressiva riduzione della prima fase all'aumento della glicemia, nonostante una intatta capacità di rilascio di ormone, come dimostrato da un concomitante test all'arginina²⁵. Quindi, mentre è riconosciuto che la prima fase è un sensibile indice di funzionalità beta cellulare, un insufficiente rilascio insulinico in questa fase può non rappresentare un difetto primario della beta cellula²⁸.

Con l'OGTT, la stimolazione alla beta cellula avviene con un ritardo non direttamente quantificabile, dovuto allo svuotamento gastrico e all'assorbimento intestinale. Questo comporta che, a differenza dell'IVGTT, la stimolazione alla beta cellula avvenga in maniera graduale. Inoltre, anche la clearance di insulina gioca in questo test un ruolo molto importante. Questi fattori rendono assai complessa la valutazione della "reale" funzione beta cellulare e il poter distinguere fra una prima fase di rilascio (indice insulino-glicemico?) e un rilascio totale (rapporto fra le AUC). Ma il fattore che più distingue il test orale da quello endovenoso è sicuramente l'effetto delle incretine. È noto che a parità di concentrazione periferica di glucosio (stimolo), la quantità secreta di insulina è molto maggiore quando il glucosio è somministrato oralmente invece che per via endovenosa²⁹. Questo è dovuto all'effetto degli ormoni gastrointestinali (GIP, *gastric inhibitory polipeptide* e GLP-1, *glucagon-like peptide-1*) stimolati quando il glucosio attraversa il tratto gastrointestinale. L'azione che questi ormoni esercitano è principalmente l'aumento della sensibilità pancreatica al glucosio con conseguente notevole aumento del rilascio di insulina durante un OGTT a livelli di

glucosio pari a quelli raggiunti con un'infusione endovenosa di glucosio²⁹. In generale l'effetto incretinico tiene conto del 50-70% dell'aumento della concentrazione di insulina in condizioni postprandiali²⁸. Alle incretine può essere dovuto (ma non è ancora dimostrato con certezza) un importante aspetto della secrezione nei diabetici di tipo 2 nei quali si osserva una pressoché totale mancanza di risposta di prima fase nei primi dieci minuti di un IVGTT (AIRg = 0), mentre col test orale si vede già al trentesimo minuto una secrezione in media di 350 pmol/min. L'effetto incretinico non si limita alla secrezione: anche la clearance insulinica è ridotta in presenza di GLP-1^{30,31} ed è ancora oggetto di studio se si abbiano effetti sulla sensibilità insulinica^{32,33}.

In conclusione dunque, durante un test orale, la semplice valutazione dell'insulina in rapporto a quella del glucosio può non essere sufficiente a valutare la funzione beta cellulare, in quanto altri importanti fattori entrano in gioco nel modulare e alterare la dinamica insulinica. Questo è un importante fattore limitante nel confrontare risultati ottenuti con i due test.

Sommario e conclusione

I test endovenoso e orale di glucosio per studi di carattere metabolico sono i più usati perché più semplici del *glucose clamp* e del test all'arginina, ma più accurati delle semplici misure basali, quali HOMA-R e HOMA-B⁷. In tabella 1, sono riportate le più salienti differenze metodologiche dei due test. Per quanto riguarda la sensibilità all'insulina, i due test possono essere impiegati tranquillamente. La sensibilità

dall'IVGTT con il modello minimo e OGIS forniscono misure della clearance di glucosio, mentre altri indici OGTT (quali quelli di Matsuda e Stumvoll) sono surrogati dell'M-value del clamp. Anche se ancora oggetto di studio, è stata ipotizzata una possibile influenza delle incretine sulla sensibilità insulinica e questo deve essere tenuto a mente nell'interpretare la sensibilità con l'OGTT. Entrambi i test forniscono figure quantitative della secrezione di insulina e della funzione beta cellulare. Tuttavia, mentre con l'IVGTT si ottiene una misura della risposta diretta di prima fase, l'OGTT fornisce una misura più generale per la quale è molto critico, se non impossibile, dividere fra prima e seconda fase. Durante l'OGTT lo svuotamento gastrico e l'assorbimento intestinale sono fattori confondenti, ma sono le incretine che giocano un ruolo fondamentale sulla secrezione di insulina (e probabilmente anche sulla sua clearance), per cui è difficile segregare il loro effetto da quello diretto del glucosio. Per entrambi i test, infine, è necessario usare cautela nell'interpretare le relazioni fra il *disposition index* o analoghi indici OGTT e altre variabili fisiologiche in quanto queste relazioni potrebbero riflettere dipendenze dalla sensibilità invece che dalla funzione beta cellulare.

Questa breve rassegna ha cercato di mettere in luce le differenze salienti fra i due test semplici più usati nella pratica clinica. Entrambi i test hanno vantaggi e limitazioni, la scelta dovrebbe essere guidata da un esame critico in relazione alle necessità dell'investigatore. Qualunque test venga poi usato, è necessario tenere presenti la natura e le limitazioni in modo da evitare interpretazioni non corrette. Gli autori si augurano che questa discussione sia stata utile a questo scopo.

Tabella 1 Riassunto delle principali caratteristiche dei test intravenoso e orale di glucosio.

IVGTT	OGTT
Richiede molti campioni	Richiede pochi campioni
Richiede notevole abilità nel fare l'esperimento	Procedura sperimentale senza eccessive difficoltà
Non descrive la normale (fisiologica) via di assumere glucosio	Simula la normale (fisiologica) assunzione di glucosio (soprattutto il <i>meal test</i>)
Descrive una fase dinamica sperimentale	Descrive la fase dinamica postprandiale
Per ottenere la misura della sensibilità insulinica richiede l'uso di modelli matematici e abilità per elaborare i dati	Per ottenere la misura della sensibilità insulinica richiede il calcolo di semplici formule
Fornisce una stima della funzione beta cellulare di prima fase	Fornisce una stima della funzione beta cellulare complessiva
Per la funzione beta cellulare, non ci sono fattori confondenti noti: questa dipende solo dalla diretta stimolazione glicemica	Altre variabili, di solito non misurate (incretine), possono costituire dei fattori confondenti per la funzione beta cellulare
Può essere usato solo in popolazioni mediamente numerose	Può essere usato in studi su vaste popolazioni
Il suo uso quale strumento diagnostico non è ancora riconosciuto	È raccomandato come ausilio diagnostico per il diabete
Validità e riproducibilità sono state ampiamente dimostrate	Validità e riproducibilità sono ancora da dimostrare completamente

Appendice *Protocolli*

Riportiamo i più comuni protocolli, con l'avvertenza che dalla letteratura si evince che vari gruppi di studio hanno apportato leggere modifiche che comunque non alterano il risultato generale. Entrambi i test si svolgono al mattino dopo 8-12 ore di digiuno.

IVGTT

Prelievi a digiuno – usualmente due: 10 e 5 min prima dell'iniezione di glucosio.

Al tempo 0, inizio dell'infusione di glucosio (50% in H₂O) nella dose totale di 0,3 grammi per chilogrammo di peso corporeo del soggetto (durata di infusione dai 30 secondi al minuto).

IVGTT-classico: prelievo di campioni di sangue ai tempi: 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 19, 22, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150, 180* min.

IVGTT-modificato: prelievo di campioni di sangue ai tempi: 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 19. Infusione di insulina (0,03-0,05 U/kg)** dal tempo 20 a 25*** min e quindi prelievi di sangue a 25, 27, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150, 180* min.

Misura della concentrazione di glucosio, insulina e, possibilmente, di C-peptide.

OGTT

Prelievi a digiuno – usualmente due: 10 e 5 min prima dell'assunzione di glucosio.

Al tempo 0, viene assunto glucosio (in soluzione acquosa) per via orale nella dose totale di 75 grammi (durata assunzione dai 30 secondi ai 5 minuti).

Prelievo di campioni di sangue ai tempi: 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180**** min.

Misura della concentrazione di glucosio, insulina e, possibilmente, di C-peptide.

*Se è noto a priori che i soggetti sono potenzialmente molto insulino-resistenti, viene consigliato anche un ultimo prelievo a 240 min, per assicurarsi che glucosio e insulina siano ritornati ai valori preiniezione.

**La dose dipende dalla tipologia dei soggetti; se sono potenzialmente molto insulino-resistenti, si consiglia la dose più elevata.

***Alcuni gruppi usano dare l'insulina in bolo in 30 sec; tuttavia in questo caso si raggiungono valori di insulinemia estremamente elevati con possibili rischi di fenomeni di saturazione e impropria interpretazione dei risultati.

****Questo è un protocollo di massima; i campioni a 45 e 150 sono opzionali e da usare se si è interessati a un'accurata descrizione degli andamenti temporali delle concentrazioni; talvolta l'OGTT si ferma ai 120 min; il campione a 30 min è obbligatorio se si vuole calcolare l'indice insulino-genico.

Bibliografia

- Pacini G, Mari A. *Assessment of insulin sensitivity from steady-state and dynamic tests*. In: Roden M, ed. *Clinical diabetes research: methods and techniques*. Chichester, UK: Wiley 2007, pp. 27-41.
- Mari A, Pacini G. *Methods for the assessment of beta cell function in vivo*. In: Roden M, ed. *Clinical diabetes research: methods and techniques*. Chichester, UK: Wiley 2007, pp. 7-26.
- DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. *Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance*. *Am J Physiol* 1979;237:E214-36.
- Parretti E, Lapolla A, Dalfrà MG, Pacini G, Mari A, Cioni R et al. *Preeclampsia in lean normotensive normotolerant pregnant women can be predicted by simple insulin sensitivity indexes*. *Hypertension* 2006;47:449-53.
- Pacini G, Tonolo G, Sambataro M, Maioli M, Ciccarese M, Brocco E et al. *Insulin sensitivity and glucose effectiveness: minimal model analysis of regular and insulin-modified IVGTT*. *Am J Physiol* 1998;274:E592-9.
- Bergman RN. *The Lilly Lecture 1989. Toward a physiological understanding of glucose tolerance: minimal model approach*. *Diabetes* 1989;38:1512-28.
- Pacini G, Mari A. *Methods for clinical assessment of insulin sensitivity and beta-cell function*. *Best Prac Res Clin Endocrinol Metab* 2003;17:305-22.
- Matsuda M, DeFronzo RA. *Insulin sensitivity indices obtained from oral glucose tolerance testing. Comparison with the euglycaemic insulin clamp*. *Diabetes Care* 1999;22:1462-70.
- Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, Jenssen T, Yki-Jarvinen H, Van Haeften T et al. *Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity*. *Diabetes Care* 2000;23:295-301.
- Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. *A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test*. *Diabetes Care* 2001;24:539-48.
- Ludvik B, Waldhäusl W, Prager R, Kautzky-Willer A, Pacini G. *Mode of action of ipomoea batatas (Caiapo) in type 2 diabetic patients*. *Metabolism* 2003;52:875-80.
- Tura A, Mari A, Winzer C, Kautzky-Willer A, Pacini G. *Impaired beta-cell function in lean normotolerant former gestational diabetic women*. *Eur J Clin Invest* 2006;36:22-8.
- Pagano G, Pacini G, Musso G, Gambino R, Mecca F, Depetris N et al. *Nonalcoholic steatohepatitis, insulin resistance, and metabolic syndrome: further evidence for an etiologic association*. *Hepatology* 2002;35:367-72.

14. Musso G, Gambino R, Durazzo M, Biroli G, Carello M, Fagà E et al. *Adipokines in NASH: postprandial lipid metabolism as a link between adiponectin and liver disease*. Hepatology 2005; 42:1175-83.
15. Kautzky-Willer A, Krssák M, Winzer C, Pacini G, Tura A, Farhan S et al. *Increased intramyocellular lipid concentration identifies impaired glucose metabolism in women with previous gestational diabetes*. Diabetes 2003;52:244-51.
16. Toffolo G, Cefalu WT, Cobelli C. *Beta-cell function during insulin-modified intravenous glucose tolerance test successfully assessed by the C-peptide minimal model*. Metabolism 1999;48: 1162-6.
17. Kahn SE. *The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes*. Diabetologia 2003;46:3-19.
18. Ahrén B, Pacini G. *Importance of quantifying insulin secretion in relation to insulin sensitivity to accurately assess beta cell function in clinical studies*. Eur J Endocrinol 2004;150: 97-104.
19. Mari A, Ahrén B, Pacini G. *Assessment of insulin secretion in relation to insulin resistance*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2005;8:529-33.
20. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW et al. *Quantification of the relationship between insulin sensitivity and beta-cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function*. Diabetes 1993; 42:1663-72.
21. Tura A, Kautzky-Willer A, Pacini G. *Insulinogenic indices from insulin and C-peptide: comparison of beta-cell function from OGTT and IVGTT*. Diab Res Clin Pract 2006;72:298-301.
22. Tura A, Ludvik B, Nolan JJ, Pacini G, Thomaseth K. *Insulin and C-peptide secretion and kinetics in humans: direct and model-based measurements during OGTT*. Am J Physiol 2001; 281:E966-74.
23. Pacini G. *Mathematical models of insulin secretion in physiological and clinical investigation*. Comp Meth Prog Biomed 1994; 41:269-85.
24. Mari A, Schmitz O, Gastaldelli A, Oestergaard T, Nyholm B, Ferrannini E. *Meal and oral glucose tests for assessment of beta-cell function: modeling analysis in normal subjects*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2002;283:E1159-66.
25. Ferrannini E, Mari A. *Beta cell function and its relation to insulin action in humans: a critical appraisal*. Diabetologia 2004; 47:943-56.
26. Pacini G. *The hyperbolic equilibrium between insulin sensitivity and secretion*. Nutr Metab Cardiovascular Dis 2006; 16:S22-7.
27. Godsland IF, Jeffs JA, Johnston DG. *Loss of beta cell function as fasting glucose increases in the non-diabetic range*. Diabetologia 2004;47:1157-66.
28. Mari A. *Methods of assessment of insulin sensitivity and beta cell function*. Immun Endoc & Metab Agents – Med Chem 2006;6:91-104.
29. Nauck MA, Homberger E, Siegel EG, Allen RC, Eaton RP, Ebert R et al. *Incretin effects of increasing glucose loads in man calculated from venous insulin and C-peptide responses*. J Clin Endocrinol Metab 1986;63:492-8.
30. Nauck MA, Bartels E, Orskov C, Ebert R, Creutzfeldt W. *Additive insulinotropic effects of exogenous synthetic human gastric inhibitory polypeptide and glucagon-like peptide-1-(7-36) amide infused at near-physiological insulinotropic hormone and glucose concentrations*. J Clin Endocrinol Metab 1993;76:912-7.
31. Shuster LT, Go VL, Rizza RA, O'Brien PC, Service FJ. *Incretin effect due to increased secretion and decreased clearance of insulin in normal humans*. Diabetes 1988;37:200-3.
32. Thomaseth K, Pavan A, Pacini G, Ahrén B. *Glucagon-like peptide-1 accelerates the onset of insulin action on glucose disappearance in mice*. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007; 292:E1808-14.
33. Ahrén B, Pacini G. *Dose-related effects of GLP-1 on insulin secretion, insulin sensitivity and glucose effectiveness in mice*. Am J Physiol 1999;277:E996-1004.
34. Ahrén B, Pacini G, Foley JE, Schweizer A. *Improved meal-related beta-cell function and insulin sensitivity by the dipeptidyl peptidase-IV inhibitor vildagliptin in metformin-treated patients with type 2 diabetes over one year*. Diabetes Care 2005; 28:1936-40.