

Università degli Studi di Milano

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche
e Sperimentali

Dipartimento di Scienze Cliniche e di Comunità

Corso di Dottorato in Scienze Endocrinologiche e Metaboliche
XXVII ciclo

ANALISI DEL METABOLISMO GLUCIDICO IN PAZIENTI
CIRROTICI SOTTOPOSTI A TRAPIANTO EPATICO: RUOLO
DELLA SECREZIONE β CELLULARE E
DELL'INSULINORESISTENZA

Settore scientifico-disciplinare: MED/13

Tesi di Dottorato di:

Benedetta MASSERINI

Matricola n° R09531

Tutor: Prof.ssa Laura Fugazzola

Coordinatore del Corso di Dottorato: Prof. Angelo Poletti

Anno accademico 2013-2014

Indice

Capitolo 1 – Introduzione	pag. 3
1.0 Cirrosi ed epatopatia cronica	pag. 3
1.1 Fisiopatologia	pag. 3
1.2 Presentazione clinica e diagnosi	pag. 4
1.3 Prognosi	pag. 5
2.0 Diabete mellito ed epatopatia	pag. 7
2.1 Diabete mellito di tipo 2: fattore di rischio per nonalcoholic fatty liver disease	pag. 7
2.2 Diabete mellito come complicanza della cirrosi e diabete epatogeno	pag. 10
2.3 Il diabete mellito di tipo 2 ed il diabete epatogeno aggravano la cirrosi epatica e l'HCC	pag. 12
2.4 Epatite C e diabete	pag. 13
2.5 Trapianto epatico	pag. 16
2.6 La terapia immunosoppressiva nel trapianto epatico	pag. 17
2.7 Il trapianto epatico e le sue complicanze metaboliche	pag. 21
2.8 Diabete epatogeno e trapianto epatico	pag. 24
2.9 Rischio cardiovascolare dopo trapianto epatico	pag. 25
Capitolo 2 – Scopo della tesi	pag. 28
Capitolo 3 – Materiali e metodi	pag. 29
3.1 Soggetti	pag. 29
3.2 Parametri valutati	pag. 29
3.3 Quantificazione della funzione β cellulare	pag. 30
3.4 Statistica	pag. 34
Capitolo 4 – Risultati	pag. 35
4.1 Valutazione pre-trapianto	pag. 35
4.2 Valutazione post-trapianto (6 mesi)	pag. 41
4.3 Valutazione post-trapianto (12 mesi)	pag. 55

Capitolo 5 - Discussione e conclusioni

pag. 61

Capitolo 6 – Bibliografia

pag. 67

Capitolo 1 - Introduzione

1.0 - Cirrosi ed epatopatia cronica

La cirrosi è definita come un processo cronico e diffuso, caratterizzato da fibrosi e dal sovvertimento della normale architettura epatica in noduli strutturalmente alterati. Sebbene la definizione sia morfologica, basata sulla coesistenza di necrosi epatocellulare, rigenerazione nodulare e fibrosi, la cirrosi è sempre associata ad un progressivo deterioramento delle proprietà funzionali dell'organo.

La classificazione eziologica della cirrosi epatica vede sette categorie principali:

1. Virale (epatite C, epatite B, epatite B + D)
2. Ostruzione biliare (cirrosi biliare primitiva, colangite sclerosante, atresia biliare, fibrosi cistica, colestasi intra o extra epatica)
3. Metabolica (emocromatosi, malattia di Wilson, porfiria, deficit di $\alpha 1$ antitripsina, glicogenosi, galattosemia)
4. Farmaci e tossici (alcol, amiodarone, metotrexate)
5. Vascolare (sindrome di Budd-Chiari, patologie veno-occlusive, scompenso cardiaco destro, pericarditi costrittive, ostruzione della vena cava inferiore)
6. Immunologica (epatite cronica autoimmune)
7. Criptogenetica

1.1 Fisiopatologia

Nella cirrosi epatica i vari meccanismi eziologici portano a necrosi epatocellulare e, come reazione, a sostituzione del tessuto funzionale con eccesso di matrice extracellulare di nuova sintesi e a rigenerazione cellulare. La fonte principale dell'eccesso di collagene nella cirrosi è costituita dalle cellule perisinusoidali stellate che vanno incontro ad attivazione, assumendo un fenotipo di miofibroblasto transizionale. Gli stimoli per l'attivazione della cellula stellata originano dalle cellule di Kupffer e dalle cellule infiammatorie circolanti, con produzione di IL-1, TNF α , TGF β . L'eccesso di tessuto connettivale porta a due importanti conseguenze: da un lato le nuove cellule epatiche non possono ristabilire la normale architettura, ma assumono

una disposizione nodulare, dall'altro il numero di epatociti funzionali è progressivamente sostituito da setti fibrosi (Friedman *et al*, 2004). Inoltre la contrazione tonica dei miofibroblasti e la deposizione di nuovo tessuto interstiziale porta a un restringimento e ad anomalie nella normale distribuzione dei rami della vena porta e dei sinusoidi, provocando una aumentata resistenza vascolare intraepatica ed ipertensione portale. Il risultato finale è un fegato fibrotico, nodulare, in cui l'apporto ematico agli epatociti è gravemente compromesso, come lo è la capacità degli epatociti di secernere sostanze nel plasma. La distruzione dell'interfaccia tra il parenchima e i tratti portalari occlude, a sua volta, i canali biliari, portando a ittero e insufficienza epatica. L'insufficienza epatocellulare e l'ipertensione portale sono alla base delle principali conseguenze cliniche osservate nella cirrosi epatica.

1.2 Presentazione clinica e diagnosi

La cirrosi epatica è spesso una patologia silente in quanto molti pazienti rimangono asintomatici fino allo stato di scompenso d'organo.

Cirrosi a uno stadio precoce e ben compensate si possono manifestare con anoressia e perdita di peso, debolezza, astenia e osteoporosi (Joel *et al*, 2006).

Lo scompenso d'organo può portare a complicanze come ascite, peritoniti batteriche spontanee, encefalopatia epatica, emorragia varicosa da ipertensione portale. Sintomi clinici alla diagnosi possono includere anche ittero, prurito, emorragie gastrointestinali, coagulopatia, aumento della circonferenza addominale e alterazioni dello stato mentale. Poiché la sintesi di enzimi epatici è necessaria per il metabolismo dei farmaci, pazienti con severo danno d'organo possono presentare acuita sensibilità e reazioni tossiche a farmaci e medicinali (Diehl *et al*, 2004).

Le principali complicanze che si sviluppano nel paziente cirrotico sono dovute a:

- **Insufficienza epatica progressiva:** inadeguata sintesi proteica (ipoalbuminemia, disordini della coagulazione e della fibrinolisi), alterazioni del metabolismo, con predominanza dei processi catabolici, ridotta clearance, metabolismo ed escrezione di sostanze endogene (ormoni, derivati del metabolismo cellulare) ed esogene (farmaci, tossici), aumentato rischio di encefalopatia epatica, alterata sintesi e alterata circolazione enteroepatica di sali biliari, alterata clearance di antigeni e microrganismi da parte del sistema fagocitario epatico, con ipergammaglobulinemia e aumentato rischio di batteriemia e infezioni.

- **Ipertensione portale**, con sviluppo di ascite (aggravata da uno stato di ipoalbuminemia), apertura di fistole artero-venose nella circolazione splancnica e superficiale, splenomegalia e ipersplenismo, con aumentata emocateresi, apertura del flusso portale nella circolazione sistemica e formazione di varici esofagee e gastriche, suscettibili alla rottura, che aumentano ulteriormente il rischio di encefalopatia epatica

- **Sviluppo di carcinoma epatocellulare**

- **Altre:** peritonite batterica spontanea, sindrome epatorenale, sindrome epatopolmonare (Harrison, principi di Medicina Interna, 16th edition)

La diagnosi di cirrosi epatica può essere effettuata sulla base di dati clinici, biochimici ed esami complementari (gastroscopia, TAC, angiografia), ma la diagnosi definitiva è morfologica su biopsia epatica. La biopsia epatica inoltre fornisce informazioni essenziali riguardo l'eziologia, l'attività e lo stadio della cirrosi.

Altri parametri sono importanti per lo staging e la prognosi della patologia:

a) *Biochimici:* transaminasi, fosfatasi alcalina e γ -GT, bilirubina e albumina; Gammaglobulinemia; emocromo completo con conta piastrinica e tempo di protrombina. Per l'identificazione dell'eziologia sono necessari test sierologici per epatiti virali (HCV, HBV, Delta virus), determinazione degli anticorpi anti-nucleo, anti-mitocondrio e/o anti-muscolo liscio; dosaggio dei livelli di saturazione della transferrina e della ferritina; dosaggio della ceruloplasmina e dei livelli di rame nel siero.

b) *Ecografici:* l'ecografia epatica permette la valutazione della morfologia e della struttura anatomica del fegato e dell'albero biliare e può distinguere la presenza di noduli o epatocarcinoma, la presenza di ascite o segni ecografici di ipertensione portale.

c) *Tecniche di imaging* (TAC; RMN, Angiografia, Endoscopia): sono esami complementari che permettono l'identificazione e la determinazione di noduli tumorali maligni, ipertensione portale, varici gastriche ed esofagee.

1.3 Prognosi

La prognosi della cirrosi epatica dipende dall'eziologia, dal quadro anatomo-patologico, dallo stato di funzionalità dell'organo e dalla presenza di complicanze. La classificazione in base al punteggio di Child-Turcutte-Pugh (CTP) definisce il grado di severità della cirrosi epatica. Esso si basa su parametri sia clinici che biochimici: ascite, encefalopatia epatica,

concentrazione di albumina e bilirubina sierica e tempo di protrombina (PT) (Graziadei *et al*, 2006). I pazienti vengono classificati in base a un punteggio complessivo in A, B e C, con un progressivo aumento di severità dell'epatopatia dalla A alla C (Tabella 2.4).

Classificazione secondo Child-Turcutte-Pugh

Punteggio	1	2	3
Bilirubina sierica (mg/dl)	<2	2-3	>3
Albumina (g/dl)	>3.5	3-3,5	<3
PT (allungamento in sec)	0-4	4-6	>6
Ascite	assente	facilm. controllata	scarsam. controllata
Encefalopatia	assente	minima	avanzata

Child A: 5-6 punti

Child B: 7-9 punti

Child C: >10 punti

Si parla di cirrosi “scompensata” per punteggi CTP maggiori o uguali a 7 (classe B e C). Essa è stata utilizzata anche per fornire criteri standard per l'inserimento dei pazienti nelle liste per trapianto di fegato (classe B). Per tale scopo si utilizza attualmente un nuovo score che si basa sul modello per l'epatopatia in fase terminale (model for end-stage liver disease, MELD). Esso è un sistema di punteggio derivato in modo prospettico e progettato per prevedere la prognosi di pazienti con epatopatia e ipertensione portale (<http://www.mayoclinic.org/meld/mayomodel6.html>). Consente una valutazione più oggettiva della gravità della malattia, presenta una minor variabilità da centro a centro e possiede un più ampio range di valori. Il MELD è attualmente utilizzato per stabilire la priorità tra i pazienti in lista per trapianto di fegato (Harrison, principi di Medicina Interna, 16th edition).

Variabili utilizzate per stadiazione MELD

- Tempo di protrombina, espresso come INR
- bilirubina sierica
- creatinina sierica

2.0 Diabete mellito ed epatopatia

Alterazioni del metabolismo glucidico sono frequentemente riscontrate nei pazienti affetti da cirrosi epatica, con una percentuale di diabete mellito (DM) del 15-30% e di alterata tolleranza ai carboidrati del 60-80% (IGT) (Tietge *et al*, 2004, Hickman *et al*, 2007). Non è al momento ancora chiaro se il diabete mellito di tipo 2 (DM2), senza altre componenti della sindrome metabolica, sia un fattore di rischio per lo sviluppo e la progressione di patologie epatiche. E' noto che la presenza di cirrosi può determinare tra le sue complicanze l'insorgenza di diabete mellito noto come "diabete epatogeno". Esso non viene riconosciuto come entità nosologica distinta (ADA 2006, Standard italiani per la cura del diabete mellito 2014); inoltre la sua storia naturale è diversa da quella del DM2 in quanto meno frequentemente associato alle complicanze microangiopatiche. Esso è meno associato ai tradizionali fattori di rischio per il DM2 quali obesità, età e familiarità (Garcia-Compean *et al*, 2009).

L'eziologia della patologia epatica è un fattore importante nel determinare l'insorgenza di alterazioni glicemiche, in quanto la steatoepatopatia non alcolica (NAFLD), il consumo di alcolici, l'epatite C e l'emocromatosi sono frequentemente associate a diabete mellito (Hickman *et al*, 2007). La presenza di DM si associa ad una prognosi peggiore nei paziente cirrotici, si osserva infatti un aumento della mortalità legata alle complicanze della cirrosi (sanguinamento di varici esofagee, coma epatico, HCC, sindrome epatorenale) (Hickman *et al*, 2007, Nishida *et al*, 2006).

2.1 Il diabete mellito di tipo 2 come fattore di rischio per Nonalcoholic fatty liver disease

Numerosi autori suggeriscono un possibile ruolo eziologico del diabete mellito di tipo 2 (DM2) nelle epatopatie croniche e nell'epatocarcinoma (HCC) (El Serag *et al*, 2004 Wideroff *et al*, 1997)

La NAFLD (non alcoholic fatty liver disease) comprende una serie di patologie epatiche che vanno dalla semplice steatosi, alla steatoepatite, alla fibrosi e alla cirrosi. Si stima che un terzo degli adulti americani soffra di semplice steatosi epatica (la forma più benigna di NAFLD) che è il risultato dell'accumulo di trigliceridi negli epatociti in presenza d'insulinoresistenza, e

che frequentemente rappresenta un aspetto della sindrome metabolica (Browning *et al* 2004). La steatoepatite non alcolica (NASH) rappresenta una manifestazione severa della NAFLD, in quanto provoca steatosi, infiammazione tissutale, danno cellulare e fibrosi. Inoltre la NASH può progredire verso la cirrosi e l'insufficienza epatica ed è considerata la più comune causa di cirrosi criptogenetica (Caldwell *et al*, 1999, Garcia-Compean *et al* 2009).

I meccanismi attraverso cui il DM2 può causare NAFLD sono complessi e la steatosi, l'obesità e l'insulinoresistenza (IR) agiscono come cofattori nel provocare danno epatico.

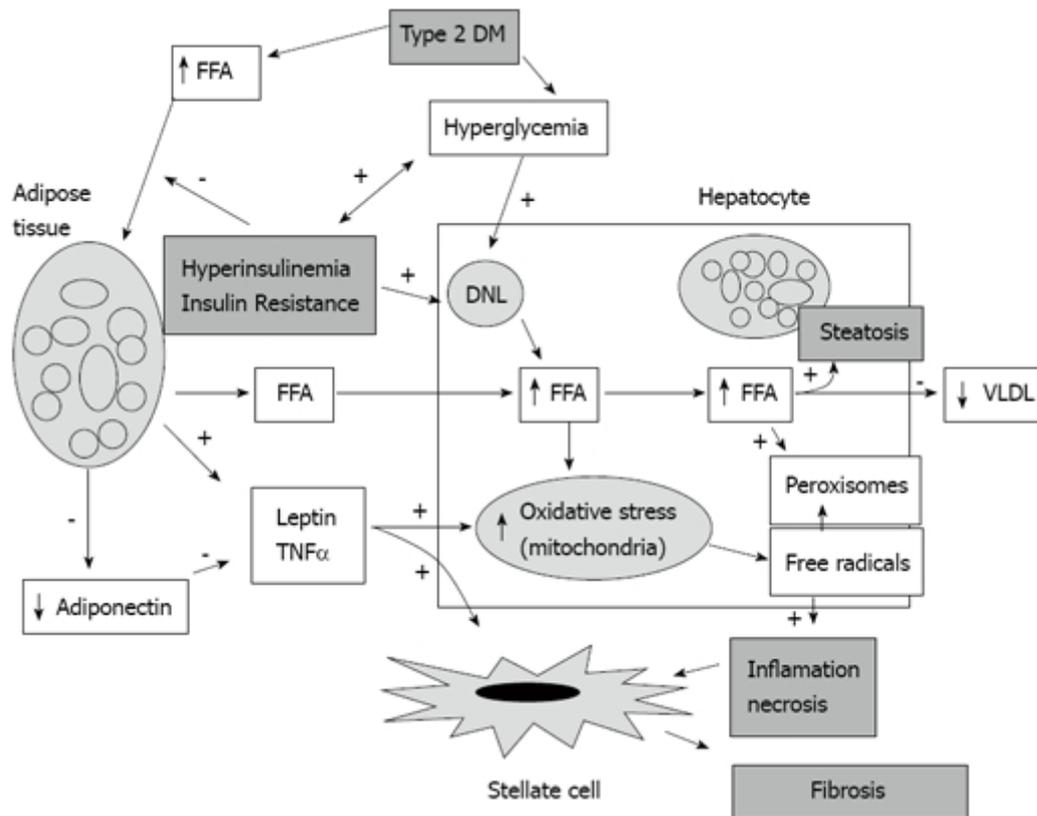
La steatosi è il risultato di un accumulo intracellulare di trigliceridi causato da un aumento dell'uptake di FFA e della liponeogenesi epatica. Allo stesso tempo, si ha una riduzione della secrezione di VLDL. Il danno epatico consiste in infiammazione e necrosi cellulare causate da un aumentato stress ossidativo mitocondriale sui trigliceridi con conseguente liberazione di radicali liberi e perossisomi.

Lo stress ossidativo mitocondriale è favorito anche dall'azione di alcune adipochine come la leptina e il TNF- α , prodotti in eccesso. La riduzione dei livelli di adiponectina, tipico degli stati d'insulinoresistenza, favorisce l'attività delle adipochine infiammatorie. Le adipochine e le citochine pro-infiammatorie attivano le cellule stellate del fegato e inducono un aumento della produzione di collagene, dei fattori di crescita tissutali ed un accumulo di matrice extracellulare, favorendo così la fibrosi (Garcia-Compean *et al*, 2009) (Figure 1).

La leptina è coinvolta nell'instaurarsi di processi fibrotici a livello epatico in quanto favorisce l'attività fagocitica e secernente citochine proinfiammatorie dei macrofagi e delle cellule di Kupffer e la produzione di ROS. La leptina inoltre agisce direttamente sulle cellule stellate (HSC) che esprimono il suo recettore (Bertolani *et al*, 2008) e l'esposizione di colture di cellule stellate alla leptina aumenta l'espressione di collagene di tipo 1. La leptina regola inoltre l'espressione tissutale dell'inibitore delle metalloproteinasi 1 (TIMP1) con conseguente minor degradazione della matrice extracellulare fibrotica (Cao *et al*, 2003). Alcuni studi su umani hanno dimostrato una correlazione diretta tra livelli di leptina e la severità della fibrosi epatica, tali dati non sono stati confermati da altri autori (Uygun *et al*, 2000; Chalasani *et al*, 2003).

L'adiponectina ha invece un ruolo epatoprotettivo. Studi condotti su topi KO per l'adiponectina mostravano lo sviluppo di una severa fibrosi epatica dopo somministrazione di CCl₄ rispetto al wild-type; inoltre si osservava un miglioramento del danno epatico nel topo wild-type dopo iniezione di adenovirus come vettore di adiponectina (Kamada *et al*, 2003). L'adiponectina sopprime la proliferazione e la migrazione delle HSC attivate e attenua l'effetto di TGF- β 1 sull'espressione di geni fibrogenici (Kamada *et al*, 2008).

Figure 1. Meccanismi di danno epatico indotto dal diabete mellito



In pazienti con NASH si osservano ridotti livelli di adiponectina rispetto a pazienti con steatosi semplice indipendentemente dal BMI e dall'insulinoreistenza, inoltre l'espressione epatica di adiponectina e del suo recettore AdipoR2 è ridotta nella NASH. (Bertolani *et al*, 2008). Nei pazienti con epatopatia cronica HCV correlata sono stati osservati valori elevati di adiponectina ed in particolare quelli con fibrosi più grave mostravano concentrazioni maggiori (Corbetta *et al*, 2011). Inoltre, tali pazienti mostravano una ridotta espressione di ADIPOR1 suggerendo uno stato di resistenza all'adiponectina. (Corbetta *et al*, 2011). Altri studi hanno evidenziato in pazienti affetti da epatopatia cronica HCV correlata una correlazione inversa tra livelli di adiponectina e grado di steatosi. La steatosi epatica è un reperto istologico comune nella epatopatia cronica dovuta ad HCV e correla con la progressione della fibrosi (Kamada *et al*, 2008).

Nei pazienti cirrotici sono state descritte elevate concentrazioni di adiponectina, probabilmente dovute anche ad un ridotto metabolismo epatico dell'adipochina (Salman *et al*, 2010)

Il TNF- α è una citochina proinfiammatoria che a livello epatico viene prodotta principalmente dalle cellule di Kupffer. L'attivazione di queste cellule induce la stimolazione del signaling

del TNF- α che è coinvolto nella patogenesi della fibrosi epatica nella NASH. Aumentati livelli di TNF- α sono stati riscontrati in corso di steatosi semplice e NASH e correlano con il grado di fibrosi epatica nella NASH (Kamada *et al*, 2008).

2.2 Diabete mellito come complicanza della cirrosi e diabete epatogeno

A seconda dell'eziologia dell'epatopatia, del grado di danno epatico e dei criteri diagnostici, l'incidenza di anomalie nell'omeostasi glucidica varia dal 60 all'80% e l'incidenza di diabete mellito dal 20 al 60% (Holstein *et al*, 2002, Nishida *et al*, 2006). È noto che già dai primi stadi delle patologie croniche del fegato si possono dimostrare insulinoresistenza e intolleranza ai carboidrati nella maggior parte dei pazienti. Il diabete si manifesta clinicamente quando la funzionalità epatica diminuisce ulteriormente, di conseguenza esso si può considerare un indice di epatopatia in fase avanzata (Garcia-Compean *et al* 2009).

In uno stato di cirrosi epatica compensata i livelli di glicemia a digiuno possono essere normali, è quindi necessario ricorrere ad un test da carico orale di glucosio per porre diagnosi di IGT o DM.

L'eziologia dell'epatopatia cronica è importante nello sviluppo di diabete, essendo l'alcol, l'epatite C, l'emocromatosi e la NASH maggiormente correlate allo sviluppo di alterazioni del metabolismo glucidico. La NASH è una manifestazione severa della NAFLD ed è associata a obesità viscerale, ipertrigliceridemia e insulinoresistenza. Il 30-45% dei pazienti affetti da NASH soffre di DM. E' inoltre stato dimostrato che l'obesità è un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di epatopatie severe. L'obesità è caratterizzata da una iperproduzione di adipochine che oltre a determinare insulinoresistenza, iperglicemia e iperinsulinemia hanno effetti a livello epatico dove favoriscono lo sviluppo di steatosi e fibrosi (come descritto nel capitolo precedente).

Anche l'epatopatia cronica HCV correlata si associa ad un aumentato rischio di sviluppare IGT e DM (Metha *et al* 2000, Knobler *et al* 2000, Garcia-Compean *et al* 2009). Inoltre nei pazienti cronicamente infetti da HCV, la steatosi epatica è presente nel 30-70% dei casi (Garcia-Compean *et al*, 2009).

Il meccanismo attraverso cui l'HCV determina insulinoresistenza e diabete non è ancora completamente chiarito. E' noto che HCV induce insulinoresistenza indipendentemente dal BMI e dallo stadio di fibrosi. Anche il genotipo di HCV ha un ruolo nel determinare i

disordini glicometabolici, essendo i genotipo 1 e 4 maggiormente associati a IR rispetto al 2 e al 3 (37% vs 17%) (Moucari *et al* 2008). È noto che i genotipi 1 e 4 sono associati a una più bassa risposta alla terapia antivirale e l'insulinoresistenza potrebbe essere un cofattore nel favorire il fallimento terapeutico osservato in questi pazienti (Garcia-Compean *et al* 2009). Questi dati non sono però stati confermati da altri autori (Aghemo *et al* 2012)

Anche i pazienti con epatopatia alcolica hanno un alto rischio relativo di sviluppare diabete, direttamente correlato con la quantità di alcol ingerito. L'alcolismo cronico si associa frequentemente a danno pancreatico con coinvolgimento anche delle insule (Garcia-Compean *et al* 2009).

L'emocromatosi, caratterizzata da un accumulo di ferro in numerosi organi, in particolare nel fegato, causato da una mutazione del gene HFE si associa frequentemente a DM. I depositi di ferro possono infiltrare infatti anche il pancreas e il miocardio. A livello pancreatico il deposito avviene principalmente negli acini della ghiandola esocrina, ma può verificarsi anche un'infiltrazione delle isole di Langerhans con danno alle β cellule. Per questo motivo il diabete può essere dimostrato in una percentuale di pazienti che va dal 50 all'85% a seconda dello stadio della patologia (Garcia-Compean *et al* 2009). Anche l'accumulo di ferro a livello epatico potrebbe contribuire ai disturbi metabolici riscontrati in tale patologia.

La patogenesi del diabete mellito legato ad epatopatia è complessa e non completamente nota. Alcuni autori hanno evidenziato valori di glicemia post-prandiale, glicemia a digiuno, insulina a digiuno e HOMA-IR significativamente più alti in pazienti con diabete epatogeno rispetto a quelli con DM 2 (Kim *et al*, 2006). È stato dimostrato come nei pazienti cirrotici le concentrazioni d'insulina a digiuno siano significativamente più alte dei controlli (Merli *et al* 1999) e come dopo trapianto epatico si riducano significativamente diventando paragonabili a quelle dei controlli (Merli *et al* 1999). Sembra quindi che l'insulinoresistenza nel diabete epatogeno sia maggiore rispetto a quella riscontrata nel DM2 e che l'alterata degradazione epatica dell'insulina possa essere causa d'iperinsulinemia (Garcia-Compean *et al* 2009).

Nell'epatopatia cronica ad uno stato di insulinoresistenza periferica si associa un'iperinsulinemia dovuta ad una ridotta "insulin extraction" da parte del fegato danneggiato e per la presenza di shunt posto-sistemici. Secondo alcuni autori l'iperinsulinemia riscontrata in pazienti cirrotici è invece legata ad un'incrementata produzione pancreatica (Garcia-Compean *et al* 2009). Tale ipotesi sembra essere rafforzata dal riscontro di aumentate concentrazioni di C-peptide che, a differenza dell'insulina, non ha una significativa clearance epatica (Merli *et al* 1999). L'iperinsulinemia di per sé può inoltre alterare l'azione periferica dell'insulina a livello muscolare ed adiposo (Lattuada *et al* 2011)

Il diabete epatogeno come il DM 2 è il risultato di una marcata riduzione della sensibilità insulinica e un difetto della secrezione β cellulare che non è in grado di compensare lo stato d'insulinoresistenza. L'IR periferica ha un ruolo importante nello sviluppo di alterazioni del metabolismo glucidico nei pazienti epatopatici come dimostrato dal fatto che dopo trapianto si osserva un miglioramento della sensibilità insulinica non solo a livello epatico ma anche muscolare e adiposo (Lattuada *et al* 2011). Fattori genetici ed ambientali (HCV, consumo di alcol) possono inoltre intervenire in una ridotta secrezione β cellulare. Sembra dunque che l'alterato metabolismo glucidico sia causato da uno stato di insulino resistenza a livello muscolare ed una risposta beta cellulare insufficiente a compensare il difetto di azione insulinica. Il diabete mellito compare in seguito ad un ulteriore peggioramento della secrezione insulinica associato allo sviluppo di insulinoresistenza a livello epatico (Garcia-Compean *et al*, 2009).

2.3 Il diabete mellito di tipo 2 ed il diabete epatogeno aggravano la cirrosi epatica e l'HCC

Studi retrospettivi hanno evidenziato l'associazione tra diabete mellito e maggior rischio di complicanze in pazienti con cirrosi di qualsiasi eziologia (Holstein *et al*, 2002; Harrison, 2006; De Marco *et al*, 1999).

È importante notare che né il Child-Pugh Score né il MELD Score, utilizzati come strumento prognostico di morbilità e mortalità a breve e lungo termine nei pazienti cirrotici, includono fra i loro parametri il DM o l'intolleranza ai carboidrati.

Alcuni studi hanno valutato il ruolo del DM come fattore prognostico indipendente in pazienti cirrotici identificando l'albumina, l'ascite, l'età, l'encefalopatia, la bilirubina, il diabete e i livelli di piastrine come fattori prognostici negativi. La maggior mortalità nei pazienti cirrotici e diabetici non era attribuibile a complicanze del diabete, ma ad un aumentato rischio di insufficienza epatica (Bianchi *et al*, 1994). In un altro studio effettuato su pazienti cirrotici con ascite refrattaria, in lista per trapianto epatico, l'HCC e il DM, ma non il Child-Pugh score, sono stati identificati come fattori predittivi indipendenti di mortalità (Moreau *et al*, 2004).

Nello studio di Nishida *et al* un gruppo di 56 pazienti cirrotici con normali glicemie a digiuno è stato sottoposto a test da carico orale di glucosio. Il 38% della popolazione risultava affetta

da diabete mellito, il 23% da intolleranza ai carboidrati, mentre nel 39% i livelli di glicemia rimanevano nel range di normalità. Dopo 5 anni di follow-up, il gruppo dei pazienti con DM e intolleranza ai carboidrati registrava una più alta mortalità rispetto ai pazienti euglicemici (44% e 32% vs 5%, rispettivamente) (Nishida *et al* 2006).

Il diabete epatogeno ha un comportamento clinico diverso rispetto al DM2: è infatti meno frequentemente associato a retinopatia e a complicanze renali e cardiovascolari.

Nei pazienti cirrotici con DM la causa più frequente di morte è l'insufficienza epatica.

Attualmente, il diabete mellito è considerato un fattore di rischio per l'insorgenza di HCC insieme all'epatite B, C e alla cirrosi alcolica. Inoltre la presenza di DM in pazienti con HCC si associa ad una minor sopravvivenza a 1 anno (Garcia-Compean *et al*, 2009).

Il meccanismo attraverso cui il diabete peggiora il decorso clinico della cirrosi non è stato ancora completamente chiarito. Il diabete accelera la fibrosi e l'infiammazione, portando più rapidamente a insufficienza epatica, ed incrementa l'incidenza di infezioni batteriche, peggiorando il quadro di immunodepressione tipico dei pazienti affetti da cirrosi. È noto che i pazienti con peritoniti batteriche spontanee hanno un elevato rischio di mortalità dovuto a sepsi, insufficienza epatica e sindrome epato-renale (Garcia-Compean *et al*, 2009).

L'IR nell'epatite C promuove la progressione della fibrosi epatica attraverso diversi meccanismi: steatosi epatica, iperleptinemia e aumento dei livelli di TNF- α . Le cellule stellate epatiche presentano infatti recettori per la leptina e l'iperleptinemia riscontrata nei pazienti HCV positivi può concorrere all'attivazione delle cellule HSC e la progressione della cirrosi. Il TNF- α , che è aumentato nei pazienti HCV positivi, attiva le cellule stellate epatiche e favorisce la deposizione di collagene (Romero Gomez 2006)

2.4 Epatite C e diabete

Lo spettro di severità delle epatopatie associate a HCV è molto ampio e varia da una lieve fibrosi a quadri di cirrosi (Negro *et al*, 2009). Questa variabilità sembra dipendere da numerosi fattori, spesso ospite-dipendenti, come l'età, il sesso maschile, il consumo di alcolici, il sovrappeso, lo stato immune e la presenza di co-infezioni (Alberti *et al*, 2005). Anche la presenza di alterazioni a carico dell'omeostasi glucidica è in grado di modificare il corso della patologia, già in condizioni di pre-diabete: l'insulinoresistenza è in grado sia di accelerare la progressione dell'epatite C sia di influenzare la risposta alla terapia antivirale

(Negro *et al*, 2009). L'HCV sembra inoltre coinvolto nella patogenesi dell'insulino resistenza. L'infezione da virus C è attualmente considerata una patologia sistemica, e si ritiene che circa il 38% dei pazienti con infezione da HCV svilupperà i sintomi di almeno una delle seguenti manifestazioni extraepatiche: crioglobulinemia, patologie renali, neuropatia, linfoma, sindrome di Sjogren (alta incidenza), porfiria cutanea tarda, diabete mellito (incidenza intermedia), ulcere corneali, lichen planus, fibrosi polmonare, fibromialgia, patologie tiroidee (bassa incidenza) (White *et al*, 2008; Masini *et al*, 2005). Il diabete mellito è una frequente complicanza di tutte le patologie epatiche, indipendentemente dall'eziologia, specialmente agli stadi avanzati.

Diversi studi hanno evidenziato un maggior rischio di sviluppare DM in pazienti HCV positivi rispetto ai soggetti con HBV (Wang *et al*, 2007, White *et al*, 2008).

I maggiori fattori di rischio per lo sviluppo di diabete mellito in pazienti affetti da HCV sono: età avanzata, obesità, fibrosi epatica severa, familiarità per DM (Hui *et al*, 2003, Mehta *et al*, 2003). I pazienti che vanno incontro a trapianto di fegato per cirrosi HCV correlata hanno inoltre un rischio aumentato di sviluppare diabete dopo il trapianto (Noto *et al*, 2006).

Diversi autori hanno inoltre dimostrato come il trattamento dell'infezione da HCV riduca l'incidenza annuale di diabete (Arase *et al* 2009). Aghemo e collaboratori hanno evidenziato come l'eradicazione del virus prevenga lo sviluppo (HOMA-IR > 2) o il peggioramento dell'insulinoresistenza (Aghemo *et al* 2012).

I meccanismi attraverso cui l'HCV può provocare diabete non sono ancora completamente noti. Si ritiene che esso agisca da un lato attraverso l'induzione di insulinoresistenza e steatosi, e dall'altro attraverso una graduale distruzione delle cellule insulari, con conseguente deficit insulinico (Garcia-Compean *et al*, 2009)

Per quanto riguarda l'induzione di IR si ritiene che HCV possa agire sia per via diretta che indiretta. Il meccanismo diretto ipotizza un'interferenza tra HCV core protein ed il signalling intracellulare dell'insulina. Nello studio di Aytug è stato evidenziato come nei soggetti HCV positivi vi sia una ridotta fosforilazione di IRS-1 indotta e un'alterata attivazione di fosfatidilinositolo3kinasi con conseguente alterata fosforilazione di Akt (Aytug *et al* 2009).

Un altro studio ha evidenziato una ridotta espressione di IRS1 e IRS 2 negli epatociti di soggetti HCV positivi e in fegati di topi transgenici HCV core, proponendo come possibile meccanismo l'incrementata espressione di SOCS3 indotta da HCV core protein e la conseguente degradazione proteosomica ubiquitina mediata di IRS-1 e IRS-2 (Kawaguchi *et al*, 2004).

Un'altra molecola che contribuisce all'IR indotta dal virus C è la proteinfosfatasi 2A (PP2A)

che risulta overespressa nell'infezione da HCV. PP2A contribuisce alla patogenesi dell'insulinoresistenza nei pazienti con epatopatia HCV correlata attraverso la defosforilazione e quindi l'inattivazione di PKB/Akt. Inoltre tale proteina è in grado di inibire il segnale di interferone e questo potrebbe spiegare il link tra insulinoresistenza e ridotta risposta clinica all'interferone nell'epatopatia HCV correlata (Bernsmeier *et al*, 2008).

HCV agisce inoltre in maniera indiretta promuovendo la produzione di citochine infiammatorie in particolare IL 18 e TNF- α (Vanni *et al* 2009).

L'espressione dell'mRNA di TNF- α è fortemente correlata al grado di severità dell'epatopatia ed al livello di insulinoresistenza, in modelli sia animali che umani (Cheung *et al*, 2000, Greenberg *et al*, 2002, Konrad *et al*, 2000, Ruan *et al*, 2003).

E' stata evidenziata una correlazione positiva tra la concentrazione di TNF- α e la carica virale di HCV (Elsammak *et al*, 2005).

TNF- α può indurre IR attraverso diversi meccanismi. Esso infatti stimola la produzione di SOC-3 che inibisce la fosforilazione di Akt e fosfatidilinositono3kinasi con conseguente alterazione del signalling intracellulare dell'insulina, riduzione dell'espressione di GLUT4 e blocco dell'uptake di glucosio (Romero-Gomez, 2006), riduce l'espressione di IRS-1 e stimola la lipolisi con conseguente incremento degli acidi grassi liberi che incrementano l'insulinoresistenza a livello epatico e muscolare (Greenberg *et al*, 2002) (Figura 2). In modelli murini il blocco del TNF- α , operato per mezzo di farmaci quali l'infliximab, previene la comparsa d'insulinoresistenza. Inoltre l'iperproduzione di TNF- α in pazienti con epatopatia cronica di tipo C correla con una più rapida progressione della fibrosi e bassa risposta alla terapia con interferone (Romero-Gomez, 2006).

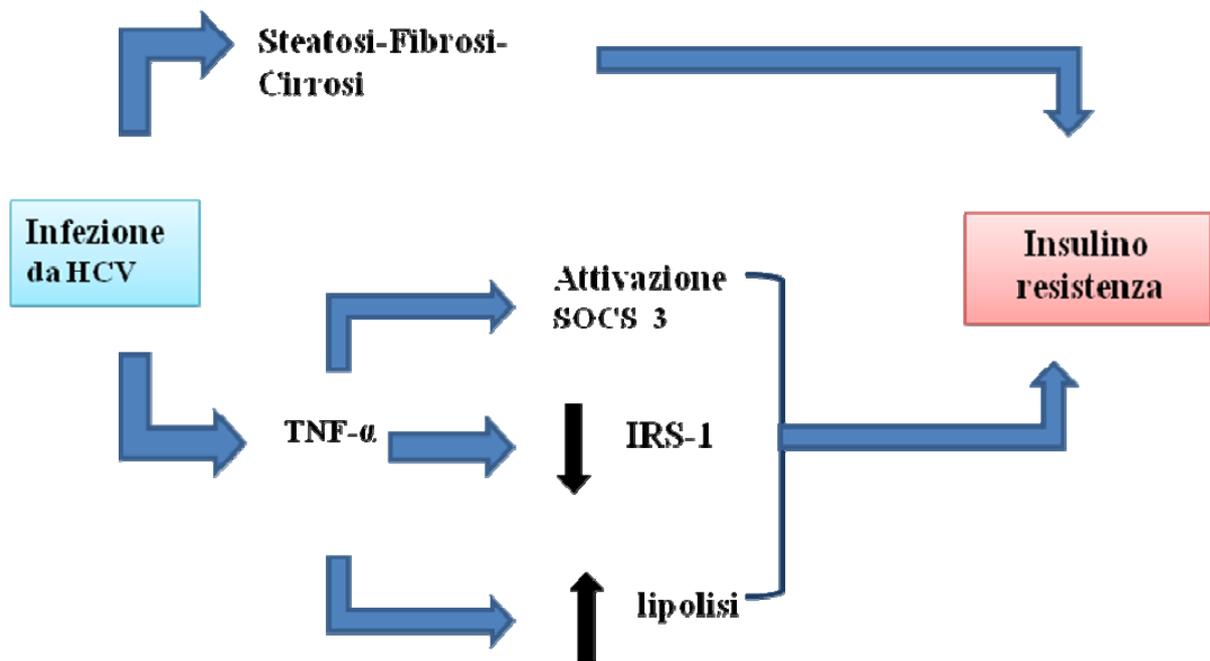
L'epatite HCV correlata è inoltre caratterizzata dalla presenza di steatosi determinata dallo stato di IR (Noto *et al* 2006), ma anche l'eccessivo accumulo di lipidi a livello epatico influenza negativamente l'insulinosensibilità (Lattuada *et al* 2011, Noto *et al* 2006). Si è infatti osservato come la riduzione dei trigliceridi intracellulari migliori la sensibilità insulinica (Noto *et al* 2006). E' possibile che l'insulinoresistenza indotta da HCV aumenti dopo lo sviluppo di steatosi creando un circolo vizioso (Noto *et al* 2006).

Alcuni studi hanno dimostrato l'effetto citopatico diretto di HCV sulle β -cellule (Masini *et al*, 2005), in cui il virus causa modificazioni della morfologia cellulare e una ridotta secrezione di insulina dopo stimolo glicemico in vitro.

Il diabete nei pazienti affetti da HCV si presenta come una complicanza temibile, in quanto associata ad una peggiore prognosi ed ad un aumentato rischio di carcinoma epatico (El-Serag *et al* 2004).

Per evitare una sottostima dell'incidenza del DM, i pazienti affetti da cirrosi HCV correlata dovrebbero essere sottoposti a test da carico orale di glucosio (OGTT), dal momento che il dosaggio della glicemia a digiuno è spesso un test poco sensibile nel riconoscimento delle alterazioni a carico del metabolismo glucidico (Huang *et al*, 2008).

Figura 2. Meccanismi patogenetici dell'insulinoresistenza nell'infezione da HCV



2.5 Il trapianto epatico

Il trapianto epatico è considerato il trattamento più efficace per un gran numero di epatopatie terminali che non possono più giovare di trattamenti medici.

Attualmente, i tassi di sopravvivenza a uno, tre e cinque anni dopo trapianto epatico negli Stati Uniti, sono rispettivamente del 87.6%, 79.9% e 74.5% (*United Network for Organ Sharing, 2006*). Le principali indicazioni per trapianto di fegato nell'adulto sono: cirrosi virale (HBV, HCV), cirrosi alcolica, malattie colestatiche (PBC, PSC), insufficienza epatica fulminante (HBV, HAV, amanita phalloides, paracetamolo), epatite autoimmune, malattie epatiche vascolari (Budd Chiari), malattie metaboliche (M. di Wilson, Emocromatosi) e tumori maligni del fegato (1 nodulo solitario < 5 cm o 3 noduli < 3 cm).

2.6 La terapia immunosoppressiva nel trapianto epatico

I recenti miglioramenti delle terapie immunosoppressive hanno drasticamente modificato l'outcome dei pazienti dopo trapianto epatico. Tuttavia, il rigetto cronico e la sopravvivenza a lungo termine dell'organo rimangono grandi problemi nella gestione del paziente trapiantato (Encke *et al*, 2004).

Con l'aumentata sopravvivenza dei pazienti dopo trapianto d'organo è cresciuta la preoccupazione per le complicanze a lungo termine: malattie cardiovascolari, infezioni, neoplasie *de novo* e compromissione della funzione renale in gran parte legata alla terapia immunosoppressiva (Kuramitsu *et al* 2014).

I più importanti farmaci immunosoppressori attualmente in uso, corticosteroidi e inibitori delle calcineurine, sono stati riconosciuti come fattori di rischio rilevanti per lo sviluppo di diabete mellito post-trapianto che, insieme a nefrotossicità farmaco-indotta, ipertensione arteriosa, osteoporosi, iperlipidemia e neuropatia, rappresenta una delle complicanze della terapia anti-rigetto (Weir, 2001).

Ciclosporina

Dal 1970 è stata introdotta una nuova categoria di agenti immunosoppressori, attualmente fondamentali: gli "inibitori delle Calcineurine" (CNIs).

L'introduzione degli inibitori delle calcineurine è stata associata a un decremento dell'incidenza di diabete mellito post trapianto, poiché ha permesso la riduzione del dosaggio di corticosteroidi nel trattamento del rigetto acuto (Weir, 2001).

Al momento ne sono disponibili due tipi: Ciclosporina (CyA) e Tacrolimus.

Sia la ciclosporina che il tacrolimus hanno proprietà diabetogene, che possono essere aggravate da alte dosi di corticosteroidi.

La Ciclosporina agisce sopprimendo l'immunità cellulo-mediata attraverso l'inibizione delle cellule T. Questa avviene tramite l'interazione del farmaco con un recettore proteico citoplasmatico, il cui legame non permette l'attivazione della fosfatasi calcineurina calcio e calmodulina dipendente. Si ritiene che la calcineurina espliciti un ruolo essenziale nella trascrizione dell'interleuchina 2 (IL-2) e di altre citochine, la cui produzione da parte delle cellule T è una parte centrale della risposta immune (Post *et al*, 2005).

La ciclosporina è metabolizzata prevalentemente a livello epatico dal Citocromo P450-3A.

Gli effetti collaterali principali rimangono la nefrotossicità, che può portare a insufficienza renale nel 20% dei casi, disordini metabolici come iperpotassiemia, ipomagnesiemia,

iperlipidemia, e iperglicemia. Sono inoltre comuni ipertensione, irsutismo e iperplasia gengivale. Una percentuale dal 10 al 28% dei pazienti presenta manifestazioni neurologiche, che variano da tremore e neuropatia periferica a psicosi, allucinazioni, debolezza motoria e convulsioni (Schrem *et al*, 2004).

In vitro, è stato dimostrato che la ciclosporina altera la risposta insulino-secreatoria delle cellule β -pancreatiche al glucosio, presumibilmente attraverso un'azione sulla calmodulina. Esperimenti su modelli animali hanno dimostrato che l'esposizione a breve termine a dosi elevate di ciclosporina (15-50 mg/die) causa ridotta secrezione insulinica, diminuita riserva pancreatica dell'ormone e alterata espressione genica dell'insulina (Wahlstrom *et al*, 1992, Polastri *et al* 2002); tutti questi effetti sono reversibili con l'interruzione del farmaco (Wahlstrom *et al*, 1992).

Tacrolimus

Il Tacrolimus è un macrolide con un effetto immunosoppressivo 100 volte più potente della ciclosporina ed esplica la sua azione, legandosi alle proteine di legame FK (FKBP12) ed inibendo le calcineurine (protein-fosfatasi calcio/calmodulina dipendenti), responsabili della defosforilazione e traslocazione nel nucleo di NFAT (nuclear factor of activated T cell) e della successiva trascrizione di IL-2, IL-3, IL-4, IL-8, e vari agenti chemiotattici. Il metabolismo segue la stessa via dei citocromi della ciclosporina a livello epatico (Post *et al*, 2005, Radu *et al* 2005).

Nonostante abbiano un meccanismo di azione simile, gli effetti collaterali del tacrolimus e della ciclosporina sono differenti: sebbene la nefrotossicità sia sovrapponibile, alcuni autori hanno evidenziato che i pazienti trattati con tacrolimus presentano un'augmentata incidenza di diabete (Encke *et al* 2004), ma un miglior profilo di rischio cardiovascolare per la ridotta incidenza di ipertensione arteriosa e dislipidemia (Polastri *et al* 2002, Encke *et al*, 2004). Inoltre il Tacrolimus determina una minor insorgenza di irsutismo e iperplasia gengivale (Encke *et al*, 2004).

Alcuni autori hanno evidenziato un maggior effetto diabetogeno del Tacrolimus rispetto alla ciclosporina (Weir *et al* 2001, Encke *et al*, 2004). L'elevata incidenza del diabete mellito associato alla terapia con tacrolimus potrebbe ridursi dopo il primo periodo post-operatorio, consensualmente alla riduzione del dosaggio di corticosteroidi e/o di tacrolimus stesso.

Per altri autori l'incidenza di DM non differisce tra pazienti trattati con tacrolimus e ciclosporina (Van Hooff *et al* 2004).

L'esatta eziologia dell'effetto diabetogeno del tacrolimus è ancora incerta. In studi su modelli animali, gli effetti del tacrolimus sulle cellule insulari e sulla secrezione insulinica si sono rivelati simili a quelli della ciclosporina; tuttavia, gli effetti del tacrolimus sono maggiormente rilevanti sugli esseri umani (Weir, 2001).

In isole pancreatiche e linee β -cellulari, sia il tacrolimus che la ciclosporina si sono dimostrati in grado di diminuire i livelli di mRNA, il contenuto di insulina e la secrezione insulinica (Herold *et al*, 1993, Redmon *et al*, 1996, Oetjen *et al* 2003).

Lo studio di Oetjen condotto su ratti transgenici ha evidenziato che sia il tacrolimus che la ciclosporina inibiscono la trascrizione genica dell'insulina umana glucosio stimolata. Tale inibizione avviene a concentrazioni di farmaco tali da inibire l'attività fosfatase della calcineurina. Secondo gli autori l'attività fosfatase delle calcineurine stimolata dal glucosio ed inibita dal tacrolimus sembrerebbe una parte importante del signaling glicemico al gene dell'insulina umana nelle cellule insulari (Oetjen *et al* 2003). Il Tacrolimus riduce notevolmente il numero dei granuli secretori nelle β cellule in maniera reversibile con la riduzione della dose di farmaco (Radu *et al* 2005).

Uno studio su ratti ha evidenziato, dopo esposizione al farmaco, una ridotta secrezione insulinica glucosio-indotta senza alterazioni del contenuto insulinico nelle β cellule e non ha mostrato un incremento di necrosi o apoptosi delle cellule insulari. Lo stesso studio ha evidenziato una ridotta attività della glucokinasi (che agisce come "sensore di glucosio" nelle β cellule pancreatiche) nelle cellule insulari trattate con tacrolimus verosimilmente responsabile della ridotta secrezione insulinica indotta dal glucosio (Radu *et al* 2005).

E' stata inoltre evidenziata una citotossicità del farmaco sulle β cellule in vivo (Polastri *et al* 2002).

Corticosteroidi

I corticosteroidi sono stati la pietra miliare della terapia immunosoppressiva fino all'avvento degli inibitori delle calcineurine e continuano ad essere parte sia della terapia del rigetto cellulare acuto che della terapia di mantenimento.

I corticosteroidi esplicano il loro effetto immunosoppressivo bloccando l'espressione di citochine da parte delle cellule T e delle cellule presentanti l'antigene (Danovitch *et al*, 2001). Inoltre inibiscono la migrazione e la fagocitosi macrofagica.

Molti effetti collaterali sono associati alla terapia a lungo termine con corticosteroidi: diabete mellito, infezioni batteriche e fungine, osteoporosi, sindrome di Cushing, ipertensione,

iperlipidemia, irsutismo, aumentato rischio di ulcere gastriche, esofagee e cataratta. Complicanze cardiovascolari con aumentato rischio di morbilità e mortalità sono state associate alla terapia a lungo termine con steroidi.

Il principale meccanismo con cui i corticosteroidi (GC) inducono diabete è l'aumentata insulinoresistenza. I GC inducono un incremento della gluconeogenesi epatica sia per induzione dell'espressione degli enzimi coinvolti nella gluconeogenesi (PEPCK, G6Pase), che per un maggior apporto di substrati dovuto ad un aumento della lipolisi e della proteolisi indotto dai GC (van Raalte *et al*, 2009, Fardet *et al* 2014). A livello del tessuto adiposo e muscolare determinano ridotto uptake di glucosio per ridotta espressione e fosforilazione di IRS-1, PI3K, AKT, ridotta migrazione di GLUT 4 e ridotta sintesi di glicogeno (van Raalte *et al*, 2009). Inoltre i GC riducono la secrezione insulinica diminuendo l'espressione di GLUT2 e della glucokinasi. Conseguentemente si osserva una diminuzione dell'uptake di glucosio e della sua fosforilazione con riduzione di sintesi di ATP, minor influsso di calcio e ridotta secrezione di insulina. Inoltre i GC determinano, agendo sui canali del K, delle correnti ripolarizzanti con ulteriore riduzione del calcio intracellulare e conseguentemente della secrezione insulinica (Ullrich *et al*, 2005). La ridotta secrezione d'insulina è accentuata dal concomitante utilizzo degli inibitori delle calcineurine.

Inoltre vi è evidenza della correlazione dose-dipendente tra corticosteroidi e sviluppo di diabete mellito post-trapianto: dosaggi ridotti e una durata minore del trattamento steroideo sono entrambi associati ad una diminuita incidenza di diabete (Räkel *et al*, 2011).

Antimetaboliti

- L'Azatioprina è stato il primo antimetabolita utilizzato nella terapia immunosoppressiva dei trapiantati di fegato. L'azatioprina è un derivato imidazolico delle purine ed la sua azione risulta in una inibizione della sintesi di DNA, RNA e proteine (Post *et al*, 2005).

- Il Micofenolato Mofetile (MMF) causa l'inibizione della sintesi *de novo* di nucleotidi purinici, attraverso l'interazione con la deidrogenasi inosina monofosfato, e quindi il blocco della replicazione del DNA nei linfociti B e T (Post *et al*, 2005).

In studi sul cellule insulari di ratto il MMF si è dimostrato capace di inibire la funzione β cellulare e indurre l'apoptosi delle β cellule, tuttavia in studi sull'uomo non sembra alterare la secrezione insulinica né la sua espressione genica nelle cellule pancreatiche (Polastri *et al* 2002)

Studi preliminari suggeriscono che l'utilizzazione del micofenolato mofetile in combinazione con ciclosporina o tacrolimus nei trapiantati di fegato riduca l'incidenza del rigetto acuto e permetta la diminuzione del dosaggio di corticosteroidi.

- Il sirolimus è una molecola strutturalmente simile al tacrolimus con proprietà immunosoppressive, antineoplastiche e antifungine. Il sirolimus si lega alle molecole FKBP12 e blocca l'attivazione delle cellule B e T mediata da citochine. Nonostante il sito di legame sia lo stesso del tacrolimus (FKBP12), il sirolimus ha un meccanismo di azione differente ed impedisce la progressione del linfocita T alla fase S del ciclo cellulare (Post *et al*, 2005). Anche il sirolimus è stato riconosciuto recentemente come potenzialmente diabetogeno (Räkel *et al*, 2011).

2.7 Il trapianto epatico e le sue complicanze metaboliche

La sopravvivenza dei pazienti trapiantati è aumentata significativamente nell'ultima decade, fino a raggiungere l'85% nella maggior parte delle unità di trapianto (Lopez *et al*, 2006). La prolungata sopravvivenza dopo trapianto epatico, nella maggioranza dei casi superiore ai 10 anni, ha portato i pazienti trapiantati a dover affrontare anche l'aumentata incidenza di alterazioni metaboliche che frequentemente affliggono la popolazione occidentale: obesità e diabete (Correia *et al*, 2003).

L'uso di agenti immunosoppressivi, necessari per evitare il rigetto d'organo, può causare molteplici disordini metabolici (dislipidemia, obesità, diabete mellito), disfunzioni renali, ipertensione arteriosa, malattie ossee e neoplasie. La maggior parte di queste complicanze tardive determina un aumentato rischio cardiovascolare (Asfar *et al*, 1996).

La comparsa di alterazioni del metabolismo del glucosio, che colpisce dal 2 al 38% dei pazienti è riconosciuta da molti anni come complicanza del trapianto d'organo (Räkel *et al*, 2011, Khalili *et al*, 2004). Prima dell'avvento della ciclosporina come farmaco anti-rigetto, la terapia immunosoppressiva con alte dosi di corticosteroidi causava diabete mellito post-trapianto (new-onset diabetes after transplantation: NODAT) in più del 40% dei pazienti (Friedman *et al*, 1985). Negli ultimi anni l'incidenza di diabete mellito post-trapianto si è dimezzata, verosimilmente grazie alle nuove terapie (Valderhaug *et al*, 2007).

Stime precise dell'incidenza di NODAT sono difficili da definire in quanto nei vari trial clinici vengono usati diversi criteri diagnostici per il diabete e manca l'identificazione dei pazienti affetti da diabete prima del trapianto epatico (Reisæter *et al*, 2001).

La maggior parte dei casi di diabete post-trapianto si sviluppa entro il primo anno dall'intervento, sebbene vi siano sporadici casi di insorgenza dopo 4 o 5 anni dal trapianto (Paolillo *et al*, 2001).

La comparsa di diabete post-trapianto si associa ad un aumento della mortalità e del rischio di rigetto. Inoltre la maggior incidenza di infezioni e l'incrementato rischio di sepsi contribuisce ad aumentare il tasso di mortalità a breve termine (Baid *et al*, 2001, John *et al*, 2002, Younossi *et al* 2014).

Una diagnosi precoce ed un appropriato trattamento del diabete nei pazienti trapiantati permette di migliorarne la qualità di vita e di ridurre le complicanze a lungo termine di tale patologia.

La presenza di DM pre trapianto si associa inoltre ad una minor sopravvivenza e maggiori complicanze cardiovascolari (Younossi *et al* 2014) ed infettive (John *et al*, 2001).

Sebbene attualmente non siano ancora chiaramente definiti i fattori di rischio per lo sviluppo di diabete dopo trapianto, sono state identificate una serie di caratteristiche che sembrano predisporre i pazienti allo sviluppo di tale complicanza (Marchetti 2005, Räkel *et al*, 2011, Baid *et al*, 2001, Pham *et al* 2012) (Tabella 1)

Tabella 1. Fattori associati ad incrementato rischio di sviluppo di NODAT

- Etnia afro-americana o ispanica
- Familiarità per diabete
- Obesità
- Età > 40 anni
- Infezione da HCV
- Sindrome metabolica
- Terapia immunosoppressiva
- Alterata glicemia a digiuno o ridotta tolleranza ai carboidrati pre-trapianto
- Infezione da CMV

Il virus dell'epatite C sembra un fattore di rischio importante per lo sviluppo di diabete post-trapianto. I meccanismi coinvolti sembrano essere l'insulinoresistenza ed un effetto citopatico sulle β cellule (Räkel *et al*, 2011, Baid *et al*, 2001).

La terapia immunosoppressiva può potenziare l'effetto diabetogeno dell'infezione da HCV attraverso un incremento della replicazione virale (Baid *et al*, 2001).

Il tipo di terapia immunosoppressiva somministrata è in grado di spiegare il 74% della

variabilità di incidenza di diabete nei pazienti trapiantati (Montori *et al*, 2002).

I corticosteroidi sono noti per il loro effetto diabetogeno che appare dose-correlato (Räkel *et al*, 2011). Il meccanismo principale è l'insulinoresistenza, che determina incremento della gluconeogenesi a livello epatico, ed, a livello del tessuto adiposo e muscolare, un ridotto uptake di glucosio ed una ridotta sintesi glicogeno (van Raalte *et al*, 2009). Inoltre i GC riducono la secrezione insulinica (Ullrich *et al*, 2005).

La ridotta secrezione di insulina è accentuata dal concomitante uso degli inibitori delle calcineurine il cui effetto diabetogeno è legato principalmente ad una tossicità β cellulare. In particolare il tacrolimus sembra essere associato ad un maggior rischio di NODAT rispetto alla ciclosporina (Weir, 2001). L'incidenza di diabete dopo trapianto epatico è del 16,6% nei pazienti in terapia con tacrolimus e del 9,8% nei pazienti in terapia con ciclosporina (Dumortier *et al*, 2006). Inoltre, anche l'incidenza di alterata glicemia a digiuno si è dimostrata maggiore nei pazienti trattati con tacrolimus (47% con tacrolimus vs 38% con ciclosporina).

Le linee guida internazionali sul NODAT suggeriscono una valutazione pre-trapianto per il riconoscimento dei fattori di rischio per NODAT sia anamnestici che biochimici ed un'eventuale scelta della terapia immunosoppressiva che tenga conto della maggior predisposizione individuale allo sviluppo di diabete. Inoltre si suggeriscono eventuali modificazioni dello stile di vita quando attuabili. (Wilkinson *et al*, 2005).

Le stesse linee guida suggeriscono una valutazione periodica (1, 3, 6, 12 mesi) della glicemia a digiuno ed eventuale OGTT (Wilkinson *et al*, 2005). L'uso di OGTT è indicato anche in pazienti con normali valori di glicemia a digiuno per valutare la presenza di diabete mellito o di IGT. Inoltre i pazienti dovrebbero essere valutati per la presenza di Sindrome Metabolica ed altri fattori di rischio cardiovascolare. Pochi dati sono attualmente disponibili circa la terapia del NODAT, si consigliano modifiche dello stile di vita e, quando possibile, la riduzione delle dosi di tacrolimus, ciclosporina e glucocorticoidi, eventualmente sostituendoli con azatioprina e MMF. Per la terapia ipoglicemizzante si consiglia l'utilizzo dell'insulina nel periodo perioperatorio e quindi si rimanda alle linee guida dell'ADA per il trattamento del paziente diabetico di tipo 2 senza dare indicazioni particolari per questo tipo di pazienti (Wilkinson *et al*, 2005). Alcuni autori consigliano l'uso di biguanidi ove non ci sia una funzione renale compromessa, inibitori di α -glucosidasi, glielazide (Räkel *et al*, 2011). Primi studi sull'uso degli inibitori di DPP-4 (sitagliptin e vildagliptin) hanno fornito dati incoraggianti sull'efficacia e la sicurezza di questi farmaci nei pazienti trapiantati renali (Boerner *et al* 2014, Haidinger *et al* 2014).

2.8 Diabete epatogeno e trapianto epatico

La cirrosi epatica è caratterizzata dalla presenza di alterazioni del metabolismo glucidico (Holstein *et al*, 2002; Nishida *et al*, 2006).

La maggior parte della letteratura si è concentrata sullo sviluppo di diabete dopo trapianto d'organo ma sono presenti alcuni dati che evidenziano un possibile beneficio del trapianto epatico sull'omeostasi glucidica (Perseghin *et al* 2000, Pallayova *et al* 2013, Vlaeminck-Guillem *et al* 2000, Merli *et al* 1999).

Lo studio italiano del 2000 ha evidenziato come il trapianto epatico curi il diabete epatogeno nel 67% dei pazienti diabetici cirrotici (Perseghin *et al* 2000)

In questo studio i pazienti cirrotici erano caratterizzati da un'importante insulinoresistenza indipendentemente dalla presenza di diabete, inoltre i soggetti affetti da epatopatia e diabete mostravano un difetto secretivo che non consentiva l'ipersecrezione compensatoria presente nei cirrotici non diabetici (Perseghin *et al* 2000).

I pazienti cirrotici diabetici mostravano un'alterata regolazione della produzione endogena di glucosio che poteva essere spiegata dalla ridotta insulinizzazione epatica causata dagli shunt porto-sistemici o da alterata secrezione insulinica (Perseghin *et al* 2000)

Durante l'OGTT i pazienti diabetici cirrotici (in particolare quelli con risoluzione del diabete dopo trapianto) avevano una risposta dell'insulina e del C-peptide simile ai controlli normali, tuttavia insufficiente a mantenere normali i livelli di glicemia. I cirrotici non diabetici mostravano una maggior risposta secretiva rispetto ai controlli, compensando così l'insulinoresistenza e riuscendo a mantenere una normale glicemia. I pazienti cirrotici e diabetici presentavano quindi un difetto della funzione β cellulare che non consentiva l'ipersecrezione compensatoria di insulina che si osserva nei cirrotici non diabetici. La cirrosi sembrava quindi caratterizzata da un'elevata IR che portava allo sviluppo di diabete nei pazienti in cui le β cellule non riuscivano a compensare tale stato con un'ipersecrezione insulinica. Il trapianto epatico nei diabetici cirrotici portava alla normalizzazione della glicemia e/o alla riduzione delle terapie ipoglicemizzanti (Perseghin *et al*, 2000).

Nell'immediato post-trapianto i pazienti venivano posti in terapia insulinica (anche i pazienti diabetici che erano ben controllati con la sola dieta o la terapia orale) per le alte dosi dei corticosteroidi e lo stress dell'intervento chirurgico. I cirrotici con diabete persistente post-trapianto e quelli con normalizzazione del metabolismo glucidico non mostravano differenze significative nella terapia immunosoppressiva, né nella familiarità per DM (Perseghin *et al*, 2000).

Secondo alcuni autori la cura del diabete epatogeno post trapianto d'organo è dovuta al miglioramento dell'insulinosensibilità (Perseghin *et al*, 2000, García-Compean *et al*, 2009, Merli *et al* 1999).

Dati riguardanti il C-peptide, che si mantiene più basso durante OGTT nei pazienti diabetici non curati, (Perseghin *et al* 2000) pongono l'attenzione sul ruolo della secrezione insulinica. Sembra quindi che la cura del diabete epatogeno dopo trapianto d'organo sia dovuta ad un miglioramento della sensibilità insulinica a patto che la funzione β cellulare sia mantenuta. Nel 33% non si aveva remissione del diabete a causa di una ridotta funzione β cellulare. Infatti i pazienti non guariti dal diabete epatogeno presentavano una minor risposta β cellulare nonostante una riduzione della IR (Perseghin *et al*, 2000, García-Compean *et al*, 2009). Il miglioramento del metabolismo glucidico e dell'insulinosensibilità sembra essere dovuto al miglioramento della clearance epatica e della disponibilità periferica di glucosio (quest'ultima verosimilmente secondaria alla correzione dell'iperinsulinemia cronica) (García-Compean *et al*, 2009). La normalizzazione dell'iperinsulinemia sembra essere dovuta o a una ridotta secrezione pancreatica o ad una ripristinata clearance epatica (Merli *et al* 1999).

2.9 Rischio cardiovascolare dopo trapianto epatico

Le complicanze cardiovascolari rappresentano secondo un recente studio la terza causa di morte (21%) nei pazienti trapiantati di fegato dopo graft failure (29%) e neoplasia (26%) (Nicolau-Raducu *et al* 2014). Lo stesso studio ha evidenziato una morbilità e una mortalità cardiovascolare del 15,2% e del 2,8% nel primo anno post trapianto ed un'associazione tra score MELD elevato e insufficienza renale acuta pre trapianto con la mortalità cardiaca. La mortalità cardiovascolare dopo il primo anno dal trapianto è del 2% e sembra essere legata a fattori di rischio quali dislipidemia, obesità, ipertensione arteriosa ed iperglicemia (Nicolau-Raducu *et al* 2014).

Inoltre, i classici fattori di rischio cardiovascolare quali diabete, ipertensione arteriosa e dislipidemia, rappresentano anche fattori di rischio per il rigetto d'organo cronico (Jardine, 2001).

Gli effetti avversi della terapia immunosoppressiva, i cambiamenti nello stile di vita, la suscettibilità genetica e i disordini metabolici preesistenti conducono in ultima analisi ad un elevato rischio per patologie cardiovascolari di origine aterosclerotica.

Il diabete post-trapianto ha un significativo impatto sul rischio di morte per patologie cardiovascolari. Il tasso di mortalità per ischemia cardiaca si è rivelato 20.8 volte maggiore in pazienti trapiantati affetti da diabete rispetto alla popolazione generale; in pazienti trapiantati non diabetici il tasso di mortalità è 6.4 volte maggiore rispetto alla popolazione generale (Lindholm *et al*, 1995).

Sebbene subito dopo trapianto epatico possa presentarsi un calo ponderale dovuto alla prolungata ospedalizzazione, nei mesi successivi l'obesità è una complicanza frequente che contribuisce ad incrementare il rischio per patologie cardiovascolari. L'aumento ponderale è soprattutto dovuto ad un incremento della massa grassa, più significativo nel primo anno dopo il trapianto e che successivamente tende a raggiungere un plateau. L'incidenza di obesità nei pazienti sottoposti a trapianto epatico è circa del 30-70% (Munoz *et al* 2005, Munoz *et al*, 1991).

L'incremento ponderale e l'obesità dopo trapianto epatico sono di origine multifattoriale (fattori genetici, mancanza di attività fisica, effetti collaterali della terapia anti-rigetto - corticosteroidi e ciclosporina - e cambiamento delle abitudini alimentari). Il tacrolimus è associato ad un minor incremento ponderale rispetto alla ciclosporina (Munoz *et al*, 2005).

Dopo il trapianto epatico, molti studi hanno confermato un'elevata incidenza di ipercolesterolemia e/o ipertrigliceridemia. L'eziologia della dislipidemia è multifattoriale (genetica, dieta), ma la principale causa rimane la terapia immunosoppressiva (in particolare corticosteroidi, ciclosporina e sirolimus). Tacrolimus e MMF si associano ad una minor incidenza di dislipidemia. (Munoz *et al* 2005, Claes *et al* 2012, Deleuze *et al* 2006).

La terapia corticosteroidica aumenta la sensazione di appetito, l'introito di nutrienti in particolare degli alimenti ad alto contenuto calorico e di grassi, la produzione e secrezione epatica di VLDL, determina incremento di peso e riduce la beta ossidazione degli acidi grassi (Fardet *et al* 2014).

La ciclosporina nel ratto aumenta la secrezione epatica di VLDL ed incrementa a livello epatico la trascrizione di alcuni geni coinvolti nella sintesi di colesterolo e del fattore di trascrizione SREBP-2 che regola i pathway di sintesi di colesterolo e acidi grassi (Wu *et al* 1999).

Le linee guida sul NODAT consigliano la terapia statinica, in particolare nei pazienti con alterazioni del metabolismo glucidico, tenendo presente la possibile interazione farmacologica

tra statine ed inibitori delle calcineurine che vengono metabolizzati dal citocromo p450. Si tende invece a sconsigliare l'uso dei fibrati per il rischio di nefrotossicità (Wilkinson *et al*, 2005).

L'ipertensione arteriosa si presenta a sua volta molto frequentemente in pazienti trapiantati di fegato e contribuisce al rischio di mortalità cardiovascolare. Approssimativamente dal 20 al 70% dei pazienti sottoposti a trapianto epatico sviluppa ipertensione arteriosa, che può perdurare nel tempo nel 30-50% dei casi (Lopez *et al*, 2006, Algareem *et al* 2014). La sua origine è multifattoriale, ma la terapia con corticosteroidi e gli effetti del trattamento con inibitori delle calcineurine (in particolare la ciclosporina) sul letto microvascolare renale appaiono essere fattori essenziali nello sviluppo di ipertensione arteriosa (Munoz *et al*, 2005). Infatti, il principale effetto secondario degli inibitori delle calcineurine è la vasocostrizione sistemica e renale, alla cui patogenesi prende parte il sistema della renina-angiotensina.

Infine, l'insufficienza renale cronica è presente a 5 anni dal trapianto epatico nel 7-21% dei pazienti. La causa principale è l'effetto nefrotossico della terapia con inibitori delle calcineurine. Questi farmaci causano insufficienza renale attraverso due meccanismi patogenetici, che spesso coesistono: 1) modificazioni funzionali che conducono a vasocostrizione delle arteriole renali, con diminuzione progressiva del filtrato glomerulare ed eventualmente sviluppo di necrosi tubolare; 2) insulti strutturali che consistono principalmente in arteriolopatia ischemica, sclerosi glomerulare, atrofia tubolare e fibrosi renale (Lopez *et al*, 2006).

Capitolo 2 – Scopo della tesi

Scopo della tesi è quello di analizzare il metabolismo glucidico in una popolazione di pazienti affetti da cirrosi epatica di diversa eziologia candidati a trapianto d'organo. In particolare lo studio si propone di quantificare la funzionalità secretoria delle cellule β del pancreas, con particolare riferimento alla 1° fase, e il grado di insulinoresistenza in questa popolazione. Inoltre lo studio si prefigge di valutare gli effetti del trapianto epatico sul metabolismo glucidico analizzando lo stato di insulinoresistenza e la secrezione β cellulare.

Capitolo 3 – Materiali e metodi

3.1 Soggetti

Sono stati valutati 107 pazienti (31 femmine e 76 maschi; età media 53.9 ± 8.8 anni) affetti da epatopatia cronica in stadio avanzato, in lista di attesa per trapianto epatico presso il Centro Trapianti di Fegato della Fondazione IRCCS Policlinico – Ca' Granda di Milano.

L'eziologia della cirrosi epatica nella nostra popolazione è risultata:

- HCV 55 pazienti (51.4%)
- HBV 12 pazienti (11.2%)
- HBV+HDV 10 pazienti (9.3%)
- Alcool 17 pazienti (15.9%)
- Autoimmune 4 pazienti (2 pazienti con colangite sclerosante e 2 con cirrosi biliare primitiva) (3.7%)
- Altro 9 pazienti (3 pazienti affetti da sindrome di Budd-Chiari, 1 da amiloidosi, 2 con colestasi croniche, 1 con s. di Rendu-Osler, 2 cirrosi criptogenetica) (8.4%)

Una volta avvenuto il trapianto epatico i pazienti sono stati rivalutati a 3, 6 e 12 mesi.

La diagnosi di diabete in questi pazienti è stata formulata secondo i criteri ADA del 2006 così come la diagnosi di alterata glicemia a digiuno (IFG; glicemia a digiuno ≥ 100 mg/dl e < 126 mg/dl) e alterata tolleranza ai carboidrati (IGT; glicemia a 2h dal carico ≥ 140 e < 200 mg/dl) (ADA, 2006),

3.2 Parametri valutati

I pazienti sono stati valutati presso l'U.O. di Endocrinologia e Diabetologia dello stesso ospedale. Sono stati raccolti i parametri antropometrici, endocrino-metabolici secondo un protocollo standardizzato e la storia anamnestica (con particolare attenzione per il problema epatico, indagando l'eziologia della cirrosi, l'anno di diagnosi di epatopatia cronica, l'andamento della patologia nel tempo con le complicanze insorte, ed eventuali terapie antivirali precedenti, con cicli di interferone e/o ribavirina).

Tutte le valutazioni sono state eseguite alle ore 8.00 dopo un digiuno di almeno 8 ore.

Le valutazioni antropometriche sono state eseguite misurando peso, altezza, circonferenza della vita e della pressione arteriosa. L'indice di massa corporea (BMI) è stato calcolato secondo la formula $\text{peso (kg)}/\text{altezza (m)}^2$.

La misurazione del BMI in pazienti affetti da cirrosi epatica può non essere affidabile come indice dello stato nutrizionale a causa degli edemi periferici e dell'ascite che spesso si accompagnano all'epatopatia cronica. Questo problema, tuttavia, non si verifica in tutti i pazienti, ed è comunque possibile formulare un giudizio clinico sulla quantità di liquido accumulata, da sottrarre al peso misurato. Gli stessi accorgimenti possono essere messi in atto per la stima della circonferenza vita.

Al basale e nel follow-up sono stati dosati glicemia, insulinemia e C-peptide, colesterolo totale, colesterolo HDL, trigliceridi, AST, ALT, γ GT, fosfatasi alcalina, bilirubina totale, pseudocolinesterasi, albumina, azotemia, creatinina, emoglobina glicata.

L'insulinoresistenza è stata misurata mediante l'homeostasis model assessment (HOMA-IR): $\text{insulina } (\mu\text{U/ml}) \times \text{glicemia (nmol/l)}/22.5$ (Matthews *et al*, 1985). L'HOMA-IR è infatti stato descritto come indice affidabile d'insulinoresistenza anche in pazienti cirrotici e dopo trapianto epatico (Perseghin *et al* 2003).

È stato infine effettuato un test da carico orale di glucosio 75 gr (OGTT) con prelievo per glicemia, insulinemia e C-peptide ai tempi 0', 15', 30', 45', 60', 90', 120', 150', 180'. I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite il Modello Minimo di Secrezione Insulinica. Prima e durante l'effettuazione del test è stata monitorata la glicemia capillare del paziente.

Le stesse valutazioni sono state eseguite durante le visite di follow-up a 3, 6 e 12 mesi dopo il trapianto epatico.

3.3 Nuove tecniche di quantificazione della funzione β cellulare

Per la quantificazione della funzione β cellulare è stato ideato un modello minimo di secrezione insulinica, da applicare a un OGTT 75g di glucosio, con prelievo per glicemia, insulina e c-peptide ai tempi 0', 15', 30', 45', 60', 90', 120', 150', 180'.

Esso è illustrato in Figura 1, alla quale sono state aggiunte le equazioni che descrivono le due componenti del gluco-sensore β -cellulare e, a valle degli eventi che precedono la secrezione insulinica, lo schema del modello bi-compartmentale della cinetica del C-peptide.

Nella Figura 2 è illustrato il dettaglio del modello minimo della cinetica del C-peptide. Le equazioni che descrivono le relazioni tra le varie componenti del modello del C-peptide sono le seguenti:

$$dCP_1/dt = ISR(t) + k_{12}CP_2(t) - [k_{01} + k_{21}]CP_1(t) \quad , \quad CP_1(0) = 0 \quad (1)$$

$$dCP_2/dt = k_{21}CP_1(t) - k_{12}CP_2(t) \quad , \quad CP_2(0) = 0 \quad (2)$$

Figura 1. Schema del modello minimo di secrezione insulinica.

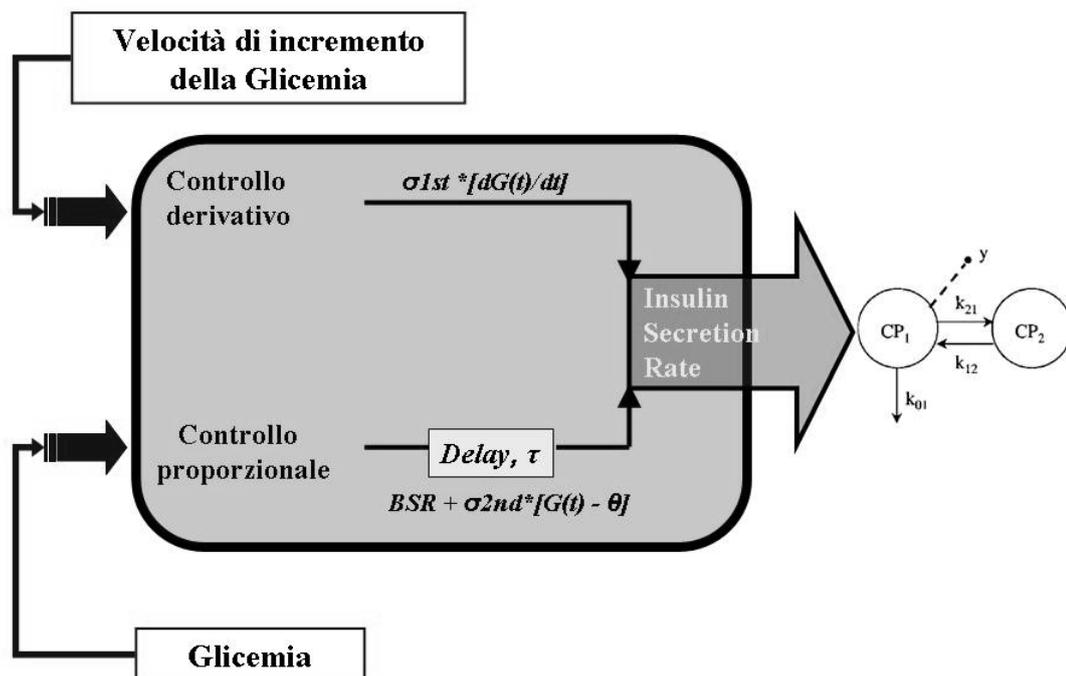
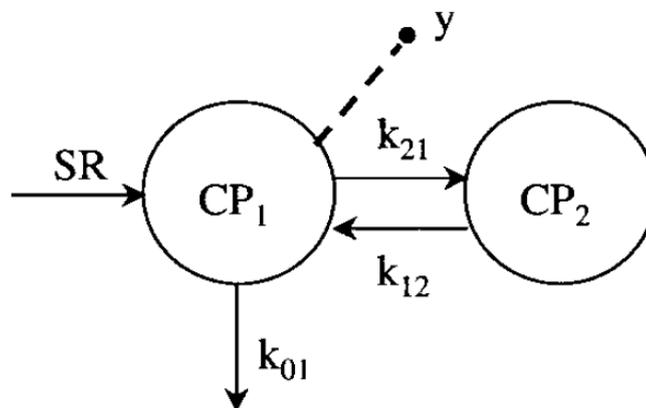


Figura 2. Modello minimo della cinetica del C-peptide.



La struttura è quella di un sistema ingresso-uscita: a monte sta **SR** ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}$), che rappresenta la secrezione insulinica (Insulin Secretion Rate) che entra nel compartimento CP_1 . **CP₁** (pmol) rappresenta la massa di C-peptide nel compartimento “accessibile” (plasma + tessuti a rapido equilibrio con il plasma); **CP₂** rappresenta la massa di C-peptide nel compartimento “periferico” (tessuti a lento interscambio con il plasma); $\mathbf{k}_{i,j}$ (min^{-1}) sono i parametri della cinetica del C-peptide: \mathbf{k}_{12} e \mathbf{k}_{21} sono i parametri di scambio tra CP_1 e CP_2 , mentre \mathbf{k}_{01} è il parametro relativo alla perdita irreversibile (rappresentata in massima parte dalla clearance renale); y (in fig. A1 e A2) indica il sito di campionamento.

È noto fin dai primi anni '70 che la secrezione insulinica mostra complessivamente un carattere bifasico; questo è più o meno evidente a seconda del tipo e dell'intensità dello stimolo glicemico cui viene sottoposta la popolazione delle β -cellule. Studi recenti hanno dimostrato l'attendibilità dell'ipotesi secondo cui l'insulina non è immagazzinata omogeneamente nel citoplasma β -cellulare, ma è distribuita in famiglie di granuli secretori, che possiedono soglie glicemiche di attivazione diverse (Cobelli *et al*, 2007, Dalla Man *et al*, 2005). Il modello della secrezione insulinica ricalca i caratteri macroscopici della fisiologia β -cellulare: la funzione $\text{ISR}(t)$ è costituita da una componente rappresentata dalla velocità di secrezione insulinica basale (BSR) e dalle componenti “statica” e “dinamica” della secrezione β -cellulare rispettivamente regolate dai parametri di “glucose sensitivity” $\sigma^{1\text{st}}$ e $\sigma^{2\text{nd}}$:

Formalmente,

$$\text{ISR}(t) = \text{BSR} + \text{SR}^{1\text{st}}(t) + \text{SR}^{2\text{nd}}(t) \quad (1)$$

dove:

$$\text{BSR} = \text{CP}_{\text{ss}} \cdot V_1 \cdot k_{01} \quad (2)$$

$$\text{SR}^{1\text{st}}(t) = \mathbf{X}^{1\text{st}}(t) \cdot T^{-1} \quad (3)$$

$$\text{SR}^{2\text{nd}}(t) = \mathbf{X}^{2\text{nd}}(t) \cdot \tau^{-1} \quad (4)$$

ISR = velocità di secrezione pre-epatica di insulina, **BSR** = velocità di secrezione insulinica basale, **SR^{1st}** = velocità di secrezione insulinica nella prima fase, **SR^{2nd}** = velocità di secrezione insulinica nella seconda fase, **CP_{ss}** = concentrazione di C-peptide in stato basale non stimolato (steady-state), **V₁** = volume [L] di distribuzione del C-peptide nel compartimento accessibile (CP_1), **X^{1st}** = quantità (massa) di C-peptide (insulina) resa disponibile per la prima fase di secrezione insulinica, **T** = *tempus*, costante di tempo della prima fase, **X^{2nd}** = quantità (massa) di C-peptide (insulina) resa disponibile per la seconda fase di secrezione insulinica, **τ** = *tau*, costante di tempo della seconda fase.

Sviluppando il differenziale rispetto al tempo per $X^{1st}(t)$ si ottiene:

$$d X^{1st}(t)/dt = \sigma^{1st} \cdot \{[dG(t)/dt]/[\log(1.1 + t)]\} - X^{1st}(t) \cdot T^{-1}$$

, se $dG(t)/dt > 0$ (3.1)

$$dX^{1st}(t)/dt = - X^{1st}(t) \cdot T^{-1} \quad , \text{ se } dG(t)/dt \leq 0 \quad (3.2)$$

Dove: σ^{1st} = parametro che regola la sensibilità al glucosio della prima fase di secrezione insulinica, G = glicemia, $\log(1.1 + t)$ normalizza rispetto al tempo il declino di σ^{1st} .

Operando similmente per $X^{2nd}(t)$ si ottiene:

$$d X^{2nd}(t)/dt = \sigma^{2nd} \cdot [G(t) - \theta] - X^{2nd}(t) \cdot \tau^{-1} \quad (4.1)$$

Dove: σ^{2nd} = parametro che regola la sensibilità al glucosio della seconda fase di secrezione insulinica, θ = soglia glicemica al di sopra della quale la β -cellula risponde con la seconda fase di secrezione insulinica.

Da notare che nell'equazione 3.1 il parametro σ_{1st} è moltiplicato – a meno dei fattori di correzione - per la derivata della glicemia rispetto al tempo ($dG(t)/dt$), mentre nell'eq. 4.1 il parametro σ_{2nd} è moltiplicato per la glicemia in quanto tale. Nel caso della seconda fase vi è dunque una proporzionalità diretta tra glicemia e insulinemia, mentre nel caso della prima fase la relazione è di tipo derivativo e riflette la dipendenza della secrezione insulinica di prima fase dalla *forma* della curva $G(t)$ e quindi dalla velocità di incremento della glicemia.

I parametri ignoti stimati dal modello sono: CP_{ss} , T , σ^{1st} , θ , τ , σ^{2nd} . In questo lavoro ci si riferisce al parametro τ con il termine di **Delay**: questo rappresenta il ritardo associato alla seconda fase, cioè l'intervallo di tempo che la β -cellula necessita per adeguare la secrezione insulinica al livello corrente di glicemia.

Dal punto di vista fisiologico, due sono gli aspetti della funzione beta-cellulare quantificati dal modello:

1. controllo derivativo (o dinamico): viene presentato come la quantità di insulina rilasciata dalla β cellula in risposta a una velocità di incremento della glicemia di $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ che dura 1 minuto [unità: $(\text{pmol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ superficie corporea})/(\text{mM} \cdot \text{min}^{-1})$]
2. controllo proporzionale (o statico): viene presentato come la curva stimolo-risposta che lega la glicemia (stimolo, asse delle x) alla velocità di secrezione di insulina (risposta biologica, asse delle y); in questo studio la velocità di secrezione di insulina (unità: $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ superficie corporea) viene presentata per le glicemie di 4.0, 5.5, 8.0, 11.0 e 15.0 mmol/l (corrispondenti a 72, 99, 144, 198, 270 mg/dl).

3.3 Statistica

I risultati sono espressi come media±deviazione standard (DS). Le differenze tra variabili continue sono state analizzate usando lo Student's t test o il test ANOVA ove appropriato. Le variabili categoriche sono state analizzate mediante test χ^2 o Fisher's exact test. Le correlazioni sono state eseguite mediante regressione lineare.

L'analisi di regressione logistica è stata utilizzata per valutare l'associazione tra il miglioramento del compenso glicemico e le seguenti variabili indipendenti: sesso, familiarità per DM, età, anni di epatopatia, HCV.

La significatività statistica è stata limitata a valori di $P < 0.05$.

Capitolo 4 – Risultati

4.1 Valutazione pre-trapianto

Sono stati valutati 107 pazienti affetti da cirrosi epatica di diversa eziologia (31 femmine e 76 maschi) non diabetici noti in lista per trapianto epatico presso il Centro Trapianti di Fegato della Fondazione IRCCS Ca' Granda- Ospedale Maggiore Policlinico. In base ai risultati del test da carico orale di glucosio i pazienti sono stati suddivisi in 3 gruppi: 54 diabetici (50.5%) (DM), 34 pre diabetici (alterata tolleranza ai carboidrati e/o alterata glicemia a digiuno) (31.8%) (pre DM) e 19 non diabetici (17.7%) (no DM).

I 3 gruppi risultano paragonabili per sesso, consumo di alcool, prevalenza di epatocarcinoma ed infezione da HCV, durata dell'epatopatia, Child-Pugh score, BMI, circonferenza della vita, valori di pressione arteriosa. I pazienti DM risultavano rispetto ai no DM significativamente più anziani (Tukey's post hoc test $P<0.05$) e con una maggior familiarità per DM (48.1 % vs 15.8% $P=0.015$). (Tabella 4.1.1)

Tabella 4.1.1. Caratteristiche anamnestiche, cliniche ed antropometriche dei pazienti affetti da diabete (DM), pre diabete (pre DM) e non diabetici (no DM).

	DM	Pre DM	No DM	P
HCV (n)	31 (57.4%)	17 (50.0%)	7 (36.8%)	0.298
Epatocarcinoma (n)	11 (20.4%)	13 (38.2%)	6 (31.6%)	0.178
Potus (n)	17 (31.5%)	11 (32.4%)	6 (31.6%)	0.996
Femmine/maschi (n)	19/35	8/26	4/15	0.353
Età (anni)	56.0±7.0	53.2±8.2	49.1±12.2	0.01
Durata dell'epatopatia (anni)	14.8±11.7	10.6±8.6	10.7±10.1	0.13
Child-Pugh score	8.9±1.8	8.1±2.3	8.2±2.3	0.25
Body mass index (kg/m ²)	26.7±3.7	26.8±3.5	25.1±3.0	0.19
Circonferenza vita (cm)	97.6±9.8	100.6±10.4	97.0±11.2	0.33
PAS (mmHg)	114.2±15.9	113.0±13.1	116.1±13.1	0.77
PAD (mmHg)	69.1±8.3	72.1±8.4	68.2±9.9	0.19

PAS: pressione arteriosa sistolica, PAD: pressione arteriosa diastolica.

Non ci sono invece differenze significative per quanto riguarda la familiarità per DM tra diabetici e pre diabetici (48.1% vs 41.2% $P=0.66$) e tra il gruppo pre DM e no DM (41.2% vs 15.8% $P=0.072$).

I pazienti diabetici presentano valori di glicemia a digiuno significativamente maggiori dei non diabetici (Tukey's post hoc test $P<0.05$). Non si evidenziano significative differenze per quanto riguarda i valori di emoglobina glicata, insulina, C-peptide, HOMA-IR e lipidi tra i tre gruppi. Tuttavia è presente un trend significativo per quanto riguarda i valori di HOMA-IR, emoglobina glicata ed insulina a digiuno (Tabella 4.1.2).

Non vi sono differenze significative della funzione renale tra i tre gruppi (Tabella 4.2.3).

Tabella 4.1.2 Dati metabolici nei 3 gruppi di pazienti

	DM	Pre DM	No DM	P
Glicemia a digiuno (mg/dl)	96.1±17.3	91.9±13.1	85.5±9.2	0.027
HbA1c (%)	5.06±0.90	4.87±0.66	4.57±0.68	0.067 [¶]
Colesterolo totale (mg/dl)	132.7±42.4	134.1±31.4	146.6±75.1	0.53
Colesterolo HDL (mg/dl)	49.1±18.4	52.5±18.6	48.3±24.2	0.66
Trigliceridi (mg/dl)	85.3±30.3	73.1±26.2	79.2±54.7	0.28
Colesterolo LDL (mg/dl)	67.0±34.0	67.3±26.6	82.5±67.4	0.32
HOMA-IR	5.49±4.26	4.97±4.82	2.87±2.26	0.088*
Insulina a digiuno (μUI/ml)	20.8±12.9	21.0±16.3	12.2±8.13	0.059 [§]
C-Peptide a digiuno (ng/ml)	4.3±1.8	3.9±1.9	3.6±1.6	0.27

*Test for linear trend $P=0.0285$

§ Test for linear trend $P=0.025$

¶ Test for linear trend $P=0.022$

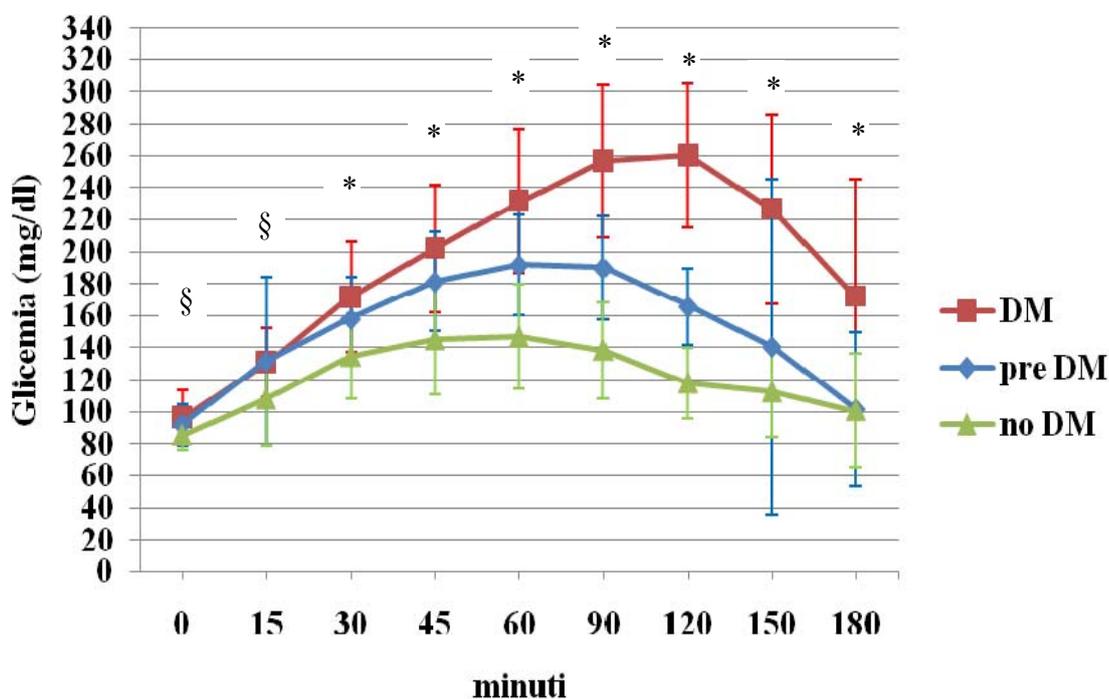
Nella tabella 4.1.3 sono presentati i dati inerenti la funzione epatica nei tre gruppi di pazienti. Nelle figure 4.1.1, 4.1.2 e 4.1.3 sono rappresentate le curve di glicemia, insulina e C-peptide durante OGTT nei tre gruppi.

Come atteso i pazienti diabetici presentano valori di glicemia significativamente più elevati dei pazienti euglicemici e pre diabetici (Fig 4.1.1).

Tabella 4.1.3 Funzione epatica e renale nei pazienti diabetici, pre diabetici e non diabetici

	DM	Pre DM	No DM	P
AST (U/l)	90.3±59.7	55.9±32.3	72.9±56.4	0.014
ALT (U/l)	56.1±39.8	38.9±28.6	63.6±69.2	0.099
γGT (U/l)	71.4±63.9	69.8±59.0	137.3±128.2	0.0079
Fosfatasi alcalina (U/l)	145.8±74.9	117.5±49.5	154.4±91.7	0.12
Bilirubina totale (mg/dl)	2.8±1.6	2.2±1.7	4.3±5.2	0.027
Pseudocolinesterasi (U/l)	2639±1849	3475±1877	2866±1922	0.16
Albumina (g/dl)	3.4±0.5	3.5±0.7	3.7±0.5	0.19
Creatinina (mg/dl)	0.9±0.3	0.9±0.4	0.9±0.2	0.96
Urea (mg/dl)	37.6±15.8	34.3±12.3	33.2±14.3	0.40

Fig 4.1.1 Valori di glicemia durante OGTT nei 3 gruppi di pazienti

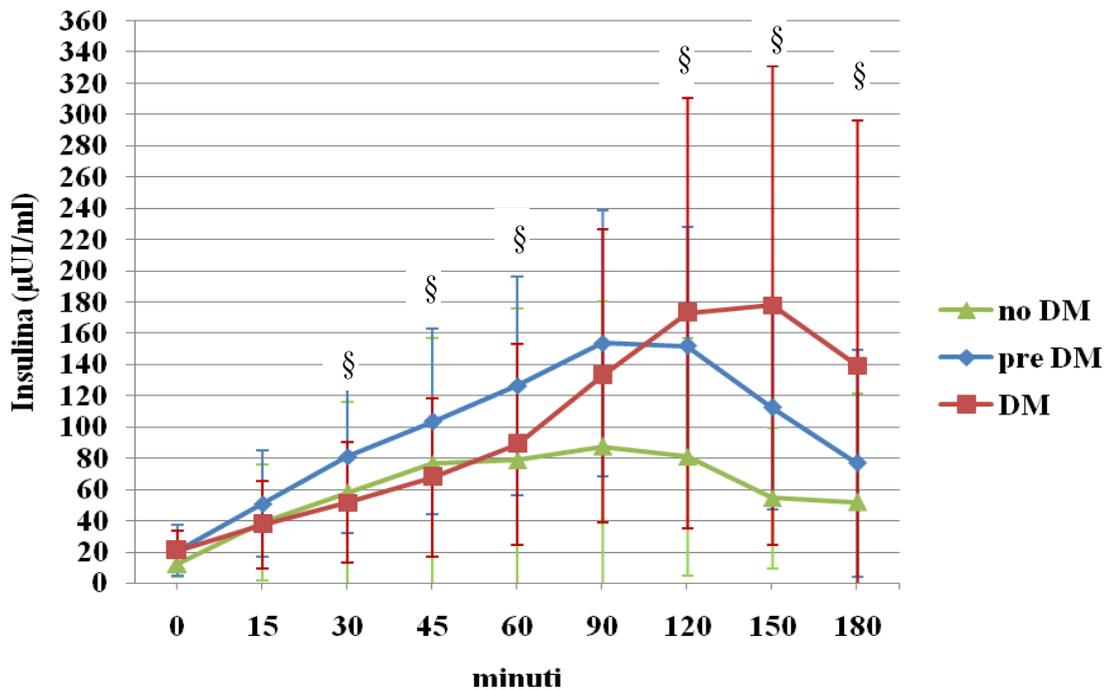


*ANOVA $P < 0.0001$ § ANOVA $P < 0.05$

I pazienti pre diabetici mostrano valori d'insulinemia significativamente più elevati dei pazienti diabetici tra i 30 e i 60 minuti (Tukey post hoc test $P < 0.05$). Dopo 120

minuti i pazienti diabetici mostrano valori d'insulina più elevati rispetto ai pazienti euglicemici (Tukey post hoc test $P<0.05$) (Fig. 4.1.2)

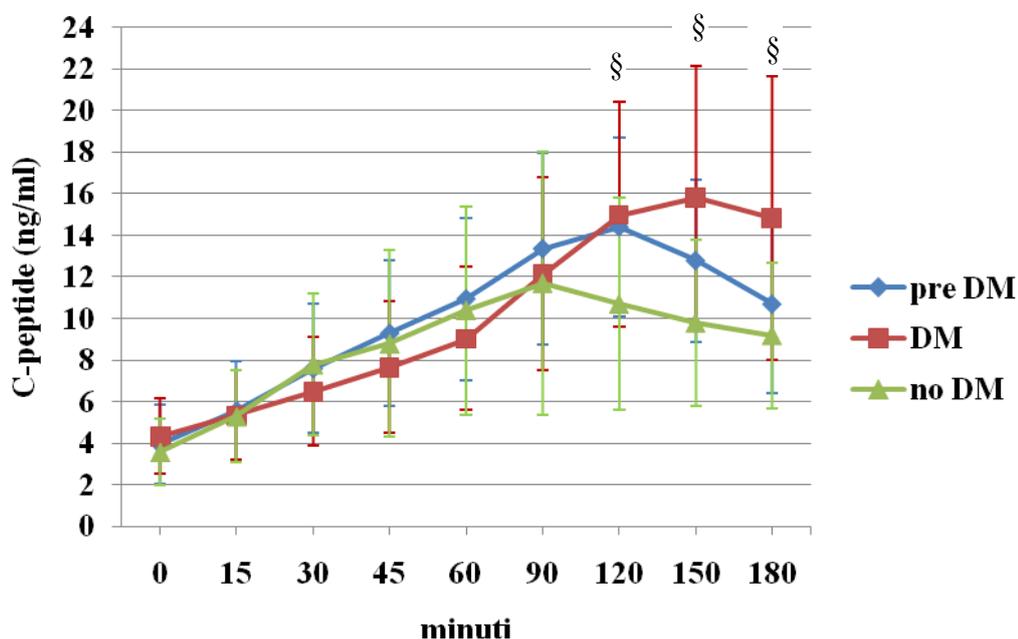
Fig. 4.1.2 Valori di insulina durante OGTT nei 3 gruppi di pazienti



§ ANOVA $P<0.05$

I livelli di C-peptide sono simili nei 3 gruppi fino a 120 minuti quando i pazienti diabetici mostrano valori significativamente più elevati dei non diabetici (Tukey post hoc test: 15.5 ± 5.4 vs 10.7 ± 5.1 ng/ml $P<0.05$). A 120 minuti anche i pazienti pre diabetici mostrano valori significativamente più elevati dei pazienti euglicemici (Tukey post hoc test: 14.4 ± 4.3 vs 10.7 ± 5.1 ng/ml $P<0.05$). A 150 e 180 minuti i diabetici mostrano valori di C-peptide significativamente più elevati sia dei pazienti affetti da IGT e/o IFG sia dei pazienti euglicemici (Tukey post hoc test $P<0.05$).

Fig. 4.1.3 Valori di C-peptide durante OGTT nei 3 gruppi di pazienti



§ ANOVA $P < 0.05$

In 47 pazienti (24 DM, 14 pre DM e 9 non DM), applicando il modello minimo di secrezione insulinica ai valori ottenuti durante l'OGTT, è stato possibile ricavare una stima della secrezione β cellulare nei 3 gruppi.

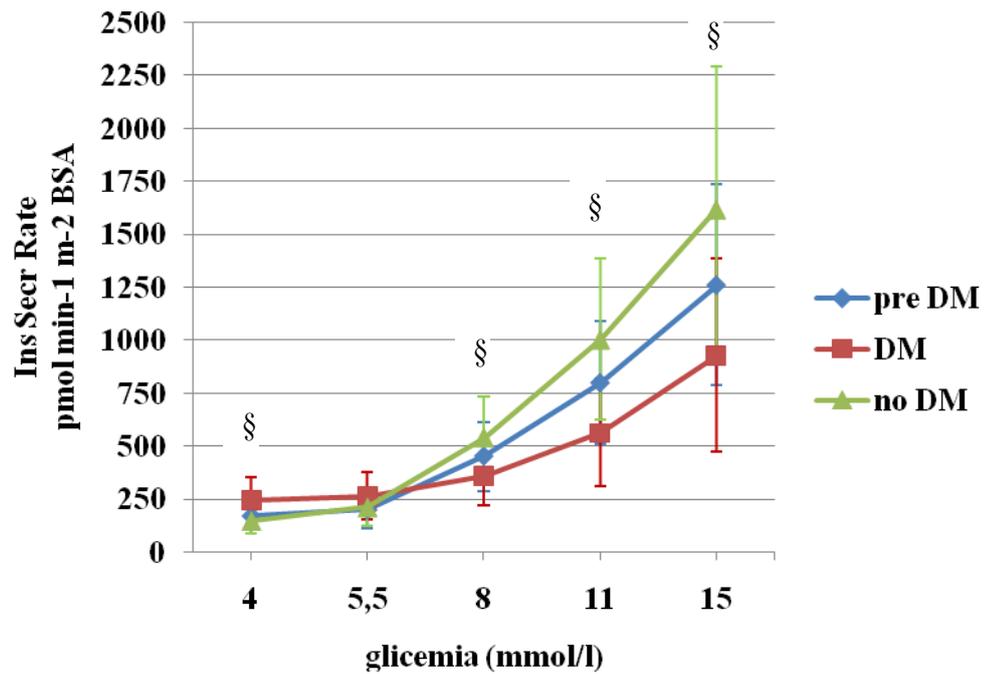
La prima fase di secrezione β cellulare risulta maggiore nei pazienti prediabetici (DM 647 ± 852 , pre DM 1547 ± 1450 , no DM 594 ± 522 [pmol m^{-2} BSA]/[mMxmin $^{-1}$] $P = 0.03$).

Seguendo l'andamento delle curve nei tre gruppi di pazienti è possibile evidenziare una minor risposta secretiva nei pazienti diabetici rispetto ai pazienti non diabetici (Tukey's multiple comparison test) per valori di glicemia di 8, 11 e 15 mmol/l (144, 198 e 270 mg/dl) (364.6 ± 141.4 vs 545.8 ± 187.9 pmol min^{-1} m^{-2} BSA $P < 0.05$; 566.6 ± 255.8 vs 1007.0 ± 381.0 pmol min^{-1} m^{-2} BSA $P < 0.05$; 932.2 ± 457.9 vs 1621 ± 674.2 pmol min^{-1} m^{-2} BSA $P < 0.05$ rispettivamente).

Per livelli di glicemia pari a 4 mmol/l (72 mg/dl) i pazienti diabetici presentano un indice secretivo maggiore rispetto ai pazienti euglicemici (Tukey's multiple comparison test: 248.5 ± 108.9 vs 151.7 ± 60.9 pmol min^{-1} m^{-2} BSA, $P < 0.05$) (Figura 4.1.4)

I pazienti diabetici presentano una maggior insulinoresistenza rispetto a quelli pre diabetici ed euglicemici (HOMA-IR DM 6.3 ± 5.3 , pre DM 3.9 ± 3.1 , no DM 2.2 ± 1.7 $P=0.039$).

Figura 4.1.4 Stima della secrezione insulinica (controllo proporzionale) nei 3 gruppi di pazienti



§ ANOVA $P < 0.05$

4.2 Valutazione post-trapianto (6 mesi)

54 pazienti sono stati valutati fino a 6 mesi dopo trapianto epatico con riscontro di un miglioramento del compenso glicemico (33.3% pazienti diabetici, 27.8% pre diabetici, 38.9 % euglicemici).

Dei 18 pazienti diabetici a 6 mesi 3 risultavano preDM e 15 diabetici alla valutazione pre trapianto.

Dei 15 pazienti pre DM a 6 mesi 6 erano diabetici, 1 euglicemico e 8 pre diabetici alla valutazione basale.

Dei 21 pazienti euglicemici a 6 mesi post trapianto 6 risultavano DM, 8 pre DM e 7 no DM alla valutazione pre intervento.

Nel follow-up si osserva un incremento di valori di colesterolo totale, colesterolo LDL, trigliceridi ed emoglobina glicata e una riduzione dei valori d'insulina a digiuno e di HOMA-IR rispetto al pre trapianto (tabella 4.2.1 e figura 4.2.1)

Tabella 4.2.1 Parametri metabolici prima, 3 e 6 mesi dopo trapianto epatico

	Pre trapianto	3 mesi	6 mesi	P
Glicemia a digiuno (mg/dl)	92.1±15.8	95.9±15.5	95.1±12.7	0.12
HbA1c (%)	4.8±0.9	5.3±0.8	5.5±0.8	<0.0001
Colesterolo totale (mg/dl)	137.2±42.2	187.7±53.7	172.8±38.1	< 0.0001
Colesterolo HDL (mg/dl)	50.6±18.9	54.0±16.6	52.9±16.9	0.43
Trigliceridi (mg/dl)	83.0±34.0	134.2±60.4	120.7±46.6	< 0.0001
Colesterolo LDL (mg/dl)	72.0±39.6	107.2±48.4	95,3±30.3	0.0002
HOMA-IR	4.77±4.55	2.02±1.38	2.41±1.47	0.0003
Insulina a digiuno (μUI/ml)	19.4±16.3	8.9±5.3	10.9±7.0	0.0001
C-Peptide a digiuno (ng/ml)	3.81±1.72	3.91±2.72	3.38±1.59	0.27

A 3 e 6 mesi dopo trapianto si osserva un miglioramento della funzione epatica ed un rialzo dei valori di creatina e urea (tabella 4.2.2).

Nella tabella 4.2.3 sono riportate le variazioni dei parametri antropometrici e di pressione arteriosa dopo trapianto epatico (tabella 4.2.3).

Figura 4.2.1 valori di HOMA-IR prima e dopo trapianto epatico

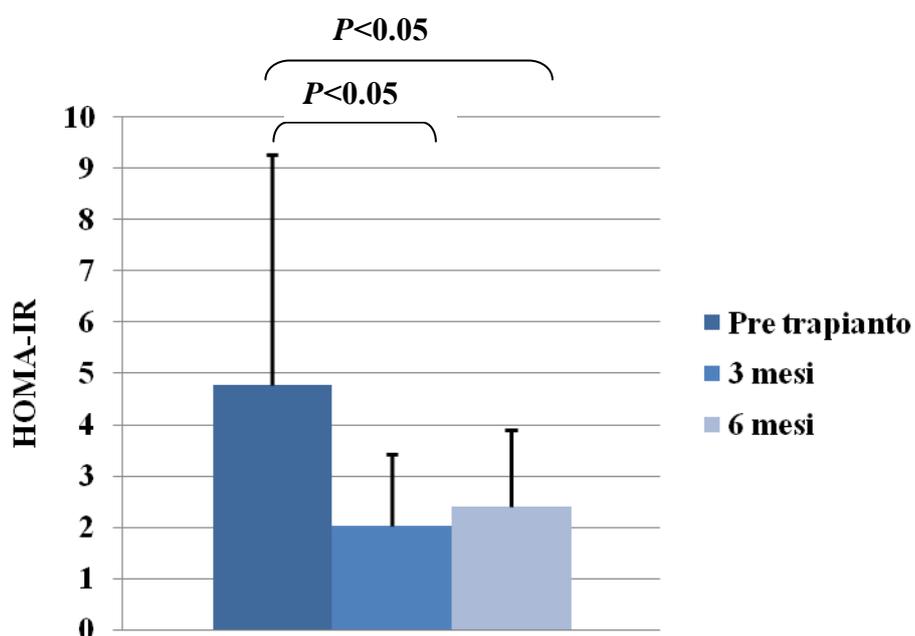


Tabella 4.2.2 Variazione dei parametri di funzione epatica e renale prima e dopo trapianto epatico

	Pre trapianto	3 mesi	6 mesi	<i>P</i>
AST (U/l)	89.8±60.4	25.2±19.6	30.5±19.8	<0.0001
ALT (U/l)	61.2±48.8	37.6±38.2	38.5±34.4	0.0029
γGT (U/l)	80.1±63.7	114.2±167.6	111.0±167.1	0.25
Fosfatasi alcalina (U/l)	161.8±204.1	114.6±98.6	128.5±93.4	0.18
Bilirubina totale (mg/dl)	3.42±3.28	0.89±0.73	0.85±0.46	<0.0001
Pseudocolinesterasi (U/l)	2756±1474	6287±1873	6818±2012	<0.0001
Albumina (g/dl)	3.36±0.45	4.22±0.31	4.33±0.29	<0.0001
Creatinina (mg/dl)	0.88±0.29	1.07±0.33	1.11±0.32	<0.0001
Urea (mg/dl)	34.0±13.6	54.1±16.8	55.0±20.4	<0.0001

Tabella 4.2.3 Variazione dei parametri antropometrici e di pressione arteriosa prima e dopo trapianto epatico

	Pre trapianto	3 mesi	6 mesi	P
BMI (kg/m ²)	26.4±3.6	25.2±3.3	26.0±3.5	0.0087
Circonferenza vita (cm)	98.0±11.2	96.6±8.7	97.9±10.5	0.39
PAS (mmHg)	112.0±12.6	125.3±12.5	122.1±14.8	<0.0001
PAD (mmHg)	68.9±8.4	77.3±7.8	76.9±7.3	<0.0001

Non si osservano correlazioni tra gli anni di epatopatia e le variazioni dei parametri del metabolismo glucidico e d'insulinoresistenza tra la valutazione basale e quella a 6 mesi (Δ HOMA-IR: $P=0.318$ $r=-0.14$; Δ HbA1c $P=0.37$ $r=0.12$), né tra l'età dei pazienti e i suddetti parametri (Δ HOMA-IR: $P=0.24$ $r=0.17$; Δ HbA1c $P=0.17$ $r=-0.19$). Non si osservano inoltre correlazioni significative tra i parametri di miglioramento della funzione epatica (Δ AST, Δ ALT e Δ pseudocolinesterasi) e le variazioni di HOMA-IR e HbA1c ad eccezione di una correlazione positiva tra Δ pseudocolinesterasi e Δ HbA1c ($P=0.019$ $r=0.39$).

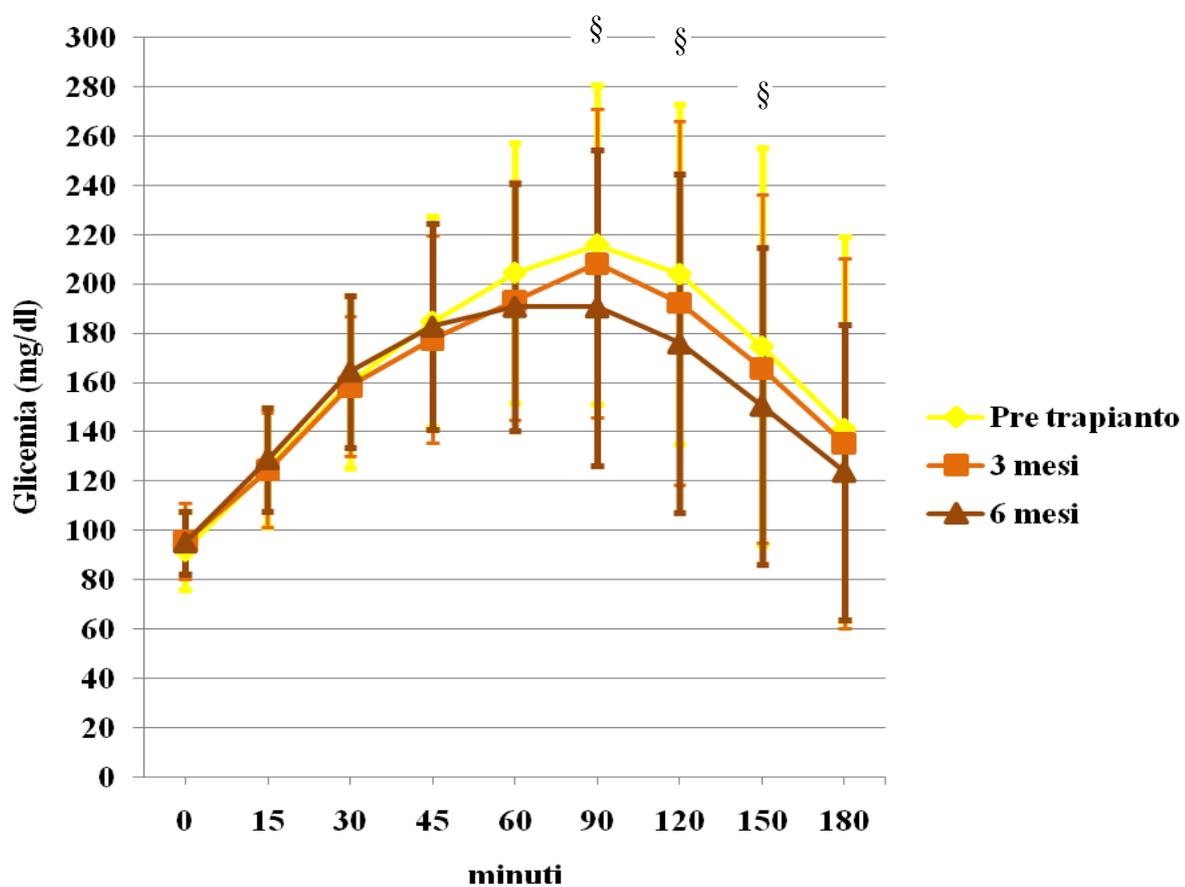
Nella figura 4.2.2 sono riportati i valori di glicemia durante OGTT prima e dopo trapianto epatico. I valori di glicemia diminuiscono significativamente dai 90 ai 150 minuti dopo carico orale di glucosio a 3 e 6 mesi dopo il trapianto.

Nella figura 4.2.3 si può osservare come dopo 3 e 6 mesi dal trapianto epatico i valori di insulina siano significativamente inferiori in tutti i punti del carico orale di glucosio rispetto a quelli basali.

Inoltre a 15, 30, 45 e 60 minuti dopo carico orale i valori d'insulinemia ottenuti 6 mesi dopo il trapianto sono significativamente superiori a quelli ottenuti dopo 3 mesi (Tukey's multiple comparison test: 15 minuti 3 mesi 21.6 ± 14.6 , 6 mesi 27.3 ± 17.4 μ UI/ml, $P<0.05$; 30 minuti 3 mesi 31.9 ± 24.6 , 6 mesi 42.5 ± 37.2 μ UI/ml, $P<0.05$; 45 minuti 3 mesi 36.5 ± 26.4 , 6 mesi 48.8 ± 41.7 μ UI/ml $P<0.05$; 60 minuti 3 mesi 46.8 ± 38.3 , 6 mesi 64.5 ± 53.5 μ UI/ml $P<0.05$).

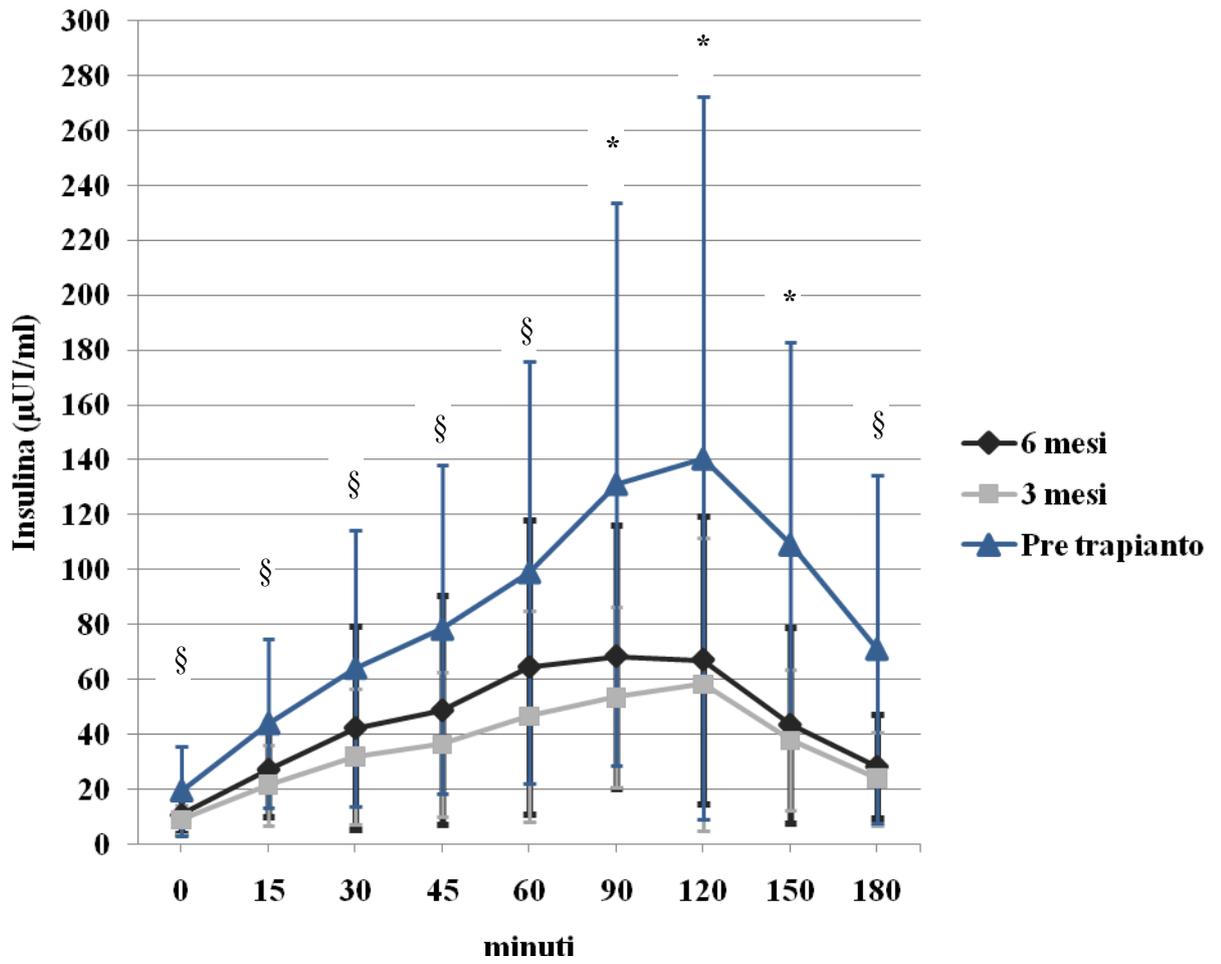
Nella figura 4.2.4 si può osservare come i valori di C-peptide siano sovrapponibili prima e dopo trapianto epatico fino ai 120 minuti. Dopo 120 minuti i valori basali risultano significativamente maggiori rispetto a quelli ottenuti a 3 e 6 mesi dall'intervento.

Figura 4.2.2 Confronto tra i livelli di glicemia ottenuti durante OGTT prima e dopo trapianto



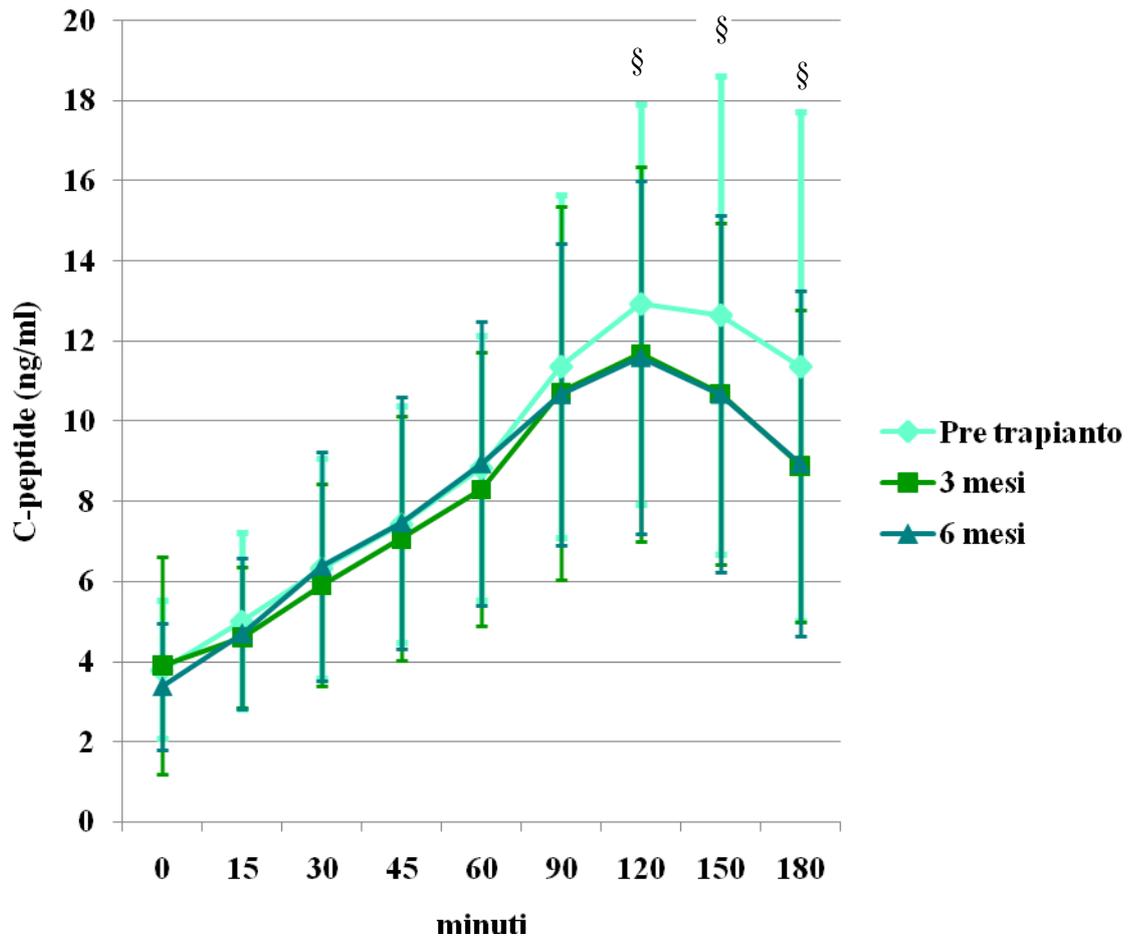
§ ANOVA $P < 0.05$

Figura 4.2.3 Confronto tra i livelli di insulina ottenuti durante OGTT prima e dopo trapianto epatico



§ ANOVA $P < 0.05$ * ANOVA $P < 0.0001$

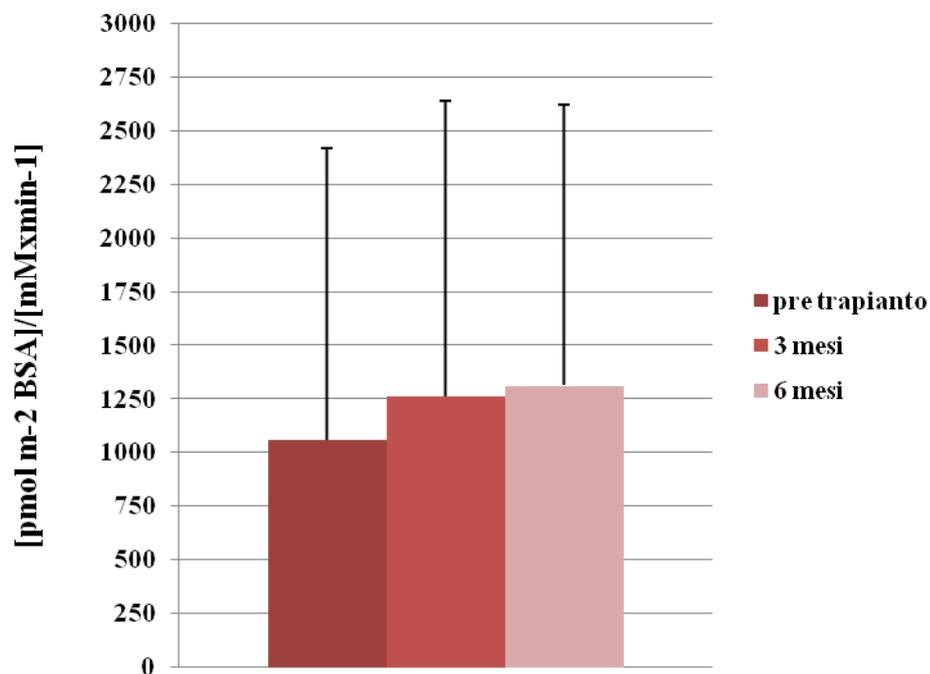
Figura 4.2.4 Confronto tra i livelli di C-peptide ottenuti durante OGTT prima e dopo trapianto epatico



§ ANOVA $P < 0.05$

In 43 soggetti, applicando il modello minimo di secrezione insulinica ai valori ottenuti durante l'OGTT, è stato possibile ricavare una stima della secrezione β cellulare. Non ci sono differenze significative per quanto riguarda il controllo derivativo (figura 4.2.5).

Figura 4.2.5 Stima della secrezione insulinica (controllo derivativo) prima, 3 e 6 mesi dopo trapianto d'organo

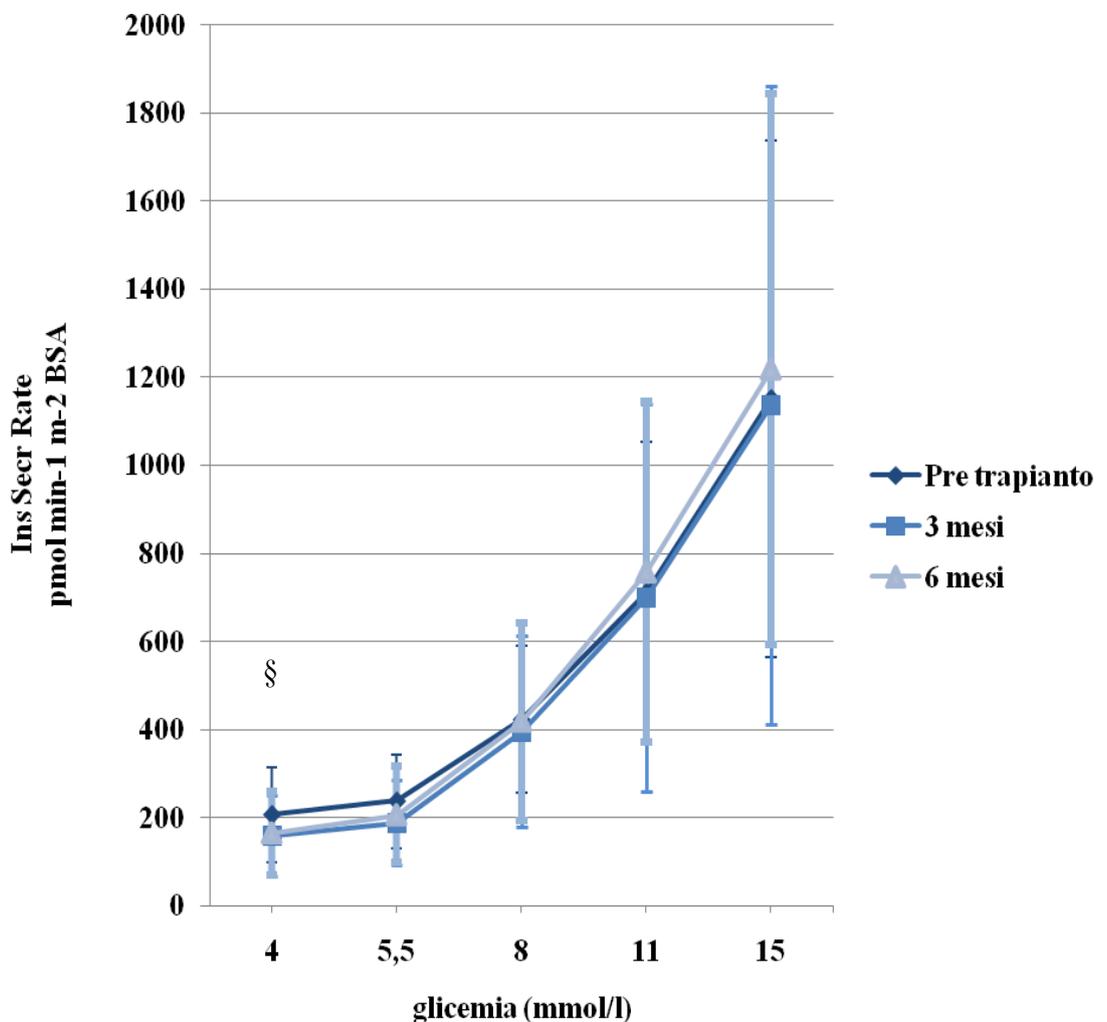


$P=0.553$

Nella figura 4.2.6 è rappresentata la stima della secrezione β cellulare in termini di controllo proporzionale prima e dopo trapianto epatico.

Si osserva un maggior indice secretivo prima del trapianto rispetto a 3 mesi (Tukey's multiple comparison test: pre trapianto 206.4 ± 107.1 , 3 mesi 158.9 ± 92.1 pmol min⁻¹ m⁻² BSA $P < 0.05$) per valori di glicemia di 4 mmol/l.

Figura 4.2.6 Stima della secrezione insulinica (controllo proporzionale) prima, 3 e 6 mesi dopo trapianto d'organo



§ ANOVA $P < 0.05$

46 pazienti che presentavano alterazione del metabolismo glucidico alla valutazione pre trapianto sono stati suddivisi in due gruppi in base al miglioramento (20 pazienti) o meno (26 pazienti) del controllo glicometabolico. Il miglioramento glicometabolico è stato definito come passaggio dal gruppo DM a quello dei pre DM o dei no DM, o dal gruppo affetto da IFG e IGT a quello euglicemico.

I due gruppi non differiscono per sesso, prevalenza di infezione da HCV ed epatocarcinoma, familiarità positiva per diabete mellito, consumo di alcool, età, durata di epatopatia, Child-Pugh Score, BMI, circonferenza della vita, dose di prednisone, uso di tacrolimus, HOMA-IR, livelli di emoglobina glicata, C-peptide ed insulina a digiuno come mostrato nella tabella 4.2.4

Tabella 4.2.4 Dati clinici dei pazienti che presentano o meno un miglioramento del metabolismo glucidico 6 mesi dopo trapianto epatico

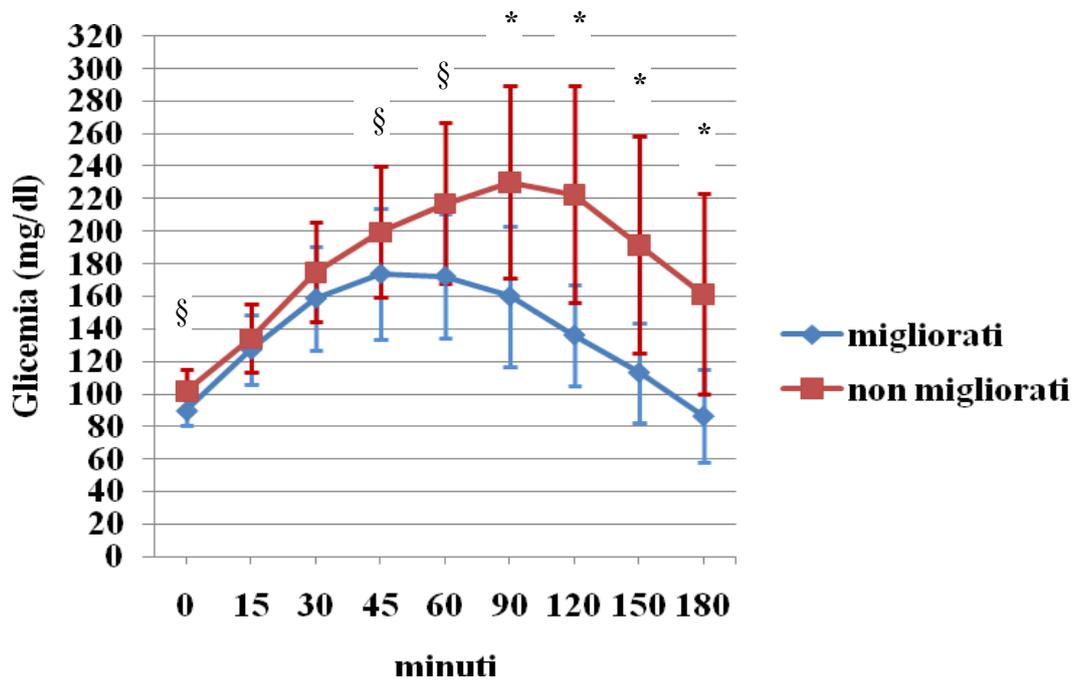
	migliorati	Non migliorati	P
F/M (n)	7/13	5/21	0.31
Familiarità positiva per DM (n)	8 (40%)	13 (50%)	0.56
HCV (n)	12 (60%)	15 (58%)	1
Consumo di alcool (n)	4 (20%)	5 (19%)	1
Epatocarcinoma (n)	5 (25%)	7 (27%)	1
Età (anni)	54.2±7.6	54.3±8.5	0.95
Durata di epatopatia (anni)	16.4±10.8	16.2±11.8	0.95
Child-Pugh Score	9.3±2.2	9.2±2.0	0.94
BMI (kg/m ²)	25.6±3.1	26.2±4.1	0.61
Glicemia a digiuno (mg/dl)	89.7±9.0	101.8±13.5	0.0012
Insulina a digiuno (μUI/ml)	11.5±6.5	9.5±5.7	0.28
C-peptide a digiuno (ng/ml)	3.65±1.61	3.56±1.64	0.86
HbA1c (%)	5.4±0.6	5.7±0.9	0.22
Circonferenza vita (cm)	97.1±10.4	97.7±12.6	0.88
Dose di prednisone (mg/kg/die)	0.056±0.055	0.076±0.074	0.31
Uso di tacrolimus (n)	5 (25.0%)	10 (38.5%)	0.35
HOMA-IR	2.49±1.56	2.44±1.50	0.92

I soggetti che presentano un miglioramento del metabolismo glucidico non mostrano differenze della funzione epatica rispetto ai pazienti non migliorati (AST 31.5 ± 15.5 vs 42.7 ± 33.3 U/l $P=0.18$; ALT 48.7 ± 40.2 vs 51.8 ± 47.4 U/l $P=0.66$; γ GT 104.4 ± 153.4 vs 132.1 ± 186.2 U/l $P=0.60$; bilirubina totale 0.78 ± 0.37 vs 0.93 ± 0.53 mg/dl $P=0.29$; albumina 4.3 ± 0.26 vs 4.3 ± 0.31 g/dl $P=0.91$; fosfatasi alcalina 116.6 ± 68.6 vs 139.4 ± 116.8 U/l $P=0.45$; pseudo colinesterasi 7307 ± 1920 vs 6358 ± 1926 U/l $P=0.11$ rispettivamente). Non si osservano differenze significative tra i pazienti migliorati e i non migliorati per quanto riguarda i livelli di colesterolo totale (178.2 ± 41.7 vs 173.1 ± 35.6 mg/dl $P=0.66$), colesterolo HDL (57.2 ± 21.1 vs 50.9 ± 13.1 mg/dl $P=0.22$), colesterolo LDL (95.3 ± 37.0 vs 97.8 ± 27.4 mg/dl $P=0.79$), trigliceridi (128.3 ± 53.1 vs 121.9 ± 41.4 mg/dl $P=0.65$), creatinina (1.08 ± 0.32 vs 1.16 ± 0.28 mg/dl $P=0.38$), urea (55.9 ± 19.2 vs 59.5 ± 20.2 mg/dl $P=0.55$), pressione arteriosa sistolica (122.3 ± 14.2 vs 125.6 ± 15.3 mmHg $P=0.45$) e diastolica (76.8 ± 7.1 vs 78.3 ± 7.7 mmHg $P=0.50$).

L'analisi di regressione logistica non ha mostrato alcuna associazione tra il miglioramento del compenso glicemico e le seguenti variabili indipendenti: sesso, età, anni di epatopatia, infezione da HCV e familiarità per DM

Come atteso i pazienti migliorati mostrano valori di glicemia significativamente inferiori ai non migliorati durante OGTT (Fig 4.2.7)

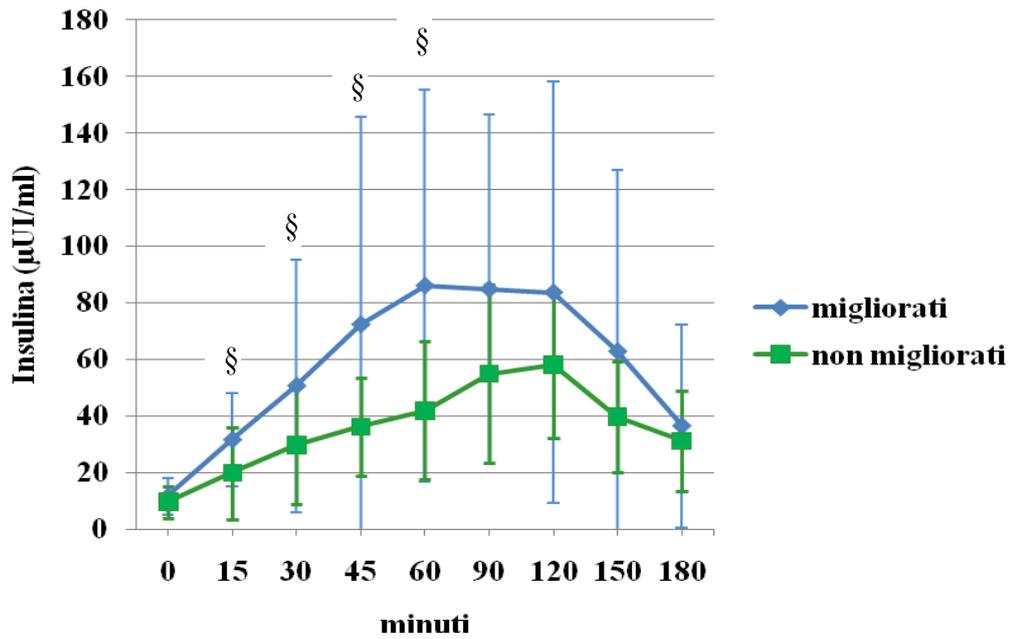
Figura 4.2.7 Confronto dei livelli di glicemia ottenuti durante OGTT 6 mesi dopo trapianto epatico tra pazienti con e senza miglioramento del metabolismo glucidico



* $P < 0.0001$ § $P < 0.05$

I pazienti migliorati mostrano valori d'insulinemia più elevati dei non migliorati nella prima parte dell'OGTT (Fig 4.2.8)

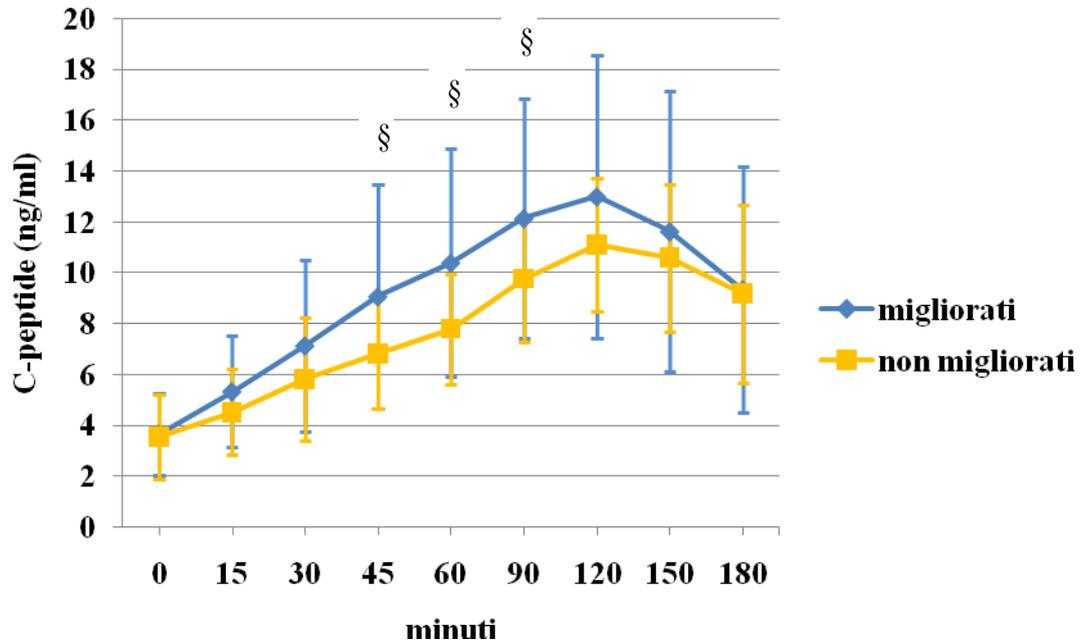
Figura 4.2.8 Confronto dei livelli d'insulina ottenuti durante OGTT 6 mesi dopo trapianto epatico tra pazienti con e senza miglioramento del metabolismo glucidico



§ $P < 0.05$

I pazienti migliorati mostrano anche valori di C-peptide superiori rispetto a quelli dei non migliorati a 45, 60 e 90 minuti dell'OGTT (Fig 4.2.9)

Figura 4.2.9 Confronto dei livelli di C-peptide ottenuti durante OGTT 6 mesi dopo trapianto epatico tra pazienti con e senza miglioramento del metabolismo glucidico

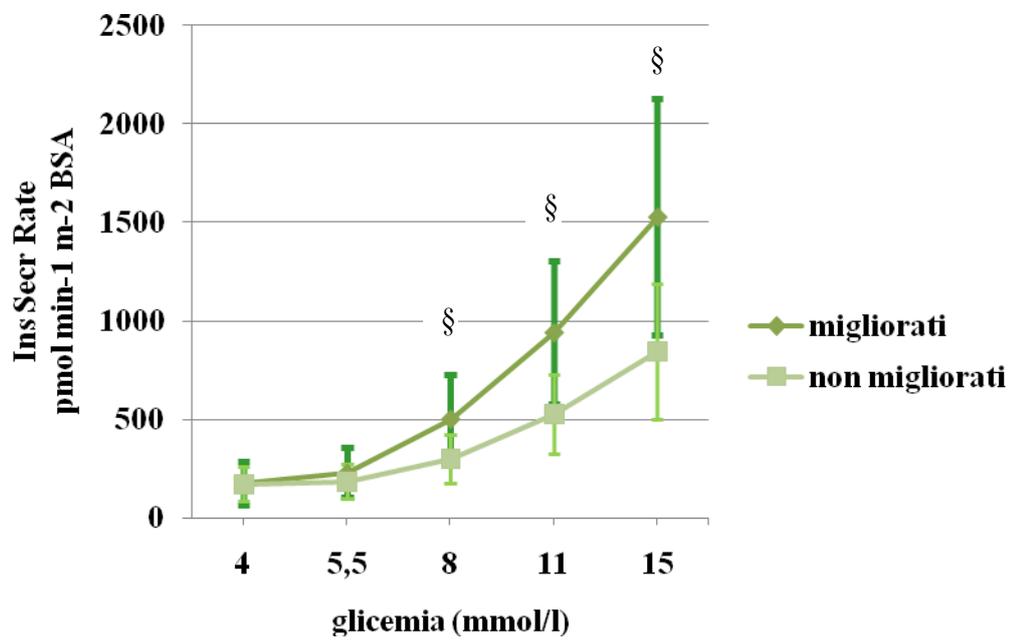


§ $P < 0.05$

Per quanto riguarda la stima della secrezione insulinica secondo il modello minimo non c'è una differenza significativa del controllo derivativo tra migliorati e non migliorati (1412 ± 1047 vs 983.1 ± 878.5 [pmol m⁻² BSA]/[mMxmin⁻¹] $P=0.199$).

Per quanto riguarda il controllo proporzionale, seguendo l'andamento delle curve nei due gruppi di pazienti, è possibile evidenziare una minor risposta secretiva nei pazienti non migliorati per valori di glicemia di 8, 11 e 15 mmol/l (144, 198 e 270 mg/dl) (Figura 4.2.10)

Figura 4.2.10 Stima della secrezione insulinica secondo il modello minimo (controllo proporzionale) nei pazienti con miglioramento o meno del metabolismo glucidico



§ $P < 0.05$

4.3 Valutazione post-trapianto (12 mesi)

32 pazienti hanno completato il follow-up a 12 mesi, 11 pazienti risultavano euglicemici (34.4%), 8 diabetici (25%) e 13 pre diabetici (40.6%).

Degli 8 pazienti diabetici 7 risultavano diabetici ed uno pre diabetico alla valutazione pre trapianto. Dei 13 pazienti pre DM 7 risultavano diabetici e 6 pre diabetici alla valutazione basale. Degli 11 pazienti non diabetici 2 erano diabetici, 5 pre diabetici e 4 euglicemici alla valutazione pre trapianto.

Nelle tabelle 4.3.1 e 4.3.2 sono riportate le variazioni dei parametri metabolici e di funzione epatica prima e dopo trapianto epatico che confermano quelle già osservate a 6 mesi.

Tabella 4.3.1 Parametri metabolici prima, 3, 6 e 12 mesi dopo trapianto epatico

	Pre trapianto	3 mesi	6 mesi	12 mesi	P
Glicemia basale (mg/dl)	93.0±19.1	98.9±17.3	96.3±13.2	97.9±12.9	0.104
HbA1c (%)	4.96±1.02	5.35±0.84	5.62±0.92	5.67±0.70	0.0001
Colesterolo tot (mg/dl)	139.0±37.0	190.0±37.1	175.1±28.7	172.6±33.2	<0.0001
HDL (mg/dl)	55.3±17.9	56.2±16.0	54.2±15.4	50.3±16.1	0.33
Trigliceridi (mg/dl)	80.1±26.8	132.8±63.0	118.0±40.7	120.9±56.8	<0.0001
LDL (mg/dl)	68.6±35.3	106.5±31.1	97.6±23.3	98.9±27.5	<0.0001
HOMA-IR	5.48±5.14	2.17±1.62	2.28±1.44	2.36±1.73	0.0017
Insulina basale (µUI/ml)	22.1±17.9	9.0±6.2	9.6±6.1	9.7±6.67	0.0002
C-Peptide basale (ng/ml)	3.95±1.83	4.03±3.38	3.20±1.45	3.11±1.62	0.16

Non si osservano differenze significative pre e post trapianto per quanto riguarda BMI (pre trapianto: 26.7 ± 3.7 , 3 mesi: 25.7 ± 3.8 , 6 mesi: 26.6 ± 4.0 , 12 mesi: 26.2 ± 6.7 kg/m^2 $P=0.43$) e circonferenza vita (pre trapianto: 98.0 ± 11.1 , 3 mesi: 97.0 ± 9.7 , 6 mesi: 98.9 ± 11.5 , 12 mesi: 100.2 ± 12.2 cm $P=0.22$). Si conferma un significativo rialzo dei valori di pressione arteriosa sia sistolica (pre trapianto: 112.3 ± 11.5 , 3 mesi: 127.3 ± 12.8 , 6 mesi: 120.5 ± 15.9 , 12 mesi: 120.6 ± 10.8 mmHg $P < 0.0001$) che diastolica (pre trapianto: 68.8 ± 8.2 , 3 mesi: 77.7 ± 7.8 , 6 mesi: 75.6 ± 7.8 , 12 mesi: 77.0 ± 5.7 mmHg $P < 0.0001$).

Si conferma anche a 12 mesi il rialzo dei valori di creatinina (pre trapianto: 0.87 ± 0.30 , 3 mesi: 0.99 ± 0.30 , 6 mesi: 1.05 ± 0.33 , 12 mesi: 1.08 ± 0.26 mg/dl $P < 0.0001$) e urea (pre trapianto: 35.9 ± 14.9 , 3 mesi: 54.1 ± 17.6 , 6 mesi: 56.4 ± 21.7 , 12 mesi: 51.9 ± 16.3 mg/dl $P < 0.0001$) rispetto alla valutazione pre trapianto.

Tabella 4.3.2 Variazione dei parametri di funzione epatica prima e dopo trapianto epatico

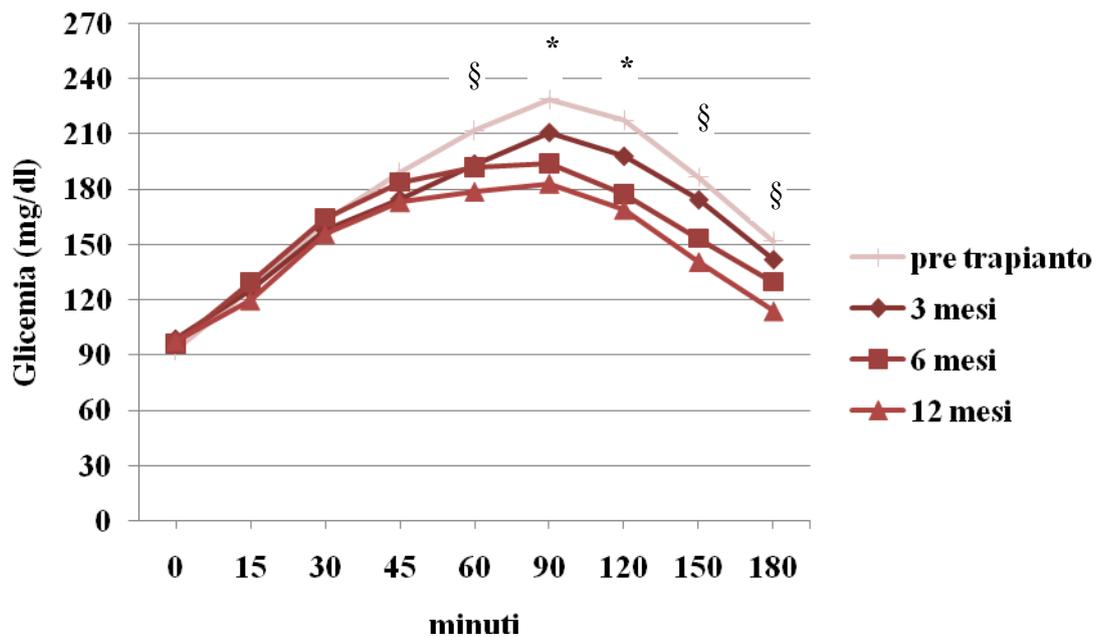
	Pre trapianto	3 mesi	6 mesi	12 mesi	P
AST (U/l)	81.0 ± 46.1	23.3 ± 13.1	30.1 ± 20.7	32.6 ± 27.8	< 0.0001
ALT (U/l)	52.9 ± 35.4	29.9 ± 28.4	36.3 ± 34.1	34.7 ± 45.3	0.0285
γ GT (U/l)	85.5 ± 70.5	96.3 ± 121.9	93.2 ± 154.5	93.5 ± 150.4	0.94
Fosfatasi alcalina (U/l)	129.7 ± 43.5	116.6 ± 106.3	137.6 ± 107.7	117.3 ± 77.3	0.44
Bilirubina totale (mg/dl)	3.0 ± 1.8	0.8 ± 0.6	0.8 ± 0.4	0.8 ± 0.5	< 0.0001
Pseudocolinesterasi (U/l)	2676 ± 1115	6485 ± 1781	7246 ± 1814	7213 ± 1996	< 0.0001
Albumina (g/dl)	3.38 ± 0.42	4.21 ± 0.32	4.34 ± 0.26	4.26 ± 0.30	< 0.0001

Nella figura 4.3.1 è rappresentato il confronto tra valori medi di glicemia prima e dopo trapianto epatico.

Dai 60 minuti i valori di glicemia ottenuti durante OGTT 12 mesi dopo trapianto sono significativamente inferiori ai quelli ottenuti pre trapianto (Tukey's multiple

comparison test: 60 minuti: pre trapianto 212.4 ± 60.8 , 12 mesi 178.7 ± 46.9 mg/dl $P < 0.05$, 90 minuti: pre trapianto 229.2 ± 74.3 , 12 mesi 183.0 ± 60.1 mg/dl $P < 0.05$, 120 minuti: pre trapianto 217.9 ± 76.0 , 12 mesi 168.9 ± 60.9 mg/dl $P < 0.05$, 150 minuti: pre trapianto 187.1 ± 92.8 12 mesi 140.7 ± 59.3 mg/dl $P < 0.05$, 180 minuti: pre trapianto 152.2 ± 91.1 12 mesi 114.2 ± 51.8 mg/dl $P < 0.05$). Ai tempi 90 e 150 minuti post carico orale di glucosio i livelli di glicemia 12 mesi post trapianto sono significativamente inferiori anche a quelli ottenuti a 3 mesi (Tukey's multiple comparison test: 90 minuti: 3 mesi 211.2 ± 63.1 , 12 mesi 183.0 ± 60.1 mg/dl $P < 0.05$; 150 minuti: 3 mesi 174.6 ± 72.5 12 mesi 140.7 ± 59.3 mg/dl $P < 0.05$) (figura 4.3.1).

Figura 4.3.1 Confronto tra valori medi di glicemia ottenuti durante OGTT prima, 3, 6 e 12 mesi dopo trapianto epatico



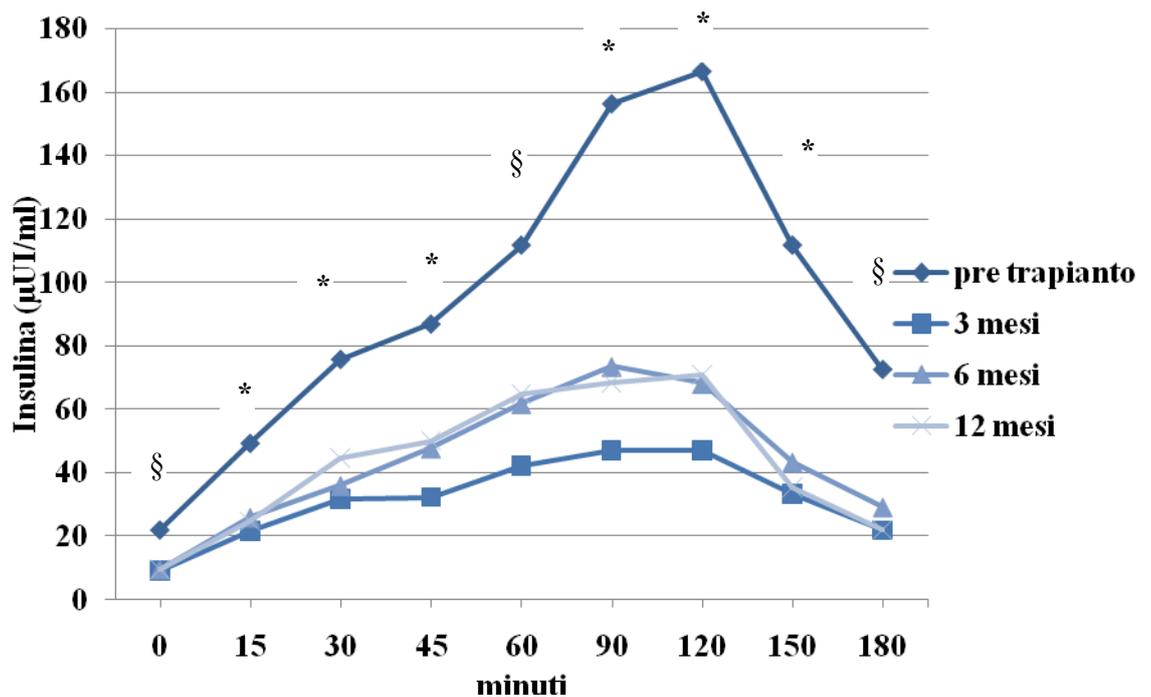
§ ANOVA $P < 0.05$ *ANOVA $P < 0.0001$

Nella figura 4.3.2 è rappresentato il confronto tra valori medi d'insulinemia prima e dopo trapianto epatico.

I valori d'insulina 12, 6 e 3 mesi dopo trapianto epatico sono significativamente inferiori a quelli ottenuti pre trapianto (Tukey's multiple comparison test).

A 45 minuti i valori d'insulinemia ottenuti 12 e 6 mesi dopo trapianto sono significativamente superiori a quelli ottenuti a 3 mesi (Tukey's multiple comparison test: 3 mesi 32.2 ± 22.8 , 6 mesi 47.7 ± 40.8 12 mesi 50.0 ± 38.8 $\mu\text{UI/ml}$ $P < 0.05$) (figura 4.3.2).

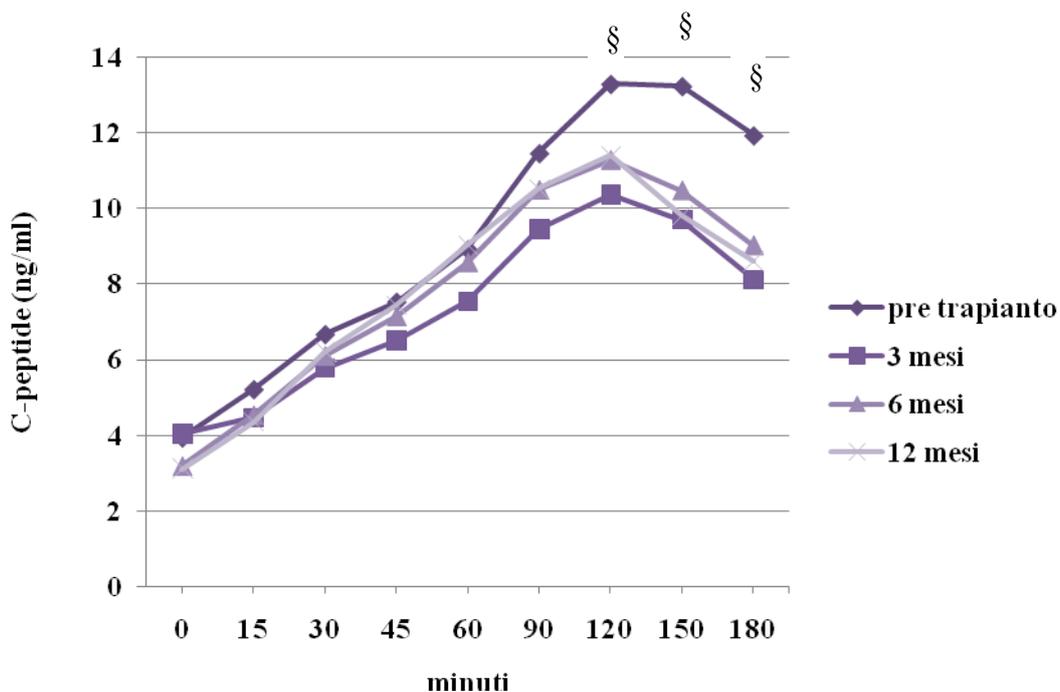
Figura 4.3.2 Confronto tra valori medi d'insulina ottenuti durante OGTT prima, 3, 6 e 12 mesi dopo trapianto epatico



§ ANOVA $P < 0.05$ *ANOVA $P < 0.0001$

Nella figura 4.3.3 sono rappresentate le curve dei valori ematici di C-peptide prima, 3, 6 e 12 mesi dopo trapianto epatico. Ai tempi 150 e 180 minuti i valori di C-peptide a 12, 6 e 3 mesi post trapianto sono significativamente inferiori a quelli ottenuti pre trapianto (Tukey's multiple comparison test). Il test Tukey's post hoc evidenzia inoltre come al tempo 120 minuti post carico orale i livelli di C-peptide siano significativamente inferiori a 3 mesi rispetto al pre trapianto (pre trapianto: 13.3 ± 5.4 , 3 mesi: 10.4 ± 51.8 ng/ml $P < 0.05$)

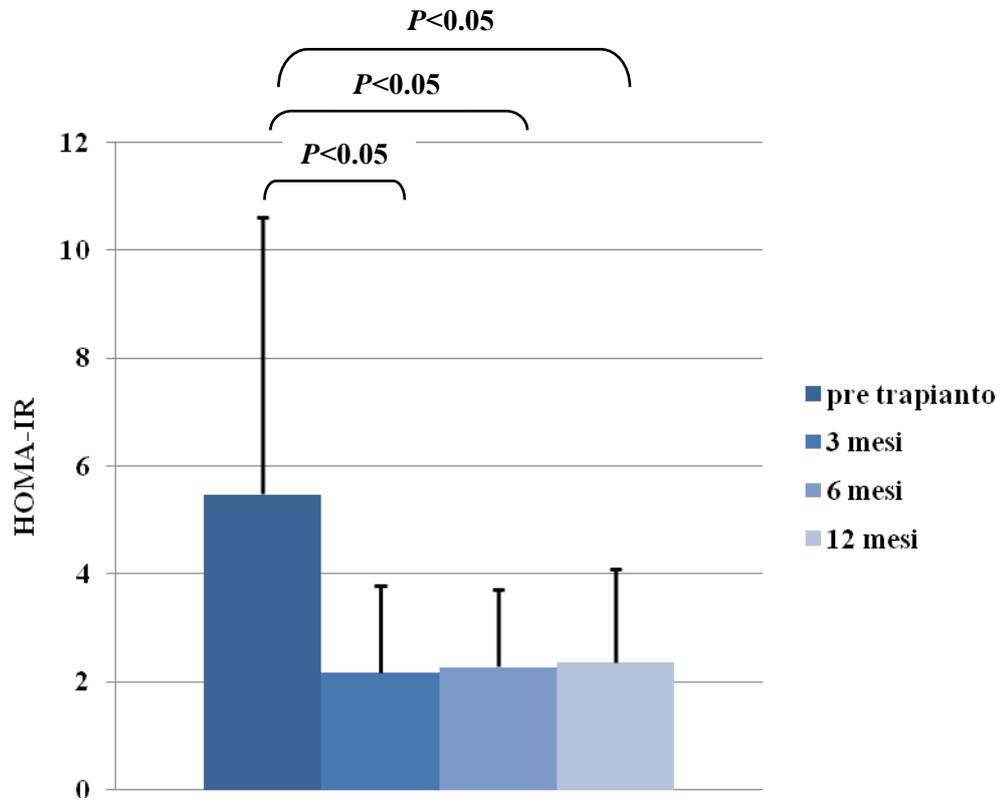
Figura 4.3.3 Confronto tra valori medi di C-peptide ottenuti durante OGTT prima, 3, 6 e 12 mesi dopo trapianto epatico



§ ANOVA $P < 0.05$

Già 3 mesi dopo il trapianto epatico si osserva un miglioramento dell'insulino sensibilità che si mantiene anche a 6 e 12 mesi (figura 4.3.4 e tabella 4.3.1)

Figura 4.3.4 Confronto tra valori di HOMA-IR prima e dopo trapianto epatico



Capitolo 5 – Discussione e conclusioni

Alterazioni del metabolismo glucidico sono frequentemente riscontrate nei pazienti affetti da cirrosi epatica, tanto che il diabete mellito viene riconosciuto come possibile complicanza delle epatopatie in fase avanzata (Tietge *et al* 2004, Hickman *et al* 2007). La presenza di diabete mellito si associa ad una prognosi peggiore nei pazienti cirrotici (Holstein *et al* 2002; Harrison 2006; Nishida *et al* 2006, Hickman *et al* 2007) ed il diabete stesso può essere causa di epatopatia attraverso processi che portano allo sviluppo di NAFLD, NASH, cirrosi (El Serag *et al* 2004, Garcia-Compean *et al*, 2009). Il virus dell'epatite C (che nella nostra popolazione è responsabile del quadro di cirrosi in oltre il 50% dei casi) ha di per sé un effetto diabetogeno attraverso l'induzione d'insulinoreistenza (Romero-Gomez 2006) e, secondo alcuni autori, anche attraverso un meccanismo citopatico sulle β cellule pancreatiche (Masini *et al* 2005).

A seconda dell'eziologia dell'epatopatia, del grado di danno epatico e dei criteri diagnostici utilizzati, l'incidenza di pre-diabete nella cirrosi epatica varia dal 30 all'80% e quella di diabete mellito tra il 15 e il 70% (Holstein *et al* 2002, Tietge *et al* 2004, Nishida *et al* 2006). È importante sottolineare che gli studi che riportano un'incidenza di diabete mellito più bassa utilizzano come criterio diagnostico i valori di glicemia a digiuno mentre gli studi che indicano un'incidenza più elevata si basano sui risultati del test da carico orale di glucosio (Holstein *et al* 2002, Nishida *et al* 2006).

Nel nostro studio il 50.5% dei pazienti risultava affetto da diabete mellito ed il 31.8% dei soggetti mostrava una condizione di pre-diabete. Complessivamente dunque l'82.3% della nostra popolazione presentava alterazioni del metabolismo glucidico.

Tale prevalenza riscontrata in pazienti in lista d'attesa per trapianto epatico, la maggior parte dei quali con un'epatopatia in fase terminale, è in linea con quanto indicato in letteratura che vede il diabete mellito come indice di epatopatia in fase avanzata (Garcia-Compean *et al* 2009).

I pazienti diabetici erano significativamente più anziani dei non diabetici in accordo con i dati della letteratura che individuano l'età avanzata tra i fattori di rischio per lo sviluppo di diabete mellito nei soggetti affetti da epatopatia cronica (Mehta *et al* 2003). Non si osservavano invece differenze per quanto riguarda la familiarità per DM

e il BMI in accordo coi dati della letteratura che evidenziano come il diabete epatogeno sia meno legato ai classici fattori di rischio per il DM2 quali body mass index e familiarità (Garcia-Compean *et al* 2009). Non si osservavano inoltre differenze per quanto riguarda la prevalenza di infezione da virus HCV ed il consumo di alcool che in letteratura sono stati descritti come fattori di rischio per lo sviluppo di diabete mellito nei pazienti epatopatici (Hickman *et al* 2007).

Tutti i pazienti giunti alla nostra osservazione venivano considerati non diabetici in quanto la valutazione del loro compenso glicometabolico era stata effettuata mediante glicemia a digiuno ed emoglobina glicata, che nella nostra popolazione risultavano entro i limiti di norma.

I valori di emoglobina glicata non risultavano significativamente diversi nei pazienti affetti da diabete mellito, pre-diabete ed euglicemici (pur essendoci un trend significativo) e si mantenevano al di sotto del 6% (valore al di sopra del quale il paziente viene considerato pre diabetico secondo gli standard italiani per la cura del diabete mellito 2014).

I livelli di glicemia a digiuno nei pazienti diabetici erano significativamente più elevati che nei non diabetici, tuttavia rimanevano inferiori a 126 mg/dl.

Questi due parametri non sono dunque sufficienti a riconoscere uno stato di alterato metabolismo glucidico nei pazienti cirrotici.

I pazienti diabetici mostravano inoltre una tendenza ad una maggior insulinoresistenza rispetto agli altri due gruppi pur non raggiungendo la significatività statistica verosimilmente per la scarsa numerosità del campione.

Analizzando i dati ottenuti mediante OGTT si può osservare come i pazienti diabetici presentassero valori di glicemia significativamente più elevati rispetto agli altri due gruppi e come i pazienti affetti da prediabete mostrassero una curva glicemica intermedia tra i DM e i noDM.

Per quanto riguarda i valori d'insulina durante OGTT si poteva osservare come i pazienti affetti da prediabete mostrassero valori superiori ai pazienti diabetici nella prima parte del test. Dai 120 minuti post carico i pazienti diabetici presentavano valori significativamente più elevati dei soggetti euglicemici.

I livelli di C-peptide erano simili nei 3 gruppi nella prima parte dell'OGTT per diventare significativamente superiori nei pazienti diabetici dopo i 120 minuti.

I pazienti diabetici sembravano quindi mostrare una perdita della risposta rapida di secrezione insulinica per raggiungere livelli di secrezione più alti in un secondo tempo.

Questa tesi sembrerebbe confermata dall'analisi dei dati con il modello minimo di secrezione insulinica. Si osservava infatti una prima fase della secrezione insulinica maggiore nei pazienti prediabetici riconducibile alla capacità della β cellula di compensare uno stato d'insulinoresistenza tramite ipersecrezione. Nei soggetti diabetici tale ipersecrezione compensatoria non era presente determinando un incremento dei valori glicemici.

Seguendo l'andamento delle curve si poteva osservare come i pazienti diabetici presentassero un ritardo nella fase rapida di secrezione insulinica mostrando un indice secretivo maggiore per valori di glicemia pari a 4 mmol/l.

Per valori di glicemia pari a 8, 11 e 15 mmol/l i pazienti diabetici mostravano una minor risposta secretiva rispetto ai pazienti euglicemici.

Analizzando i dati inerenti il follow up emerge un miglioramento del compenso glicemico in accordo con alcuni dati della letteratura (Perseghin *et al* 2000, Merli *et al* 1999).

La maggior parte dei dati presenti in letteratura si è però concentrata sullo sviluppo di diabete mellito post trapianto con una stima di NODAT dopo trapianto epatico del 2.5-38% (Räkel *et al* 2011).

Nella nostra popolazione un solo paziente no DM pre-trapianto aveva sviluppato NODAT 3 mesi dopo l'intervento per ritornare euglicemico alle successive valutazioni. L'utilizzo del test da carico orale di glucosio per lo screening del DM nei pazienti cirrotici in lista per trapianto epatico non è quindi utile soltanto per una corretta diagnosi iniziale, ma anche per una possibile indicazione prognostica circa il metabolismo glucidico. La diagnosi di DM pre-trapianto è importante perché esso si associa ad una minor sopravvivenza e a maggiori complicanze cardiovascolari ed infettive (John *et al* 2001, Nishida *et al* 2006). La comparsa di diabete post-trapianto si associa ad un aumento della mortalità e del rischio di rigetto. Inoltre esso si associa ad una maggior incidenza di infezioni e di sepsi che contribuisce ad aumentare il tasso di mortalità a breve termine (Baid *et al* 2001, John *et al* 2002). Il fatto che nella nostra popolazione si sia registrato un solo caso di diabete mellito e due casi di prediabete post-trapianto potrebbe essere spiegato dal fatto che i dati presenti in letteratura sono deficitari per quanto riguarda la valutazione pre-trapianto. L'esecuzione di OGTT pre-

trapianto sembra fornire indicazioni sui soggetti a rischio di sviluppare NODAT in quanto la maggior parte di essi presenta già delle alterazioni basali del metabolismo glucidico.

Stime precise dell'incidenza di NODAT sono difficili da definire in quanto vengono usati diversi criteri diagnostici per il diabete mellito nei vari trial clinici e manca l'identificazione dei pazienti affetti da diabete prima del trapianto epatico (Reisæter *et al* 2001). Dati su pazienti sottoposti a trapianto renale che avevano eseguito un OGTT prima dell'intervento mostravano un rischio di NODAT del 10-50% (Räkel *et al* 2011). Le linee guida del 2004 sul NODAT (Wilkinson *et al* 2005) suggeriscono una valutazione pre-trapianto mediante anamnesi, glicemia a digiuno ed OGTT. L'OGTT è anche un miglior predittore dell'aumentato rischio cardiovascolare (Tominaga *et al* 1999). I pazienti con OGTT alterato dovrebbero essere indirizzati ad un counselling per modificare lo stile di vita quando possibile e seguiti attentamente post-trapianto.

Per quanto riguarda altri fattori di rischio cardiovascolare nella nostra popolazione si osservava un mantenimento dei valori di BMI di partenza durante il follow-up a 12 mesi, un incremento dei valori di colesterolo totale, LDL e trigliceridi come indicato già in letteratura (Kuramitsu *et al* 2014, Lopez *et al* 2006). Tale incremento potrebbe essere dovuto al miglioramento della sintesi epatica, alla terapia immunosoppressiva (Munoz *et al* 2005, Claes *et al* 2012, Deleuze *et al* 2006) ed alle modifiche alimentari (Lunati *et al* 2013).

Si osservava inoltre un miglioramento della funzione epatica, come atteso, ed un peggioramento della funzione renale in accordo con i dati presenti in letteratura (Kuramitsu *et al* 2014).

Si osservava inoltre, nonostante un miglioramento del quadro metabolico, un incremento dei valori di emoglobina glicata verosimilmente legato al miglioramento del quadro di anemia frequentemente presente nei pazienti cirrotici.

L'analisi delle curve mostrava un miglioramento progressivo dei valori glicemici nei mesi di follow-up, soprattutto nella seconda metà del test.

Le curve dell'insulina mostravano una riduzione dei valori in tutti i punti dell'OGTT. Ciò potrebbe essere spiegato sia da un miglioramento della clearance epatica dell'insulina che da una ridotta secrezione β cellulare.

Dai dati ottenuti attraverso il modello minimo di secrezione insulinica non appariva evidente una riduzione della secrezione β cellulare dopo trapianto epatico. Nello studio del 1999 era stata descritta una mancata normalizzazione post-trapianto della

secrezione insulinica studiata mediante clamp iperglicemico nonostante la riduzione dell'insulinoresistenza. In particolare la prima fase di secrezione β cellulare rimaneva più alta rispetto ai controlli (Merli *et al* 1999).

Anche nel nostro studio la prima fase di secrezione insulinica studiata mediante modello minimo, quindi tramite dati ottenuti con la metodica non invasiva dell'OGTT, non si riduceva dopo trapianto d'organo pur in presenza di un miglioramento dell'insulinosensibilità.

Dall'analisi delle curve di C-peptide emergeva una riduzione dei valori, anche se non così marcata come nel caso dell'insulina. Ciò potrebbe dipendere dal miglioramento dell'insulinoresistenza associato al fatto che il metabolismo del C-peptide è prevalentemente renale (Jones *et al* 2013) e quindi non viene influenzato così marcatamente come l'insulina dal trapianto epatico.

Analizzando i dati di follow-up si conferma il miglioramento dell'insulinosensibilità post trapianto epatico come già riportato in letteratura (Perseghin *et al* 2000, Merli *et al* 1999). La riduzione dell'HOMA-IR compare infatti già dopo 3 mesi dall'intervento e si mantiene durante tutto il follow-up.

Analizzando inoltre i dati ottenuti a 6 mesi dal trapianto d'organo, suddividendo i pazienti in due gruppi a seconda o meno del miglioramento del metabolismo glucidico, si osservava come le due popolazioni non differissero per BMI, durata dell'epatopatia, familiarità per DM, prevalenza d'infezione di HCV, terapia immunosoppressiva (alcuni dei quali sono fattori di rischio per lo sviluppo di NODAT).

Tale dato è in accordo con un altro studio italiano che non aveva evidenziato differenze tra pazienti cirrotici guariti e non guariti da DM dopo trapianto epatico per quanto riguarda la familiarità per DM2, l'eziologia della cirrosi, la terapia immunosoppressiva e il BMI (Perseghin *et al* 2000). A differenza del nostro studio, in quello di Perseghin non vi erano dati sulla durata dell'epatopatia che, secondo gli autori, potrebbe avere un impatto sul successo del trapianto epatico nella cura del diabete mellito (Perseghin *et al* 2000). Tale ipotesi non viene confermata dal nostro studio.

Nel nostro studio non sembravano quindi emergere fattori basali in grado di predire il miglioramento o meno del metabolismo glucidico dopo trapianto.

I due gruppi non differivano inoltre per HOMA-IR che risultava comunque notevolmente ridotto a 6 mesi rispetto al basale.

Analizzando le curve dell'OGTT in questi due gruppi di pazienti si osservava, come atteso, valori glicemici più bassi nei pazienti migliorati. In questi ultimi inoltre i livelli d'insulina e C-peptide erano più elevati in presenza di un simile stato d'insulino resistenza come ad indicare un miglioramento della secrezione β cellulare. Una maggiore secrezione β cellulare veniva indicata anche dall'analisi dei dati secondo il modello minimo di secrezione insulinica.

Ciò sembrerebbe confermare i dati dello studio italiano che aveva evidenziato non solo un miglioramento della sensibilità insulinica, ma anche della funzione β cellulare nei pazienti cirrotici e diabetici guariti dopo il trapianto (Perseghin *et al* 2000).

Il miglioramento del metabolismo glucidico post-trapianto sembra quindi dipendere non solo da un incremento dell'insulinosensibilità, ma anche da una miglior secrezione insulinica.

In conclusione possiamo affermare l'importanza di eseguire l'OGTT per una corretta valutazione dello stato glicometabolico dei pazienti cirrotici, considerando le importanti conseguenze prognostiche del diabete mellito sulla patologia epatica (Nishida *et al* 2006, Huang *et al* 2008).

Lo studio del metabolismo glucidico pre-trapianto sembra inoltre dare delle indicazioni sul rischio di alterazioni dello stesso post-trapianto. Si potrebbe quindi valutare un appropriato regime immunosoppressivo al fine di ridurre i rischi diabetogeni connessi a tale terapia senza minarne l'efficacia antirigetto.

Vista la possibilità di sviluppare, oltre al diabete, altre complicanze quali dislipidemia ed ipertensione arteriosa, che aumentano il rischio cardiovascolare (Reisæter *et al* 2001), appare fondamentale un follow-up prolungato nel tempo del paziente trapiantato e la rapida impostazione di adeguati schemi terapeutici.

Da questo studio emerge il ruolo non solo dell'insulinoresistenza, ma anche del relativo difetto di secrezione insulinica nello sviluppo di DM nei pazienti cirrotici.

Inoltre si è osservato come il trapianto epatico possa migliorare il metabolismo glucidico in un sottogruppo di pazienti cirrotici. Tale dato sembra essere legato non solo ad una riduzione dell'insulinoresistenza presente in tutti i pazienti dopo trapianto, ma anche ad un miglioramento della secrezione β cellulare.

Capitolo 6 – Bibliografia

Aghemo A, Prati GM, Rumi MG, Soffredini R, D'Ambrosio R, Orsi E, De Nicola S, Degasperi E, Grancini V, Colombo M. Sustained virological response prevents the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2012;56(5):1681-7.

Alberti A, Vario A, Ferrari A, Pistis R. Review article: Chronic hepatitis C—Natural History and cofactors. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22 Suppl 2:74-78

Algarem N, Sholkamy A, Alshazly M, Daoud A. New-onset diabetes and hypertension as complications of liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(3):870-2.

America Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2006;29S1:S62-9

Arase Y, Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Kobayashi M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Hosaka T, Hirakawa M, Ikeda K, Kumada H. Sustained virological response reduces incidence of onset of type 2 diabetes in chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009;49(3):739-44.

Asfar S, Metrakos P, Freyer J: An analysis of late deaths after liver transplantation. *Transplantation* 1996; 61:1377-1381.

Aytug S, Reich D, Sapiro LE, Bernstein D, Begum N. Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: a mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. *Hepatology.* 2003;38(6):1384-92.

Baid S, Cosimi AB, Farrell ML, Schoenfeld DA, Feng S, Chung RT, Tolloff-Rubin N, Pascual M. Posttransplant diabetes mellitus in liver transplant recipients: risk factors, temporal relationship with hepatitis C virus allograft hepatitis, and impact on mortality. *Transplantation* 2001;72:1066-72.

Bernsmeier C, Duong FHT, Christen V, Pugnale P, Negro F, Terracciano L, Heim MK. Virus-induced over-expression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signalling in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008;49:429-440

Bertolani C, Marra F. The role of adipokines in liver fibrosis. *Pathophysiology* 2008;15:91-101

Bianchi G, Marchesini G, Zoli M, Bugianesi E, Fabbri A, Pisi E. Prognostic significance of diabetes in patients with cirrhosis. *Hepatology* 1994;20:119-125

Boerner BP, Miles CD, Shivaswamy V. Efficacy and safety of sitagliptin for the treatment of new-onset diabetes after renal transplantation. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:617638.

Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004;40(6):1387-95.

Caldwell SH, Oelsner DH, Iezzoni JC, Hespenheide EE, Battle EH, Driscoll CJ. Cryptogenic cirrhosis: clinical characterization and risk factors for underlying disease. *Hepatology* 1999;29:664-9.

Cao Q, Mak KM, Ren C, Lieber CS. Leptin stimulates tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in human hepatic stellate cells: respective roles of the JAK/STAT and JAK-mediated H₂O₂-dependant MAPK pathways. *J Biol Chem* 2004;279:4292-304

Chalasani N, Crabb DW, Cummings OW, Kwo PY, Asghar A, Pandya PK, Considine RV. Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003;98:2771-6.

Cheung AT, Wang J, Ree D, Kolls JK, Byer-Ash M: Tumor necrosis factor-alpha induces hepatic insulin resistance in obese Zucker (fa/fa) rats via interaction of

leukocyte antigen-related tyrosine phosphatase with focal adhesion kinase. *Diabetes*, 2000; 49: 810-819.

Claes K, Meier-Kriesche HU, Schold JD, Vanrenterghem Y, Halloran PF, Ekberg H. Effect of different immunosuppressive regimens on the evolution of distinct metabolic parameters: evidence from the Symphony study. *Nephrol Dial Transplant*. 2012;27(2):850-7.

Cobelli C, Toffolo G.M., Dalla Man C., Campioni M., Denti P., Caumo A., Butler P., Rizza R.: Assessment of β -cell function in humans, simultaneously with insulin sensitivity and hepatic extraction, from intravenous and oral glucose test. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 293:E1-E15.

Corbetta S, Redaelli A, Pozzi M, Bovo G, Ratti L, Redaelli E, Pellegrini C, Beck-Peccoz P, Spada A. Fibrosis is associated with adiponectin resistance in chronic hepatitis C virus infection. *Eur J Clin Invest* 2011;41(8):898-905

Correia IMTD, Rego LO, Lima AS: Post-Liver transplant obesity and diabetes. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2003;6:457-460.

Dalla Man C, Campioni M, Polonsky KS, Basu R, Rizza RA Toffolo G, Cobelli C. Two-hour seven-sample Oral Glucose Tolerance Test and meal protocol: minimal model assessment of β -cell responsivity and insulin sensitivity in nondiabetic individuals. *Diabetes* 2005; 54: 3265-3273

Danovitch G. Immunosuppressive medications and protocols. In: Danovitch GM, ed. *Handbook of Kidney Transplantation*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:82-83.

Deleuze S, Garrigue V, Delmas S, Chong G, Swarcz I, Cristol JP, Mourad G New onset dyslipidemia after renal transplantation: is there a difference between tacrolimus and cyclosporine? *Transplant Proc*. 2006;38(7):2311-3.

De Marco R, Locatelli F, Zoppini G, Verlato G, Bonora E, Muggeo M. Cause-specific mortality in type 2 diabetes: the Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;22:756-61

Diehl A. Alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. Goodman L, Ausiello D, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 22nd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders, 2004:935-936.

Dumortier J, Bernard S, Bouffard Y, Boillot O: Conversion from tacrolimus to cyclosporine in liver transplanted patients with diabetes mellitus. *Liver Transplantation*, 2006; 12: 659-664.

Elsammak M, Refai W, Elsayaf A, Abdel-Fattah I, Abd Elatti E, Ghazal A: Elevated serum tumor necrosis factor alpha and ferritin may contribute to the insulin resistance found in HCV positive Egyptian patients. *Curr Med Res Opin* 2005;21:527-534.

El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*. 2004;126(2):460-8.

Encke J, Uhl W, Stremmel W, Sauer P: Immunosuppression and modulation in liver transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2004;19 (supplement 4):iv22-iv25.

Fardet L, Fève B. Systemic Glucocorticoid Therapy: a Review of its Metabolic and Cardiovascular Adverse Events. *Drugs*. 2014;74(15):1731-45

Friedman S, Schiano T. Cirrhosis and its sequelae. In: Goodman L, Ausiello D, eds. *Cecil Textbook of Medicine*. 22nd ed. Philadelphia, Pa.: Saunders 2004: 936-944.

Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management *World J Gastroenterol* 2009;15:280-288

García-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Maldonado-Garza H. Hepatogenous diabetes. Current views of an ancient problem. *Ann Hepatol* 2009;8:13-20

Graziadei I. Liver transplantation organ allocation between Child and MELD. *Wien Med Wochenschr* 2006;156:410-415.

Greenberg AS, McDaniel ML: Identifying the links between obesity, insulin resistance and beta-cell function: Potential role of adipocyte-derived cytokines in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Eur J Clin Invest* 2002;32:24-34.

Haidinger M, Werzowa J, Hecking M, Antlanger M, Stemer G, Pleiner J, Kopecky C, Kovarik JJ, Döllner D, Pacini G, Säemann MD. Efficacy and safety of vildagliptin in new-onset diabetes after kidney transplantation--a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Transplant.* 2014;14(1):115-23.

Harrison SA. Liver disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol* 2006;40: 68-76

Harrison, Principi di Medicina Interna, 16th edition

Herold KC, Nagamatsu S, Buse JB, Kulsakdinum P, Steiner DF: Inhibition of glucose-stimulated insulin release from bTC3 cells and rodent islets by an analog of FK506. *Transplantation*, 1993; 55: 186-192.

Hickman IJ, Macdonald GA. Impact of diabetes on the severity of liver disease. *Am J Med* 2007;120:829-34

Holstein A, Hinze S, Plaschke A, Egberts EH: Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17:677-681

Huang JF, Yu ML, Dai CY, Hsieh MY, Hwang SJ, Hsiao PJ, Lee LP, Lin ZY, Chen SC. Reappraisal of the Characteristics of glucose abnormalities in patients with chronic hepatitis C infection. *Am J Gastroenterol* 2008;103:1933-1940

Hui JM, Sud A, Farrell GC, Bandara P, Byth K, Kench JG, McCaughan GW, George J. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology* 2003; 125:1695-1704.

Jardine A. Assessing cardiovascular risk profile of immunosuppressive agents. *Transplantation* 2001 ;72(12 Suppl):S81-8.

Joel J Heidelbaugh, Bruderly M: Cirrhosis and chronic liver failure, complication and treatment. *Am Fam Physician* 2006;74(5):756-62

John PR, Thuluvath PJ. Outcome of liver transplantation in patients with diabetes mellitus: a case-control study. *Hepatology* 2001;34:889-95

John PR, Thuluvath PJ. Outcome patients with new-onset diabetes mellitus after liver transplantation compared with those without diabetes mellitus. *Liver Transplantation*, 2002; 8:708-13

Jones AG, Hattersley AT. The clinical utility of C-peptide measurement in the care of patients with diabetes. *Diabet Med.* 2013;30(7):803-17.

Kamada Y, Tamura S, Kiso S, Matsumoto H, Saji Y, Yoshida Y, Fukui K, Maeda N, Nishizawa H, Nagaretani H, Okamoto Y, Kihara S, Miyagawa J, Shinomura Y, Funahashi T, Matsuzawa Y. Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 2003;125:1796-807

Kamada Y, Takehara T, Hayashi N. Adipocytokines and liver disease. *J Gastroenterol* 2008;43:811-822

Kawaguchi T, Yoshida T, Harada M, Hisamoto T, Nagao Y, Ide T, Taniguchi E, Kumemura H, Hanada S: Hepatitis C virus Down-Regulates Insulin Receptor Substrate 1 and 2 through up-Regulation of Suppressors of Cytokine Signaling 3. *Am J Pathol* 2004; 165:1499-1508.

Khalili M, Lim JW, Bass N, Ascher NL, Roberts JP, Terrault NA. New onset diabetes mellitus after liver transplantation: the critical role of hepatitis C infection. *Liver Transpl* 2004;10:349-55

Kim MG, Choi WC. Differential diagnosis of diabetes mellitus caused by liver cirrhosis and other type 2 diabetes mellitus. *Korean J Epatol* 2006;12:524-529

Knobler H, Schihmanter R, Zifroni A, Fenakel G, Schattner A. Increased risk of type 2 diabetes in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mayo Clin Proc* 2000;75:355-9.

Konrad T, Zeuzem S, Vicini P, Toffolo G, Briem D, Lormann J, Herrmann G, Berger A, Kusterer K, Teuber G, Cobelli C, Usadel KH: Evaluation of factors controlling glucose tolerance in patients with HCV infection before and after 4 months therapy with interferon-alpha. *Eur J Clin Invest* 2000;30:111-121.

Kuramitsu K, Fukumoto T, Iwasaki T, Tominaga M, Matsumoto I, Ajiki T, Ku Y. Long-term complications after liver transplantation. *Transplant Proc.* 2014;46(3):797-803.

Lattuada G, Ragogna F, Perseghin G. Why Does NAFLD Predict Type 2 Diabetes? *Curr Diab Rep* 2011;11:167–172

Lindholm A, Albrechtsen D, Frödin L, Tufveson G, Persson NH, Lundgren G. Ischemic heart disease--major cause of death and graft loss after renal transplantation in Scandinavia. *Transplantation* 1995;60:451-7

Lopez MM, Valenzuela JE, Alvarez FC, Lopez-Alvarez M: Long-term problems related to immunosuppression (Review). *Transplant Immunology*, 2006; 17:31-35.

Lunati ME, Grancini V, Agnelli F, Gatti S, Masserini B, Zimbalatti D, Pugliese G, Rossi G, Donato MF, Colombo M, Beck-Peccoz P, Orsi E. Metabolic syndrome after liver transplantation: short-term prevalence and pre- and post-operative risk factors. *Dig Liver Dis.* 2013;45(10):833-9.

Marchetti P : “New-Onset Diabetes after Liver Transplantation”: from Pathogenesis to Management. *Liver Transplantation*, 2005;11(6):612-620.

Masini M , Campani D, Boggi U, Menicagli M, Funel N, Pollera M, Lupi R, Del Guerra S, Bugliani M, Torri S, Del Prato S, Mosca F, Filipponi F, Marchetti P: Hepatitis C virus infection and human pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes Care* 2005;28:940-941

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28:412-9

Merli M, Leonetti F, Riggio O, Valeriano V, Ribaldo MC, Strati F, Tisone G, Casciani CU, Capocaccia L. Glucose intolerance and insulin resistance in cirrhosis are normalized after liver transplantation. *Hepatology*. 1999;30(3):649-54

Mehta SH, Brancati FL, Strathdee SA, Pankow JS, Netski D, Coresh J, Szklo M, Thomas DL. Hepatitis C virus infection and incident type 2 diabetes. *Hepatology* 2003;38:50-56.

Montori VM, Velosa JA, Basu A: Posttransplantation diabetes: A systematic review of the literature. *Diabetes Care*, 2002;25:583-92.

Moreau R, Deleuge P, Pessione F, Hillaire s, Durand F; Lebrec D, Valla DC. Clinical characteristics and outcome of patients with cirrhosis and refractory ascites. *Liver Int* 2004;24: 457-464

Moucari R, Asselah T, Cazals-hatem D, Voitot H, Boyer N, Ripault MP, Sobesky R, Martinout-Peignoux M, maylin S, Nicolas-Chanoine MH, Paradis V, Vidaud M, Valla D, Bedossa P, Marcellin P. Insulin resistance in chronic hepatitis C: association with genotypes 1 and 4, serum HCV RNA level and liver fibrosis. *Gastroenterology* 2008;134:416-623

Munoz SJ, Deems RO, Moritz MJ, Martin P, Jarrell BE, Maddrey WC. Hyperlipidemia and obesity after orthotopic liver transplantation. *Transplant Proc* 1991;23:1480-3.

Munoz S, ElGenaidi H: Cardiovascular risk factors after liver transplantation. *Liver Transplantation* 2005;11(S2):S52-S56.

Negro F, Alaei M. Hepatitis C virus and type 2 diabetes. *World J Gastroenterol* 2009;13:1537-1547

Nicolau-Raducu R, Gitman M, Ganier D, Loss G, Cohen A, Patel H, Girgrah N, Sekar K, Nossaman B. Adverse Cardiac Events After Orthotopic Liver Transplantation: A Cross-sectional Study in 389 Consecutive Patients. *Liver Transpl.* 2014 Sep 11 (Epub ahead of print).

Nishida T, Tsuji S, Tsuji M, Arimitsu S, Haruna Y, Imano E. Oral glucose tolerance test predict prognosis of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2006;101:70-75.

Noto H, Raskin P. Hepatitis C infection and diabetes. *J Diabetes Complications.* 2006 ;20(2):113-20.

Oetjen E, Baun D, Beimesche S, Krause D, Ciorny I, Blume R, Dickel C, Wehner S, Knepel W: Inhibition of human insulin gene transcription by the immunosuppressive drugs Cyclosporin A and Tacrolimus in primary, mature islets of transgenic mice. *Mol Pharmacol* 2003;63:1289-1295.

Pallayova M, Wilson V, John R, Taheri S. Liver transplantation: a potential cure for hepatogenous diabetes? *Diabetes Care.* 2013;36(7):e97

Paolillo JA, Boyle GJ, Law YM: Posttransplant diabetes mellitus in pediatric thoracic organ recipients receiving tacrolimus-based immunosuppression. *Transplantation,* 2001;71:252.

Perseghin G, Mazzaferro V, Sereni LP, Regalia E, Benedini S, Bazzigaluppi E, Pulvirenti A, Leão AA, Calori G, Romito R, Baratti D, Luzi L. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology* 2000;31:694-703.

Perseghin G, Caumo A, Mazzaferro V, Pulvirenti A, Piceni Sereni L, Romito R, Lattuada G, Coppa J, Costantino F, Regalia E, Luzi L. Assessment of insulin sensitivity based on a fasting blood sample in men with liver cirrhosis before and after liver transplantation. *Transplantation*. 2003;76(4):697-702.

Pham PT, Edling KL, Chakkera HA, Pham PC, Pham PM. Screening strategies and predictive diagnostic tools for the development of new-onset diabetes mellitus after transplantation: an overview. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2012;5:379-87.

Polastri L, Galbiati F, Bertuzzi F, Fiorina P, Nano R, Gregori S, Aldrighetti L, Pozza G, Secchi A, Adorini L, Davalli AM. Secretory defects induced by immunosuppressive agents on human pancreatic beta-cells. *Acta Diabetol*. 2002;39(4):229-33.

Post DJ, Douglas DD, Mulligan DC: Immunosuppression in liver transplantation. *Liver Transplantation*, 2005, Nov; 11(11): 1307-1314.

Radu RG, Fujimoto S, Mukai E, Takehiro M, Shimono D, Nabe K, Shimodahira M, Kominato R, Aramaki Y, Nishi Y, Funakoshi S, Yamada Y, Seino Y. Tacrolimus suppresses glucose-induced insulin release from pancreatic islets by reducing glucokinase activity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(2):E365-71.

Räkel A, Karelis AD. New-onset diabetes after transplantation: risk factors and clinical impact. *Diabetes Metab* 2011;37:1-14

Redmon JB, Olson LK, Armstrong MB, Greene MJ, Robertson RP. Effects of tacrolimus (FK506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells. *J Clin Invest*. 1996;98(12):2786-93.

Reisæter AV, Hartmann A: Risk Factor and Incidence of Posttransplant Diabetes Mellitus. *Transplant Proc* 2001;33 (Suppl 5A):8S-18S.

Romero-Gomez M. Insulin resistance and hepatitis C. *World J Gastroenterol* 2006;12:7075-7080

Ruan H, Lodish HF: Insulin resistance in adipose tissue: Direct and indirect effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:447-455.

Salman TA, Allam N, Azab GI, Shaarawy AA, Hassouna MM, El-Haddad OM. Study of adiponectin in chronic liver disease and cholestasis *Hepatol Int* 2010;4:767-74

Schrem H, Luck R, Becker T, Nashan B, Klempnauer J: Update on liver transplantation using cyclosporine. *Transplant Proc* 2004;36:2525-2531.

SID, AMD: Standard italiani per la cura del diabete mellito, 2014

Tietge UJ, Selberg O, Kreter A. Alteration in glucose metabolism associated with liver cirrhosis persist in the clinically stable longterm course after liver transplantation. *Liver Transpl* 2004;10:1030-1040.

Tominaga M, Eguchi H, Manaka H, Igarashi K, Kato T, Sekikawa A. Impaired glucose tolerance is a risk factor for cardiovascular disease, but not impaired fasting glucose. The Funagata Diabetes Study. *Diabetes Care* 1999;22:920-4

Ullrich S, Berchtold S, Ranta F, Seebohm G, Henke G, Lupescu A, Mack AF, Chao CM, Su J, Nitschke R, Alexander D, Friedrich B, Wulff P, Kuhl D, Lang F. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion. *Diabetes* 2005;54:1090-9

Uygun A, Kadayifci A, Yesilova Z, Erdil A, Yaman H, Saka M, Deveci MS, Bagci S, Gulsen M, Karaeren N, Dagalp K. Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000;95:3584-9

Valderhaug TG, Hjelmessaeth J, Rollag H, Leivestad T, Røislien J, Jenssen T, Hartmann A. Reduced incidence of new-onset posttransplantation diabetes mellitus during the last decade. *Transplantation* 2007;84:1125-30.

van Hooff JP, Christiaans MH, van Duijnhoven EM. Evaluating mechanisms of post-transplant diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant*. 2004;19 Suppl 6:vi8-vi12.

Vanni E, Abate ML, Gentilcore E, Hickman I, Gambino R, Cassader M, Smedile A, Ferrannini E, Rizzetto M, Marchesini G, Gastaldelli A, Bugianesi E. Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2009;50(3):697-706.

van Raalte DH, Ouwens DM, Diamant M. Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur J Clin Invest* 2009;39:81-93

Vlaeminck-Guillem V, Guillem P, Dequiedt P, Pruvot FR, Fontaine P. Liver transplantation eliminates insulin needs of a diabetic patient. *Diabetes Metab*. 2000;26(6):493-6.

Wahlstrom HE, Akimoto R, Endres D: Recovery and hypersecretion of insulin and reversal of insulin resistance after withdrawal of short-term cyclosporine treatment. *Transplantation*, 1992;53(6):1190-1195.

Wang CS, Wang ST, Yao WJ, Chang TT, Chow P. Hepatitis C virus infection and the development of type 2 diabetes mellitus in a community-based longitudinal study. *Am J Epidemiol* 2007;166:196-203

Weir M. Impact of Immunosuppressive Regimes on posttransplant diabetes mellitus. *Transplant Proc* 2001;33:23S-26S

White DL, Ratziu V, El-Serag HB. Hepatitis C infection and risk of diabetes: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol* 2008;49:831-844

Wideroff L, Gridley G, Mellekjær L, Chow WH, Linet M, Keehn S, Borch-Johnsen K, Olsen JH. Cancer incidence in a population-based cohort of patients hospitalized with diabetes mellitus in Denmark. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1360-5

Wilkinson A, Davidson J, Dotta F, Home PD, Keown P, Kiberd B, Jardine A, Levitt N, Marchetti P, Markell M, Naicker S, O'Connell P, Schnitzler M, Standl E, Torregosa JV, Uchida K, Valantine H, Villamil F, Vincenti F, Wissing M. Guidelines for the

treatment and management of new-onset diabetes after transplantation. *Clin Transplant* 2005;19:291-8

Wu J, Zhu YH, Patel SB. Cyclosporin-induced dyslipoproteinemia is associated with selective activation of SREBP-2. *Am J Physiol*. 1999;277:E1087-94.

Younossi ZM, Stepanova M, Saab S, Kalwaney S, Clement S, Henry L, Frost S, Hunt S. The impact of type 2 diabetes and obesity on the long-term outcomes of more than 85 000 liver transplant recipients in the US. *Aliment Pharmacol Ther*. 2014;40(6):686-94

