

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO**

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE**

**XXXI ciclo**

**DIPARTIMENTO DI FISIOPATOLOGIA MEDICO-CHIRURGICA E DEI  
TRAPIANTI**

**RUOLO CENTRALE DELLA  $\beta$  CELLULA NEL PROMUOVERE LA  
REGRESSIONE DEL DIABETE DOPO TRAPIANTO DI FEGATO IN  
PAZIENTI CON CIRROSI EPATICA**

**Cirrhosis, Effects of TRAnsplantation and Diabetes (CETRA) Study**

Tesi di dottorato di:

Valeria GRANCINI

Matr. N. R11229

Tutor: Prof.ssa Maura Arosio

Coordinatore del dottorato: Prof. Emilio Berti

Anno Accademico: 2017-2018

## **INDICE**

### **Capitolo I - Introduzione**

1. Il diabete epatogeno
2. Il diabete post trapianto epatico
3. Il trapianto epatico e le sue ripercussioni metaboliche

### **Capitolo II – Scopo della tesi**

### **Capitolo III – Materiali e Metodi**

1. Disegno dello studio
2. Soggetti
3. Parametri valutati
4. Analisi statistica

### **Capitolo IV – Risultati**

### **Capitolo V – Discussione**

### **Capitolo VI – Conclusioni**

### **Bibliografia**

## CAPITOLO I - INTRODUZIONE

### 1. IL DIABETE EPATOGENO

#### 1.1 INTRODUZIONE

Il diabete epatogeno può essere definito come uno stato di alterata regolazione glicemica causata da una perdita di funzione epatica come conseguenza della cirrosi, una definizione che presuppone che il diabete si sviluppi dopo la comparsa di epatopatia (1).

Ad oggi, nonostante l'associazione tra diabete mellito (DM) e cirrosi sia stata riconosciuta (2), il diabete epatogeno non è considerato un'entità clinica separata (3). Questo è probabilmente dovuto alla difficoltà nel distinguere tale condizione dal classico DM di tipo 2 (DM2), a causa della natura bidirezionale che lega le alterazioni del metabolismo glucidico e la patologia epatica cronica.

Infatti, il DM2 stesso, nel contesto della sindrome metabolica (SM), può favorire l'insorgere di Non Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD), che può esitare in cirrosi (4). Inoltre, alcuni agenti eziologici tipici dell'epatopatia, come il virus dell'epatite C (HCV) (5), possono esercitare un affetto diabetogenico diretto già nelle fasi precoci della patologia attraverso diversi e in parte non ben definiti meccanismi comprendenti l'insulinoresistenza e, probabilmente, una disfunzione  $\beta$  cellulare (6). In tali condizioni la cirrosi non può essere considerata la causa diretta del diabete, dal momento che le anomalie del metabolismo glucidico insorgono prima del suo sviluppo. In ogni caso, quando diabete e cirrosi coesistono, a prescindere da quale patologia si sia sviluppata prima, essi si influenzano a vicenda (6,7).

Infine, il diabete epatogeno presenta caratteristiche cliniche e fisiopatologiche peculiari, che potrebbero giustificarlo come entità patologica distinta e che necessiterebbe, almeno in parte, di diverse procedure diagnostiche, di una diversa valutazione prognostica e di diverse possibili misure terapeutiche.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA

La cirrosi epatica è una delle principali cause di morbilità e mortalità nei paesi maggiormente sviluppati. E' la 14° principale causa di morte al mondo, ma la 4° se si considera la sola Europa. Ogni anno al mondo si contano 1.300.000 morti, 170000 in Europa e 33539 negli Stati Uniti. Attualmente in Europa 5500 persone all'anno vengono sottoposte a trapianto epatico e la cirrosi rappresenta la principale indicazione (8). I principali agenti eziologici che conducono a tale quadro clinico sono, negli Stati Uniti e in Europa, l'infezione da virus dell'epatite C (HCV), l'abuso di alcol e, sempre più, la presenza di steatoepatite non alcolica (NASH). L'infezione da virus dell'epatite B è la principale causa nell'Africa sub-Sahariana e nel Sud Est Asiatico. E' difficile fornire una stima esatta della prevalenza di cirrosi nel mondo, dal momento che, allo stadio iniziale, la patologia è pressochè asintomatica, portando a una sottodiagnosi di tale condizione.

In letteratura, la prevalenza stimata del diabete in soggetti con cirrosi è variabile, assestandosi tra il 20% e il 70%. Tale ampia variabilità dipende da numerosi fattori, inclusi i criteri diagnostici e i metodi di valutazione del DM, così come lo stadio e l'eziologia dell'epatopatia.

Nel 1967, Megyesi et al. (8) riportarono che, in una popolazione di 28 pazienti con patologia epatica cronica, il 43% dimostrava una normale tolleranza glucidica

(NGT), il 25% dimostrava intolleranza ai carboidrati (IGT) e il 32% DM al test da carico orale di glucosio (OGTT). Studi successivi hanno confermato l'alta incidenza di anomalie del metabolismo glucidico in pazienti con cirrosi (9-11).

In particolare, Muller et al. (11) dimostrarono che in una popolazione di 108 pazienti sottoposti a OGTT, il 27% presentava NGT, il 36% IGT e il 37% DM. E' stata inoltre riportata un'incidenza del 4.4% a un anno e del 21.2% a 4 anni di follow up nei pazienti cirrotici sottoposti a OGTT (12).

In realtà, i dati del US Scientific Registry of Transplant Recipients indicano incidenze meno elevate. Nei pazienti trapiantati dal 1999 al 2008, la percentuale di pazienti riceventi a cui era stato diagnosticato il diabete variava dal 14.9% al 21.5% nel 2008 (13), mentre un'anamnesi positiva per diabete era nota nell'11.2% dei pazienti sottoposti a trapianto epatico tra il 1994 e il 2013 (14).

Ricerche su singoli centri più recenti, che utilizzano i criteri correnti per la diagnosi di DM (2), hanno evidenziato che, basandosi sulla glicemia a digiuno (FPG), da sola o in associazione ai livelli di emoglobina glicata (HbA1c), la prevalenza di DM in pazienti cirrotici è di circa il 30-40% (Tabella 1.1).

In particolare, Holstein et al. (15), hanno riportato una prevalenza di DM del 32.7%, Wlazlo et al. (16) del 37.2%, Garcia-Compeàn et al. (17) del 27.6% (con un 10.7% della coorte già affetto da alterata glicemia a digiuno - IFG), e Jeon et al. (18) del 34.4%.

In aggiunta, tre studi condotti in pazienti cirrotici in lista d'attesa per trapianto di fegato (OLT), comprendenti due ricerche svolte presso il nostro Centro, hanno riportato una prevalenza di DM del 41.7% (19), 27.2% (20) e del 30.7% (21) rispettivamente, e di IFG del 16.6% (19), 3.4% (20) e 10.3 (21) rispettivamente.

In ogni caso, la prevalenza di anomalie del metabolismo glucidico risultava essere

più elevata quando pazienti cirrotici che non dimostrino FPG e HbA1c patologiche sono sottoposti a OGTT (Tabella 1.1), dal momento che una significativa percentuale dei pazienti veniva riclassificata come appartenente alla categoria IGT nel 25-50% circa e DM nel 35-55%.

In particolare, la prevalenza di IGT e DM, rispettivamente, era del 37.1% e 57.2% nello studio di Holstein et al. (15), 38% e 35% nello studio di Tietge et al. (22), 23.2% e 37.5% nello studio di Nishida et al. (23), 45% e 33.8% nello studio di Garcia-Compeàn et al. (17), 47.7% e 32% nello studio di Jeon et al. (18), 19.7% e 45.9% nello studio di Taguchi et al. (24), 36.8% e 47.2% nello studio di Grancini et al. (20). In contrapposizione a questi dati, Marselli et al. (21) hanno dimostrato come, di 208 pazienti cirrotici consecutivi con normali FPG o IFG, solo il 7.2% dimostrava IGT e il 6.3% DM.

Questi dati confermano la necessità di effettuare un OGTT per porre diagnosi di DM in tutti i pazienti cirrotici che presentino normali FPG e HbA1c (25). Utilizzando tale approccio combinato (Tabella 1), le alterazioni del metabolismo glucidico risultano essere ancor più alte negli studi sopra citati.

Comunque, solo una parte dei pazienti cirrotici con DM è affetta da diabete epatogeno. Infatti, nella maggior parte dei pazienti con aumentati livelli di FPG, il diabete è stato riscontrato prima della diagnosi di cirrosi (16, 20). Garcia-Compean et al. (17) hanno dimostrato che, di 36 pazienti cirrotici con glicemie compatibili con diabete, 25 (69.4%) avevano un'anamnesi positiva per DM di tipo 2, mentre solo 11 (30.6%) rispettavano i criteri per diagnosi di diabete epatogeno. Inoltre, dei 92 pazienti cirrotici con DM identificati da Marselli et al. (21), 78 (84.8%) avevano un DM già noto, mentre solo 14 (15.2%) hanno ricevuto diagnosi di diabete nel corso dello studio.

Tabella 1.1 – *Prevalenza di anormalità del metabolismo glucidico in pazienti con cirrosi utilizzando gli attuali criteri diagnostici (1)*

<b>Sulla base dei livelli di glicemia a digiuno (FPG) e/o HbA1c</b>				
<b>Studio</b>	<b>N</b>	<b>Metodo</b>	<b>IFG(%)</b>	<b>DM (%)</b>
Holstein et al. (2002)	52	FPG	NA	17 (33.2)
Wazlo et al. (2010)	94	FPG	NA	35 (37.2)
Garcia-Compeàn et al. (2012)	130	FPG	14 (10.7)	36 (27.6)
Jeon et al. (2013)	195	FPG	NA	67 (34.4)
Lunati et al. (2013)	84	FPG +HbA1c	14 (16.6)	35 (41.7)
Grancini et al. (2015)	206	FPG +HbA1c	7 (3.4)	56 (27.2)
Marselli et al. (2016)	300	FPG	31 (10.3)	92 (30.7)
<b>Sulla base dell'OGTT</b>				
<b>Studio</b>	<b>N</b>	<b>Metodo</b>	<b>IFG(%)</b>	<b>DM (%)</b>
Holstein et al. (2002)	35	OGTT	13 (37.1)	20 (57.2)
Tietge et al. (2004)	100	OGTT	38 (38.0)	35 (35.0)
Nishida et al. (2006)	56	OGTT	13 (23.2)	21 (27.5)
Garcia-Compeàn et al. (2012)	80	OGTT	36 (45.0)	27 (33.8)
Jeon et al. (2013)	128	OGTT	61 (47.7)	41 (32.0)
Taguchi et al. (2014)	61	OGTT	12 (19.7)	28 (45.9)
Grancini et al. (2015)	163	OGTT	60 (36.8)	77 (47.2)
Marselli et al. (2016)	205	OGTT	15 (7.2)	13 (6.3)
<b>Sulla base di entrambi</b>				
<b>Studio</b>	<b>N</b>	<b>Metodo</b>	<b>IFG(%)</b>	<b>DM (%)</b>
Holstein et al. (2002)	52	FPG + OGTT	50 (96.1)	37 (71.1)
Garcia-Compeàn et al. (2012)	130	FPG+OGTT+HbA1c	113 (86.9)	63 (48.3)
Jeon et al. (2013)	195	FPG + OGTT	169 (86.7)	108 (55.4)
Grancini et al. (2015)	206	FPG + OGTT	197 (88.3)	133 (59.6)
Marselli et al. (2016)	300	FPG + OGTT	141 (41.0)	105 (35.0)

Differenze nella prevalenza di DM sono legate anche alla gravità dell'epatopatia. Del

Vecchio et al. (10) hanno evidenziato come il DM sia più frequente in pazienti con cirrosi scompensata rispetto a pazienti in fasi più precoci della malattia, con una prevalenza del 63% nel primo gruppo, mentre Gentile et al. (12) hanno dimostrato un'incidenza di DM del 35.3% dopo 4 anni di follow up in pazienti con peggior funzione epatica contro il 21.2% di incidenza nell'intera coorte. Più recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato che il DM era presente nel 20.5% dei pazienti con cirrosi in classe A, 56.1% in classe B e 61.2% in classe C secondo la classificazione Child-Pugh (20), mentre Marselli et al. (21) non hanno trovato significative differenze nella prevalenza di DM o IGT a seconda della classificazione Child-Pugh.

L'eziologia della patologia epatica è un altro fattore che può influenzare la prevalenza di diabete attraverso diversi meccanismi (6), come specificato nel seguente paragrafo. Infatti, è stato dimostrato che il rischio di sviluppo di alterazioni del metabolismo glucidico è più alto in pazienti con cirrosi alcolica rispetto alla cirrosi colestatica (26) e, negli uomini, anche dopo aggiustamento dei risultati da diversi fattori confondenti (27, 28). E' stata dimostrata una relazione a U, con una più bassa incidenza di DM nei pazienti appartenenti al secondo quartile di intake alcolico (29). Allo stesso modo, un'alta prevalenza di DM è stata riscontrata in soggetti con emocromatosi (30) e in pazienti con cirrosi da NAFLD e infezione HCV, anche se nella maggior parte dei casi, in tali circostanze, l'insorgenza di diabete precede la diagnosi di cirrosi, non incontrando così i criteri diagnostici per diabete epatogeno.

L'acronimo NAFLD comprende una serie di condizioni patologiche che vanno dalla semplice steatosi alla steatoepatite non alcolica (NASH), alla cirrosi e, in alcuni casi, all'epatocarcinoma (HCC) (31). Il DM e le alterazioni metaboliche che si associano all'iperglicemia nella SM rappresentano la causa piuttosto che la conseguenza del fegato grasso (32), anche se l'insorgenza della patologia epatica a sua volta provoca

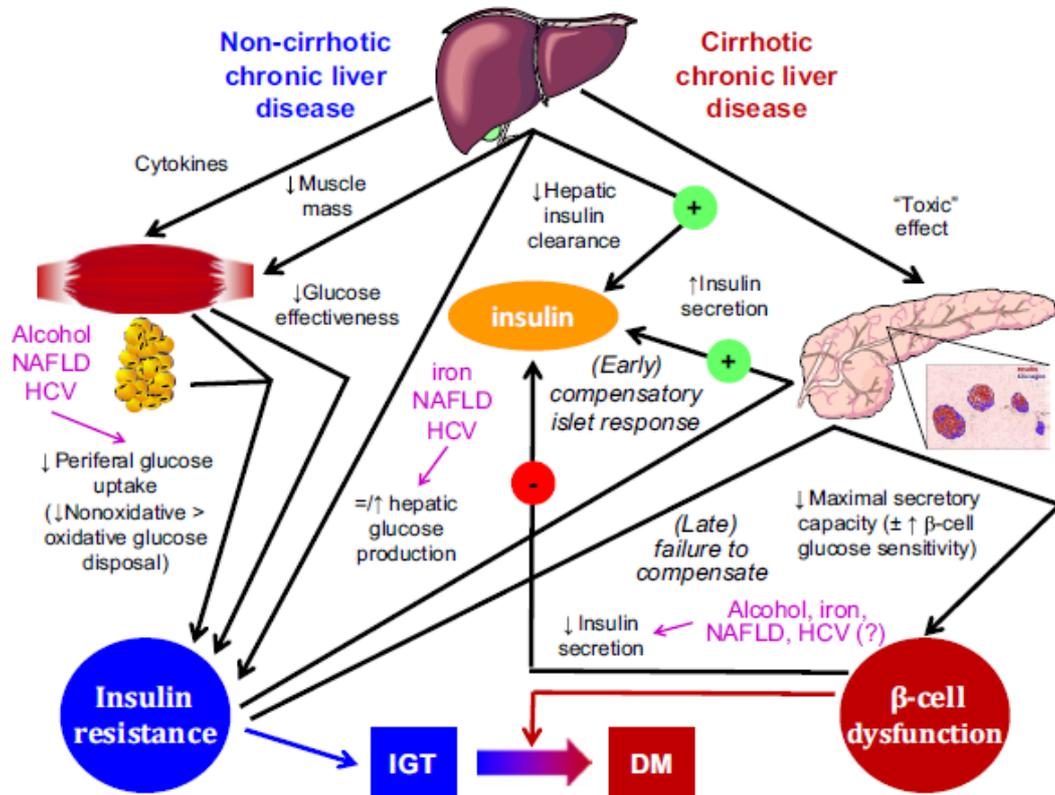
un ulteriore peggioramento della sensibilità insulinica (33). Di conseguenza, il DM, l'obesità e/o la SM sono virtualmente presenti in tutti i pazienti con NAFLD (34) e sono associati a un rischio 2.5 volte maggiore di sviluppare NAFLD (35,36). Allo stesso modo, il DM2 ha una prevalenza 3 volte più alta in pazienti con infezione cronica da HCV rispetto ai pazienti che non abbiano contratto tale infezione (37) e nei pazienti con epatite cronica C non evoluta a cirrosi rispetto a pazienti con epatite cronica da qualsiasi altra causa o alla popolazione generale (38, 39).

Comunque, nei pazienti con cirrosi, la prevalenza di DM2 è più alta che nei pazienti con epatite cronica, ma è simile nei pazienti HCV positivi o HCV negativi (26, 38), suggerendo che l'effetto diabetogenico promosso dalla disfunzione epatica sia maggiore rispetto a quello promosso dall'HCV.

### 1.3 FISIOPATOLOGIA

Sia l'insulinoresistenza che la disfunzione  $\beta$  cellulare contribuiscono allo sviluppo di diabete epatogeno (40,41) (Fig. 1.1), analogamente a quanto accade nel DM2 (42). Nonostante ciò, la fisiopatologia del diabete epatogeno è almeno in parte diversa da quella del DM2, anche se numerosi aspetti sono ancora in corso di studio.

Figura 1.1- *Fisiopatologia del diabete epatogeno. In violetto, gli effetti degli specifici agenti eziologici epatici; + e - indicano gli effetti positivi e negativi sui livelli circolanti di insulina, rispettivamente (1)*



### 1.3.1 Insulinorestenza

Numerosi studi clinici mostrano come l'insulinorestenza svolga un ruolo fondamentale nelle epatopatie croniche, gi  nello stadio di pre-cirrosi (43). L'insulinorestenza, nell'ambito della cirrosi,   caratterizzata da un diminuito uptake sistemico del glucosio, dovuto a una diminuzione del suo metabolismo sia tramite la via non-ossidativa (44) che ossidativa (38): l'uptake glucidico si   dimostrato diminuito in tessuti quali il tessuto adiposo e, soprattutto, il muscolo (40, 44, 45), in parte anche come conseguenza del concomitante stato di sarcopenia (46), ma non in area splancnica (44). Al contrario, la produzione epatica di glucosio risulta invariata

o addirittura diminuita nell'ambito della cirrosi (40, 45), principalmente a causa di un inadeguato stimolo alla glicogenolisi da parte del glucagone (47). Con l'instaurarsi del diabete conclamato, tuttavia, venendo meno il controllo insulinico su tale via metabolica, si può assistere a un incremento dell'output epatico di glucosio (40, 41). E' interessante notare che, soprattutto in pazienti affetti da NAFLD e infezione da HCV, la produzione epatica di glucosio può risultare aumentata già negli stadi pre-cirrotici della malattia.

La sensibilità al glucosio può risultare inoltre diminuita nei pazienti con cirrosi per via della perdita di massa magra (48,49,50). Il meccanismo attraverso il quale la cirrosi compromette l'insulinosensibilità periferica non è ancora completamente compreso: una caratteristica del diabete epatogeno è che i livelli sierici di insulina sono significativamente più alti che nel DM2 (43), ma non è ancora chiarito se l'iperinsulinemia rappresenti la principale causa di insulinoresistenza o se sia una risposta adattativa delle isole pancreatiche ad essa.

Da una parte, numerosi studi hanno dimostrato che l'iperinsulinemia insorge come conseguenza della ridotta clearance epatica di insulina, dovuta agli shunt porto-sistemici e alla disfunzione epatocitaria, tipici di tale condizione (51-54). Infatti, una riduzione prolungata dell'iperinsulinemia si è dimostrata efficace nel ripristinare la normale insulinosensibilità (55), confermando quindi il ruolo centrale dell'iperinsulinemia nello sviluppo di insulinoresistenza (56). Dall'altra parte, un'esagerata secrezione insulinica è stata associata ad insulinoresistenza in pazienti cirrotici ma non diabetici (53, 57), pur in assenza di modifiche nell'uptake di glucosio da parte del fegato, confermando quindi che tale modifiche metaboliche sono fenomeni finali, che possono solo aggravare una pre-esistente iperinsulinemia (47, 58).

L'aumento della produzione insulinica è supportato dall'evidenza di ipertrofia delle isole pancreatiche su biopsie di pazienti cirrotici (59), ove si documenta un più alto tasso di proliferazione e un più basso tasso di apoptosi rispetto agli individui non cirrotici (47, 58, 60).

Queste evidenze, insieme alla conferma della preesistenza di uno stato di insulinoresistenza rispetto all'instaurarsi della cirrosi nell'ambito dell'epatopatia cronica, supportano il concetto che un'alterata sensibilità insulinica non può essere attribuita allo scompenso epatico, anche se quest'ultimo può ulteriormente peggiorarla.

Al contrario, numerosi meccanismi partecipano alla patogenesi dell'insulinoresistenza, inclusi la serie di fattori di rischio per disordini metabolici di ogni singolo paziente, l'estensione e la gravità delle lesioni istologiche e, in particolare, l'eziologia dell'epatopatia sottostante (6,7,43) (Tabella 1.2).

Tabella 1.2 - *Meccanismi specifici di insulinoresistenza e disfunzione  $\beta$  cellulare nella cirrosi (1)*

	<b>Insulinoresistenza</b>	<b>Disfunzione <math>\beta</math> cellulare</b>
<b>Alcool</b>	↓uptake del glucosio insulino-mediato (in acuto)	Danno diretto alle $\beta$ cellule
<b>Ferro</b>	↓ soppressione epatica della produzione di glucosio insulino-mediata	Danno diretto alle $\beta$ cellule
<b>NAFLD</b>	↓ sensibilità insulinica per <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Disfunzione del tessuto adiposo: <ul style="list-style-type: none"> <li>-alterata secrezione di adipochine</li> <li>- ↑ citochine proinfiammatorie</li> <li>-↑ rilascio FFA</li> </ul> </li> <li>b) Steatosi <ul style="list-style-type: none"> <li>-↑ uptake e sintesi di FFA</li> <li>-↓ rilascio e catabolismo di FFA</li> </ul> </li> <li>c) ↓ effetto incretinico <ul style="list-style-type: none"> <li>- ↓ soppressione della produzione epatica di glucosio</li> <li>- ↓ stimolazione dell'ossidazione dei lipidi e inibizione della lipogenesi de novo</li> </ul> </li> </ul>	Lipotossicità verso le $\beta$ cellule
<b>HCV</b>	↓ sensibilità insulinica per via diretta e per via citochino-mediata (HCV-genotipo dipendente) <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Interferenza con il signalling insulinico <ul style="list-style-type: none"> <li>-fosforilazione di IRS-1 Ser viaJNK o mTOR/70S6K</li> <li>-ubiquitinazione e degradazione proteosomica di IRS-1</li> <li>-Akt/PKB defosforilazione via upregolazione di PP2A</li> </ul> </li> <li>b) Steatosi <ul style="list-style-type: none"> <li>-↑ lipogenesi de novo</li> <li>-↓βossidazione via down-regolazione di PPAR<math>\alpha</math></li> <li>-↓rilascio di trigliceridi per down-regolazione di MTP</li> </ul> </li> </ul>	Danno alle $\beta$ cellule: Diretto (tossico) Indiretto (autoimmune)

E' ormai noto che l'alcol riduce l'uptake del glucosio insulina mediato dopo un'ingestione acuta (5), anche se i dati sugli effetti dell'assunzione cronica di alcol sono ancora conflittuali (61). I depositi di ferro a livello epatocitario, nell'ambito dell'emocromatosi, si sono dimostrati in grado di interferire con la funzione dell'insulina di sopprimere la produzione epatica di glucosio (62).

Nella NAFLD, l'insulinoresistenza è mediata da meccanismi multipli: innanzitutto, l'infiammazione e la disfunzione del tessuto adiposo correlata all'obesità interferisce

con l'insulino-sensibilità attraverso un'alterata secrezione di adipokine, un'aumentata produzione di citochine pro-infiammatorie come tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , e un aumentato rilascio di free fatty acid (FFA). Questi cambiamenti alterano la sensibilità insulinica sia direttamente, tramite vie recettore-mediate sul riguardanti il metabolismo glucidico e lipidico (63), sia attraverso l'attivazione di vie proinfiammatorie che interferiscono con il segnale insulinico (64).

Oltre ad alterare la sensibilità insulinica, inoltre, le modifiche dei livelli di adipochine, e soprattutto la diminuzione di concentrazioni ematiche di adiponectina (65), sembrerebbero giocare un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nella progressione di NAFLD, stimolando la steatosi, l'infiammazione locale e la fibrosi (66, 67).

In secondo luogo, l'aumentato rilascio di FFA dagli adipociti, insieme ad aumentati uptake e sintesi di FFA a livello epatico, che eccedono il tasso di catabolismo, contribuisce allo sviluppo di steatosi, che altera la sensibilità insulinica tramite il coinvolgimento di numerosi intermediari del metabolismo lipidico (68).

Inoltre, il ridotto effetto incretinico, che si è dimostrato associato alla NAFLD (69, 70) così come all'obesità e al DM2, contribuisce all'instaurarsi di insulinoresistenza attraverso diversi meccanismi. Infatti, oltre ad inibire la secrezione di glucagone, gli ormoni incretinici inibiscono direttamente la produzione endogena di glucosio attraverso un meccanismo insulina-indipendente (71).

Ancora, glucagon-like peptide (GLP)-1 stimola l'ossidazione lipidica (72) e inibisce la lipogenesi (73) a livello epatico, riducendo il grado di lipotossicità e infiammazione, e influenza il metabolismo lipidico a livello del tessuto adiposo (73) e dell'intestino (74).

Infine, l'aumentata espressione dell'enzima dipetidyl peptidase 4 (DPP4) che si

verifica in corso di NAFLD (75) può contribuire all'alterazione dell'insulino sensibilità riducendo i livelli di incretini a favorendo la progressione della patologia epatica attraverso un meccanismo incretino-indipendente (76).

Numerose evidenze scientifiche dimostrano che uno stato di insulinoresistenza si instaura precocemente in corso di infezione cronica da HCV (77, 78), in relazione al grado di fibrosi (78, 79), ed è un fattore predittivo noto sulla risposta alla terapia antivirale con interferone (80). Uno studio svolto su soggetti HCV positivi ha evidenziato che la sensibilità insulinica è ridotta a livello epatico, ma non a livello muscolare (81) e a livello del tessuto adiposo (82), dato non confermato da un secondo studio sulla stessa popolazione (83), nel quale è stata dimostrata un'insulinoresistenza muscolare, ma non epatica né a livello del tessuto adiposo.

L'alterata sensibilità insulinica è stata attribuita a diversi meccanismi diretti e indiretti, virus-mediati (84). Shintani et al. (81) hanno dimostrato una partecipazione diretta del virus C nello sviluppo di insulinoresistenza e DM2 utilizzando un modello di topo transgenico che esprimeva specificatamente la proteina del core dell' HCV sugli epatociti. Come suggerito da tale studio, l'attivazione del sistema del TNF- $\alpha$  potrebbe giocare un ruolo fondamentale nell'alterazione del metabolismo glucidico. Questa ipotesi è supportata dall'evidenza di aumentati livelli sierici di TNF- $\alpha$  e del suo recettore, osservati in pazienti HCV positivi, e dalla relazione esistente tra queste alterazioni e il grado di infiammazione epatocitaria e danno epatico (85, 86).

Un'attivazione del sistema del TNF- $\alpha$  (così come di altre citochine) in pazienti HCV positivi potrebbe essere la conseguenza di una risposta immune dipendente da linfociti Th1, mediata da IFN $\gamma$ , evocata dal virus (5) e giustificherebbe la presenza di insulinoresistenza anche in tessuti non infetti, quali ad esempio il muscolo (84).

Inoltre, è stato dimostrato che l'HCV interferisce direttamente con il segnale

insulinico (84). Si gli effetti diretti di HCV che quelli citochina-mediati esitano nell'inattivazione e degradazione dell'IRS1 e 2 e nella defosforilazione dei successivi mediatori della cascata enzimatica quali la fosfatidilinositolo 3-kinasi e AKT/protein-kinasi B attraverso multipli meccanismi (87-92). Infine, è stato dimostrato che HCV è in grado di promuovere la steatosi, che risulta essere effettivamente più frequente in corso di infezione da HCV rispetto all'infezione da HBV (93), attraverso la stimolazione della lipogenesi e l'alterazione sia della  $\beta$ -ossidazione mitocondriale che l'esocitosi dei trigliceridi (94-98). La steatosi a sua volta altera l'azione insulinica (99), contribuendo ulteriormente all'instaurarsi di insulinoresistenza virus-mediata (5), anche se la gravità della steatosi non predice invariabilmente il grado di alterazione di sensibilità insulinica (84).

I meccanismi patogenetici virus-mediati sembrano essere correlati al genotipo di HCV, essendo i genotipi 1, 2 e 4 associati a un più grave stato di insulinoresistenza (43), anche se questa relazione risulta ancora controversa (5). Mentre i genotipi 1 e 4 correlano principalmente con un alterato signalling insulinico, il genotipo 3 sembrerebbe associato a un grado più severo di steatosi (84).

### 1.3.2 Disfunzione $\beta$ -cellulare

Il peggioramento della funzione  $\beta$ -cellulare è un evento cruciale per lo sviluppo di DM nei pazienti con cirrosi, così come nel DM2 (42). Infatti, la disfunzione insulare, risultato di alterazione nella massima capacità secretoria piuttosto che nella sensibilità  $\beta$ -cellulare al glucosio (100), non permette l'instaurarsi di meccanismi di compenso all'insulinoresistenza (41, 100).

I meccanismi specifici relativi ai differenti agenti eziologici dell'epatopatia

sottostante sono riassunti in Tabella 1.2.

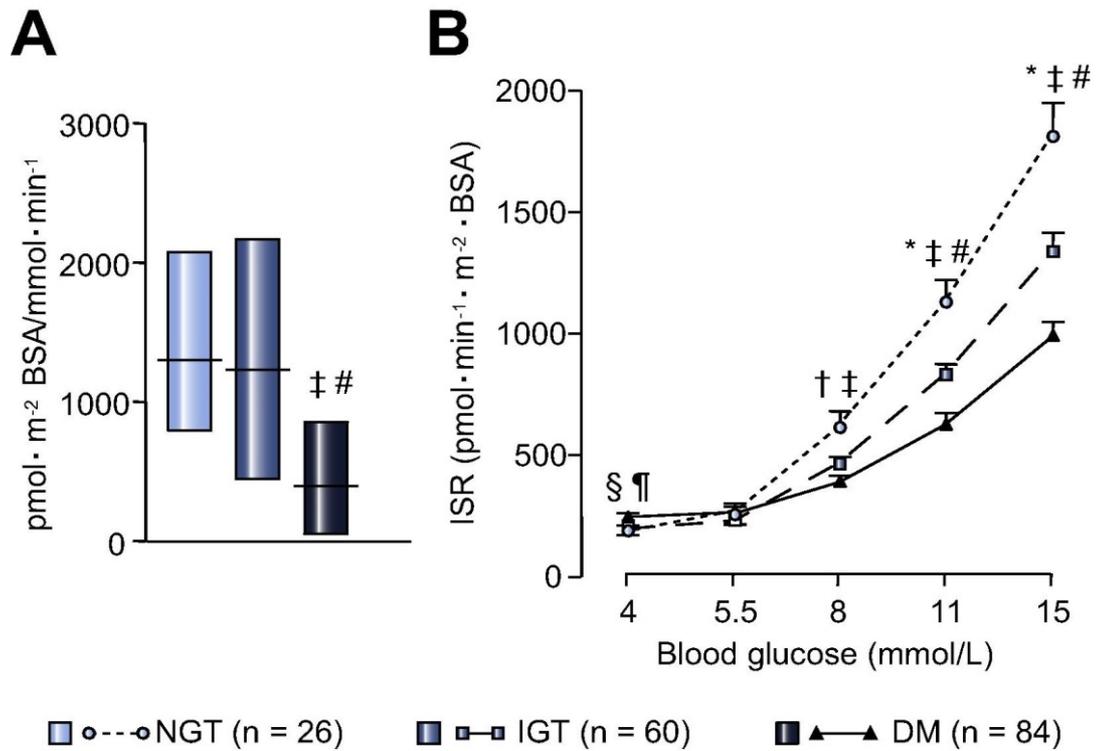
La patogenesi del diabete secondario a cirrosi alcolica ed emocromatosi è stata correlata al concomitante danno tissutale a livello epatico e  $\beta$ -cellulare causati, rispettivamente, dalla tossicità dell'alcol e dai depositi marziali. In particolare, nonostante il ferro si accumuli principalmente nelle cellule pancreatiche esocrine, la presenza di granuli contenenti ferro è stata dimostrata anche all'interno delle  $\beta$  cellule (101). Inoltre, nelle forme di NAFLD associate ad obesità e SM, lo spillover di FFA dal tessuto adiposo esita in deposizione di lipidi non solo a livello epatico, ma anche in altri tessuti, incluse le isole pancreatiche, con conseguente disfunzione  $\beta$ -cellulare (102). Infine, è stato anche ipotizzato che HCV potrebbe alterare la funzione  $\beta$ -cellulare attraverso meccanismi diretti (tossici) e indiretti (auto-immuni). Infatti HCV è stato identificato a livello delle cellule duttali e acinari del pancreas (103) e addirittura nelle  $\beta$  cellulare (104). Nonostante queste evidenze, la secrezione insulinica era simile in pazienti non diabetici con epatite cronica HCV positivi o negativi (77). Per quanto riguarda i meccanismi immuno-mediati, dimostrando HCV analogia aminoacidica con l'auto-antigene acido glutammico-decarbossilasi (105), è stato ipotizzato che l'infezione possa scatenare una reazione autoimmune contro le  $\beta$ -cellule attraverso un meccanismo di mimetismo molecolare (5). Tuttavia, nonostante la ben nota associazione tra infezione HCV e numerosi disordini autoimmuni (106), non c'è evidenza di un'aumentata prevalenza di autoimmunità verso le isole pancreatiche in pazienti HCV positivi (107).

In aggiunta a tali meccanismi, che potrebbero instaurarsi prima dello sviluppo di cirrosi in relazione alle specifiche eziologie, lo scompenso epatico sembrerebbe alterare la secrezione insulinica.

Un recente studio svolto presso il nostro Centro ha fornito importanti informazioni

circa il contributo relativo della disfunzione  $\beta$ -cellulare e dell'insulinoresistenza al diabete epatogeno, analizzando i risultati di un OGTT della durata di 3 ore con prelievi ematici intensivi (ogni 15 minuti durante la prima ora, quindi ogni 30 minuti), effettuati su una vasta popolazione di pazienti cirrotici (20). Ai dati ottenuti dal test è stato applicato un Modello Matematico ad hoc con lo scopo di stimare la funzione  $\beta$ -cellulare. Il grado di insulinoresistenza è stato invece stimato tramite l'indice OGIS-2h. I risultati hanno dimostrato una significativa riduzione dell'insulinosensibilità nei pazienti IGT e DM se confrontati con i pazienti NGT, mentre la funzione  $\beta$ -cellulare era significativamente alterata nei soggetti DM, ma non nei soggetti IGT. Questi dati indicano che il passaggio da NGT a IGT è principalmente dovuto a un peggioramento dell'insulinoresistenza, anche se la disfunzione  $\beta$ -cellulare può contribuire. Al contrario, un'ulteriore peggioramento della funzione  $\beta$ -cellulare, senza modifiche nella sensibilità insulinica, caratterizza il passaggio da IGT a DM conclamato nei pazienti con cirrosi (Figura 1.2).

Figura 1.2 – Funzione  $\beta$  cellulare nei soggetti NGT, IGT e DM. (A) controllo derivativo (mediana e range interquartile), (B) controllo proporzionale (media  $\pm$  SEM) (20).



Ancor più importante, il nostro studio ha dimostrato come il deterioramento della secrezione insulinica, ma non della sensibilità, era consensuale al peggioramento del compenso epatico, valutando la gravità della patologia epatica secondo la classificazione Child-Pugh, che risultava essere fattore predittore indipendente di disfunzione  $\beta$  cellulare anche dopo aggiustamento per tolleranza glucidica (Figure 3 e 4)

Figura 1.3 – Sensibilità insulinica (oral glucose insulin sensitivity – OGIS -2h) nei pazienti in base alla tolleranza glucidica (A) e alla gravità della patologia epatica (B) (media  $\pm$  SEM) (20).

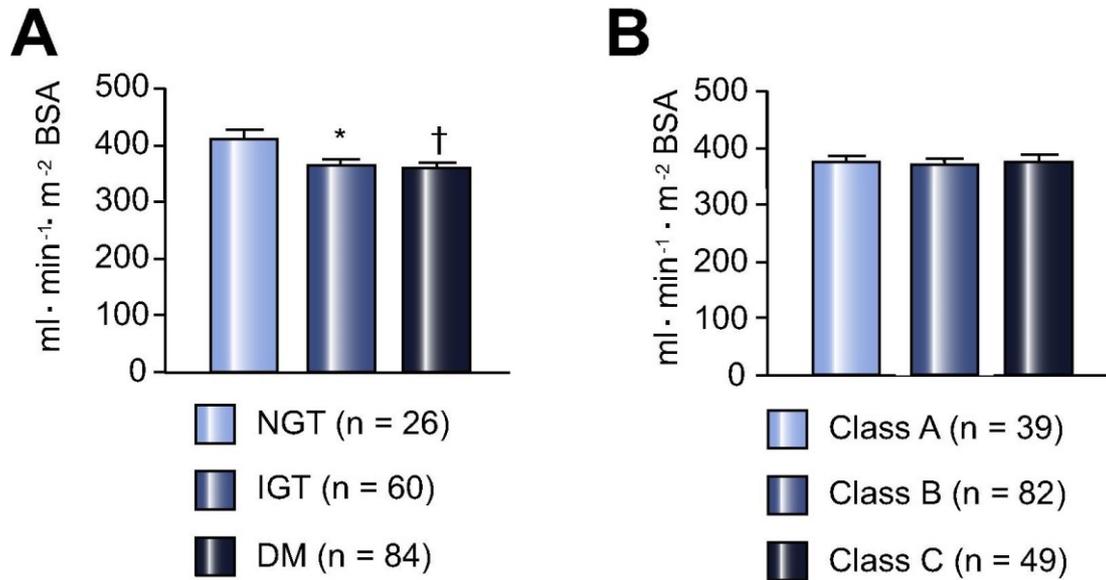
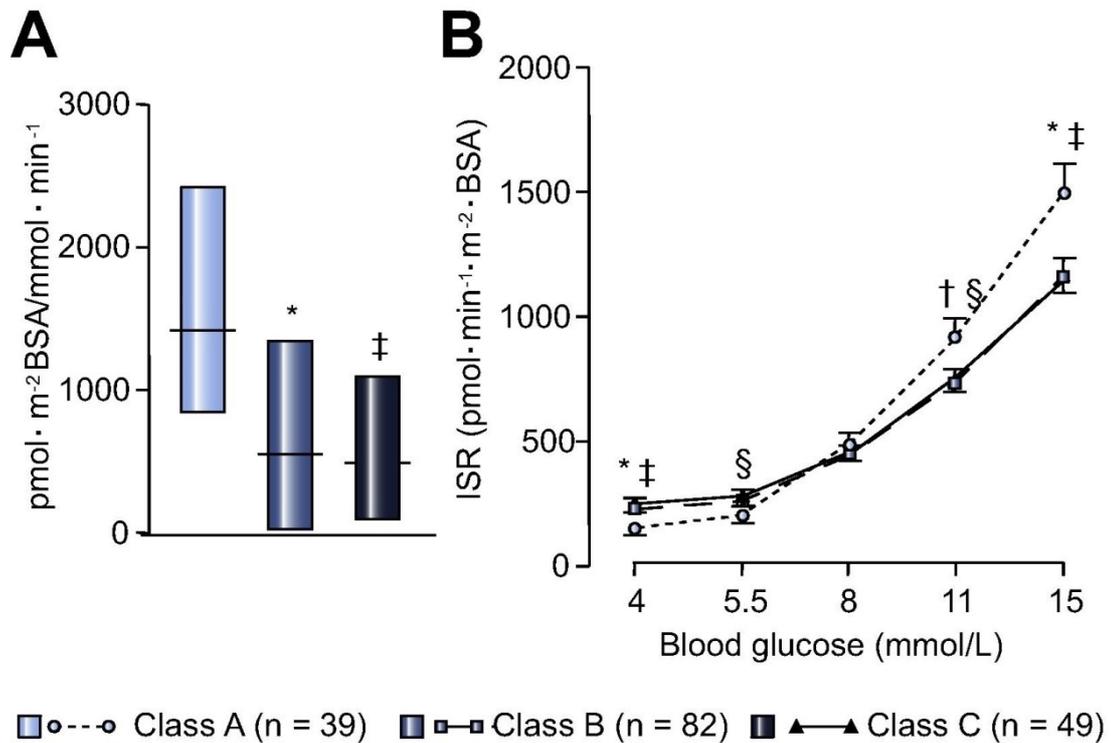


Figura 1.4 – Funzione  $\beta$  cellulare nei pazienti in base gravità della patologia epatica. (A) controllo derivativo (mediana e range interquartile), (B) controllo proporzionale (media  $\pm$  SEM) (20).



Queste evidenze indicano che la perdita di funzione epatica in sè esercita un effetto dannoso sulle isole pancreatiche. Tale condizione potrebbe essere giustificata dal fatto che i pazienti con cirrosi ad uno stadio più avanzato potrebbero avere una più lunga storia di malattia e, quindi, una maggior esposizione delle  $\beta$  cellule all'insulinoreistenza, che potrebbe esitare in una più profonda disfunzione insulare. Oltre a questo, un fegato scompensato potrebbe esercitare un effetto "tossico" diretto sulle  $\beta$  cellule attraverso la produzione di sostanze le cui concentrazioni potrebbero diminuire o aumentare a seconda di una diminuita sintesi o degradazione epatica.

Potenziati candidati per questo effetto tossico potrebbero essere i prodotti finali di glicazione (AGEs), i prodotti finali di lipossidazione (ALEs), fattori ipossia-

inducibili (HIFs) e la betatropina. Infatti, il fegato è il principale responsabile del catabolismo degli AGEs e degli ALEs, come confermato dall'evidenza che i livelli di AGE e di ALE aumentano notevolmente nei pazienti con cirrosi, correlando con la gravità dell'epatopatia, e diminuiscono dopo trapianto epatico (108). Questi prodotti, caratteristicamente elevati dei soggetti diabetici, sono anche potenzialmente in grado di alterare la secrezione e l'azione insulinica in soggetti non diabetici (109).

Inoltre, l'ipossia è una caratteristica comune nei pazienti con cirrosi ed è correlata alla gravità dell'epatopatia (110). Gli HIFs, una famiglia di fattori di trascrizione che mediano la risposta tissutale all'ipossia, sono implicati nello sviluppo di fibrosi epatica (111) e disfunzione  $\beta$  cellulare (112).

Infine, è stato dimostrato che la betatropina, un ormone identificato di recente, espresso principalmente a livello epatico e nel tessuto adiposo, è in grado di promuovere proliferazione  $\beta$  cellulare e migliorare la tolleranza glucidica (113). Rimane da chiarire il motivo per cui i livelli di betatropina sono aumentati, anziché diminuiti, nei pazienti cirrotici, in relazione alla gravità dell'epatopatia e del grado di insulinoresistenza (114), così come nei soggetti con DM2 (115). Questi risultati suggeriscono che una up-regolazione della betatropina potrebbe essere una risposta compensatoria alla ridotta sensibilità insulinica in corso di cirrosi. Per tale motivo sarebbero auspicabili ulteriori studi per meglio comprendere il cross-talk tra fegato e pancreas in pazienti cirrotici.

#### 1.4 PRESENTAZIONE CLINICA

La principale differenza clinica tra diabete epatogeno e DM2 in pazienti affetti da epatopatia cronica è il tempo di insorgenza del diabete che, rispettivamente, segue o

precede la diagnosi di cirrosi. Altre differenze riflettono la stretta relazione tra diabete epatogeno e perdita di funzione epatica, mentre il DM2 è correlato ai classici fattori di rischio, indipendentemente dal grado di scompenso epatico (Tabella 1.3)

Tabella 1.3 – *Caratteristiche distintive del diabete epatogeno e del DM2 che insorge in pazienti con epatopatia cronica (1)*

	<b>Diabete epatogeno</b>	<b>DM2</b>
<b>Insorgenza</b>	Dopo l'insorgenza di cirrosi	Prima dell'insorgenza di cirrosi
<b>Presentazione</b>	DM subclinico (FPG e HbA1c nella norma, risposta anormale all'OGTT)	DM conclamato (FPG e HbA1c anormali)
<b>Ipoglicemia e MALA</b>	Alto rischio	Basso rischio
<b>Effetto del trapianto</b>	Guarigione o miglioramento (?)	Persistenza
<b>Fattori di rischio tradizionali per DM</b>	Meno frequenti	Frequenti
<b>Complicanze del DM</b>	Bassa incidenza	Alta incidenza
<b>Complicanze dell'epatopatia</b>	Incidenza più alta rispetto ai soggetti cirrotici non diabetici	Incidenza più alta rispetto ai soggetti cirrotici non diabetici
<b>Mortalità</b>	Incidenza più alta rispetto ai soggetti cirrotici non diabetici	Incidenza più alta rispetto ai soggetti cirrotici non diabetici

*MALA: acidosi lattica metformina-associata, OLT: trapianto epatico ortotopico*

Come riferito precedentemente, i livelli di FPG e HbA1c potrebbero essere inappropriatamente normali in pazienti con diabete epatogeno, come risultato netto dell'alterato metabolismo glucidico (a causa della disfunzione epatica) e della ridotta emivita degli eritrociti (a causa dell'ipersplenismo) (43). Di conseguenza, il rapporto glicemiapost-prandiale/FPG è più alto nei soggetti con diabete epatogeno (7) e la diagnosi di questa condizione spesso richiede un OGTT (25).

In aggiunta, se confrontato con pazienti affetti da DM2 e cirrosi compensata, il diabete epatogeno potrebbe essere associato ad un maggior rischio di episodi ipoglicemici se è in corso una terapia anti-iperglicemizzante, dovuto all'impossibilità di aumentare la produzione epatica di glucosio, e a un maggior rischio di sviluppo di acidosi lattica associata a metformina, a causa di un alterato metabolismo epatico dei lattati (6).

Infine, il diabete epatogeno è meno frequentemente associato ai fattori di rischio tradizionali come anamnesi familiare positiva, età e indice di massa corporea (10), così come è meno frequentemente associato alle complicanze micro e macro vascolari (15, 22). La più bassa incidenza di complicanze del diabete potrebbe essere correlata all'aumentata mortalità per le complicanze della cirrosi o al possibile effetto protettivo esercitato dall'insufficienza epatica attraverso la diminuzione dei livelli di colesterolo, di pressione arteriosa e attraverso le alterazioni della cascata della coagulazione (6, 7). Infatti, numerosi studi prospettici e retrospettivi indicano che la sopravvivenza è significativamente più bassa nei soggetti cirrotici diabetici rispetto ai soggetti cirrotici non diabetici (23, 116-119), anche se pochi studi non hanno confermato questo dato (120-121). Inoltre, nello studio di popolazione "Verona study", il rischio di morte per causa epatica a 5 anni era 2.52 volte maggiore nei soggetti con DM2 se confrontati con la popolazione generale (122).

E' da sottolineare il fatto che il tasso di mortalità era aumentato anche nei soggetti cirrotici con alterazioni subcliniche del metabolismo glucidico (IGT o DM diagnosticato tramite OGTT), se confrontati con soggetti NGT. In essi la principale causa di morte era un peggioramento della patologia epatica in > 90% dei casi (123).

Comunque, il DM non era associato ad un'aumentata mortalità in pazienti con un Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score  $\geq 10$ , suggerendo che l'effetto deleterio del diabete sulla sopravvivenza era mascherato dalla gravità della patologia epatica sottostante (119).

La presenza di DM è stata associata anche alla presenza di encefalopatia (119, 124-126), probabilmente a causa di molteplici meccanismi (127), così come ad insufficienza epatica acuta (128). Inoltre, il tasso di incidenza di ascite (117, 119), emorragia gastrointestinale (18, 129), infezioni batteriche (119) e peritoniti (130) è

risultato più alto nei soggetti DM rispetto ai soggetti cirrotici non diabetici. Infine, numerosi dati in letteratura confermano la stretta relazione tra diabete ed epatocarcinoma (131-134).

Per tale motivi, nonostante le anomalie del metabolismo del glucosio non siano considerate nei più utilizzati algoritmi diagnostici, come ad esempio il Child-Pugh Score e il MELD score (135), il DM è un maggior predittore di mortalità (118) nei soggetti con cirrosi. Inoltre, in pazienti cirrotici con ascite refrattaria in lista d'attesa per trapianto epatico, è stato dimostrato che il DM, ma non il Child-Pugh score, è predittore indipendente di mortalità (117).

Queste evidenze suggeriscono la necessità di includere la presenza o meno di DM nella valutazione prognostica di pazienti con cirrosi.

Il diabete epatogeno dovrebbe teoricamente essere associato a un più alto tasso di complicanze della patologia epatica, a causa della sua stretta relazione con la disfunzione epatica, se confrontato con il DM2 che insorge in pazienti con epatopatia cronica. In realtà, non sono disponibili dati esaustivi sull'impatto prognostico del diabete epatogeno rispetto al DM2 nei pazienti con cirrosi.

## **2. IL DIABETE POST TRAPIANTO EPATICO**

Sulla base dei dati dell'European Live Transplant Registry, che comprende i dati di più di 93000 trapianti di fegato effettuati tra il 1968 e il 2009, l'indicazione più frequente per il trapianto di fegato (OLT) è la cirrosi secondaria ad epatite virale o abuso alcolico. Dopo la cirrosi, l'indicazione più comune è l'epatocarcinoma (HCC) e, a seguire, la colestasi cronica (da cirrosi biliare primitiva o atresia delle vie biliari extraepatiche) (136).

Il tasso di sopravvivenza dei pazienti sottoposti a OLT è migliorato drasticamente negli ultimi anni, raggiungendo l'85% a un anno e il 73% a 5 anni nel registro europeo. I tassi rispettivi negli Stati Uniti sono dell'88 e dell'70% (137).

L'allungarsi della sopravvivenza media dei soggetti riceventi trapianto di fegato comporta l'aumento dell'incidenza di alcune complicanze, tra le quali lo sviluppo di diabete mellito (Post Transplant Diabetes Mellitus - PTDM). Tale patologia risulta associata, oltre alle note complicanze del diabete, a una diminuita funzione del graft e a un aumentato rischio di rigetto (138).

Il PTDM può essere definito come un'alterazione del metabolismo glucidico che rispetta i criteri diagnostici di DM in pazienti sottoposti al OLT.

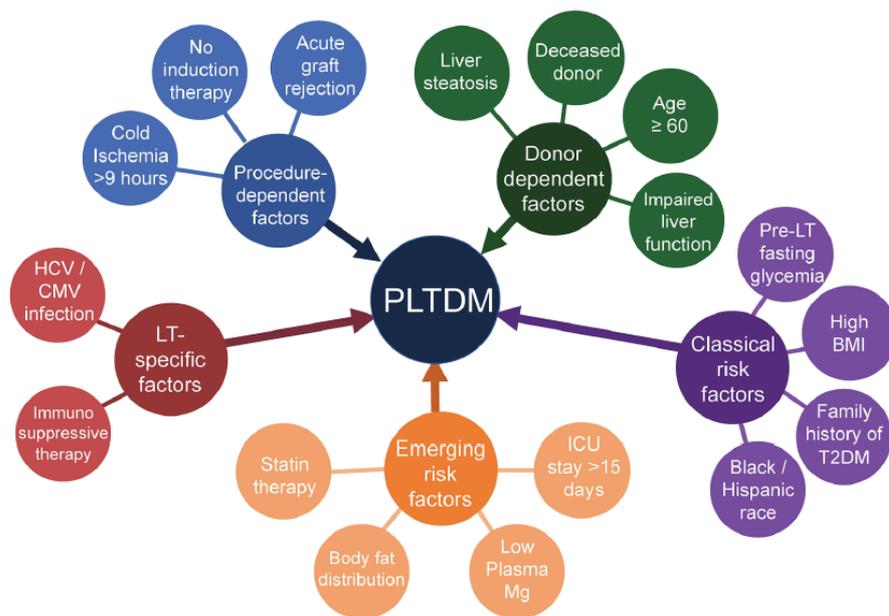
L'incidenza di tale patologia, sulla base dei dati della letteratura, varia sulla base dei criteri diagnostici utilizzati. Per tale motivo le "International Consensus Guidelines", sviluppate nel 2014 (139), raccomandano l'utilizzo dei criteri della World Health Organization (140) o dell'American Diabetes Association (141). Inoltre, dal momento che alcuni casi di PTDM possono essere transitori, la durata del follow-up e il tempo della diagnosi possono influenzare l'incidenza globale riportata (142-145).

## 2.1 Fattori di rischio

Come discusso precedentemente, mentre è difficile che in un diabete insorto prima di cirrosi possa ristabilirsi l'euglicemia dopo un trapianto epatico andato a buon fine, il diabete epatogeno, direttamente causato dalla perdita di funzione epatica, potrebbe beneficiare di tale intervento terapeutico (16). Tuttavia, numerosi fattori possono favorire la persistenza o addirittura la diagnosi de novo di DM dopo trapianto epatico. I fattori di rischio per lo sviluppo di PTDM possono essere suddivisi in due

categorie: quelli associati allo sviluppo di DM nella popolazione generale e quelli specificatamente associati allo sviluppo di DM in riceventi trapianto di fegato (Figura 1.4) (167)

Figura 1.4 – *Fattori di rischio per lo sviluppo di PTDM. CMV: citomegalovirus, ICU: intensive care unit (167)*



I “classici” fattori di rischio includono l’età avanzata (144-153), il sesso maschile (145, 147, 152, 153), un alto BMI (147, 148, 152, 153), presenza di alterazioni metaboliche pre-trapianto (154-156), familiarità per DM (154) ed etnia afroamericano o ispanica (148, 157).

Le condizioni che predispongono allo sviluppo di DM dopo OLT sono l’epatite C (143-148, 152, 154, 156, 158-161), l’infezione da citomegalovirus (150, 153), terapia immunosoppressiva con alte dosi di corticosteroidi (142, 143, 148, 151, 152, 162) o inibitori delle calcineurine (CNIs; tacrolimus e ciclosporina) (144, 148, 149, 151,

152, 154, 163, 164). La steatoepatite non alcolica (NASH) è un importantissimo fattore di rischio per lo sviluppo di DM2 nella popolazione generale (165), e non c'è ragione di pensare che tale associazione dovrebbe essere diversa in pazienti che sottoposti a OLT.

Altri fattori di rischio, la cui relazione è però meno evidente, sono la terapia con statine (155), la distribuzione centripeta del grasso corporeo nel periodo pre-trapianto (160), bassi livelli di magnesio prima e 1 mese dopo l'intervento (150), l'iperglicemia nel primo mese post-trapianto (153, 164) e la necessità di permanenza in Unità di terapia intensiva per > 15 giorni dopo intervento (153).

Anche le caratteristiche del donatore possono giocare un importante ruolo nel predisporre o proteggere dal PTDM. Fattori associati ad un aumentato rischio sono l'età > 60 anni (147, 148), il sesso maschile (153), la stasi epatica diagnosticata con TC o biopsia (142, 163) e il trapianto da cadavere rispetto a donatore vivente (145, 153). In uno studio su pazienti giapponesi riceventi trapianto epatico da donatore nientista, livelli di colinesterasi < 185 IU/L (come misura di funzione epatica), sono risultati fattori di rischio indipendente per sviluppo di PTDM (149).

Tra le variabili collegate alla procedura stessa un tempo di ischemia fredda > 9 ore è estremamente dannoso (153). L'uso di una terapia di induzione con farmaci diversi dai corticosteroidi, come ad esempio il basiliximab (148, 152) come parte del regime immunosoppressivo si è dimostrato protettivo verso il PTDM in numerosi studi. Anche il rigetto acuto di organo predispone allo sviluppo di PTDM (147, 150, 152, 166), ma un legame causa-effetto è difficile da stabilire, dato il necessario ricorrere, in questa situazione, all'utilizzo di steroidi ad alte dosi

### 2.1.1 Terapia immunosoppressiva

Il trattamento immunosoppressivo (glucocorticoidi, CNIs E Inibitori del Mammalian Target per la Ripamicina - mTOR), gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo di PTDM (168-171).

I glucocorticoidi, ampiamente utilizzati nell'immediato post-trapianto e in caso di rigetto d'organo, possono interferire con il metabolismo glucidico attraverso diverse vie.

Il catabolismo lipidico e muscolare indotto dallo steroide gioca un ruolo fondamentale, fornendo ulteriore substrato alla produzione di glucosio. Nel muscolo, i glucocorticoidi promuovono un aumento del catabolismo e una diminuzione della sintesi proteica, risultando in un aumento dei livelli di aminoacidi e atrofia muscolare, e contribuiscono alla riduzione dell'uptake insulino-mediato del glucosio.

Nel tessuto adiposo, i corticosteroidi promuovono un aumento della lipolisi, risultando in un aumento dei livelli plasmatici di acidi grassi non esterificati, che si accumulano a livello muscolare e che, a loro volta, riducono l'uptake muscolare interferendo con il segnale insulinico (171, 172). Inoltre, l'esposizione in vitro delle  $\beta$  cellule ai glucocorticoidi provoca un'inibizione della secrezione insulinica, attraverso una up-regolazione della serum-and-glucocorticoid-inducible kinasi-1 (173), citotossicità (174) e un effetto antiproliferativo e pro-apoptotico (175) e tale fenomeno sembra essere direttamente correlato alla dose e alla durata dell'esposizione.

I CNIs comprendono la ciclosporina, un undecapeptide ciclico idrofobo con terminazione N-metilata che la rende resistente alla digestione da parte delle proteasi gastrointestinali, e il tacrolimus, un antibiotico macrolide (176, 177). Questi farmaci inibiscono la calcineurina, una fosfatasi calcio-dipendente responsabile

dell'attivazione e della regolazione delle cellule T, ma che può essere ritrovata anche in altri tessuti (178). Per tale ragione, essa è coinvolta anche in molte altre funzioni cellulari, come la trascrizione di fattori fondamentali per la sopravvivenza e la proliferazione delle  $\beta$  cellule (179) e la regolazione delle vie metaboliche nel tessuto adiposo e scheletrico (180,181). L'interferenza da parte di questi farmaci porta all'inibizione della secrezione insulinica basale e glucosio-stimolata, con effetto maggiore per il tacrolimus rispetto alla ciclosporina (169, 182), mentre l'effetto di tali agenti sulla sensibilità insulinica sembra essere meno significativo. L'esposizione in vitro degli adipociti al tacrolimus si è dimostrata in grado di ridurre l'uptake di glucosio (182), ma dati da studi in vivo non sono ancora disponibili.

Gli inibitori di mTOR, everolimus e sirolimus, esercitano la loro azione immunosoppressiva interferendo con l'attivazione e la proliferazione delle cellule T mediata dalla proteina mTOR. Effetti collaterali tipici di tale farmaco sono l'ipercolesterolemia e l'ipertrigliceridemia (184, 185), mentre la loro interferenza con il metabolismo del glucosio sembra essere meno evidente in confronto agli steroidi e ai CNI, rendendo tale classe di farmaci una buona strategia terapeutica per i soggetti affetti o a rischio di DM.

In aggiunta a tutti i fattori di rischio portati precedentemente, gli importanti cambiamenti nel lifestyle dopo trapianto di fegato possono influenzare profondamente il metabolismo glucidico in entrambi i sensi.

Da una parte, l'aumentato appetito e il ritorno a una dieta libera portano ad un aumento dell'intake calorico giornaliero da carboidrati e lipidi, favorendo l'aumento di peso e le anomalie metaboliche associate all'obesità centrale, compresi DM e dislipidemia (186). Inoltre l'aumentato intake di sale può favorire o slantizzare

un'ipertensione arteriosa, aumentando ulteriormente il rischio cardiovascolare in questi pazienti.

Dall'altra parte, il miglioramento generalizzato della salute e l'aumentato intake proteico che solitamente seguono un trapianto epatico andato a buon fine portano a un miglioramento significativo della debolezza muscolare e della sarcopenia, favorendo l'aumento dell'attività fisica con tutti i benefici cardio-metabolici che l'accompagnano.

### 3. IL TRAPIANTO EPATICO E LE SUE RIPERCUSSIONI METABOLICHE

In uno studio recentemente condotto presso il nostro Centro (20) abbiamo dimostrato come, rispetto ai soggetti cirrotici non affetti da DM, i pazienti cirrotici con diabete epatogeno presentano una peggior funzione  $\beta$  cellulare, che si aggrava parallelamente al peggiorare della funzione epatica. Inoltre, tali pazienti presentano glicemie a digiuno e livelli di HbA1c nei range di normalità, a causa dell'alterato metabolismo epatico dello zucchero e della ridotta emivita degli eritrociti, rispettivamente (187, 188). Questa presentazione "subclinica" implica che, nei pazienti con cirrosi, un OGTT è sempre richiesto per la diagnosi e fornisce una spiegazione alle differenze di prevalenza di DM riscontrate in letteratura, a seconda dei mezzi diagnostici utilizzati.

Per definizione, il diabete patogeno dovrebbe trarre beneficio dall'OLT, il trattamento di prima scelta per l'epatopatia terminale, dal momento che il ripristino della funzione epatica dovrebbe eliminare i fattori locali e sistemici che influiscono profondamente sulla secrezione e sulla sensibilità insulinica, portando quindi a un miglioramento o addirittura alla regressione del DM. Dall'altra parte, l'OLT, così

come in caso di trapianto di altri organi solidi, è spesso associato allo sviluppo di DM post trapianto. Studi precedenti condotti su pazienti con diabete conclamato hanno fornito risultati conflittuali. Perseghin et al. hanno dimostrato che l'OLT è in grado di curare il diabete in 2/3 dei casi. Al contrario, Lunati et al. hanno dimostrato che la prevalenza di diabete rimane invariata in un periodo di follow-up di un anno, con una percentuale di pazienti che ha sviluppato DM post trapianto. Allo stesso modo, perfino in pazienti cirrotici con normali glicemie a digiuno, come nel caso del diabete epatogeno, le anomalie del metabolismo glucidico possono persistere anche dopo trapianto, nonostante il reinstaurarsi di una normale funzione epatica.

I meccanismi fisiopatologici alla base della regressione o meno del diabete sono ampiamente sconosciuti.

Sorprendentemente, nessuno studio ha mai valutato il contributo rispettivo dei 3 determinanti diretti della regolazione glucidica insulino-dipendente, quali la secrezione e il catabolismo insulinico, che insieme determinano la biodisponibilità insulinica, e la sensibilità insulinica.

## **CAPITOLO II – SCOPO DELLA TESI**

Scopo della tesi è quello valutare le modificazioni nella funzione  $\beta$  cellulare, nella clearance insulinica e nella sensibilità insulinica in un periodo di follow-up di 2 anni dopo trapianto epatico in pazienti cirrotici con storia pre-trapianto negativa per DM, tramite l'utilizzo di un OGTT esteso e di modelli matematici validati per l'analisi dei risultati

## CAPITOLO III – MATERIALI E METODI

### 1. DISEGNO DELLO STUDIO

Abbiamo condotto lo studio monocentrico “Cirrhosis, Effects of TRAnsplant and diabetes” (CETRA), uno studio osservazionale prospettico con lo scopo di valutare la relazione di insulino-sensibilità e funzione  $\beta$  cellulare con i cambiamenti nel metabolismo glucidi che si verificano dopo trapianto in soggetti cirrotici con storia pre-trapianto negativa per DM. Lo studio è in accordo con la Dichiarazione di Helsinki. Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico della Fondazione IRCCS CA' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico di Milano (Prot. n. 516) ed ogni partecipante ha fornito il suo consenso informato in forma scritta.

### 2. SOGGETTI

Da Gennaio 2010 a Dicembre 2016, 187 pazienti consecutivi con cirrosi diagnosticata su base bioptica e candidati a trapianto di fegato sono stati valutati per eventuale inclusione. 65 pazienti sono stati esclusi poiché mostravano una HbA1c o FPG compatibili con DM. 117 dei rimanenti 122 pazienti sono stati arruolati nello studio CETRA. Di tale popolazione, 98 pazienti sono stati sottoposti a OLT, 80 di questi hanno completato il periodo di follow-up di 2 anni e sono stati inclusi nell'analisi. E' stato deciso di valutare soltanto i pazienti che avessero completato tale periodo di follow-up dal momento che l'omeostasi del glucosio è soggetta a importanti fluttuazioni nel primo anno post-trapianto, per poi stabilizzarsi dal secondo anno in poi.

### 3. PARAMETRI VALUTATI

I pazienti sono stati valutati presso l'U.O. Endocrinologia. Al momento dell'arruolamento, hanno fornito un'anamnesi completa tramite un'intervista strutturata e sono stati classificati sulla base del Child-Pugh Score.

Prima del trapianto e dopo 3, 6, 12 e 24 mesi, sono stati raccolti i parametri antropometrici, metabolici ed endocrinologici secondo un protocollo standardizzato.

I pazienti in sono inoltre stati sottoposti ad OGTT e i dati ottenuti sono stati infine analizzati per mezzo del modello minimo di secrezione insulinica, tramite il quale è stato possibile effettuare una stima della funzionalità  $\beta$  cellulare, come di seguito descritto in dettaglio.

#### Indagini anamnestiche

In tutti i pazienti è stata rilevata la storia medica completa, con particolare attenzione per il problema epatico, indagando l'eziologia della cirrosi, l'anno di diagnosi dell'epatopatia cronica, l'andamento della patologia nel tempo con le complicanze insorte, eventuali terapie antivirali precedenti, in particolare in riferimento ai cicli di interferone e/o ribavirina.

Nei soggetti di sesso femminile è stata indagata la storia del ciclo mestruale (cicli regolari, oligomenorrea, polimenorrea) e l'eventuale nascita di feti macrosomici.

All'anamnesi familiare è stata indagata la presenza, in parenti di primo o secondo grado, di patologie come il diabete mellito, ipertensione arteriosa, sovrappeso corporeo o obesità, dislipidemie e patologie cardiovascolari, definite come comparsa di infarto o ictus in età giovanile (<60 anni).

All'anamnesi fisiologica è stato indagato lo stile di vita, ricercando la presenza, sia in passato che attualmente, di abitudine al fumo o all'alcool. Al paziente è stato inoltre richiesto di definire il suo stile di vita come sedentario, normale o attivo e di fornire un elenco completo dei farmaci abitualmente assunti.

### Valutazioni antropometriche

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

La circonferenza addominale (CV) e dei fianchi (CF) sono state misurate seguendo le indicazioni del protocollo NHANES III. Per individuare il livello in corrispondenza del quale va misurata la circonferenza addominale, per prima cosa viene individuato e fissato un punto di repere osseo: con il soggetto in ortostatismo e l'esaminatore alla sua destra, si localizza la cresta iliaca di destra. Appena al di sopra della porzione superiore del bordo laterale della cresta iliaca di destra viene tracciato un segno orizzontale, che poi viene incrociato con un tratto verticale corrispondente alla linea ascellare media. Il nastro per la misurazione viene posizionato in corrispondenza di un piano orizzontale passante per il punto individuato e segnato sulla arcata destra del tronco. Il piano su cui giace il nastro è parallelo al pavimento e durante la misurazione non devono essere effettuate pressioni sull'addome.

La circonferenza dei fianchi è stata misurata a livello dei trocanteri con il soggetto in ortostatismo e l'esaminatore alla sua destra.

La composizione corporea è stata valutata con metodica bioimpedenziometrica (BIA) tramite l'apparecchiatura Akern Quantum/S®, che permette una valutazione rapida, di facile esecuzione e non invasiva. Essa si basa sul principio della diversa

conduzione dei tessuti al passaggio di una debolissima e inavvertita corrente elettrica (800 microA a 50 kHz di frequenza). Il presupposto fisiologico alla base di questa metodica è che la massa magra, costituita soprattutto da acqua ed elettroliti, offre una bassa resistenza al passaggio della corrente, mentre la massa grassa, comportandosi da isolante, offra un'elevata resistenza.

Viene in questo modo fornita una misura della resistività corporea, che a sua volta può essere tradotta, grazie ad un programma computerizzato, in termini di massa grassa (FAT), e di massa magra (FFM, fat free mass), acqua corporea totale (TBW, total body water), acqua intra- ed extracellulare (ICW, intracellular water; ECW, extracellular water), massa cellulare corporea (BCM, body cellular mass).

La misura viene effettuata dopo aver applicato una differenza di potenziale ad appositi elettrodi adesivi posizionati al centro della superficie dorsale della mano e del piede destro. Per quanto riguarda la mano l'elettrodo negativo è posizionato a livello dell'articolazione metacarpofalangea, l'elettrodo positivo tra prominenza distale del radio e dell'ulna. Sul piede l'elettrodo negativo è posizionato in corrispondenza dell'articolazione metatarsofalangea, l'elettrodo positivo tra i malleoli mediale e laterale della caviglia.

*Figura 3.1. – Posizionamento degli elettrodi in corso di bioimpedenziometria*



È bene ricordare che la misurazione del BMI in pazienti affetti da cirrosi epatica può non essere affidabile come indice dello stato nutrizionale a causa della ritenzione 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 addominale e della circonferenza fianchi.

Negli anni passati (188), Pirlich et al. hanno effettuato uno studio per verificare l'effettiva utilità dell'analisi bioimpedenziometrica per la misurazione della composizione corporea e della massa cellulare in pazienti cirrotici con o senza versamento ascitico. Il calcolo del BCM permette di stimare lo stato nutrizionale, e valori ridotti di BCM sono associati a aumentata mortalità, indipendentemente dal grado di severità dell'epatopatia di base. Gli autori hanno concluso, in base al loro

studio, che, nonostante alcune limitazioni in pazienti con importante versamento ascitico, l'analisi bioimpedenziometrica rimane una metodica affidabile per la determinazione della composizione corporea e del BCM in pazienti cirrotici, con e senza ascite (188).

La valutazione delle misure antropometriche e l'analisi bioimpedenziometrica sono state eseguite al fine di:

- valutare la composizione corporea (BMI, circonferenza vita, kg di massa magra e kg di massa grassa) e il BCM per indagare lo stato nutrizionale prima del trapianto
- fornire una stima accurata del contenuto di liquidi intracellulari, necessaria per il calcolo della secrezione insulinica a uno stimolo glucidico, senza che esso sia falsato dalla presenza, nel compartimento extravascolare dei liquidi corporei, dal versamento ascitico.

#### Valutazione endocrino-metaboliche

Tutte le valutazioni basali, nei pazienti in lista per trapianto epatico, sono state eseguite alle ore 8.30 del mattino dopo un digiuno di almeno 8 ore.

Al basale sono stati dosati glicemia (tramite metodo Esochinasi), insulinemia e C-peptide (tramite metodo eclia), colesterolo totale (tramite metodo CHOD-PAP), HDL (tramite metodo enzimatico colorimetrico), trigliceridi (tramite metodo GPO-PAP), AST, ALT (tramite metodo IFCC senza P-5-P), GGT (tramite metodo SZASZ), FA (tramite metodo IFCC liquid), bilirubina totale (tramite metodo DPD) e diretta (tramite metodo Jendrassik), pseudocolinesterasi (tramite metodo butiriltiocolina), proteine totali (tramite metodo Biureto), albumina (tramite metodo Verde di bromocresolo), azotemia (tramite metodo Ureasi GLDH), creatininemia (tramite

metodo jaffè), uricemia (tramite metodo Uricasi/PAP), emoglobina glicata (tramite cromatografia liquida ad alta prestazione), emocromo completo e funzione tiroidea (TSH, fT3, fT4, tramite metodo eclia).

In tutti i pazienti è stato inoltre calcolato il valore di HOMA-IR, Homeostatic Model Assesment, tramite la formula  $[\text{glicemia (mg/dl)/18}] \times [\text{insulinemia (\mu U/ml)/22.5}]$  -, indice del grado di resistenza insulinica (194).

### Valutazione dinamica tramite OGTT

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'. Prima e durante l'effettuazione del test è stata monitorata la glicemia capillare del paziente.

I risultati ottenuti sono stati analizzati tramite il Modello Minimo di Secrezione Insulinica (190).

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

1. controllo derivativo (o dinamico, DC): viene presentato come la quantità di insulina rilasciata dalla  $\beta$  cellula in risposta a una velocità di incremento della glicemia di  $1 \text{ mmol l}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  che dura 1 minuto [unità:  $(\text{pmol} \cdot \text{m}^{-2} \text{ superficie corporea}) / (\text{mM} \cdot \text{min}^{-1})$ ]

2.2. controllo proporzionale (o statico, PC): viene presentato come la curva stimolo-risposta che lega velocità di secrezione insulinica (risposta biologica, asse delle y) ai livelli di glicemia (stimolo, asse delle x); in questo studio la velocità di secrezione di insulina (unità:  $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2} \text{ superficie corporea}$ ) 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.

Il modello utilizza le concentrazioni di C-peptide, secreto in concentrazione equimolare rispetto all'insulina, ma che subisce una degradazione epatica minore rispetto all'ormone, essendo il suo metabolismo prevalentemente renale, per fornire una stima del tasso di produzione  $\beta$  cellulare. Inoltre il modello considera solo la percentuale di C-peptide diluita nel "compartimento accessibile" ai recettori dell'insulina, poiché, grazie ai dati ottenuti dall'impedenziometria, esclude il compartimento non accessibile, rappresentato dall'ascite e da versamenti periferici.

Sulla base dei valori di glicemia e insulinemia ottenuti dall'OGTT è stato infine possibile stimare l'OGIS-2h (Oral Glucose Insulin Sensitivity Index a 2 ore) ( $\text{ml} \times \text{min}^{-1} \times \text{m}^{-2} \text{BSA}$ ), al fine di caratterizzare meglio il grado di insulinosensibilità (191).

È stato a questo riguardo ideato un modello minimo di secrezione insulinica, da applicare a un OGTT 75g di glucosio, con prelievo per glicemia, insulinemia e C-peptide ai tempi 0', 15', 30', 45', 60', 90', 120', 150', 180'.

Esso è illustrato in figura 3.2, alla quale sono state aggiunte le equazioni che descrivono le due componenti del gluco-sensore  $\beta$ -cellulare e, a valle degli eventi che precedono la secrezione insulinica, lo schema del modello bi-compartimentale della cinetica del C-peptide.

In Figura 3.3 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:

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

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

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  $CP_1$ .  $CP_1$  (pmol) rappresenta la massa di C-peptide nel compartimento "accessibile" (plasma + tessuti a rapido equilibrio con il plasma);  $CP_2$  rappresenta la massa di C-peptide nel compartimento "periferico" (tessuti a lento interscambio con il plasma);  $k_{i,j}$  ( $\text{min}^{-1}$ ) sono i parametri della cinetica del C-peptide:  $k_{12}$  e  $k_{21}$  sono i parametri di scambio tra  $CP_1$  e  $CP_2$ , mentre  $k_{01}$  è il parametro relativo alla perdita irreversibile

Figura 3.2 – Schema del modello minimo di secrezione insulinica.

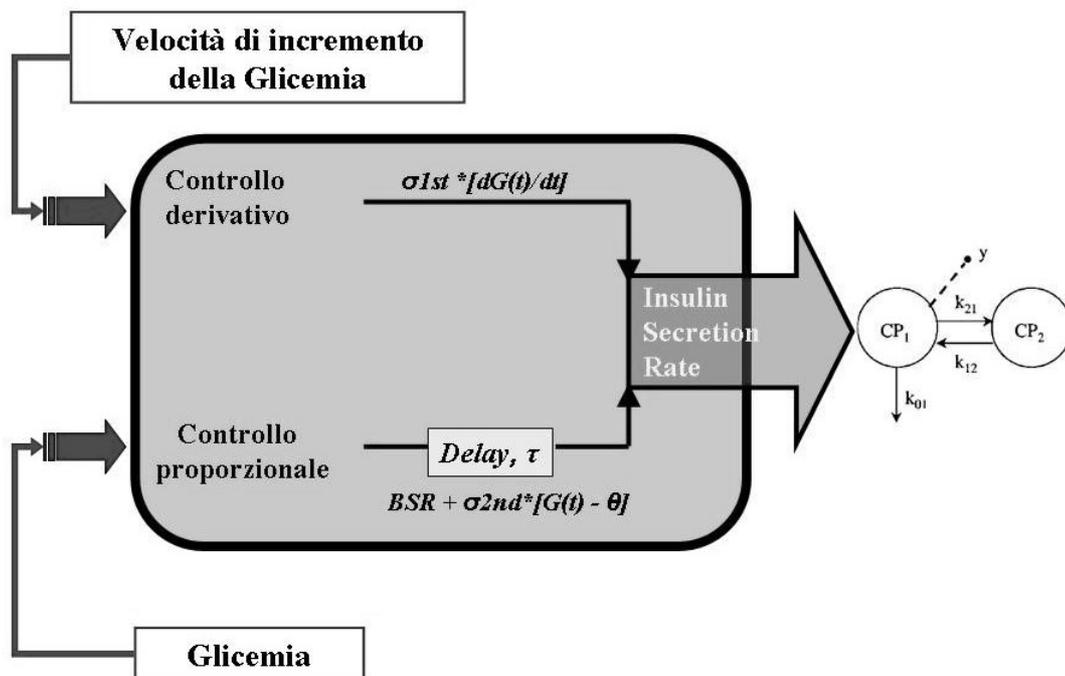
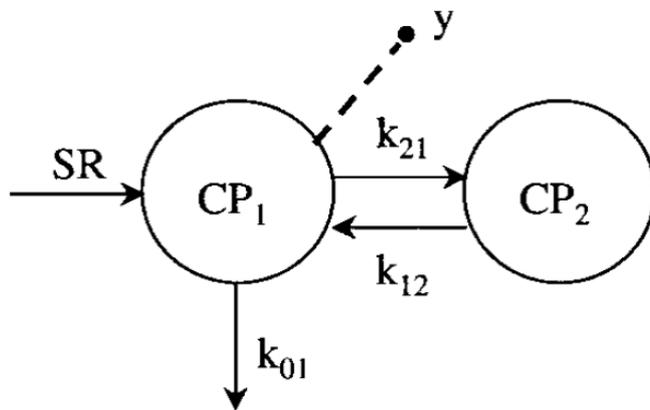


Figura 3.3 – Modello minimo della cinetica del C-peptide..



(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  $\beta$ -cellule e studi recenti hanno dimostrato l'attendibilità dell'ipotesi secondo cui l'insulina non è immagazzinata omogeneamente nel citoplasma  $\beta$ -cellulare, ma è distribuita in famiglie di granuli secretori, che possiedono soglie glicemiche di attivazione diverse. Il modello della secrezione insulinica ricalca i caratteri macroscopici della fisiologia  $\beta$ -cellulare: la funzione  $ISR(t)$  è costituita da una componente rappresentata dalla velocità di secrezione insulinica basale (BSR) e dalle componenti "statica" e "dinamica" della secrezione  $\beta$ -cellulare rispettivamente regolate dai parametri di "glucose sensitivity"  $\sigma^{1st}$  e  $\sigma^{2nd}$ .

Formalmente,

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

dove:

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

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

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

**ISR** = velocità di secrezione pre-epatica di insulina, **BSR** = velocità di secrezione insulinica basale, **SR<sup>1st</sup>** = velocità di secrezione insulinica nella prima fase, **SR<sup>2nd</sup>** = velocità di secrezione insulinica nella seconda fase, **CP<sub>ss</sub>** = concentrazione di C-peptide in stato basale non stimolato (steady-state), **V<sub>1</sub>** = volume [L] di distribuzione del C-peptide nel compartimento accessibile (CP<sub>1</sub>), **X<sup>1st</sup>** = quantità (massa) di C-peptide (insulina) resa disponibile per la prima fase di secrezione insulinica, **T** = *tempus*, costante di tempo della prima fase, **X<sup>2nd</sup>** = 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  $X^{1\text{st}}(t)$  si ottiene:

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

$$, \text{ se } dG(t)/dt > 0 \quad (3.1)$$

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

Dove:  $\sigma^{1\text{st}}$  = 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  $\sigma^{1\text{st}}$ .

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

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

Dove:  $\sigma^{2\text{nd}}$  = 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  $\sigma_{1st}$  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  $\sigma_{2nd}$  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:  $CP_{ss}$ ,  $T$ ,  $\sigma^{1st}$ ,  $\theta$ ,  $\tau$ ,  $\sigma^{2nd}$ . In questo lavoro ci si riferisce al parametro  $\tau$  con il termine di **Delay**: questo rappresenta il ritardo associato alla seconda fase, cioè l'intervallo di tempo che la  $\beta$ -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 beta-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 mM (corrispondenti a 72, 99, 144, 198, 270 mg/dl).

Da tale modello è inoltre possibile stimare l' Insulin Clearance Index (Ins Clear;  $l \times \text{min}^{-1} \times \text{m}^{-2} \text{ BSA}$ ).

La sensibilità e la biodisponibilità insulinica in risposta al glucosio danno origine a un fisiologico loop che determina lo stato della regolazione glucidica (192,193).

Dal momento che la funzione  $\beta$ -cellulare e la clearance insulinica determinano insieme la biodisponibilità insulinica e il PC rappresenta la maggior parte dell'insulina rilasciata dalla  $\beta$  cellula in risposta all'OGTT, abbiamo calcolato la biodisponibilità insulinica come PC corretto (PCadj): l'aumento di concentrazioni di insulina causato dall'aumento di concentrazioni di glucosio di 1 mmol/L, in accordo con la formula  $PC_{adj} = r^2/InsClear$ . Quindi abbiamo tracciato le concomitanti modifiche di PCadj e OGIS-2h nel tempo a seconda del gruppo di outcome (193). I punti rappresentano l'azione congiunta della biodisponibilità insulinica e della sensibilità insulinica, mentre le traiettorie rappresentano i cambiamenti nel corso del follow up (vettori "tempo"). Per tale motivo la rappresentazione grafica che ne risulta viene denominata "vector plot" (193, 194). La linea concava raffigurata nei vector plots rappresenta la fisiologica relazione inversa (iperbolica) esistente tra la biodisponibilità insulinica (PCadj) e la sensibilità insulinica (OGIS-2h) calcolata sulla base dei dati ottenuti dai soggetti con normale omeostasi glucidica (NFG/NGT) della nostra popolazione.

Al di sotto della linea concava si posizionano i soggetti con adattamento alla sensibilità insulinica più basso del normale. Maggiore è la distanza tra un punto in questa area e la linea concava, peggiore è l'adattamento corporeo e peggiore è l'omeostasi glucidica di tale soggetto. Teoricamente, il ritorno alla normale omeostasi glucidica dovrebbe passare attraverso un miglioramento della biodisponibilità insulinica (spostamento verso l'alto del vettore), un miglioramento

della insulinosensibilità (spostamento orizzontale verso destra) o, più comunemente, di entrambi (vettore obliquo).

#### 4. ANALISI STATISTICA

I risultati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard (DS) e rappresentati come media  $\pm$  errore standard (SEM) nelle figure. Le modifiche dal pre-trapianto (baseline) al follow-up di 2 anni sono espresse in differenza di medie e intervallo di confidenza del 95%.

Le differenze dei parametri fra i gruppi e le differenze tra basale e 2° anno sono state analizzate usando il test ANOVA one-way, per l'analisi post hoc è stato utilizzato il test Bonferroni. Per le variabili a distribuzione non Gaussiana sono stati usati il test di Kruskal-Wallis e il test dei segni per ranghi di Wilcoxon. Le differenze dei parametri fra i gruppi al basale e al 2° anno di follow up sono state valutate tramite il test di Student o il test dei segni per ranghi di Wilcoxon.

E' stato applicato un modello di regressione lineare generale (GLM) per valutare le modificazioni nel tempo della funzione  $\beta$  cellulare, della clearance insulinica e della sensibilità insulinica, dopo normalizzazione dei dati, se necessaria, tramite trasformazione logaritmica. nel caso venisse rilevata una interazione significativa gruppo/tempo, l'analisi GLM è stata ripetuta all'interno di ogni gruppo per valutare le differenze prima e dopo OLT. La risposta insulinica del PC è stata analizzata tramite GLM per misure ripetute. Dal momento che nessuna trasformazione ha potuto normalizzare la distribuzione dei valori di DC, è stato utilizzato il test non parametrico di Friedman, seguito da test di Wilcoxon per confrontare ogni tempo post trapianto con i valori pre-trapianto.

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

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma SPSS versione 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).

## CAPITOLO IV – RISULTATI

Le principali caratteristiche dei soggetti dello studio sono elencate in Tabella 4.1.

Tabella 4.1 - *Caratteristiche dei pazienti*

<b>N</b>	80
<b>Età (anni)</b>	52.9 ± 8.9
<b>Maschi/Femmine (n°/%)</b>	57 (71.25) / 23 (28.25)
<b>Anamnesi Familiare positiva per DM (n°/%)</b>	34 (42.50)
<b>Durata epatopatia, anni</b>	12.7 ± 10.8
<b>Eziologia epatopatia, n°/%</b>	
- HCV	23 (28.75)
- HCV + HBV (± HDV ± alcool)	11 (13.75)
- HCV + alcool o autoimmune	4 (5.00)
- HBV (± HDV ± alcool)	16 (20.00)
- alcool	10 (12.50)
- Autoimmune *	6 (7.50)
- Criptogenetica	4 (5.00)
- Altre †	6 (7.50)
<b>Stadio della cirrosi (Classe Child-Pugh), n (%)</b>	
- A	10 (12.50)
- B	B 42 (52.50)
- C	C 28 (35.00)
<b>Presenza di HCC, n (%)</b>	25 (31.25)

*I dati sono espressi come media ± deviazione standard. \* Cirrosi biliare primitiva (n=3), colangite sclerosante (n=1). † S. Budd-Chiari (n=2), adenomatosi (n=1), amiloidosi (n=1), colestasi cronica (n=1), S. Rendu-Osler (n=1).*

Alla valutazione pre-trapianto, dopo OGTT, 36 pazienti hanno avuto una risposta al test compatibile con diagnosi di diabete, ricevendo quindi diagnosi di diabete epatogeno, mentre in 44 pazienti le glicemie a 2 ore dall'ingestione di zucchero si sono mantenute al di sotto dei livelli diagnostici per DM (15 NFG/NGT, 5 IFG, 20 IGT, 4 IFG+IGT). Se confrontati con i pazienti non-DM, i pazienti DM mostravano maggior età, maggiori livelli di HbA1c, glucosio, C-peptide e aminotrasferasi, simili InsClear, minor DC, PC e OGIS-2h, come mostrato in Tabella 4.2.

Da segnalare inoltre che i pazienti non-DM dimostravano, rispetto ai soggetti DM, più alti livelli di albuminemia e di pseudocolinesterasi, indici di sintesi e, quindi, di miglior funzione epatica.

Tabella 4.2 - *Caratteristiche cliniche e stima della secrezione, catabolismo e sensibilità insulinica sulla base della presenza o assenza di diabete alla valutazione baseliana*

	<b>No DM</b>	<b>DM</b>	<b>P</b>
<b>N</b>	44	36	
<b>Età, anni</b>	50.4±9.6	55.9±7.0	0.006
<b>Genere maschile, n (%)</b>	12 (80.0)	23 (63.9)	0.188
<b>Child-Pugh score</b>	8.68±2.44	8.86±1.42	0.697
<b>HCV, n (%)</b>	3 (20.0)	20 (55.6)	0.192
<b>HCC, n (%)</b>	4 (26.7)	12 (33.3)	0.716
<b>Familiarità per DM, n (%)</b>	4 (26.7)	14 (38.9)	0.555
<b>HbA1c, %</b>	4.4±0.2	4.8±0.3	0.018
<b>Glucosio, mmol·l-1</b>	5.02±0.86	5.58±1.59	0.047
<b>Glucosio-2h, mmol·l-1</b>	8.22±1.73	14.53±3.02	<0.0001

<b>Insulina, pmol·l-1</b>	95.4±58.5	94.9±68.0	0.976
<b>C-peptide, nmol·l-1</b>	1.13±0.41	1.41±0.61	0.014
<b>BMI, kg·m-2</b>	25.6±3.3	26.3±4.6	0.452
<b>Circonferenza vita, cm</b>	98.6±12.5	98.4±11.0	0.953
<b>Circonferenza fianchi, cm</b>	100.5±8.1	102.0±7.8	0.769
<b>Trigliceridi, mmol·l-1</b>	0.94±0.56	0.91±0.23	0.793
<b>Colesterolo tot, mmol·l-1</b>	3.62±1.26	3.43±1.13	0.499
<b>Colesterolo HDL, mmol·l-1</b>	1.31±0.57	1.27±0.49	0.704
<b>Colesterolo LDL, mmol·l-1</b>	1.86±1.08	1.76±0.91	0.651
<b>PA sistolica, mmHg</b>	113.2±14.3	111.1±13.9	0.510
<b>PA diastolica, mmHg</b>	69.6±9.3	68.4±8.4	0.575
<b>Proteine totali, g·l-1</b>	6.92±0.94	6.94±0.74	0.897
<b>Albumina, g·l-1</b>	3.56±0.51	3.21±0.39	0.001
<b>Bilirubina totale, μmol·l-1</b>	63.1±68.6	49.8±26.0	0.279
<b>Bilirubina diretta, μmol·l-1</b>	37.2±61.2	29.0±18.3	0.450
<b>AST, U·l-1</b>	65.1±43.0	94.5±66.1	0.020
<b>ALT, U·l-1</b>	44.5±41.3	58.3±36.5	0.127
<b>γGT, U·l-1</b>	89.7±81.6	76.5±62.9	0.438
<b>ALP, U·l-1</b>	148.2±66.6	137.3±61.9	0.459
<b>Pseudocholinesterase, U·l-1</b>	3,277±2,067	2,326±858	0.016
<b>eGFR, ml·min-1·1.73m-2</b>	94.1±23.6	86.4±19.6	0.124
<b>DC, pmol·m-2 BSA/mmol·min-1</b>	1,550±1,624	522.9±846	0.001
<b>PC (σ2), pmol·min-1·m-2 BSA/mmol·l-1</b>	129.9±62.3	89.4±53.1	0.002
<b>PC (ISR), pmol·min-1·m-2·BSA</b>			
<b>4.0 mmol·l-1 glucose</b>	174.1±73.7	241.0±122.8	0.004
<b>5.5 mmol·l-1 glucose</b>	219.8±82.5	269.4±147.1	0.064
<b>8.0 mmol·l-1 glucose</b>	497.0±172.6	380.0±228.2	0.012
<b>11.0 mmol·l-1 glucose</b>	887.0±321.9	585.9±315.6	<0.001

<b>15.0 mmol·l<sup>-1</sup> glucose</b>	1,406.9±549.7	936.6±483.6	<0.001
<b>InsClear, l·min<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> BSA</b>	1,224±1,473	1,338±2,007	0.803
<b>OGIS-2h, ml·min<sup>-1</sup>·m<sup>-2</sup> BSA</b>	419.9±69.6	353.5±82.5	<0.001

*I dati sono espressi come media±SD, se non indicato in altro modo. eGFR = estimated glomerular filtration rate; DC = derivative control; BSA = body surface area; PC = proportional control; ISR = insulin secretion rate; InsClear = insulin clearance; OGIS = Oral Glucose Insulin Sensitivity.*

Nel corso del follow-up di 2 anni, in 23 pazienti (63.8%) il diabete è andato incontro a regressione (13 pazienti, 56.5%, risultavano con NGT e 10 pazienti, 43.5%, IFG o IGT), mentre 13 pazienti (36.2%) sono rimasti diabetici. Tra i soggetti non diabetici, 4 hanno sviluppato la patologia nel post-trapianto (9.1%), mentre 40 non hanno sviluppato la patologia (91.1%).

Sulla base di tale evoluzione, i pazienti sono stati divisi in 4 gruppi di outcome:

- Gruppo REG (regressori): pazienti in cui il diabete è andato incontro a regressione dopo trapianto
- Gruppo non-REG (non-regressori): pazienti in cui il diabete non è andato incontro a regressione dopo trapianto
- Gruppo PROG (progressori): pazienti che hanno sviluppato diabete post-trapianto
- Gruppo non-PROG (non progressori): pazienti che non hanno sviluppato diabete né prima né dopo trapianto

Alla valutazione pre-trapianto, i soggetti REG dimostravano più bassi livelli di HbA1c (P=0.029), FPG (P=0.046) e di glicemia 2 ore post OGTT (P=0.030) rispetto

ai soggetti non-REG, mentre nessuna differenza statisticamente significativa è stata riscontrata negli altri parametri, inclusa l'eziologia e la severità della patologia epatica, l'indice di massa corporea e gli indici secrezione, catabolismo e sensibilità insulinica (Tabella 4.3)

Tabella 4.3 – *Caratteristiche cliniche e parametri di secrezione, catabolismo e sensibilità insulinica a seconda del gruppo di outcome*

	<b>REG</b>	<b>non-REG</b>	<b>PROG</b>	<b>non-PROG</b>	<b>P</b>
<b>N</b>	23	13	4	40	
<b>Età, anni</b>	57.0 ± 7.4	54.1 ± 6.1	57.0 ± 5.9	49.8 ± 9.7	0.011
<b>Sesso maschile, n (%)</b>	12 (52.2)	11 (84.6)	2 (50.0)	32 (80.0)	0.055
<b>Child-Pugh score</b>	8.87 ± 1.42	8.85 ± 1.46	8.75 ± 1.71	8.68 ± 2.52	0.984
<b>HCV, n (%)</b>	12 (52.2)	8 (61.5)	1 (25.0)	17 (42.5)	0.486
<b>HCC, n (%)</b>	6 (26.1)	6 (46.2)	1 (25.0)	12 (30.0)	0.630
<b>Familiarità per DM, n (%)</b>	6 (26.1)	8 (61.5)	3 (75.0)	17 (42.5)	0.103
<b>HbA<sub>1c</sub>, %</b>	4.68 ± 0.57	5.42 ± 1.00	4.33 ± 0.84	4.56 ± 0.71	0.003
<b>Glicemia, mmol/L</b>	5.17 ± 1.04	6.31 ± 2.12	4.75 ± 0.41	5.05 ± 0.89	0.010
<b>Glicemia-2 h, mmol/L</b>	13.70 ± 2.19	16.00 ± 3.77	9.19 ± 1.47	8.13 ± 1.74	<0.0001
<b>Insulin, pmol/L</b>	87.5 ± 64.8	109.3 ± 74.4	81.0 ± 25.8	96.8 ± 60.8	0.827
<b>C-peptide, nmol/L</b>	1.34 ± 0.49	1.55 ± 0.78	0.94 ± 0.21	1.15 ± 0.42	0.092
<b>Peso, kg</b>	71.5 ± 14.3	80.5 ± 17.5	71.9 ± 15.6	73.6 ± 12.9	0.292
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>	26.1 ± 4.4	26.5 ± 5.1	25.8 ± 2.3	25.6 ± 3.4	0.885
<b>Circonferenza vita, cm</b>	96.1 ± 10.0	102.4 ± 11.9	97.8 ± 12.5	98.6 ± 12.6	0.505
<b>Circonferenza fianchi, cm</b>	101.8 ± 7.9	102.3 ± 8.1	100.8 ± 12.5	102.7 ± 7.7	0.954
<b>Trigliceridi, mmol/L</b>	0.91 ± 0.26	0.91 ± 0.20	0.78 ± 0.20	0.95 ± 0.59	0.458

<b>Colesterolo totale, mmol/L</b>	3.54 ± 1.26	3.24 ± 0.85	3.70 ± 0.99	3.61 ± 1.29	0.892
<b>Colesterolo HDL, mmol/L</b>	1.31 ± 0.52	1.18 ± 0.42	1.51 ± 0.52	1.30 ± 0.57	0.670
<b>Colesterolo LDL, mmol/L</b>	1.83 ± 0.98	1.64 ± 0.80	1.84 ± 0.69	1.87 ± 1.12	0.944
<b>PA sistolica, mmHg</b>	110.9 ± 15.4	111.4 ± 11.3	101.3 ± 20.2	114.4 ± 13.3	0.309
<b>PA diastolica, mmHg</b>	69.1 ± 8.3	67.2 ± 8.8	65.0 ± 10.0	70.0 ± 9.3	0.606
<b>Proteine totali, g/L</b>	7.00 ± 0.77	6.83 ± 0.70	7.25 ± 1.76	6.88 ± 0.85	0.809
<b>Albumin, g/L</b>	3.24 ± 0.39	3.14 ± 0.39	3.15 ± 0.49	3.60 ± 0.50	0.003
<b>Bilirubina totale, µmol/L</b>	51.2 ± 27.9	47.0 ± 22.7	38.9 ± 7.5	65.6 ± 71.5	0.898
<b>Bilirubina diretta, µmol/L</b>	29.9 ± 20.1	27.4 ± 14.9	20.6 ± 5.3	38.9 ± 64.0	0.785
<b>AST, U/L</b>	91.2 ± 74.5	100.5 ± 49.2	52.5 ± 19.7	66.4 ± 44.7	0.045
<b>ALT, U/L</b>	57.3 ± 41.4	60.2 ± 26.9	34.0 ± 15.1	45.5 ± 43.0	0.072
<b>GGT, U/L</b>	80.5 ± 70.9	69.2 ± 46.7	128.8 ± 105.9	85.8 ± 79.4	0.826
<b>ALP, U/L</b>	137.3 ± 70.2	137.3 ± 44.4	158.0 ± 125.1	147.2 ± 60.3	0.813
<b>Pseudocolinesterasi, U/L</b>	2459 ± 885	2095 ± 790	2739 ± 593	3325 ± 2147	0.392
<b>eGFR, ml/min/1.73 m<sup>2</sup></b>	83.4 ± 17.7	92.1 ± 22.4	81.5 ± 19.8	95.4 ± 23.8	0.170
<b>DC, pmol/m<sup>2</sup> BSA/mm<sup>2</sup> BSA/min</b>	466 ± 613	632 ± 1201	1261 ± 972	1579 ± 1682	0.002
<b>PC (σ2), pmol/min/m<sup>2</sup> BSA/mm<sup>2</sup> BSA</b>	90.5 ± 50.7	148.2 ± 239.9	124.5 ± 28.3	130.5 ± 60.9	0.023
<b>PC (ISR), pmol/min/m<sup>2</sup> BSA</b>					
<b>4.0 mmol/L glucose</b>	244.4 ± 100.5	234.5 ± 162.2	163.7 ± 41.8	175.1 ± 76.5	0.039
<b>5.5 mmol/L glucose</b>	279.8 ± 114.5	249.4 ± 200.1	194.0 ± 70.9	222.5 ± 84.0	0.164
<b>8.0 mmol/L glucose</b>	400.8 ± 190.7	400.8 ± 190.7	396.7 ± 136.5	507.2 ± 174.0	0.004
<b>11.0 mmol/L glucose</b>	636.5 ± 245.8	488.9 ± 413.9	759.8 ± 131.5	900.0 ± 333.6	<0.001
<b>15.0 mmol/L glucose</b>	999.3 ± 376.4	816.4 ± 644.6	1243.9 ± 203.0	1423.7 ± 572.4	0.002
<b>InsClear, L/min/m<sup>2</sup> BSA</b>	0.846 ± 0.434	0.898 ± 0.354	1.721 ± 1.808	1.089 ± 1.289	0.320
<b>OGIS-2 h, ml/min/m<sup>2</sup> BSA</b>	360.1 ± 89.7	341.8 ± 69.8	403.7 ± 76.8	421.5 ± 69.7	0.003

Allo stesso modo, tra le variabili alla valutazione pre-trapianto, solo l'HbA1c ( $\beta = -1.1772$ ;  $P=0.030$ ) e la familiarità positiva per DM ( $\beta = -2.942$ ;  $P=0.019$ ) si sono dimostrati predittori indipendenti per la regressione del DM. Nessuna differenza è stata osservata tra i PROG e i non-PROG (Tabella 4.3).

In Tabella 4.4 sono riportati i cambiamenti dal baseline al follow up a 2 anni per i quattro gruppi. Nonostante i livelli di HbA1c siano andati incontro ad aumento in tutti i gruppi, come aspettato (6,7), l'incremento si è dimostrato più alto in modo statisticamente significativo nei PROG rispetto ai REG ( $P=0.025$ ), ai non-REG ( $P=0.021$ ) e ai non-PROG ( $P=0.010$ ), riflettendo un peggioramento nell'omeostasi glucidica nei soggetti che sviluppano DM. Sono stati evidenziati solo minimi cambiamenti nei livelli di FPG. Il gruppo REG ha dimostrato una significativa riduzione della glicemia 2 ore post OGTT, mentre il gruppo PROG ha dimostrato un significativo aumento di tale parametro. Non si sono osservate variazioni nel tempo del peso corporeo nei gruppi in oggetto. In tutti i gruppi si è dimostrato un incremento nei valori di BP, colesterolo totale, HDL e trigliceridi, un miglioramento della funzione epatica, mentre i valori di eGFR sono andati incontro a un leggero declino a causa della terapia immunosoppressiva.

Tabella 4.4 – *Modifiche nei parametri antropometrici e clinici dopo 2 anni dal trapianto rispetto al basale a seconda del gruppo di outcome*

	REG		non-REG		PROG		non-PROG	
	Media (95% CI)	P	Media (95% CI)	P	Media (95% CI)	P	Media (95% CI)	P
HbA <sub>1c</sub> , %	0.53 (0.15; 0.92)	0.009	0.41 (-0.44; 1.25)	0.313	2.13 (1.69; 2.56)	0.053	0.43 (0.13; 0.72)	0.006

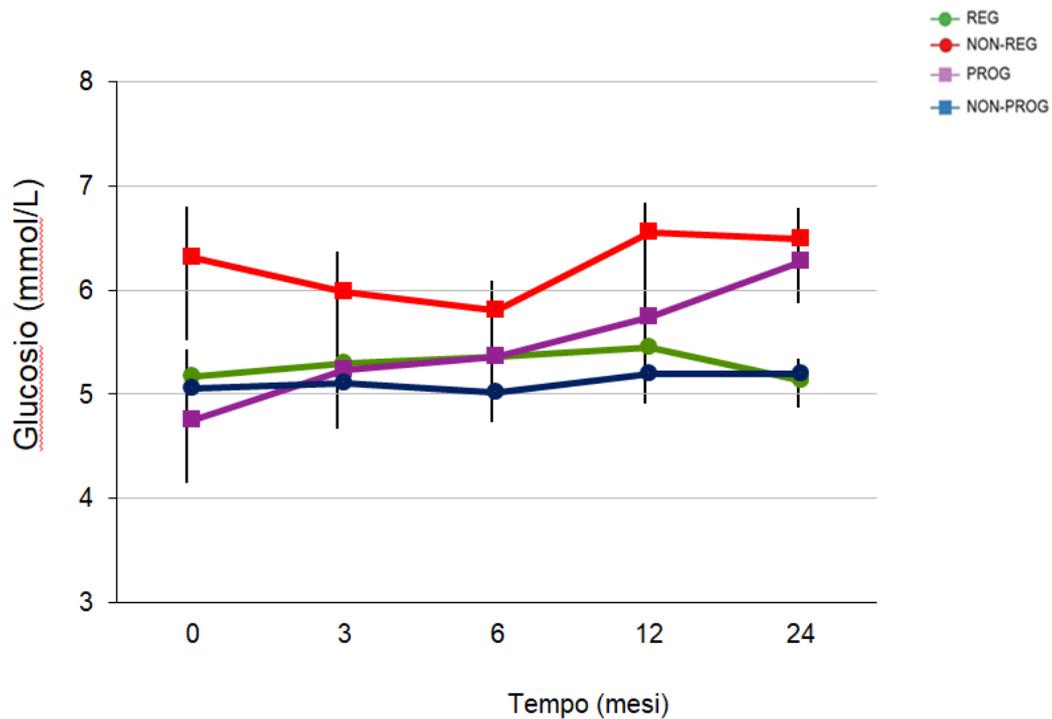
<b>Glicemia, mmol/L</b>	-0.05 (-0.40; 0.31)	0.791	0.18 (-1.07; 1.42)	0.764	1.53 (0.73; 2.32)	0.176	0.15 (-0.09; 0.39)	0.206
<b>Glicemia-2 h, mmol/L</b>	-5.99 (-6.81; -5.16)	<0.0001	-1.62 (-3.99; 0.76)	0.164	3.76 (-0.72; 8.23)	0.973	-1.14 (-1.79; -0.49)	0.001
<b>Insulina, pmol/L</b>	-41.6 (-68.9; -14.3)	0.005	-34.32 (-83.6; 15.0)	0.154	-7.7 (-108.0; 92.6)	0.504	-36.0 (-55.4; -16.5)	0.001
<b>C-peptide, nmol/L</b>	-0.35 (-0.55; -0.16)	0.001	-0.28 (-0.71; 0.16)	0.190	0.49 (-1.80; 2.79)	0.170	-0.23 (-0.36; -0.10)	0.001
<b>Peso, kg</b>	-1.71 (-4.86; 1.44)	0.273	0.11 (-8.19; 8.40)	0.978	3.38 (-19.7; 26.5)	0.273	2.69 (0.00; 5.39)	0.050
<b>BMI, kg/m<sup>2</sup></b>	-0.91 (-2.15; 0.33)	0.141	0.14 (-2.61; 2.89)	0.916	2.11 (-7.3; 11.5)	0.869	0.80 (-0.16; 1.76)	0.101
<b>Circonferenza vita, cm</b>	0.57 (-2.85; 3.98)	0.735	-1.77 (-8.71; 5.17)	0.589	1.25 (-25.9; 28.4)	0.366	2.78 (-0.57; 6.12)	0.102
<b>Circonferenza fianchi, cm</b>	-1.04 (-3.95; 1.86)	0.464	-0.92 (-5.62; 3.77)	0.676	1.00 (-15.6; 17.6)	0.327	1.43 (-1.10; 3.95)	0.260
<b>Trigliceridi, mmol/L</b>	0.36 (0.14; 0.58)	0.002	0.40 (0.20; 0.61)	0.001	0.94 (-0.11; 2.00)	0.706	0.40 (0.14; 0.66)	0.003
<b>Colesterolo totale, mmol/L</b>	0.85 (0.28; 1.42)	0.005	0.58 (-0.43; 1.59)	0.234	1.26 (-0.46; 2.97)	0.905	0.76 (0.21; 1.30)	0.008
<b>Colesterolo HDL, mmol/L</b>	0.17 (-0.12; 0.46)	0.230	-0.13 (-0.46; 0.21)	0.427	-0.25 (-1.08; 0.58)	0.783	-0.08 (-0.28; 0.12)	0.410
<b>Colesterolo LDL, mmol/L</b>	0.52 (-0.01; 1.05)	0.055	0.52 (-0.26; 1.30)	0.52 (-0.26; 1.30)	1.08 (-0.27; 2.43)	0.996	0.67 (0.21; 1.13)	0.005
<b>PA sistolica, mmHg</b>	13.7 (6.9; 20.5)	<0.0001	11.7 (2.9; 20.5)	0.014	20.0 (-8.3; 48.3)	0.528	9.25 (4.81; 13.69)	0.001
<b>PA diastolica, mmHg</b>	9.13 (4.92; 13.34)	<0.0001	11.3 (4.0; 18.6)	0.005	12.5 (-12.2; 37.2)	0.225	6.13 (2.79; 9.46)	0.001
<b>Proteine totali, g/L</b>	-0.38 (-0.72; -0.04)	0.030	-0.25 (-1.05; 0.55)	0.504	-0.97 (-3.92; 1.97)	0.775	0.03 (-0.30; 0.37)	0.835
<b>Albumina, g/L</b>	1.14 (0.90; 1.38)	<0.0001	1.08 (0.75; 1.41)	<0.0001	0.93 (0.16; 1.69)	0.659	0.84 (0.64; 1.04)	0.000
<b>Bilirubina totale, µmol/L</b>	-35.7 (-50.8; -20.5)	<0.0001	-25.9 (-41.5; -10.4)	0.004	-22.9 (-47.5; 1.7)	0.885	-52.3 (-75.2; -29.4)	0.000
<b>Bilirubina diretta, µmol/L</b>	-22.8 (-32.4; -13.2)	<0.0001	-16.6 (-27.4; -5.8)	0.006	-12.1 (-31.3; 7.0)	0.572	-31.5 (-52.3; -10.8)	0.004
<b>AST, U/L</b>	-65.1 (-96.0; -34.1)	<0.0001	-44.6 (-81.2; -8.0)	0.021	-28.8 (-64.8; 7.3)	0.888	-40.5 (-54.8; -26.2)	0.000
<b>ALT, U/L</b>	-31.2 (-48.8; -13.5)	0.001	-0.75 (-34.6; 33.1)	0.962	-6.5 (-30.9; 17.9)	0.331	-22.8 (-36.7; -8.9)	0.002

<b>GGT, U/L</b>	16.6 (-56.8; 89.9)	0.644	49.0 (-43.0; 141.0)	0.266	1.50 (-360.7; 363.7)	0.145	-22.7 (-59.1; 13.7)	0.214
<b>ALP, U/L</b>	-32.0 (-76.8; 12.8)	0.152	-37.0 (-86.8; 12.8)	0.130	-81.5 (-258.3; 95.3)	0.177	-48.8 (-77.4; -20.2)	0.001
<b>Pseudocolinesterasi, U/L</b>	4,777 (3,836; 5,718)	<0.0001	4,334 (3,222; 5,445)	<0.0001	3,283 (-2,687; 9,254)	0.158	3,631 (2,598; 4,663)	0.000
<b>eGFR, ml/min/1.73 m<sup>2</sup></b>	-18.0 (-25.1; -10.8)	<0.0001	-18.3 (-31.6; -4.9)	0.012	-20.3 (-50.8; 10.3)	0.278	-11.4 (-18.5; -4.3)	0.002

*I valori sono espressi come differenza media (95% CI). I test utilizzati sono stati il test t di Student e test dei segni per ranghi di Wilcoxon per la variabili parametriche e non parametriche, rispettivamente.*

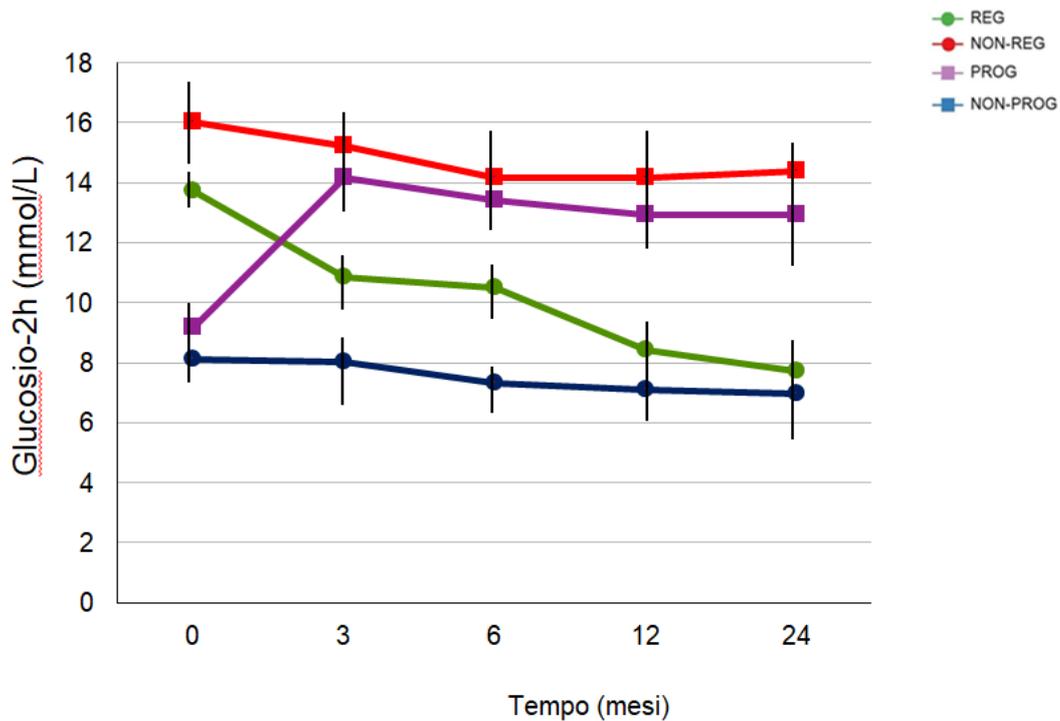
In figura 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 e 4.6 sono riportati, rispettivamente, l'andamento nel corso del tempo di glicemia, glicemia 2 ore dopo OGTT, insulinemia, c-peptide ed HbA1c nei 4 gruppi di outcome.

Figura 4.1 – *Andamento nel tempo della glicemia. I cambiamenti nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.*



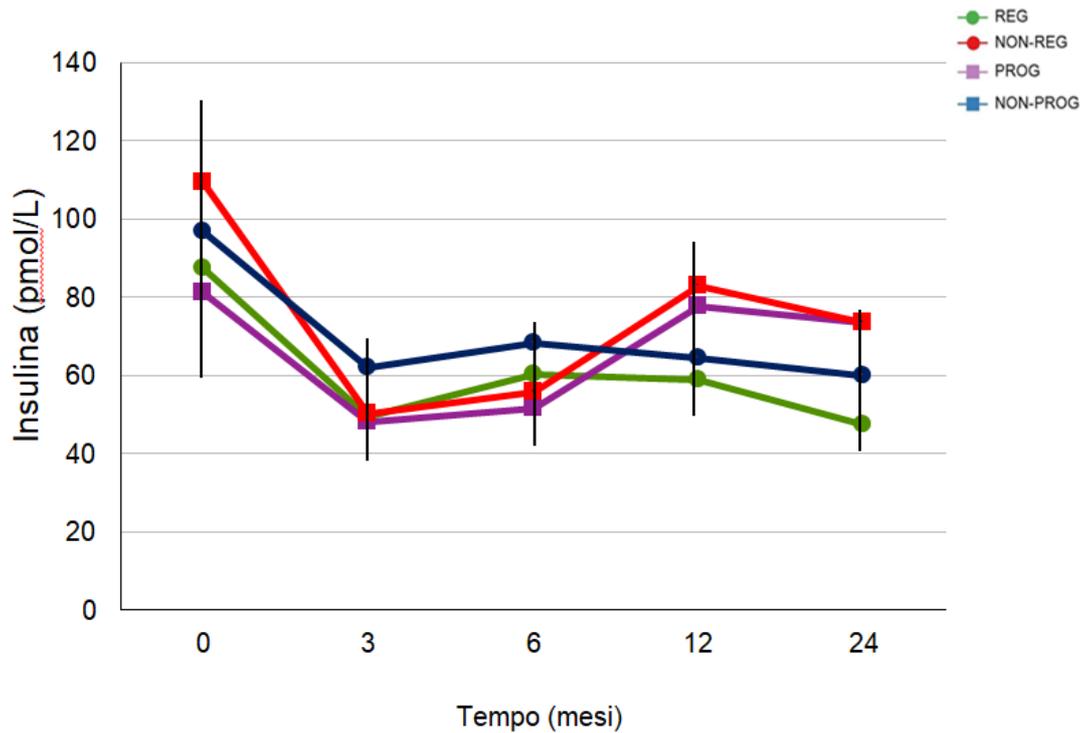
Come atteso, i livelli di glicemia dei soggetti che hanno sviluppato diabete nel post trapianto (PROG) hanno eguagliato nel tempo i livelli di glicemia dei soggetti che hanno dimostrato DM nel pretrapianto (non-REG), attestandosi su valori significativamente maggiori rispetto ai livelli di glicemia dei soggetti mai risultati diabetici (non-PROG) e dei soggetti che sono andati incontro a guarigione post trapianto (REG).

Figura 4.2 – *Andamento nel tempo della glicemia 2 ore post OGTT. I cambiamenti nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG . I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.*



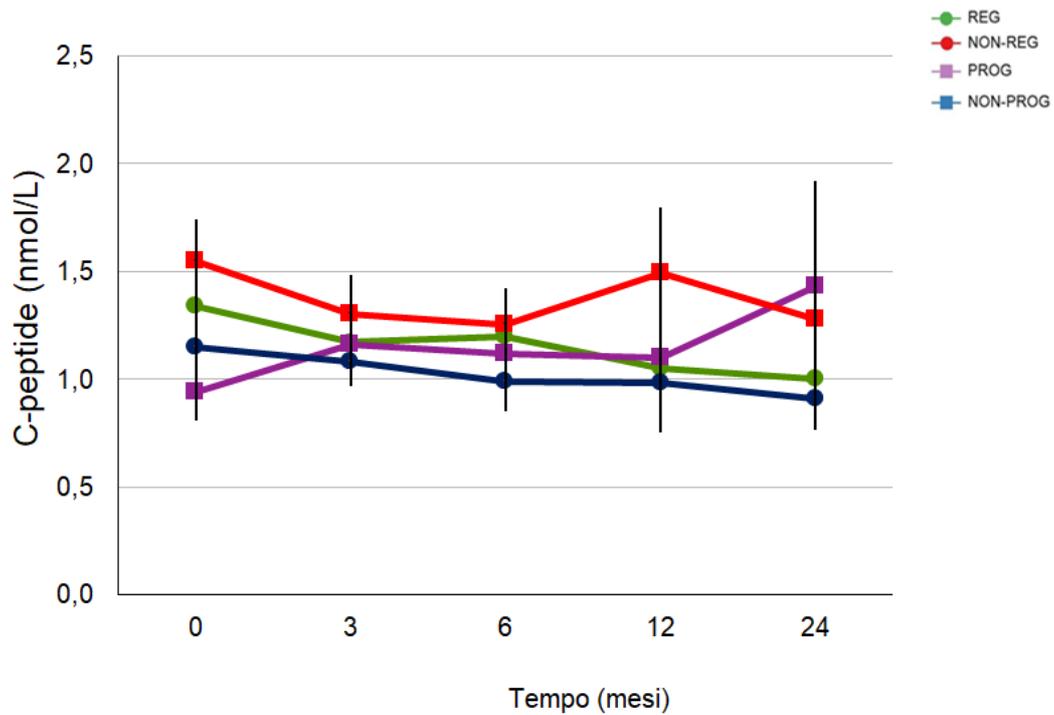
Allo stesso modo, i livelli di glicemia 2 ore post OGTT dei soggetti PROG sono aumentati dal post trapianto in poi, fino a raggiungere i livelli dei soggetti non-REG, attestandosi a livelli significativamente più alti rispetto ai soggetti non-PROG e REG.

Figura 4.3 – *Andamento nel tempo dei valori di insulinemia. I cambiamenti nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.*



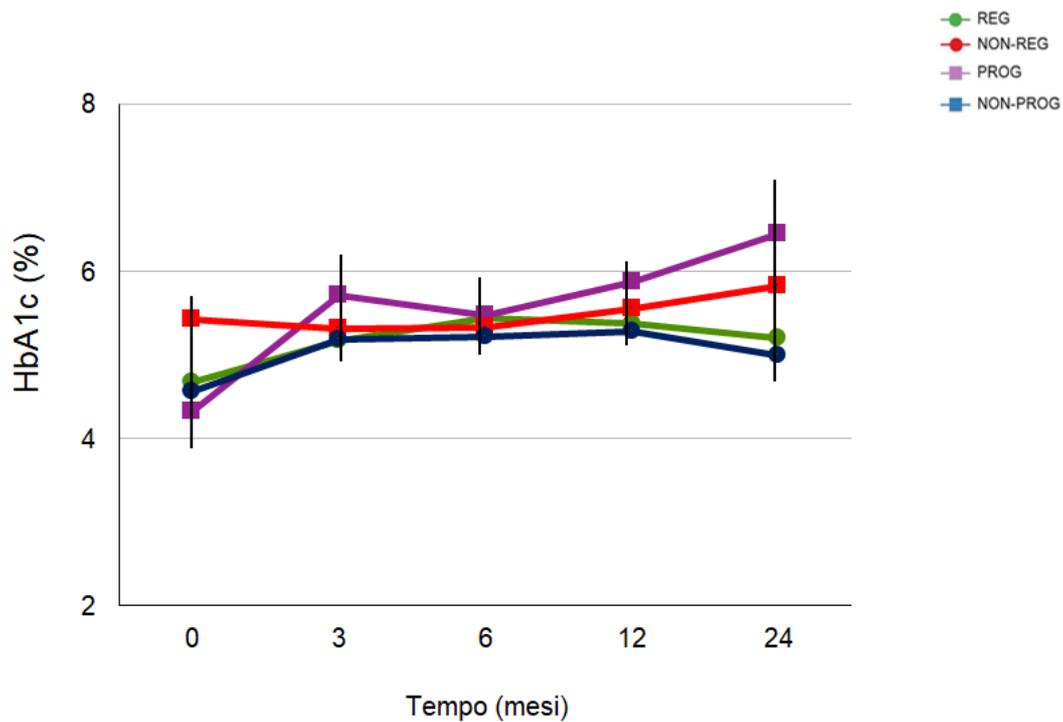
I livelli di insulinemia sono andati incontro a diminuzione consensuale in tutti e 4 i gruppi dai 3 mesi post trapianto in poi, per poi aumentare nuovamente nel gruppo dei soggetti PROG e non REG dal mese 12 in poi.

Figura 4.4 – *Andamento nel tempo dei valori di c-peptide. I cambiamenti nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.*



Allo stesso modo, i livelli di c-peptide sono andati incontro a diminuzione consensuale in tutti e 4 i gruppi, eccetto il gruppo dei PROG, dai 3 mesi post trapianto in poi, per poi aumentare nuovamente nel gruppo dei soggetti non-REG dal mese 12.

Figura 4.5 – *Andamento nel tempo dell'HbA1c. I cambiamenti nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG . I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM.*



Come atteso, I livelli di Hba1c dei soggetti PROG hanno raggiunto quelli dei soggetti non-REG dal post trapianto in poi, attestandosi a livelli significativamente maggiori rispetto ai soggetti REG e non-PROG

Il tipo di terapia immunosoppressiva utilizzata non si è dimostrato differente a seconda del gruppo di outcome.

E' stata inoltre valutata l'incidenza delle più comune complicanze post-trapianto, quali il rigetto, lo sviluppo di infezioni, la recidiva di infezione da HCV, lo sviluppo

di complicanze cardiovascolari o di fattori di rischio quali ipertensione e dislipidemia, la ricorrenza di complicanze ematologiche, psico-neurologiche e oncologiche, la necessità di interventi chirurgici, ma non si sono rese evidenti differenze significative tra i gruppi di outcome (Tabella 4.5).

Tale differenza non si è resa statisticamente significativa nemmeno considerando l'insieme dei pazienti diabetici (gruppo PROG e gruppo NON REG), rispetto ai non diabetici (gruppo REG e gruppo NON PROG).

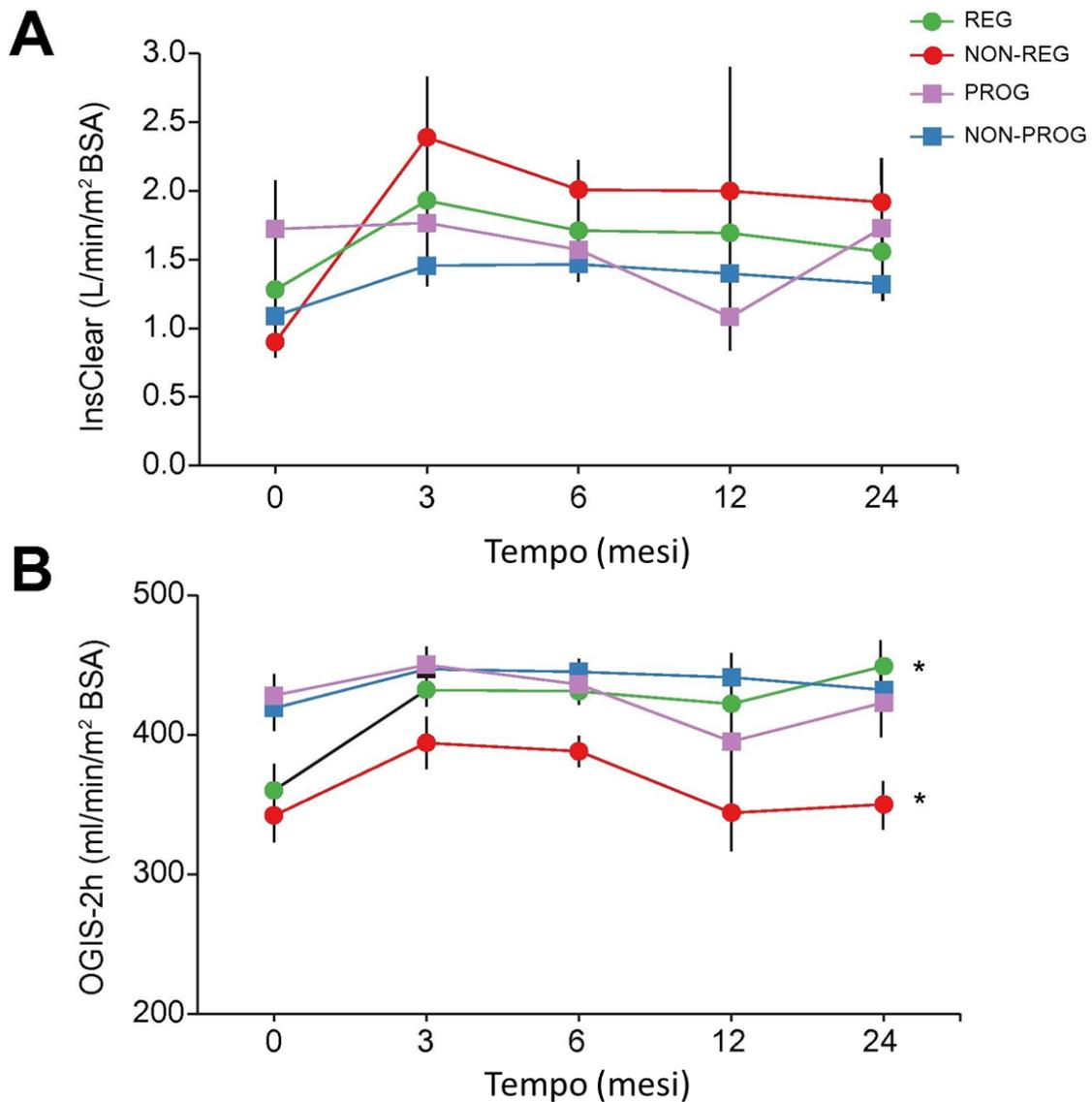
Tabella 4.5 - *Terapia immunosoppressiva e eventi avversi postOLT nella popolazione di riferimento e a seconda dei gruppi di outcome*

	Tutti	Regressors	Non-regressors	Progressors	Non-progressors	P
N	80	23	13	4	40	
Terapia						
Steroidi, giorni	319.4±692.	264.3±221.2	317.7±253.3	1,953.8±2,847.	188.3±83.2	0.107
Farmaci immunosoppressivi, n (%)						0.429
Sirolimus	16 (20.0)	5 (21.7)	2 (15.4)	0 (0.0)	9 (22.5)	
Sirolimus + MMF	27 (33.7)	5 (21.7)	4 (30.8)	3 (75.0)	15 (37.5)	
Ciclosporina	5 (6.3)	1 (4.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (10.0)	
Ciclosporina + MMF	32 (40.0)	12 (52.2)	7 (53.8)	1 (25.0)	12 (30.0)	
Complicanze, n (%)						
Rigetto						0.851
- No	57 (71.2)	18 (78.3)	9 (69.2)	2 (50.0)	28 (70.0)	
- Lieve	8 (10.0)	1 (4.3)	1 (7.7)	1 (25.0)	5 (12.5)	
- Moderato/severo	15 (18.8)	4 (17.4)	3 (23.1)	1 (25.0)	7 (17.5)	
Infezioni	32 (40.0)	10 (43.5)	6 (46.2)	3 (75.0)	13 (32.5)	0.348
Recidiva HCV *	26 (68.4)	12 (75.0)	8 (75.0)	1 (100.0)	17 (58.8)	0.662
Fattori di rischio/eventi cardiovascolari						
-Ipertensione	55 (68.8)	18 (78.3)	9 (69.2)	3 (75.0)	25 (62.5)	0.622
- Dislipidemia	9 (11.25)	2 (8.7)	2 (15.4)	1 (25.0)	4 (10.0)	0.755
- Fibrillazione atriale/flutter	3 (3.8)	1 (4.4)	1 (7.7)	0 (0.0)	1 (2.5)	0.823
- Int. chirurgici †	31 (38.8)	8 (34.8)	7 (53.9)	0 (0.0)	16 (40.0)	0.266
- Compl. ematologiche ‡	6 (7.5)	2 (8.7)	2 (15.4)	1 (25.0)	1 (2.5)	0.220
- Compl. Psico-neurologiche §	8 (10.0)	2 (8.7)	1 (7.7)	1 (25.0)	4 (10.0)	0.772
- Neoplasie #	2 (2.5)	1 (4.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.5)	0.859

*I valori sono espressi come media  $\pm$  DS, ove non indicato in altro modo. Test di Kruskal-Wallis e test  $\chi^2$  per variabili continue e categoriche, rispettivamente. \* i valori percentuali sono calcolati come casi di recidiva HCV/casi di HCV al baseline. † complicanze chirurgiche: laparoccele, deiscenze di ferite, fistole, sanguinamenti. ‡ complicanze ematologiche: gammopatie monoclonali, leucopenia, piastrinopenia, pancitopenia. § complicanze psico-neurologiche: depressione. # Neoplasie: 1 caso di linfoma, 1 caso di carcinoma prostatico + carcinoma faringeo.*

Dopo OLT, l'InsCLear è aumentata significativamente in tutti i gruppi eccetto i PROG dal 3° mese al 2° anno (Figura 4.6A).

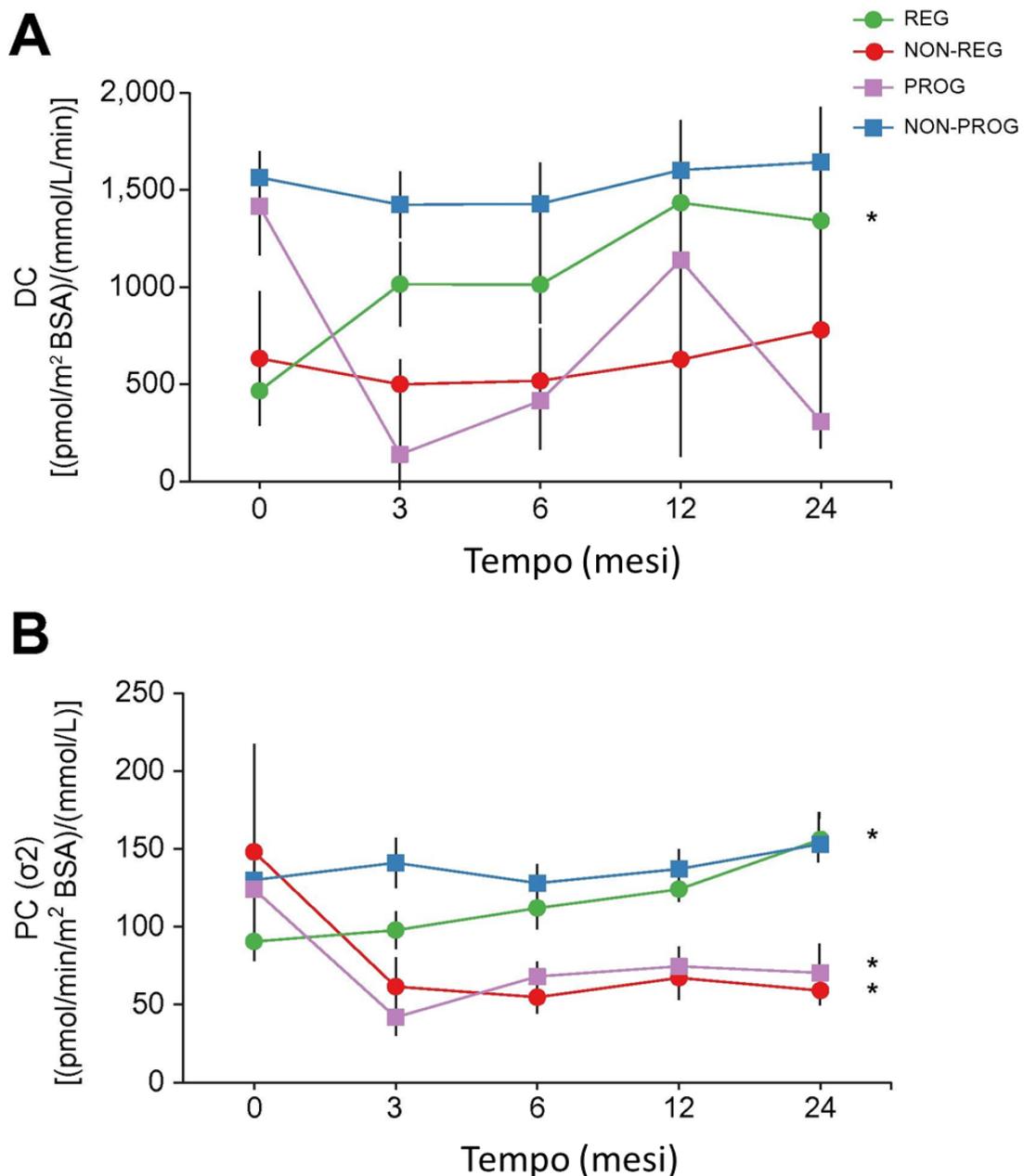
Figura 4.6– *Andamento nel tempo di InsClear e OGIS-2h. I cambiamenti in (A) InsClear e (B) OGIS-2h nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ : OGIS-2h per REG, globale e a tutti i tempi post-OLT vs. baseline; e per i NON-REG, globale e ai mesi 3 e 6 post-OLT vs.*



Anche i livelli di OGIS-2h sono aumentati in tutti i gruppi 3 mesi dopo OLT, anche se in modo non statisticamente significativo nel gruppo PROG. Dopo tale momento, hanno proseguito ad aumentare nei REG, mentre sono andati incontro a diminuzione fino a raggiungere nuovamente i livelli basali negli altri gruppi (Figura 4.6B)

Sia il DC (Figura 4.7A) che il PC (Figura 4.7B) della funzione  $\beta$  cellulare sono andati incontro a significativo aumento nel gruppo REG, a diminuzione nel gruppo PROG (nonostante un parziale e transitorio miglioramento al primo anno) e si sono mantenuti stabili nei non-PROG. Nel gruppo non-REG il PC ha dimostrato una diminuzione nel corso del follow up. Nel gruppo REG un incremento nel DC è stato osservato già a partire dal 3° mese e ha preceduto l'incremento del PC, che si è verificato invece a partire dal 1° anno.

Figura 4.7 – **Andamento nel tempo della funzione  $\beta$ -cellulare.** I cambiamenti in (A) DC e (B) PC ( $\sigma^2$ ) nel periodo di follow-up di 2 anni nei pazienti REG, NON-REG, PROG e NON-PROG. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ : DC per i REG, globale e per tutti i tempi post-OLT vs. baseline; per i PROG, globale (Friedman test seguito da Wilcoxon test); PC per i NON-REG, globale e al mese 3 post-OLT vs. baseline; REG, globale e ai mesi 12 e 24 post-OLT vs. baseline; PROG, globale e ai mesi 3 e 24 post-OLT vs. baseline (hierarchical general linear model).



Il vettore relativo al gruppo non-REG parte da una posizione significativamente lontana dalla curva normale e, al 3° mese, la sua distanza non diminuisce ma presenta uno spostamento verso il basso (peggiore del PCadj) a cui corrisponde uno spostamento verso destra (miglioramento dell'OGIS-2h). Dal 3° mese in poi, la sensibilità insulinica crolla nuovamente ai valori basali (spostamento verso sinistra) ma, non migliorando in modo significativo la PCadj, alla fine del 2° anno la distanza dei non-REG dalla curva normale risulta essere aumentata (Figura 4.8A)

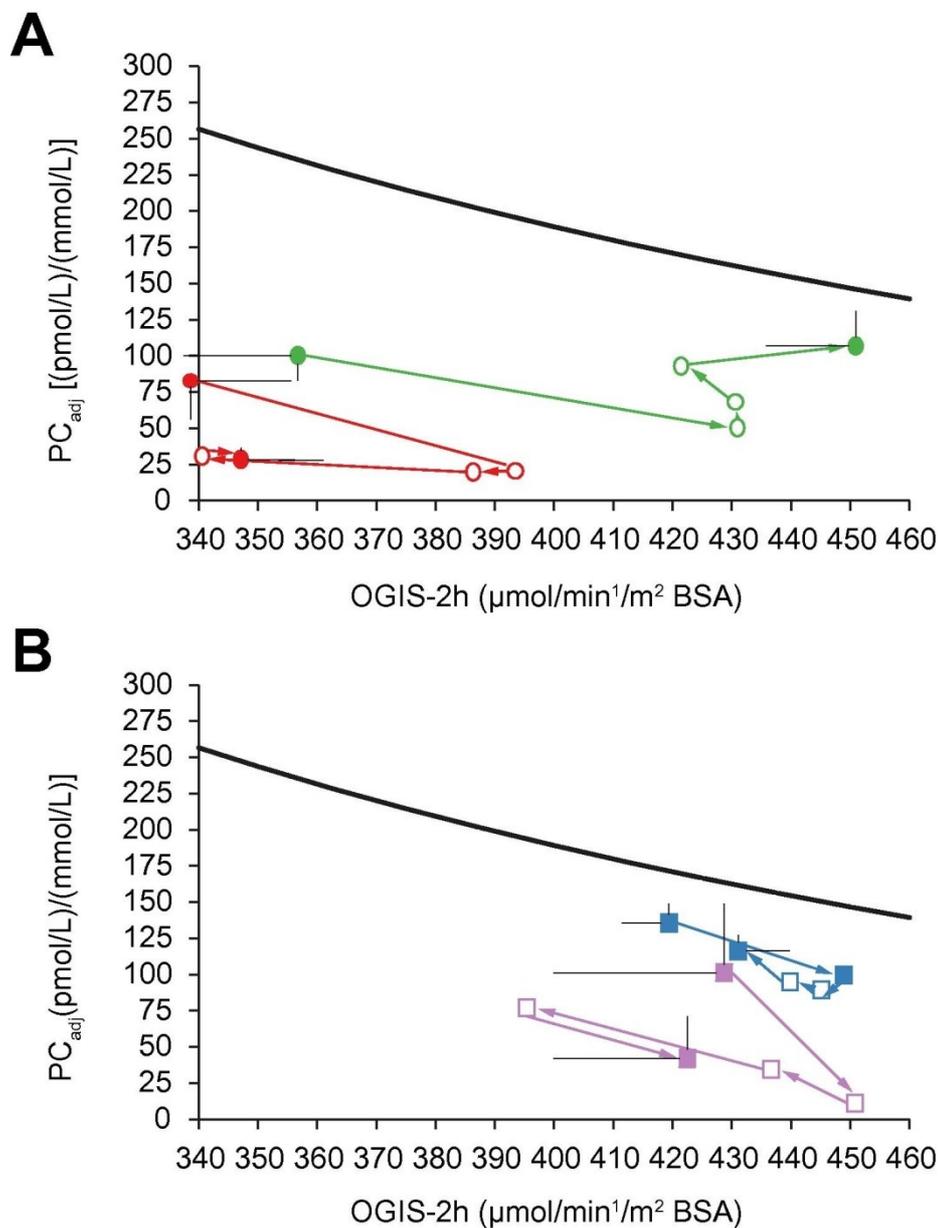
I vettore dei REG mostra un comportamento analogo nel corso dei primi 6 mesi post trapianto, con una piccola diminuzione nella distanza dalla curva normale, essendo lo spostamento verso destra (miglioramento nei valori di OGIS-2h) compensato da uno spostamento verso il basso (peggiore del PCadj). Comunque, al 1° e, soprattutto, al 2° anno, il vettore dei REG ricalca quasi completamente la normale curva dei soggetti sani, con spostamento verso l'alto in questa fase del follow up (miglioramento della biodisponibilità insulinica) (Figura 4.3A).

Il vettore dei non-PROG inizia vicino alla curva normale. Dopo trapianto, il vettore viaggia avanti e indietro attraverso punti che giacciono approssimativamente alla stessa distanza dalla curva normale, disegnando una linea parallela ad essa, anche se localizzata leggermente al di sotto, come se lo spostamento del PCadj e dell'OGIS2h si compensassero l'un l'altro (Figura 4.8B).

In contrasto, già a 3 mesi dopo OLT, il vettore dei PROG si ricolloca ad una maggiore distanza dalla normale curva rispetto al pre trapianto, essenzialmente a causa di uno spostamento verso il basso (peggiore del PCadj), non compensato dallo spostamento verso destra (miglioramento dell'OGIS-2h). Tutte le modifiche successive nel gruppo PROG mantengono essenzialmente costante la distanza dalla normale curva, e il vettore apparentemente scorre avanti e indietro su una linea parallela al-

la curva normale, anche se molto più distante se paragonata alla fase pre-trapianto (Figura 4.8B).

Figura 4.8 – *Andamento nel tempo della relazione tra  $PC_{adj}$  e OGIS-2 h*. Vector plots relativi al rapporto tra biodisponibilità insulinica in risposta al glucosio ( $PC_{adj}$ ) e sensibilità insulinica (OGIS-2 h) nell'arco del follow-up di 2 anni nei pazienti (A) REG (linea verde e cerchi) e NON-REG (linea rossa e quadrati) e nei pazienti (B) PROG (linea viola e quadrati) e NON-PROG (linea blu e quadrati). I dati sono espresso come media  $\pm$  SEM. La linea concava rappresenta il normale feedback loop esistente tra glucosio e insulina.



## CAPITOLO V – DISCUSSIONE

L'associazione tra epatopatia e diabete mellito è stata ampiamente dimostrata, essendo la sua prevalenza notevolmente elevata per essere considerata una correlazione casuale tra due patologie così comuni. Più recentemente, è stato inoltre dimostrato che il diabete stesso può essere causa di epatopatia attraverso un processo che porta allo sviluppo di NAFLD, NASH, cirrosi e epatocarcinoma, e che il virus dell'epatite C può avere un effetto diabetogeno diretto, sia attraverso un meccanismo di insulinoresistenza sia attraverso un tropismo specifico per la cellula  $\beta$  del pancreas.

E' infine nota la correlazione esistente tra trapianto d'organo e, nello specifico, trapianto di fegato e nuova insorgenza di alterazioni a carico del metabolismo glucidico.

Come riportato precedentemente tuttavia, ad oggi non sono disponibili studi volti a valutare gli effetti del trapianto di fegato su secrezione, clearance e sensibilità insulinica, che costituiscono nel complesso le tre determinanti dell'omeostasi glucidica.

Con il nostro studio ci siamo proposti di caratterizzare i componenti responsabili delle modificazioni alla regolazione glucidica nei soggetti cirrotici dopo OLT. A tal fine, abbiamo seguito in modo longitudinale una coorte di pazienti sottoposti a OLT valutando la loro tolleranza glucidica e le sue determinanti principali a specifici intervalli di tempo; abbiamo quindi identificato in modo retrospettivo 4 gruppi a seconda dello stato glicometabolico raggiunto a 2 anni post trapianto rispetto alla fase pre-trapianto.

La proporzione di soggetti che sono andati incontro a regressione del diabete nel

post-trapianto (REG-64%) sul numero totale di persone con DM prima del trapianto si è dimostrata sovrapponibile a quanto riportato da Perseghin et al. (14) e, almeno in linea teorica, dovrebbe essere una stima approssimata dei casi di diabete puramente epatogeno. In realtà, una serie di altre variabili potrebbero essere coinvolta, quali la denervazione epatica derivante dal trapianto, l'influenza della componente genetica dell'organo trapiantato e la durata del diabete pre OLT.

Un'altra evidenza significativa del nostro studio è il fatto che solo il valore di emoglobina glicata pre-OLT e l'anamnesi familiare positiva per DM si sono dimostrati predittori indipendenti negativi per regressione del DM. Queste evidenze suggeriscono come, all'interno di questa popolazione, il valore di emoglobina glicata sia ancora in grado di riflettere l'entità del compenso glicemico nonostante la presenza di fattori confondenti quali l'accorciata emivita degli eritrociti. E' inoltre sorprendente il fatto che nessuno tra gli altri fattori spesso chiamati in causa, quali le modifiche nel peso corporeo pre e post-trapianto, la terapia immunosoppressiva e la presenza di infezione da HCV, si sia dimostrato un predittore significativo di regressione del diabete, probabilmente per la relativa piccola numerosità del nostro campione.

L'originalità nel nostro studio consiste nella simultanea valutazione della funzione  $\beta$ -cellulare, del catabolismo insulinico e della sensibilità insulinica, i tre determinanti chiave immediati del metabolismo glucidico, notoriamente soggetti a profonde modifiche dopo trapianto epatico. E' infatti noto che la ripristinata funzione del fegato comporta un aumento sia della sensibilità insulinica epatica che del catabolismo insulinico, due processi fisiopatologici che agiscono in direzioni opposte tramite, rispettivamente, un miglioramento globale della sensibilità all'ormone e una riduzione della sua biodisponibilità. Inoltre, il trapianto epatico potrebbe migliorare

anche la produzione  $\beta$ -cellulare, in accordo con la nostra ipotesi di un effetto “tossico” diretto sulle  $\beta$ -cellule promosso dall’epatopatia di base, portano fino al quadro di diabete epatogeno (8).

I nostri dati hanno dimostrato che, 3 mesi dopo trapianto, gli effetti glicometabolici attesi, quali il miglioramento della sensibilità insulinica e l’aumentata clearance insulinica, si sono verificati in tutti i gruppi analizzati. Riguardo la funzione  $\beta$ -cellulare, il PC è rimasto invariato, mentre il DC ha mostrato un aumento significativo nel gruppo dei REG e una diminuzione, anche se statisticamente non significativa, nel gruppo dei PROG. Nelle fasi successive del follow-up si è verificato un graduale aumento anche del PC nel gruppo dei REG. Tale cambiamento, insieme alla speculare riduzione nel gruppo dei PROG, evidenzia come proprio la funzione  $\beta$ -cellulare possa essere il determinante principale in grado di promuovere la regressione o insorgenza di diabete dopo il trapianto, con tutti i limiti derivanti dalla scassa numerosità del gruppo dei PROG.

I vector plots inoltre dimostrano che, dopo 3 mesi, il risultato netto delle modifiche pre e post trapianto dei tre determinanti dell’omeostasi glucidica non alterano in modo apprezzabile la distanza di ogni gruppo dalla linea della normale regolazione glucidica, con la possibile eccezione del gruppo dei PROG, la cui distanza dalla linea di normalità si dimostra sensibilmente distante già a quest’epoca, suggerendo che l’alterazione metabolica responsabile della progressione a diabete possa verificarsi entro 3 mesi dal trapianto.

Importante da sottolineare come, 3 mesi dopo trapianto, non si verificano significative modifiche della funzione  $\beta$ -cellulare in alcun gruppo, eccezion fatta per il miglioramento del DC osservato nel gruppo REG. Nonostante solo una quota relativamente piccola della secrezione insulinica totale possa essere rappresentata dal

DC durante un OGTT, è possibile che il miglioramento di tale parametro possa essere considerato un biomarker e/o un fattore causale del conseguente miglioramento del metabolismo glucidico, tenendo conto che proprio il DC rappresenta la secrezione insulinica di prima fase.

I vector plots dimostrano che la distanza dalla curva normale rimane stabile nei non-PROG e, se possibile, aumenta nei non-REG. In entrambi i gruppi l'aumentata clearance insulinica era ancora evidente a distanza di 2 anni dal trapianto, mentre il miglioramento della sensibilità insulinica è andato incontro a diminuzione fino a sparire nel corso del tempo. Nonostante l'interpretazione delle modifiche nella sensibilità insulinica sia suscettibile all'influenza di fattori confondenti quali il lifestyle, le terapie concomitanti e la composizione corporea, la perdita del mantenimento del vantaggio portato dal trapianto incide negativamente sul compenso glicemico.

Mentre l'impatto netto dei cambiamenti osservati nei gruppi non-REG e non-PROG è trascurabile, il fattore fisiopatologico predominante che porta i pazienti del gruppo PROG e REG a, rispettivamente, una peggiore e migliore regolazione glucidica, appare essere la biodisponibilità dell'insulina in risposta al glucosio e non la sensibilità all'ormone. Da qui, si evince come la  $\beta$  cellula giochi un ruolo fondamentale sia nello sviluppo di DM pre-trapianto (20) sia nella sua regressione dopo OLT, anche se la secrezione insulinica stimata nella fase pre-trapianto non predice l'outcome post-trapianto.

I principali punti di forza di questo lavoro sono principalmente la simultanea valutazione della funzione  $\beta$ -cellulare, della clearance e della sensibilità insulinica e il monitoraggio della loro interazione dinamica nell'arco di un periodo di follow up di 2 anni dopo trapianto epatico.

Le limitazioni dello studio sono da imputare all'eterogeneità dell'eziologia dell'epatopatia di base, la mancanza di dati derivanti da strumentazioni quali il fibroscan per meglio caratterizzare il grado di fibrosi epatica, e la mancanza di studi a livello molecolare dei cambiamenti che coinvolgono le tre determinanti del metabolismo glucidico.

In aggiunta, nessuno dei noti fattori di rischio per l'insorgenza o la persistenza di diabete dopo OLT, quali le modificazione nel peso e nella composizione corporea, la terapia immunosoppressiva e l'eziologia dell'epatopatia, si è confermato tale all'interno della nostra popolazione e ciò potrebbe essere attribuito alla relativa piccola numerosità del nostro campione. Infine, il comportamento fisiopatologico del gruppo PROG dovrebbe essere interpretato con molta cautela, essendo questa popolazione rappresentata da un campione molto piccolo.

## CAPITOLO VI – CONCLUSIONI

Il diabete mellito è un noto fattore prognostico sfavorevole per lo sviluppo di complicanze a lungo termine in soggetti sottoposti a trapianto di fegato, quali il rigetto d'organo, gli eventi cardiovascolari, la ricorrenza di infezioni e la mortalità generale.

La biodisponibilità insulinica in risposta al glucosio, processo in cui la funzione  $\beta$  cellulare ha dimostrato di rivestire un ruolo centrale, è il processo che governa le modifiche vantaggiose o sfavorevoli nel metabolismo glucidico dopo trapianto di fegato, portando ad una eventuale regressione della patologia, a una persistenza o a uno sviluppo de novo.

In considerazione dell'impatto prognostico negativo del diabete nei soggetti cirrotici sottoposti a OLT, diviene di fondamentale importanza diagnosticare quanto prima tale complicanza e impostare terapie farmacologiche ad hoc in grado di sostenere la funzione  $\beta$  cellulare in tali individui, possibilmente con l'utilizzo di farmaci innovativi, come ad esempio le classi attive sull'asse incretinico quali i GLP-1 RA e i DPPIV-inibitori, noti per la loro azione protettiva a tale livello.

## BIBLIOGRAFIA

1. Orsi E, Grancini V, Menini S, Aghemo A, Pugliese G. Hepatogenous diabetes: Is it time to separate it from type 2 diabetes? *Liver Int.* 2017 Jul;37(7):950-962.
2. Naunyn B. Glykosurie und Diabetes durch experimentelle Insulte und Krankheiten der Leber. In: Naunyn B, ed. *Der Diabetes Mellitus*. Wien: A. Holder; 1898:38-49.
3. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care.* 2016;39(Suppl. 1):S13-S22.
4. Moscatiello S, Manini R, Marchesini G. Diabetes and liver disease: an ominous association. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2007;17:63-70
5. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: epidemiology and pathogenesis. *Diabetes Care.* 2006;29:1140-1149
6. García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, González-González JA, Maldonado-Garza HJ. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol.* 2009;15:280-288.
7. García-Compeán D, González-González JA, Lavallo-González FJ, González-Moreno EI, Villarreal-Pérez JZ, Maldonado-Garza HJ. Hepatogenous diabetes: is it a neglected condition in chronic liver disease? *World J Gastroenterol.* 2016;22:2869-2874
8. Megyesi C, Samols E, Marks V. Glucose tolerance and diabetes in chronic liver disease. *Lancet.* 1967;2:1051-1056.
9. Buzzelli G, Chiarantini E, Cotrozzi G, et al. Estimate of prevalence of glucose intolerance in chronic liver disease. Degree of agreement among some diagnostic criteria. *Liver.* 1988;8:354-359.
10. Del Vecchio Blanco C, Gentile S, Marmo R, Carbone L, Coltorti M. Alterations of glucose metabolism in chronic liver disease. *Diabetes Res Clin Pract.* 1990;8:29-36.
11. Müller MJ, Pirllich M, Balks HJ, Selberg O. Glucose intolerance in liver cirrhosis: role of hepatic and non-hepatic influences. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1994;32:749-758.
12. Gentile S, Loguercio C, Marmo R, Carbone L, Del Vecchio Blanco C. Incidence of altered glucose tolerance in liver cirrhosis. *Diabetes Res Clin Pract.* 1993;22:37-44.
13. Thuluvath PJ, Guidinger MK, Fung JJ, Johnson LB, Rayhill SC, Pelletier SJ. Liver transplantation in the United States, 1999-2008. *Am J Transplant.* 2010;10:1003-1019.
14. Younossi ZM, Stepanova M, Saab S, et al. 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;40:686-694.
15. Holstein A, Hinze S, Thiessen E, Plaschke A, Egberts EH. Clinical implications of hepatogenous diabetes in liver cirrhosis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002;17:677-681.
16. Wlazlo N, Beijers HJ, Schoon EJ, Sauerwein HP, Stehouwer CD, Bravenboer B. High prevalence of diabetes mellitus in patients with liver cirrhosis. *Diabet Med.* 2010;27:1308-1311.
17. García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, Lavallo-González FJ, et al. The prevalence and clinical characteristics of glucose metabolism disorders in patients with liver cirrhosis. A prospective study. *Ann Hepatol.* 2012;11:240-248.
18. Jeon HK, Kim MY, Baik SK, et al. Hepatogenous diabetes in cirrhosis is related to portal pressure and variceal hemorrhage. *Dig Dis Sci.* 2013;58:3335-3341.
19. Lunati ME, Grancini V, Agnelli F, et al. Metabolic syndrome after liver transplantation: short-term prevalence and pre- and post-operative risk factors. *Dig Liver Dis.* 2013;45:833-839.
20. Grancini V, Trombetta M, Lunati ME, et al. Contribution of  $\beta$ -cell dysfunction and insulin resistance to cirrhosis-associated diabetes: role of severity of liver disease. *J Hepatol.* 2015;63:1484-1490.
21. Marselli L, De Simone P, Morganti R, et al. Frequency and characteristics of diabetes in 300 pre-liver transplant patients. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2016;26:441-442.
22. Tietge UJ, Selberg O, Kreter A, et al. Alterations in glucose metabolism associated with liver cirrhosis persist in the clinically stable long-term course after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2004;10:1030-1040.
23. Nishida T, Tsuji S, Tsujii M, et al. Oral glucose tolerance test predicts prognosis of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:70-75.
24. Taguchi K, Yamanaka-Okumura H, Mizuno A, et al. Insulin resistance as early sign of hepatic dysfunction in liver cirrhosis. *J Med Invest.* 2014;61:180-189
25. Imano E, Nishida T, Shibata M, Kanda T. Significance of oral glucose tolerance test for the diagnosis of diabetes mellitus in patients with liver cirrhosis. *Intern Med.* 1999;38:918.
26. Zein NN, Abdulkarim AS, Wiesner RH, Egan KS, Persing DH. Prevalence of diabetes mellitus in patients with endstage liver cirrhosis due to hepatitis C, alcohol, or cholestatic disease. *J Hepatol.* 2000;32:209-217.
27. Holbrook TL, Barrett-Connor E, Wingard DL. A prospective population-based study of alcohol use and non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Epidemiol.* 1990;132:902-909.
28. Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, et al. A prospective study of moderate alcohol drinking and risk of diabetes in women. *Am J Epidemiol.* 1988;128:549-558.
29. Wei M, Gibbons LW, Mitchell TL, Kampert JB, Blair SN. Alcohol intake and incidence of type 2 diabetes in men. *Diabetes Care.* 2000;23:18-22.
30. Adams PC, Kertesz AE, Valberg LS. Clinical presentation of hemochromatosis: a changing scene. *Am J Med.* 1991;90:445-449.
31. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med.* 2002;346:1221-1231.
32. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003;37:917-923.
33. Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2014;2:901-910.
34. Ahmadi H, Azar ST. Liver disease and diabetes: association, pathophysiology, and management. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;104:53-62.
35. Harrison SA. Liver disease in patients with diabetes mellitus. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40:68-76.

36. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;122:1649–1657.
37. Mehta SH, Brancati FL, Sulkowski MS, Strathdee SA, Szklo M, Thomas DL. Prevalence of type 2 diabetes mellitus among persons with hepatitis C virus infection in the United States. *Ann Intern Med*. 2000;133:592–599.
38. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Esteban JI, Jardí R, Simó R. High prevalence of glucose abnormalities in patients with hepatitis C virus infection: a multivariate analysis considering the liver injury. *Diabetes Care*. 2004;27:1171–1175.
39. Petit JM, Bour JB, Galland-Jos C, et al. Risk factors for diabetes mellitus and early insulin resistance in chronic hepatitis C. *J Hepatol*. 2001;35:279–283.
40. Petrides AS, Vogt C, Schulze-Berge D, Matthews D, Strohmeyer G. Pathogenesis of glucose intolerance and diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology*. 1994;19:616–627.
41. Perseghin G, Mazzaferro V, Sereni LP, et al. Contribution of reduced insulin sensitivity and secretion to the pathogenesis of hepatogenous diabetes: effect of liver transplantation. *Hepatology*. 2000;31:694–703.
42. Kahn SE. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2003;46:3–19.
43. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sakata M, Sumie S, Sata M. Insulin resistance and chronic liver disease. *World J Hepatol*. 2011;3:99–107.
44. Shmueli E, Walker M, Alberti G, Record CO. Normal splanchnic but impaired peripheral insulin-stimulated glucose uptake in cirrhosis. *Hepatology*. 1993;18:86–95.
45. Nielsen MF, Caumo A, Aagaard NK, et al. Contribution of defects in glucose uptake to carbohydrate intolerance in liver cirrhosis: assessment during physiological glucose and insulin concentrations. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G1135–G1143.
46. Dasarathy S, Merli M. Sarcopenia from mechanism to diagnosis and treatment in liver disease. *J Hepatol*. 2016;65:1232–1244.
47. Petrides AS, De Fronzo RA. Failure of glucagon to stimulate hepatic glycogenolysis in well-nourished patients with mild cirrhosis. *Metabolism*. 1994;43:85–89.
48. Marchesini G, Pacini G, Bianchi G, Patrono D, Cobelli C. Glucose disposal, beta-cell secretion, and hepatic insulin extraction in cirrhosis: a minimal model assessment. *Gastroenterology*. 1990;99:1715–1722.
49. Petrides AS, Schulze-Berge D, Vogt C, Matthews DE, Strohmeyer G. Glucose resistance contributes to diabetes mellitus in cirrhosis. *Hepatology*. 1993;18:284–291.
50. Kato M, Asano H, Miwa Y, et al. Both insulin sensitivity and glucose sensitivity are impaired in patients with non-diabetic liver cirrhosis. *Hepatol Res*. 2000;17:93–101.
51. Johnson DG, Alberti KG, Faber OK, Binder C. Hyperinsulinism of hepatic cirrhosis: diminished degradation or hypersecretion? *Lancet*. 1977;1:10–13.
52. Bosch J, Gomis R, Kravetz D, et al. Role of spontaneous portalsystemic shunting in hyperinsulinism of cirrhosis. *Am J Physiol*. 1984;247:G206–G212.
53. Letiexhe MR, Scheen AJ, Gérard PL, et al. Insulin secretion, clearance, and action on glucose metabolism in cirrhotic patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77:1263–1268.
54. Hashimoto N, Ashida H, Kotoura Y, Nishioka A, Nishiwaki M, Utsunomiya J. Analysis of hepatic encephalopathy after distal splenorenal shunt—PTP image and pancreatic hormone kinetics. *Hepatogastroenterology*. 1993;40:360–364.
55. Petrides AS, Stanley T, Matthews DE, Vogt C, Bush AJ, Lambeth H. Insulin resistance in cirrhosis: prolonged reduction of 960 | ORSI et al. hyperinsulinemia normalizes insulin sensitivity. *Hepatology*. 1998;28:141–149.
56. Petrides AS, DeFronzo RA. Glucose and insulin metabolism in cirrhosis. *J Hepatol*. 1989;8:107–114.
57. Kruszynska YT, Home PD, McIntyre N. Relationship between insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in cirrhosis. *Hepatology*. 1991;14:103–111.
58. Greco AV, Mingrone G, Mari A, Capristo E, Manco M, Gasbarrini G. Mechanisms of hyperinsulinaemia in Child's disease grade B liver cirrhosis investigated in free living conditions. *Gut*. 2002;51: 870–875.
59. Saitoh M. Studies on histopathology of pancreas in portal hypertension. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 1984;81:1444–1452.
60. Takei K, Suda K. [Study of mechanisms of pancreatic fibrosis and structural changes in liver cirrhotic patients]. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi*. 1997;94:92–100.
61. Steiner JL, Crowell KT, Lang CH. Impact of alcohol on glycemic control and insulin action. *Biomolecules*. 2015;5:2223–2246.
62. Mendler MH, Turlin B, Moirand R, et al. Insulin resistance-associated hepatic iron overload. *Gastroenterology*. 1999;117:1155–1163.
63. Lihn AS, Pedersen SB, Richelsen B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obes Rev*. 2005;6:13–21.
64. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, et al. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature*. 2002;420:333–336.
65. Hui JM, Hodge A, Farrell GC, Kench JG, Kriketos A, George J. Beyond insulin resistance in NASH: TNF-alpha or adiponectin? *Hepatology*. 2004;40:46–54.
66. Marra F, Bertolani C. Adipokines in liver diseases. *Hepatology*. 2009;50:957–969.
67. Bradbury MW, Berk PD. Lipid metabolism in hepatic steatosis. *Clin Liver Dis*. 2004;8:639–671.
68. Nagle CA, Klett EL, Coleman RA. Hepatic triacylglycerol accumulation and insulin resistance. *J Lipid Res*. 2009;50(Suppl.):S74–S79.
69. Junker AE, Gluud L, Holst JJ, Knop FK, Vilsbøll T. Diabetic and nondiabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease have an impaired incretin effect and fasting hyperglucagonaemia. *J Intern Med*. 2016;279:485–493.
70. Muscelli E, Mari A, Casolaro A, et al. Separate impact of obesity and glucose tolerance on the incretin effect in normal subjects and type 2 diabetic patients. *Diabetes*. 2008;57:1340–1348.
71. Jun LS, Millican RL, Hawkins ED, et al. Absence of glucagon and insulin action reveals a role for the GLP-1 receptor in endogenous glucose production. *Diabetes*. 2015;64:819–827.
72. Svegliati-Baroni G, Saccomanno S, Rychlicki C, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor activation stimulates hepatic lipid oxidation and restores hepatic signalling alteration induced by a high-fat diet in nonalcoholic steatohepatitis. *Liver Int*. 2011;31:1285–1297.

73. Armstrong MJ, Hull D, Guo K, et al. Glucagon-like peptide 1 decreases lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2016;64:399–408.
74. Xiao C, Dash S, Morgantini C, Adeli K, Lewis GF. Gut peptides are novel regulators of intestinal lipoprotein secretion: experimental and pharmacological manipulation of lipoprotein metabolism. *Diabetes.* 2015;64:2310–2318.
75. Miyazaki M, Kato M, Tanaka K, et al. Increased hepatic expression of dipeptidyl peptidase-4 in non-alcoholic fatty liver disease and its association with insulin resistance and glucose metabolism. *Mol Med Rep.* 2012;5:729–733.
76. Itou M, Kawaguchi T, Taniguchi E, Sata M. Dipeptidyl peptidase-4: a key player in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2013;19:2298–2306.
77. Lecube A, Hernández C, Genescà J, Simó R. Proinflammatory cytokines, insulin resistance, and insulin secretion in chronic hepatitis C patients: a case-control study. *Diabetes Care.* 2006;29: 1096–1101.
78. Hui JM, Sud A, Farrell GC, et al. Insulin resistance is associated with chronic hepatitis C virus infection and fibrosis progression. *Gastroenterology.* 2003;125:1695–1704.
79. Konrad T, Zeuzem S, Toffolo G, et al. Severity of HCV-induced liver damage alters glucose homeostasis in noncirrhotic patients with chronic HCV infection. *Digestion.* 2000;62:52–59.
80. D'Souza R, Sabin A, Foster GR. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:1509–1515.
81. Shintani Y, Fujie H, Miyoshi H, et al. Hepatitis C virus infection and diabetes: direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. *Gastroenterology.* 2004;126:840–848.
82. Vanni E, Abate ML, Gentilcore E, et al. Sites and mechanisms of insulin resistance in nonobese, nondiabetic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2009;50:697–706.
83. Milner KL, van der Poorten D, Trenell M, et al. Chronic hepatitis C is associated with peripheral rather than hepatic insulin resistance. *Gastroenterology.* 2010;138:932–941.
84. Bugianesi E, Salamone F, Negro F. The interaction of metabolic factors with HCV infection: does it matter? *J Hepatol.* 2012;56(Suppl. 1):S56–S65.
85. Fabris C, Soardo G, Falletti E, et al. Relationship among hepatic inflammatory changes, circulating levels of cytokines, and response to IFN-alpha in chronic hepatitis C. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18:705–709.
86. Zylberberg H, Rimaniol AC, Pol S, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors in chronic hepatitis C: a correlation with histological fibrosis and activity. *J Hepatol.* 1999;30:185–191.
87. García-Monzón C, Lo Iacono O, Mayoral R, et al. Hepatic insulin resistance is associated with increased apoptosis and fibrogenesis in nonalcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2011;54:142–152.
88. Bose SK, Shrivastava S, Meyer K, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J Virol.* 2012;86:6315–6322.
89. Pascarella S, Clément S, Guilloux K, Conzelmann S, Penin F, Negro F. Effects of hepatitis C virus on suppressor of cytokine signaling mRNA levels: comparison between different genotypes and core protein sequence analysis. *J Med Virol.* 2011;83:1005–1015.
90. Miyamoto H, Moriishi K, Moriya K, et al. Involvement of the PA28gamma-dependent pathway in insulin resistance induced by hepatitis C virus core protein. *J Virol.* 2007;81:1727–1735.
91. Christen V, Treves S, Duong FH, Heim MH. Activation of endoplasmic reticulum stress response by hepatitis viruses up-regulates protein phosphatase 2A. *Hepatology.* 2007;46:558–565.
92. Bernsmeier C, Duong FH, Christen V, et al. Virus-induced overexpression of protein phosphatase 2A inhibits insulin signaling in chronic hepatitis C. *J Hepatol.* 2008;49:429–440.
93. Rozario R, Ramakrishna B. Histopathological study of chronic hepatitis B and C: a comparison of two scoring systems. *J Hepatol.* 2003;38:223–229.
94. Oem JK, Jackel-Cram C, Li YP, et al. Activation of sterol regulatory element-binding protein 1c and fatty acid synthase transcription by hepatitis C virus non-structural protein 2. *J Gen Virol.* 2008;89:1225–1230.
95. Ueki K, Kondo T, Tseng YH, Kahn CR. Central role of suppressors of cytokine signaling proteins in hepatic steatosis, insulin resistance, and the metabolic syndrome in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004;101:10422–10427.
96. Moriishi K, Mochizuki R, Moriya K, et al. Critical role of PA28gamma in hepatitis C virus-associated steatogenesis and hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:1661–1666.
97. Yamaguchi A, Tazuma S, Nishioka T, et al. Hepatitis C virus core protein modulates fatty acid metabolism and thereby causes lipid accumulation in the liver. *Dig Dis Sci.* 2005;50:1361–1371.
98. Perlemuter G, Sabile A, Letteron P, et al. Hepatitis C virus core protein inhibits microsomal triglyceride transfer protein activity and very low density lipoprotein secretion: a model of viral-related steatosis. *FASEB J.* 2002;16:185–194.
99. Castera L, Chouteau P, Hezode C, Zafrani ES, Dhumeaux D, Pawlotsky JM. Hepatitis C virus-induced hepatocellular steatosis. *Am J Gastroenterol.* 2005;100:711–715.
100. Kruszynska YT, Goulas S, Wollen N, McIntyre N. Insulin secretory capacity and the regulation of glucagon secretion in diabetic and nondiabetic alcoholic cirrhotic patients. *J Hepatol.* 1998;28:280–291.
101. Rahier J, Loozen S, Goebbels RM, Abraham M. The haemochromatotic human pancreas: a quantitative immunohistochemical and ultrastructural study. *Diabetologia.* 1987;30:5–12.
102. Robertson RP, Harmon J, Tran PO, Poytout V. Beta-cell glucose toxicity, lipotoxicity, and chronic oxidative stress in type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(Suppl. 1):S119–S124.
103. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Vargas H, Rakela J. Search for hepatitis C virus extrahepatic replication sites in patients with acquired immunodeficiency syndrome: specific detection of negative-strand viral RNA in various tissues. *Hepatology.* 1998;28:1398–1401.
104. Masini M, Campani D, Boggi U, et al. Hepatitis C virus infection and human pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Diabetes Care.* 2005;28:940–941.

105. Honeyman MC, Stone NL, Harrison LC. T-cell epitopes in type 1 diabetes autoantigen tyrosine phosphatase IA2: potential for mimicry with rotavirus and other environmental agents. *Mol Med.* 1998;4:231–239.
106. Nocente R, Ceccanti M, Bertazzoni G, Cammarota G, Silveri NG, Gasbarrini G. HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology.* 2003;50:1149–1154.
107. Betterle C, Fabris P, Zanchetta R, et al. Autoimmunity against pancreatic islets and other tissues before and after interferon-alpha therapy in patients with hepatitis C virus chronic infection. *Diabetes Care.* 2000;23:1177–1181.
108. Sebeková K, Kupcová V, Schinzel R, Heidland A. Markedly elevated levels of plasma advanced glycation end products in patients with liver cirrhosis—amelioration by liver transplantation. *J Hepatol.* 2002;36:66–71.
109. Vlassara H, Uribarri J. Advanced glycation end products (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr Diab Rep.* 2014;14:453.
110. Moreau R, Lee SS, Soupison T, Roche-Sicot J, Sicot C. Abnormal tissue oxygenation in patients with cirrhosis and liver failure. *J Hepatol.* 1988;7:98–105.
111. Nath B, Szabo G. Hypoxia and hypoxia inducible factors: diverse roles in liver diseases. *Hepatology.* 2012;55:622–633.
112. Cheng K, Ho K, Stokes R, et al. Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulates beta cell function in mouse and human islets. *J Clin Invest.* 2010;120:2171–2183.
113. Yi P, Park JS, Melton DA. Betatrophin: a hormone that controls pancreatic  $\beta$  cell proliferation. *Cell.* 2013;153:747–758.
114. Arias-Loste MT, García-Unzueta MT, Llerena S, et al. Plasma betatrophin levels in patients with liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2015;21:10662–10668.
115. Hu H, Sun W, Yu S, et al. Increased circulating levels of betatrophin in newly diagnosed type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2014;37:2718–2722.
116. 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.
117. Moreau R, Deleuge P, Pessione F, et al. Clinical characteristics and outcome of patients with cirrhosis and refractory ascites. *Liver Int.* 2004;24:457–464.
118. Berman K, Tandra S, Forssell K, et al. Incidence and predictors of 30-day readmission among patients hospitalized for advanced liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011;9:254–259.
119. Elkrief L, Chouinard P, Bendersky N, et al. Diabetes mellitus is an independent prognostic factor for major liver-related outcomes in patients with cirrhosis and chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2014;60:823–831.
120. Sangiovanni A, Prati GM, Fasani P, et al. The natural history of compensated cirrhosis due to hepatitis C virus: a 17-year cohort study of 214 patients. *Hepatology.* 2006;43:1303–1310.
121. Quintana JOJ, García-Compeán D, González JA, et al. The impact of diabetes mellitus in mortality of patients with compensated liver cirrhosis—a prospective study. *Ann Hepatol.* 2011;10:56–62.
122. 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;22:756–761.
123. García-Compeán D, Jáquez-Quintana JO, Lavallo-González FJ, et al. Subclinical abnormal glucose tolerance is a predictor of death in liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014;20:7011–7018.
124. Sigal SH, Stanca CM, Kontorinis N, Bodian C, Ryan E. Diabetes mellitus is associated with hepatic encephalopathy in patients with HCV cirrhosis. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1490–1496.
125. Kalaitzakis E, Olsson R, Henfridsson P, et al. Malnutrition and diabetes mellitus are related to hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis. *Liver Int.* 2007;27:1194–1201.
126. Jepsen P, Watson H, Andersen PK, Vilstrup H. Diabetes as a risk factor for hepatic encephalopathy in cirrhosis patients. *J Hepatol.* 2015;63:1133–1138.
127. Elkrief L, Rautou PE, Sarin S, Valla D, Paradis V, Moreau R. Diabetes mellitus in patients with cirrhosis: clinical implications and management. *Liver Int.* 2016;36:936–948.
128. El-Serag HB, Everhart JE. Diabetes increases the risk of acute hepatic failure. *Gastroenterology.* 2002;122:1822–1828.
129. Qi X, Peng Y, Li H, Dai J, Guo X. Diabetes is associated with an increased risk of in-hospital mortality in liver cirrhosis with acute upper gastrointestinal bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2015;27:476–477.
130. Wlazlo N, van Greevenbroek MM, Curvers J, et al. Diabetes mellitus at the time of diagnosis of cirrhosis is associated with higher incidence of spontaneous bacterial peritonitis, but not with increased mortality. *Clin Sci (Lond).* 2013;125:341–348.
131. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;126:460–468.
132. Davila JA, Morgan RO, Shaib Y, McGlynn KA, El-Serag HB. Diabetes increases the risk of hepatocellular carcinoma in the United States: a population based case control study. *Gut.* 2005;54:533–539.
133. Veldt BJ, Chen W, Heathcote EJ, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C cirrhosis and diabetes mellitus. *Hepatology.* 2008;47:1856–1862.
134. Wang C, Wang X, Gong G, et al. Increased risk of hepatocellular carcinoma in patients with diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Int J Cancer.* 2012;130:1639–1648.
135. Durand F, Valla D. Assessment of the prognosis of cirrhosis: childPugh versus MELD. *J Hepatol.* 2005;42(Suppl.):S100–S107.
136. Adam R, Karam V, Delvart V, O’Grady J, Mirza D, Klempnauer J, et al. Evolution of indications and results of liver transplantation in Europe. A report from the European Liver Transplant Registry (ELTR). *J Hepatol.* 2012;57:675–88.
137. Stepanova M, Wai H, Saab S, Mishra A, Venkatesan C, Younossi ZM. The outcomes of adult liver transplants in the United States from 1987 to 2013. *Liver Int.* 2015;35:2036–41.
138. Lv C, Zhang Y, Chen X, Huang X, Xue M, Sun Q et al. New-onset diabetes after liver transplantation and its impact on complications and patient survival. *J Diabetes.* 2015;7:881–90.
139. Sharif A, Hecking M, de Vries AP, Porrini E, Hornum M, Rasoul-Rockenschaub S, et al. Proceedings from an international consensus meeting on posttransplantation diabetes mellitus: recommendations and future directions. *Am J Transplant.* 2014;14:1992–2000.

140. World Health Organization. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: Report of a WHO/IDF consultation, 2006. [http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes\\_new.pdf](http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf). Accessed 31 Oct 2017.
141. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* 2015;38:140-9.
142. Honda M, Asonuma K, Hayashida S, Suda H, Ohya Y, Lee K-J, et al. Incidence and risk factors for new onset diabetes in living-donor liver transplant recipients. *Clin Transplant*. 2013;27:426.
143. Hartog H, May CJ, Corbett C, Phillips A, Tomlinson JW, Mergental H, et al. Early occurrence of new onset diabetes after transplantation is related to type of liver graft and warm ischaemic injury. *Liver Int.* 015;35:1739-47.
144. 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.
145. Soule JL, Olyaei AJ, Boslaugh TA, Busch AM, Schwartz JM, Morehouse SH, et al. Hepatitis C infection increases the risk of new-onset diabetes after transplantation in liver allograft recipients. *Am J Surg.* 2005;189:552-7.
146. The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003;26:3160-7.
147. Yadav AD, Chang YH, Aqel BA, Byrne TJ, Chakkeran HA, Douglas DD, et al. New onset diabetes mellitus in living donor versus deceased donor liver transplant recipients: analysis of the UNOS/OPTN database. *J Transplant.* 2013;2013:269096.
148. Kuo HT, Sampaio MS, Ye X, Reddy P, Martin P, Bunnapradist S. Risk factors for new-onset diabetes mellitus in adult liver transplant recipients, an analysis of the organ procurement and transplant network/united network for organ sharing database. *Transplantation.* 2010;89:1134-40.
149. Yagi S, Kaido T, Iida T, Yoshizawa A, Okajima H, Uemoto S. New-onset diabetes mellitus after living donor liver transplantation: association with graft synthetic function. *Surg Today.* 2017;47:733-42.
150. Van Laecke S, Desideri F, Geerts A, Van Vlierberghe H, Berrevoet F, Rogiers X, et al. Hypomagnesemia and the risk of new-onset diabetes after liver transplantation. *Liver Transpl.* 2010;16:1278-87.
151. Ling Q, Xie H, Lu D, Wei X, Gao F, Zhou L, et al. Association between donor and recipient TCF7L2 gene polymorphisms and the risk of new-onset diabetes mellitus after liver transplantation in a Han Chinese population. *J Hepatol.* 2013;58:271-7.
152. Li Z, Sun F, Hu Z, Xiang J, Zhou J, Yan S, et al. Newonset diabetes mellitus in liver transplant recipients with hepatitis C: analysis of the national database. *Transplant Proc.* 2016;48:138-44.
153. Ling Q, Xu X, Xie H, Wang K, Xiang P, Zhuang R, et al. New-onset diabetes after liver transplantation: a national report from China liver transplant registry. *Liver Int.* 2016;36:705-12.
154. Li DW, Lu TF, Hua XW, Dai HJ, Cui XL, Zhang JJ, et al. Risk factors for new onset diabetes mellitus after liver transplantation: a meta-analysis. *World J Gastroenterol.* 2015;21:6329-40.
155. Cho Y, Lee MJ, Choe EY, Jung CH, Joo DJ, Kim MS, et al. Statin therapy is associated with the development of new-onset diabetes after transplantation in liver recipients with high fasting plasma glucose levels. *Liver Transpl.* 2014;20:557-63.
156. Saliba F, Lakehal M, Pageaux GP, Roche B, Vanlemmens C, Duvoux C et al. Risk factors for newonset diabetes mellitus following liver transplantation and impact of hepatitis C infection: an observational multicenter study. *Liver Transpl.* 2007;13:136-44.
157. Couto CA, Gelape CL, Doycheva IB, Kish JK, Martin P, Levy C. Ethnicity predicts metabolic syndrome after liver transplant. *Hepatol Int.* 2013;7:741-8.
158. Baid S, Cosimi AB, Farrell ML, Schoenfeld DA, Feng S, Chung RT, et al. 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.
159. Carey EJ, Aqel BA, Byrne TJ, Douglas DD, Rakela J, Vargas HE, et al. Pretransplant fasting glucose predicts new-onset diabetes after liver transplantation. *J Transplant.* 2012;2012:614781.
160. Vaughn VM, Cron DC, Terjimanian MN, Gala ZS, Wang SC, Su GL, et al. Analytic morphomics identifies predictors of new-onset diabetes after liver transplantation. *Clin Transplant.* 2015;29:458-64.
161. Parolin MB, Zaina FE, Araujo MV, Kupka E, Coelho JC. Prevalence of new-onset diabetes mellitus in Brazilian liver transplant recipients: association with HCV infection. *Transplant Proc.* 2004;36:2776-7.
162. Pirsch JD, Henning AK, First MR, Fitzsimmons W, Gaber AO, Reisfield R, et al. New-onset diabetes after transplantation: results from a double-blind early corticosteroid withdrawal trial. *Am J Transplant.* 2015;15:1982-90.
163. Xue M, Lv C, Chen X, Liang J, Zhao C, Zhang Y, et al. Donor liver steatosis: a risk factor for early new-onset diabetes after liver transplantation. *J Diabetes Investig.* 2017;8:181-7.
164. Ling Q, Xie H, Li J, Liu J, Cao J, Yang F, et al. Donor graft microRNAs: a newly identified player in the development of new-onset diabetes after liver transplantation. *Am J Transplant.* 2017;17:255-64.
165. Lonardo A, Ballestri S, Guaraldi G, Nascimbeni F, Romagnoli D, Zona S, et al. Fatty liver is associated with an increased risk of diabetes and cardiovascular disease: evidence from three different disease models: NAFLD HCV and HIV. *World J Gastroenterol.* 2016;22:9674-93.
166. Linder KE, Baker WL, Rochon C, May ST, Sheiner PA, Martin ST. Evaluation of posttransplantation diabetes mellitus after liver transplantation: assessment of insulin administration as a risk factor. *Ann Pharmacother.* 2016;50:369-75.
167. Pelaez-Jaramillo MJ, Cardenas-Mojica AA, Gaete PV, Mendivil CO. Post liver transplantation Diabetes Mellitus: a review of relevance and approach to treatment. *Diabetes Ther* 2018 Apr;9(2):521-543
168. E. Sulanc, J.T. Lane, S.E. Puumala, G.C. Groggel, L.E. Wrenshall, R.B. Stevens, New-onset diabetes after kidney transplantation: an application of 2003 International Guidelines, *Transplantation* 80 (2005) 945-952.
169. B.L. Kasiske, J.J. Snyder, D. Gilbertson, A.J. Maras, Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States, *Am. J. Transplant.* 3 (2003) 178-185.
170. J.T. Lane, S. Dagogo-Jack, Approach to the patient with New-Onset Diabetes after transplant (NODAT), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 (2011) 3289-3297.
- a. Sharif, K. Baboolal, Risk factors for new-onset diabetes after kidney transplant, *Nat. Rev. Nephrol.* 6 (2010) 415-423.
171. H.A. Ferris, C.R. Kahn, New mechanisms of glucocorticoid-induced insulin resistance: make no bones about it, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3854-3857.
172. M.F. Crutchlow, R.D. Bloom, Transplant-associated hyperglycemia: a new look at an old problem, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2 (2007) 343-355. [
173. S. Ullrich, S. Berchtold, F. Ranta, G. Seebohm, G. Henke, A. Lupescu, A.F. Mack, C.M. Chao, J. Su, R. Nitschke, D. Alexander, B. Friedrich, P. Wulff, D. Kuhl, F. Lang, Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 (SGK1) mediates glucocorticoid-induced inhibition of insulin secretion, *Diabetes* 54 (2005) 1090-1099.
174. L. Fransson, V. Rosengren, T.K. Saha, N. Grankvist, T. Islam, R.E. Honkanen, A. Sjöholm, H. Ortsäter, Mitogen-

- activated protein kinases and protein phosphatase 5 mediate glucocorticoid-induced cytotoxicity in pancreatic islets and  $\beta$ -cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 383 (2014) 126–136.
175. E.S. Colvin, H.Y. Ma, Y.C. Chen, A.M. Hernandez, P.T. Fueger, Glucocorticoid-induced suppression of  $\beta$ -cell proliferation is mediated by Mig6, *Endocrinology* 154 (2013) 1039–1046.
  176. J. Borel, F.C. Feurer, H.U. Gubler, H. Stahelin, Biological effects of cyclosporin A: a new antilymphocytic agent, *Agents Actions* 6 (1976) 468–475.
  177. M.H. Kaptureczak, H.U. Meier-Kriesche, B. Kaplan, Pharmacology of calcineurin antagonists, *Transplant. Proc.* 36 (2004) 25S–32S.
  178. L. Kung, T.D. Batiuk, S. Palomo-Pinon, J. Noujaim, L.M. Helms, P.F. Halloran, Tissue distribution of calcineurin and its sensitivity to inhibition by cyclosporine, *Am. J. Transplant.* 1 (2001) 325–333.
  179. S.A. Soleimanpour, M.F. Crutchlow, A.M. Ferrari, J.C. Raum, D.N. Groff, M.M. Rankin, C. Liu, D.D. De León, A. Naji, J.A. Kushner, D.A. Stoffers, Calcineurin signaling regulates human islet  $\beta$ -cell survival, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 40050–40059.
  180. I.C. Ho, J.H. Kim, J.W. Rooney, B.M. Spiegelman, L.H. Glimcher, A potential role for the nuclear factor of activated T cells family of transcriptional regulatory proteins in adipogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 15537–15541.
  181. U. Delling, J. Tureckova, H.W. Lim, L.J. De Windt, P. Rotwein, J.D. Molkentin, A calcineurin-NFATc3-dependent pathway regulates skeletal muscle differentiation and slow myosin heavy-chain expression, *Mol. Cell. Biol.* 20 (2000) 6600–6611.
  182. J.B. Redmond, L.K. Olson, M.B. Armstrong, M.J. Greene, R.P. Robertson, Effects of tacrolimus (FK506) on human insulin gene expression, insulin mRNA levels, and insulin secretion in HIT-T15 cells, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 2786–2793.
  183. M.J. Pereira, J. Palming, M. Rizell, M. Aureliano, E. Carvalho, M.K. Svensson, J.W. Eriksson, Cyclosporine A and tacrolimus reduce the amount of GLUT4 at the cell surface in human adipocytes: increased endocytosis as a potential mechanism for the diabetogenic effects of immunosuppressive agents, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99 (2014) E1885–E1894.
  184. M.F. Abdelmalek, A. Humar, F. Stickel, P. Andreone, A. Pascher, E. Barroso, G.W. Neff, D. Ranjan, L.T. Toselli, E.J. Gane, J. Scarola, R.G. Albers, E.S. Maller, C.M. Lo, Sirolimus Liver Conversion Trial Study Group. Sirolimus conversion regimen versus continued calcineurin inhibitors in liver allograft recipients: a randomized trial, *Am. J. Transplant.* 12 (2012) 694–705.
  185. M. Masetti, R. Montalti, G. Rompianesi, M. Codeluppi, R. Gerring, A. Romano, B. Begliomini, F. Di Benedetto, G.E. Gerunda, Early withdrawal of calcineurin inhibitors and everolimus monotherapy in de novo liver transplant recipients preserves renal function, *Am. J. Transplant.* 10 (2010) 2252–2262.
  186. García-Compeán D, González-González JA, Lavallo-González FJ, González-Moreno EI, Villarreal-Pérez JZ, Maldonado-Garza HJ. Hepatogenous diabetes: is it a neglected condition in chronic liver disease? *World J Gastroenterol* 2016;22:2869–2874.
  187. Kawaguchi T, Taniguchi E, Itou M, Sakata M, Sumie S, Sata M. Insulin resistance and chronic liver disease. *World J Hepatol* 2011;3:99–107.
  188. Pirlich M<sup>1</sup>, Schütz T, Spachos T, Ertl S, Weiss ML, Lochs H, Plauth M. Bioelectrical impedance analysis is a useful bedside technique to assess malnutrition in cirrhotic patients with and without ascites. *Hepatology*. 2000 Dec;32(6):1208–15.
  189. Cretti A, Lehtovirta M, Bonora E, Brunato B, Zenti MG, Tosi F, Caputo M, Caruso B, Groop LC, Muggeo M, Bonadonna RC. Assessment of  $\beta$ -cell function during the oral glucose tolerance test by a minimal model of insulin secretion. *Eur Clin Invest.* 2001; 31:405–416.
  190. <http://webmet.pd.cnr.it/ogis/>
  191. Bergman RN, Phillips LS, Cobelli C. Physiologic evaluation of factors controlling glucose tolerance in man: measurement of insulin sensitivity and  $\beta$ -cell glucose sensitivity from the response to intravenous glucose. *J Clin Invest* 1981;68:1456–1467.
  192. Kahn SE, Prigeon RL, McCulloch DK, Boyko EJ, Bergman RN, Schwartz MW, et al. Quantification of the relationship between insulin sensitivity and  $\beta$ -cell function in human subjects. Evidence for a hyperbolic function. *Diabetes* 1993;42:1663–1672.
  193. Weyer C, Bogardus C, Mott DM, Pratley RE. The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1999;104:787–794.
  194. 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(7):412–19.