

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

Dottorato di Ricerca in
“Scienza dell’Alimentazione e della Nutrizione”

-XXVI ciclo-

Coordinatore: Prof. Franco Contaldo



**ASSE ENTERO-INSULARE E METABOLISMO GLICO-
LIPIDICO NEL DIABETE DI TIPO 2 E NELL’OBESITÀ:
EFFETTI DELLA CHIRURGIA BARIATRICA E DI
DIVERSI INTERVENTI NUTRIZIONALI**

RELATORE

Ch.mo Prof. Gabriele Riccardi

CANDIDATO

Dott. Ettore Griffo

RIASSUNTO	pag.4
1.Introduzione	pag.10
1.1. Asse entero-insulare	pag.12
<i>1.1.a. GIP</i>	<i>pag.13</i>
<i>1.1.b. GLP-1</i>	<i>pag.15</i>
<i>1.1.c. Altri ormoni dell'asse entero-insulare</i>	<i>pag.18</i>
<i>1.1.d. Metabolismo glucidico</i>	<i>pag.21</i>
<i>1.1.e. Metabolismo lipidico</i>	<i>pag.23</i>
<i>1.1.f. Alterazioni dell'asse entero-insulare nel diabete di tipo 2 e nell'obesità</i>	<i>pag.24</i>
1.2. Nutrienti ed asse entero-insulare	pag.27
<i>1.2.a. Carboidrati, fibre e prebiotici</i>	<i>pag.28</i>
<i>1.2.b. Grassi</i>	<i>pag.31</i>
<i>1.2.c. Proteine</i>	<i>pag.37</i>
<i>1.2.d. Polifenoli</i>	<i>pag.38</i>
1.3. Chirurgia bariatrica	pag.44
<i>1.3.a. Tecniche chirurgiche</i>	<i>pag.44</i>
<i>1.3.b. Decremento ponderale</i>	<i>pag.49</i>
<i>1.3.c. Remissione del diabete</i>	<i>pag.49</i>
<i>1.3.d. Ruolo della chirurgia bariatrica nell'algoritmo terapeutico del paziente obeso con DM2</i>	<i>pag.51</i>

<i>1.3.e. Meccanismi di risoluzione del diabete tipo 2 dopo chirurgia bariatrica</i>	<i>pag.53</i>
<i>1.3.f. Impatto della chirurgia bariatrica sul metabolismo lipidico</i>	<i>pag.60</i>
2. Scopi	pag.63
3. Metodologie	pag.65
4. Studi	pag.67
<i>4.1.Effetti di acidi grassi n-3 e/o polifenoli sulla risposta lipidica ed entero-ormonale in soggetti ad alto rischio cardio-metabolico</i>	<i>pag.67</i>
<i>4.2.Valutazione degli ormoni gastrointestinali e dell'omeostasi glicemica due settimane ed un anno dopo chirurgia bariatrica in pazienti obesi con diabete di tipo 2: confronto tra Roux-en-Y bypass gastrico e Sleeve gastrectomy</i>	<i>pag.94</i>
<i>4.3.Effetti a breve e medio-lungo termine della chirurgia bariatrica sulla lipemia postprandiale e sugli ormoni gastrointestinali in pazienti obesi con diabete di tipo 2</i>	<i>pag.114</i>
5. Bibliografia .	pag.127
6. Appendice	pag.155

RIASSUNTO

Le evidenze scientifiche attribuiscono agli ormoni dell'asse entero-insulare (GLP-1 e GIP), molteplici azioni che vanno dalla regolazione dell'omeostasi glicemica e lipidica al controllo del senso di fame, dell'assunzione di cibo e, quindi, dell'introito energetico. Molte funzioni svolte dagli ormoni dell'asse entero-insulare si sono evidenziate solo dopo gli interventi di chirurgia bariatrica attuati per la terapia dell'obesità morbigena. Durante il triennio del corso di dottorato in "Scienza dell'Alimentazione e della Nutrizione" la mia attività di ricerca ha riguardato lo studio dell'asse entero-insulare dopo diversi interventi nutrizionali e dopo interventi di chirurgia bariatrica effettuati con differenti tecniche chirurgiche. A tal fine sono stati condotti tre studi:

Studio 1. Obiettivo: valutare gli effetti di acidi grassi n-3 e/o polifenoli sulla risposta lipidica ed entero-ormonale in soggetti ad alto rischio cardio-metabolico. **Materiali e metodi:** 78 soggetti, di età compresa tra i 35 e i 70 anni, sovrappeso/obesi, con circonferenza vita elevata ed almeno una delle componenti della sindrome metabolica, sono stati randomizzati a seguire per 8 settimane una tra le seguenti diete: (A) controllo, povera in polifenoli e acidi grassi n-3, (B) ricca in acidi grassi n-3, (C) ricca in polifenoli, (D) ricca in acidi grassi n-3 e polifenoli. Le diete erano isocaloriche e simili per contenuto in acidi grassi saturi,

monoinsaturi, colesterolo, carboidrati, fibre, proteine e vitamine. Prima e dopo le 8 settimane d'intervento, sono state determinate le concentrazioni di GLP-1, dei lipidi e dell'apo-lipoproteina B48 (apo-B48) nel plasma e nelle subfrazioni lipoproteiche ricche in trigliceridi (chilomicroni e VLDL grandi), sia a digiuno che dopo somministrazione di un pasto ricco in grassi che rifletteva la stessa composizione delle diete assegnate. **Risultati:** In fase acuta, la concentrazione postprandiale dei trigliceridi e del colesterolo dei chilomicroni dopo pasto test ricco in n-3 era significativamente maggiore rispetto al pasto controllo ($p < 0.05$). Non sono state osservate differenze significative nei livelli di lipidi postprandiali dopo la somministrazione degli altri pasti test. Per quanto riguarda la concentrazione del colesterolo, trigliceridi ed apo-B48 nelle VLDL grandi, non si sono osservate variazioni dopo ogni pasto test somministrato. Il GLP-1 mostrava una tendenza alla riduzione soltanto dopo pasto test ricco in PUFA n-3. Dopo 8 settimane la concentrazione postprandiale dei trigliceridi e del colesterolo nei chilomicroni, si riduceva dopo la dieta ricca in n-3, ma non in modo significativo. L'AUC (*area under the curve*) dei trigliceridi e del colesterolo delle VLDL grandi era diminuita significativamente solo dopo la dieta ricca in polifenoli ($p < 0.05$). L'AUC del GLP-1 si riduceva significativamente dopo dieta ricca in n-3 ($p < 0.001$). **Conclusioni.** Dallo studio si deduce che, in fase acuta, la risposta ad un pasto grasso ricco in n-3 determina

un aumento del contenuto di colesterolo e trigliceridi dei chilomicroni rispetto al pasto di controllo; questi effetti si modificano nel medio termine.

Studio 2. Obiettivo: Valutare la sensibilità, la secrezione insulinica e la risposta degli ormoni gastrointestinali in pazienti con DM2 e obesità sottoposti a bypass gastrico (BPG) o gastrectomia verticale (SG).

Materiali e Metodi. In 33 pazienti obesi con DM2 (14 sottoposti a BPG, 6M, età: 49 ± 7 anni; BMI 42 ± 6 Kg/m² ed HbA_{1C} 8.1 ± 2.2 %, M \pm DS e 19 sottoposti a SG, 8M; 44 ± 10 anni; BMI 46 ± 9 Kg/m² e HbA_{1C} 7.6 ± 2 %) sono state valutate sensibilità e secrezione insulinica e la risposta degli ormoni gastrointestinali (GIP, GLP-1 e grelina) ad un pasto misto liquido (305 kcal) prima, 2 settimane ed 1 anno dopo CB. **Risultati.** Ad 1 anno dall'intervento chirurgico si è osservato un decremento ponderale di 40 ± 15 kg dopo BPG e 39 ± 18 kg dopo SG. La remissione del diabete, valutata come glicemia a digiuno < 100 mg/dl ed HbA_{1C} < 6.5%, si verificava nel 64% dei pazienti dopo BPG e nel 68% dei pazienti dopo SG.

La sensibilità insulinica, espressa come indice OGIS (*Oral Glucose Insulin Sensitivity*) ed indice ISI (*Insulin Sensitivity Index*), aumentava in egual misura dopo i due interventi sia a 2 settimane che a 12 mesi, senza differenze tra le due procedure chirurgiche.

La secrezione insulinica precoce, espressa come AIR (*Acute Insulin Response*), aumentava significativamente in entrambi i gruppi ($p < 0.05$). Il picco di GLP-1 dopo pasto misto, pressoché assente nel preoperatorio, raddoppiava 1 anno dopo SG (GLP-1_{t30} da 4 ± 1 a 9 ± 7 pmol/l, $p < 0.05$) e incrementava di ~7 volte dopo BPG (da 7 ± 5 a 44 ± 18 pmol/l, $p < 0.001$); la secrezione del GIP (valutata come AUC) e il picco a 60 minuti si riducevano significativamente dopo entrambi gli interventi ($p < 0.05$). La secrezione di grelina si riduceva significativamente solo dopo SG ($p < 0.05$), mentre rimaneva invariata dopo BG. **Conclusioni.** Lo studio mostra che la secrezione e sensibilità insulinica migliorano della stessa entità con le due procedure chirurgiche (BPG e SG) mentre il profilo degli ormoni gastrointestinali presenta significative differenze. Il ripristino della risposta del GLP-1 e la riduzione dei livelli di GIP sembrano essere implicati nella remissione del DM2 dopo BPG mentre la soppressione della grelina e la riduzione dei livelli di GIP potrebbero contribuirvi dopo SG.

Studio 3. Obiettivi: Valutare gli effetti a breve e a medio-lungo termine della chirurgia bariatrica sul metabolismo lipidico a digiuno e postprandiale in soggetti con DM2 ed obesità e le possibili relazioni con le modifiche degli entero-ormoni. **Metodi:** Sono stati studiati 25 pazienti con DM2 ed obesità (età: 48 ± 8 anni, BMI: 44 ± 7 kg/m²) di cui 10 sottoposti a BPG e 15 sottoposti a SG. Poiché le variazioni di peso e dei

principali parametri metabolici sono risultate simili con i due interventi, l'analisi è stata effettuata sull'intero campione. Abbiamo valutato la risposta lipidica ed entero-ormonale ad un pasto misto liquido (305 kcal) somministrato prima, 2 settimane, 12 e 24 mesi dopo chirurgia bariatrica.

Risultati. Dopo 2 settimane, 12 e 24 mesi dall'intervento chirurgico si osservava una riduzione significativa del peso corporeo, glicemia e insulinemia a digiuno e dell'insulino-resistenza (HOMA-IR) ($p < 0.05$ per tutti). Durante il *follow-up* post-operatorio i lipidi a digiuno (colesterolo totale e trigliceridi) si riducevano significativamente ($p < 0.05$), mentre il colesterolo HDL, dopo una transitoria caduta a 2 settimane ($p < 0.05$), aumentava significativamente dopo 12 e 24 mesi. La risposta dei trigliceridi plasmatici, valutata come IAUC (*incremental area under the curve*), si riduceva del 64%, 52% e 61% rispettivamente dopo 2 settimane, 12 e 24 mesi dall'intervento bariatrico. La risposta del GLP-1 al pasto misto era significativamente aumentata durante il follow-up, rispetto ai valori pre-intervento ($p < 0.001$), mentre la risposta del GIP si riduceva progressivamente. Comunque non vi era alcuna relazione tra le variazioni degli entero-ormoni e della trigliceridemia postprandiale. La riduzione dei trigliceridi a digiuno correlava positivamente solo con la riduzione dell'insulino-resistenza ($p < 0.05$). **Conclusioni:** Lo studio suggerisce che la chirurgia bariatrica induce un miglioramento molto precoce del metabolismo lipidico sia a digiuno che post-prandiale, che

permane nel periodo di *follow-up*. La riduzione dei trigliceridi a digiuno è associata ad una riduzione della resistenza all'insulina mentre la riduzione della lipemia postprandiale è, probabilmente, correlata al ridotto assorbimento intestinale dei lipidi e potrebbe essere in relazione anche con l'aumento del GLP-1.

1.Introduzione

Le evidenze scientifiche attribuiscono agli ormoni dell'asse entero-insulare (GLP-1 e GIP), molteplici azioni che vanno dalla regolazione dell'omeostasi glicemica e lipidica al controllo del senso di fame, dell'assunzione di cibo e, quindi, dell'introito energetico.

La composizione bromatologica della dieta è in grado di influenzare la secrezione postprandiale del GLP-1. E' noto che i carboidrati e le fibre sono in grado di stimolare l'asse entero-insulare migliorando, di conseguenza, il metabolismo glucidico. Per gli altri nutrienti, come gli acidi grassi polinsaturi n-3 (PUFA n-3) e i polifenoli, invece, gli studi a riguardo sono scarsi e le informazioni circa la loro influenza sul metabolismo lipidico piuttosto inconsistenti. Inoltre, gli effetti combinati di PUFA n-3 e polifenoli sulla secrezione entero-ormonale non sono mai stati indagati. Pertanto, nel primo studio sono stati valutati gli effetti, acuti e a medio termine, di diete ad alto contenuto di PUFA n-3, polifenoli o la loro combinazione, sulla risposta lipidica postprandiale e sulla secrezione di GLP-1.

Gli interventi di chirurgia bariatrica, attuati per la terapia dell'obesità morbigena, si sono rivelati in grado di determinare profonde modifiche dell'asse entero-insulare. In particolare, il bypass gastrico (BPG) e la sleeve gastrectomy (SG) rappresentano le procedure bariatriche più

diffuse e di maggiore impatto in pazienti obesi con diabete di tipo 2 (DM2) sia in termini di perdita di peso che di miglioramento dell'omeostasi glicemica e lipidica. Il secondo studio, pertanto, ha avuto come obiettivo quello di valutare il ruolo svolto dagli entero-ormoni nel miglioramento del metabolismo glicidico. Nel terzo studio sono state esaminate le modifiche del metabolismo lipidico a digiuno e postprandiale, sia a breve che a lungo termine, indotte dagli interventi bariatrici.

1.1 Asse Enteroinsulare

Il termine “asse enteroinsulare” è stato introdotto per la prima volta da Unger e Eisentraut nel 1969 per descrivere il collegamento tra il tratto gastrointestinale, che svolge un ruolo centrale nel processo di digestione, assorbimento e assimilazione dei nutrienti, e le isole pancreatiche (1). Successivamente Creutzfeldt, dieci anni dopo, identificò nel tratto gastrointestinale una popolazione di cellule enteroendocrine, ovvero cellule epiteliali specializzate in grado di produrre ormoni che contribuiscono al controllo dell'omeostasi energetica, modulano la sazietà, la motilità intestinale e la funzionalità delle isole pancreatiche (1, 2). I principali ormoni gastrointestinali coinvolti nell'asse enteroinsulare sono il GLP-1 (*glucagon-like peptide-1*) e il GIP (*Gastric Inhibitory Polypeptide* o, più modernamente, *Glucose-mediated insulinotropic polipeptide*), denominati anche "incretine" dall'acronimo “*intestinal secretion of insulin hormones*” grazie all'effetto che essi determinano a livello delle isole pancreatiche. L'effetto incretinico descrive "il fenomeno mediante il quale un carico orale di glucosio è in grado di elicitare una risposta insulinica maggiore rispetto ad un carico di glucosio somministrato per via endovenosa, anche quando è infusa la stessa quantità di glucosio o è causato un equivalente aumento della glicemia per via parenterale". Il GLP-1 e il GIP sono peptidi responsabili del 50-60% della secrezione insulinica stimolata da nutrienti (3, 4).

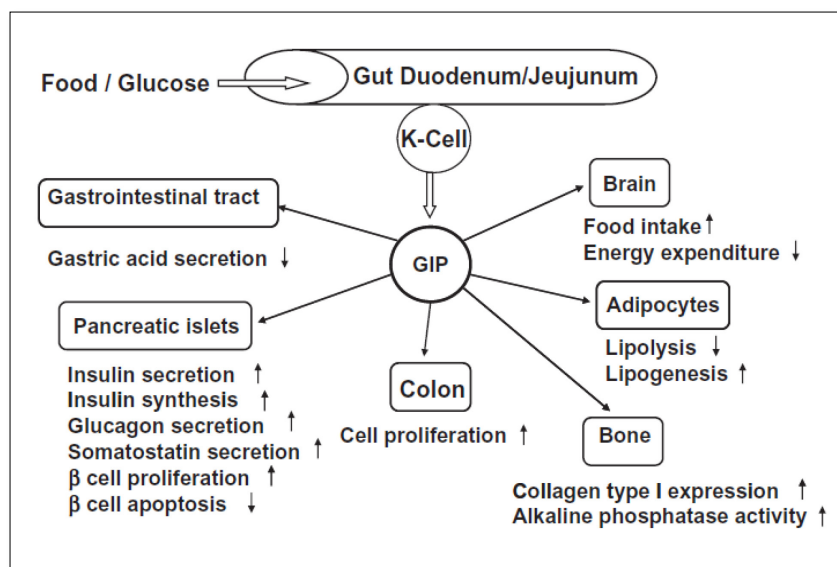
1.1.a. GIP

Il GIP è un polipeptide di 42 amminoacidi sintetizzato e secreto dalle cellule K situate principalmente a livello del duodeno e delle anse prossimali del digiuno (5). Il GIP viene rilasciato in risposta all'ingestione di nutrienti, come glucosio e acidi grassi (6, 7), in particolare, gli acidi grassi rappresentano il più potente stimolatore della secrezione di GIP nell'uomo (8). La risposta postprandiale di GIP è direttamente proporzionale alle calorie del pasto e alla velocità con cui i nutrienti arrivano all'intestino. Più specificamente, è la capacità di assorbimento dei nutrienti piuttosto che la semplice presenza dei nutrienti nell'intestino a stimolare il rilascio di GIP (9). La somministrazione di glucosio, oralmente o per via intraduodenale, determina un rapido rilascio di GIP che raggiunge il picco massimo dopo 15-30 minuti per poi ritornare ai valori basali, dopo circa 3 ore. La risposta del GIP ad un pasto grasso, invece, è più lenta e più prolungata rispetto a quella determinata dal glucosio, a causa del ritardato svuotamento gastrico (8). Il GIP, secreto nell'immediato periodo postprandiale, ha un'emivita piuttosto breve (circa 7 minuti) perché rapidamente inattivato dall'enzima dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-IV), un'amminopeptidasi prodotta dalle cellule intestinali e dalle cellule endoteliali che rimuove dal polipeptide i due amminoacidi all'estremità N-terminale, generando la forma inattiva del GIP 3-42. Il GIP esplica la

sua azione biologica attraverso i recettori accoppiati alle proteine G con conseguente aumento della concentrazione citosolica di cAMP. I recettori del GIP sono espressi in diversi tessuti come stomaco, pancreas, tessuto adiposo, osso e cervello dove esplica la sua azione biologica: 1) provoca un aumento postprandiale di glucagone; 2) previene l'apoptosi e stimola la proliferazione delle beta cellule; 3) promuove l'assorbimento del glucosio nel piccolo intestino aumentando il numero di recettori GLUT1; 4) stimola la conversione del glucosio in acidi grassi e la deposizione di grasso nel tessuto adiposo; 5) promuove l'attività della lipoprotein-lipasi (LPL); 6) previene il riassorbimento e aumenta la formazione dell'osso; 7) aumenta l'introito calorico e riduce la spesa energetica; 8) riduce la secrezione acida gastrica (Figura 1) (10-12).

Figura 1. Azioni del GIP in differenti tessuti ed organi

(da Paschetta E. et al. - Obesity review 2011)

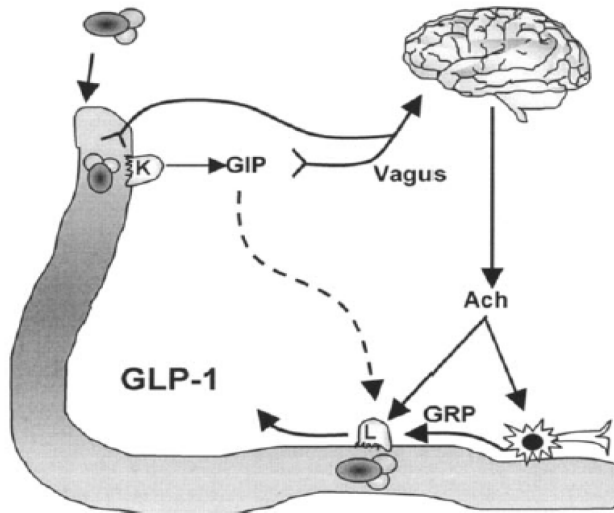


1.1.b. GLP-1

Il GLP-1 è prodotto principalmente dalle cellule L del tratto distale del piccolo intestino e del colon. Le cellule L sono cellule endocrine dell'epitelio intestinale, di tipo-aperto, che contattano direttamente i nutrienti del lume intestinale attraverso la propria superficie apicale ed i tessuti vascolari e neurali attraverso la propria superficie basolaterale. Il principale stimolo alla secrezione del GLP-1 è rappresentato dal pasto. Nell'uomo, il GLP-1 è rilasciato rapidamente in circolo dopo l'ingestione di un pasto misto ricco in grassi o in carboidrati (13) o di singoli nutrienti, quali glucosio o altri zuccheri, acidi grassi, aminoacidi essenziali e fibre (14). La sua secrezione segue un pattern bifasico, con una fase più precoce (entro 10-20 minuti) seguita da una seconda fase più tardiva (dopo 60-120 minuti). Poiché la gran parte delle cellule L sono localizzate nel tratto distale del piccolo intestino è improbabile che la fase precoce di secrezione del GLP-1 possa essere mediata dal contatto diretto dei nutrienti con le cellule L. Infatti, diversi studi hanno dimostrato che il passaggio del chimo nel duodeno stimola le cellule K, GIP-secretrici, a produrre GIP, con la successiva liberazione di neurotrasmettitori, GRP ed acetilcolina, e quindi di GLP-1 (Figura 2) (15). I neuroni del nucleo del tratto solitario, sito nel tronco encefalico, sintetizzano anch'essi GLP-1: questi inviano le proprie afferenze al

nucleo arcuato e ai nuclei paraventricolare e dorso-mediale, tutti siti nell'ipotalamo, e coinvolti nel controllo della fame (16).

Figura 2. *Fattori coinvolti nella secrezione di GLP-1 dopo un pasto*
(da Lim GE et al. – Diabetes 2006)

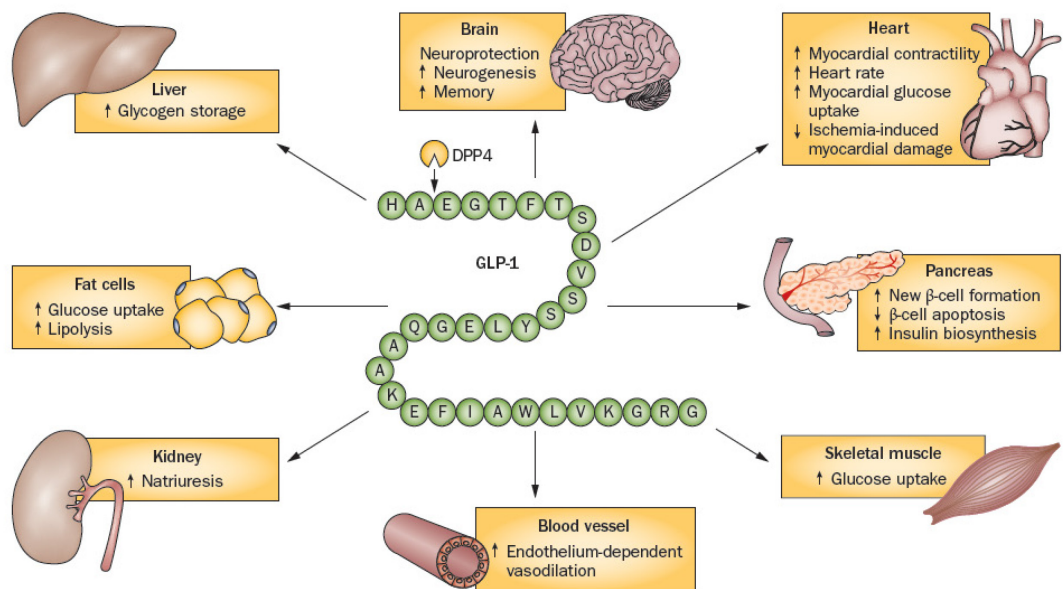


Il GLP-1 rilasciato dalle cellule L, ha una emivita estremamente breve (da 2 a 5 minuti) in quanto anch'esso come il GIP è substrato dell'enzima DPP-IV che lo degrada nelle forme inattive: GLP-1 9-37 e GLP-1 9-36 amide. Le isoforme attive, in grado di interagire coi recettori a 7 segmenti transmembrana associati alle proteine G, sono il GLP-1 7-36 amide e il GLP-1 7-37 presenti in circolo rispettivamente per il 75% e 25%. Il GLP-1, interagendo con i recettori, è responsabile delle seguenti azioni biologiche: stimolazione della secrezione insulinica in maniera glucosio-dipendente e soppressione della secrezione del glucagone attraverso un effetto diretto sulle cellule α ed in parte attraverso la

stimolazione della secrezione di somatostatina; azione a livello ipotalamico, aumentando il senso di sazietà; a livello gastrico, riducendo la secrezione acida e determinando un rallentamento dello svuotamento gastrico; a livello del muscolo, fegato e tessuto adiposo, aumentando la captazione di glucosio e la glicogenosintesi (Figura 3) (4).

Figura 3. Azioni pleiotropiche del GLP-1 su vari tessuti ed organi.

(da Meier JJ – Nature Reviews Endocrinology 2012)

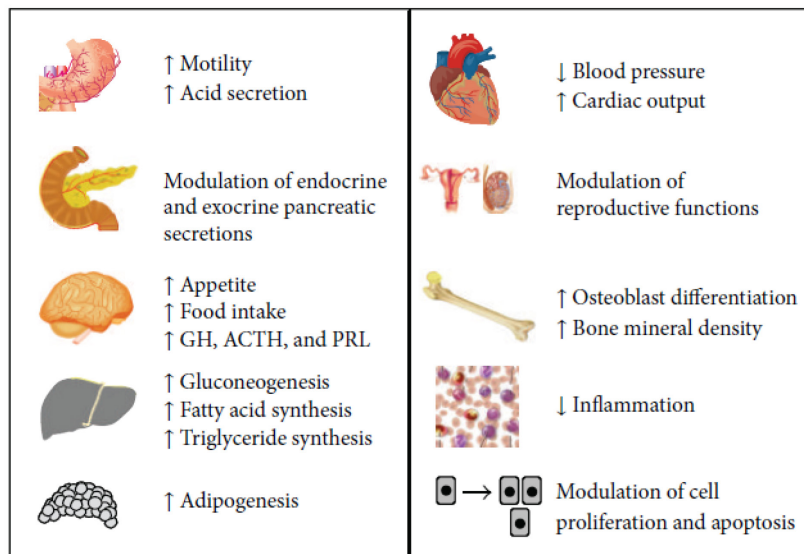


1.1.c. Altri ormoni associati all'asse entero-insulare

Grelina. La grelina è un peptide oressigeno di 28 aminoacidi prodotto prevalentemente dalle cellule epiteliali X/A-like del fondo gastrico e in misura minore dall'ipofisi, dall'ipotalamo e dal rene. La grelina circolante si trova in forma acilata per il 10%, e in forma desacilata per il 90%, tuttavia solo la forma acilata è in grado di interagire con i recettori ed attivare la via dell'inositolo trifosfato. I recettori per la grelina, scoperti già prima dell'ormone stesso, sono prevalentemente espressi sulle cellule ipofisarie GH-secernenti, sulle cellule ipotalamiche e nel tessuto adiposo. La principale azione di tale ormone consiste nella stimolazione ipofisaria della secrezione di GH, tuttavia svolge anche un'importante regolazione del bilancio energetico poiché è in grado di aumentare il senso di fame e l'assunzione di cibo attraverso un'azione diretta sui centri ipotalamici. A livello del tessuto adiposo svolge un'azione opposta a quella del GH, sopprimendo l'utilizzazione dei grassi. A livello gastrico ne stimola la motilità e la secrezione, a livello pancreatico inibisce la secrezione insulinica, peggiorando l'insulino-sensibilità (Figura 4). I livelli di grelina in circolo aumentano in condizioni di digiuno e diminuiscono in seguito all'ingestione di nutrienti (17).

Figura 4. *Principali funzioni fisiologiche della grelina*

(da Delporte C.- Scientifica 2013)



PYY. Il Peptide YY (PYY) è un peptide di 36 aminoacidi sintetizzato e rilasciato in circolo dalle cellule L enteroendocrine ed è presente in circolo in due forme PYY 1-36 e PYY 3-36. È importante sottolineare che la forma biologicamente attiva, in grado di interagire con i recettori Y2R, è il PYY 3–36. I livelli circolanti di PYY aumentano rapidamente in risposta all'ingestione di sostanze nutritive e il loro aumento dipende dalla densità calorica del pasto e dalla composizione dei nutrienti (18). L'iniziale aumento postprandiale del PYY circolante avviene entro 15 minuti dall'assunzione del cibo, prima che i nutrienti hanno raggiunto le cellule L, implicando l'esistenza di un meccanismo neurale, come per il GLP-1, in questo processo di rilascio (19). In genere, si verifica un picco di PYY dopo 1-2 h dall'assunzione del pasto, seguita da una fase di

plateau dopo diverse ore. Le sue principali azioni biologiche sono quelle di inibire la motilità gastrica, aumentare l'assorbimento di acqua ed elettroliti nel colon, sopprimere la secrezione pancreatica e rallentare lo svuotamento gastrico (18).

Colecistochinina. La colecistochinina (CCK) è un peptide intestinale liberato dalle cellule I endocrine in risposta all'ingestione di sostanze nutritive. Il ruolo fisiologico più importante della CCK è la regolazione del bilancio energetico attraverso la stimolazione della sazietà a breve termine. Questo effetto è mediato attraverso il legame con i recettori presenti sui neuroni afferenti vagali che comporta l'attivazione delle vie coinvolte nella regolazione energetica (20) . Inoltre, la CCK si è rivelata anche in grado di stimolare la secrezione di insulina, di agire come fattore di crescita delle cellule beta pancreatiche e come fattore anti-apoptotico (21). In questo senso la CCK possiede un profilo d'azione biologica che suggerirebbe la sua applicabilità terapeutica per l'obesità e diabete.

1.1.d. Metabolismo glicidico

La capacità degli ormoni entero-insulari di regolare l'omeostasi glicemica è ben documentata.

Numerosi sono gli studi che hanno dimostrato il ruolo fisiologico del GLP-1 nell'omeostasi del glucosio attraverso la sua azione insulintropica: la somministrazione esogena di GLP-1 o del suo agonista è in grado di normalizzare l'iperglicemia a digiuno e ridurre le escursioni glicemiche postprandiali sia in soggetti che in ratti diabetici. Anche gli studi che hanno utilizzato l'antagonista del recettore del GLP-1 hanno dimostrato il suo ruolo nell'omeostasi glicemica, infatti la somministrazione dell'exendina (9–39) aumenta la glicemia a digiuno e postprandiale e riduce i livelli di insulina in circolo sia nel modello animale che nell'uomo (22, 23). L'exendina (9–39) aumenta anche i livelli plasmatici di glucagone e ciò dimostra indirettamente la capacità del GLP-1 endogeno di inibire la secrezione di glucagone (24). L'azione del GLP-1 sull'omeostasi glicemica non è dovuta soltanto alla sua capacità di stimolare la secrezione dell'insulina ma, come dimostrato da numerosi studi nell'uomo, anche alla sua capacità di modulare la motilità gastrica, lo svuotamento gastrico, la produzione epatica di glucosio e la sazietà. Sebbene i meccanismi attraverso i quali il GLP-1 regola in vivo questi processi sono ancora da chiarire, sembra che alcuni, come lo

svuotamento gastrico e sazietà, siano mediati da un percorso neurale-viscerale.

L'importanza del GIP nell'omeostasi del glucosio è stata analizzata utilizzando peptidi antagonisti di GIP o sieri immunizzanti diretti contro il recettore del GIP in topi e conigli. Questi esperimenti hanno dimostrato che anche il GIP svolge un ruolo predominante nella regolazione della clearance postprandiale del glucosio. Contrariamente a quanto affermato da studi condotti sul GLP-1, il GIP endogeno non sembra essere importante nel controllo dell'omeostasi glicemica a digiuno (23, 25, 26).

Numerosi studi supportano un ruolo della grelina nell'omeostasi del glucosio (27, 28). È stata descritta una relazione inversa tra i livelli di grelina nel sangue e livelli di insulina suggerendo l'esistenza di un meccanismo di feedback negativo tra grelina e insulina (29, 30). I meccanismi coinvolti nell'effetto inibitorio della grelina sulla secrezione insulinica indotta da glucosio includono un aumento dell'espressione dell'IA-2 β (insulinoma-associated protein) e l'attivazione della proteina disaccoppiante UCP2 attraverso la via dell'AMPK (31). La grelina stimola inoltre la glicogenolisi epatica e la neoglucogenesi ed è coinvolta, pertanto, nell'aumento delle concentrazioni di glucosio (27).

1.1.e. Metabolismo lipidico

Recentemente, oltre alla ben nota azione degli ormoni entero-insulari sull'omeostasi glicemica, l'attenzione si è spostata sulla loro capacità di influenzare il metabolismo lipidico. Numerose sono le evidenze che hanno dimostrato l'azione degli entero-ormoni sulla regolazione della lipogenesi, della lipolisi e sul rilascio in circolo degli acidi grassi liberi. Qin e colleghi hanno mostrato come l'infusione di GLP-1 ricombinante nella vena giugulare di ratti riduca l'assorbimento intestinale dei trigliceridi (32). Essi hanno inoltre osservato una ridotta produzione di apo B-48 e apo A-IV, due importanti elementi strutturali dei chilomicroni. In un altro studio, Meier et colleghi (33) hanno dimostrato come nell'uomo, l'infusione per via endovenosa di GLP-1 riduca la normale risposta postprandiale dei trigliceridi. Allo stesso modo, in soggetti con DM2, trattati per 4 settimane con un inibitore del DPP-IV, si osservava una marcata riduzione dei trigliceridi postprandiali e della concentrazione di apo B-48 (34). Gli studi di Hsieh su modello animale hanno dimostrato come in topi trattati con un agonista del recettore del GLP-1 (exendin-4), si osservava una riduzione dei trigliceridi e dell'apo B-48, cosa che non era osservata quando i topi erano trattati con l'antagonista del recettore del GLP-1 (exendin 9-39) o quando erano studiati topi knockout per il recettore del GLP-1. Anche in enterociti isolati da criceti la secrezione di apo B-48 era inibita dopo trattamento

con exendin-4 (35). Questi studi, nel complesso, evidenziano come la somministrazione di GLP-1 o l'inibizione della sua degradazione determinano una marcata riduzione dell'assorbimento lipidico, verosimilmente, attraverso la ridotta sintesi di chilomicroni. Anche il GIP svolge un ruolo cruciale nel metabolismo lipidico postprandiale. Diversi studi hanno dimostrato una modesta risposta dei chilomicroni postprandiali dopo somministrazione di GIP nei cani (36) e un'attenuazione della risposta dei trigliceridi plasmatici nei ratti dopo somministrazione di grasso per via intraduodenale (37). Rimane ancora da chiarire se queste azioni dipendano dalla concomitante stimolazione dell'insulina determinata dal GIP.

1.1.f. Alterazioni dell'asse entero-insulare nel diabete mellito tipo 2 e nell'obesità

Recenti dati sperimentali suggeriscono che, oltre ai ben noti difetti della funzione beta-cellulare e della sensibilità insulinica, anche la riduzione dell'effetto incretinico, per difetto della secrezione o dell'azione degli ormoni gastrointestinali, contribuisce alla patogenesi del diabete tipo 2 (38). E' ben noto che una delle prime alterazioni che si determinano nel diabete è la perdita del picco precoce di secrezione insulinica in risposta al pasto, con conseguente aumento della glicemia post-prandiale. In pazienti con diabete tipo 2, l'effetto incretinico risulta diminuito e la secrezione di GLP-1 dopo l'assunzione di un pasto è ridotta rispetto ai

soggetti di controllo (39). Il ridotto effetto incretinico sembrerebbe dovuto soprattutto alla marcata riduzione della secrezione del GLP-1 mentre la capacità insulintropica dell'ormone non risulta alterata. Al contrario, i livelli del GIP (sia a digiuno che post-prandiali) sono normali o addirittura aumentati rispetto ai soggetti sani suggerendo la presenza di una condizione di GIP-resistenza, causata o da una *down-regulation* dell'espressione dei recettori per il GIP o da una desensibilizzazione del recettore all'azione del GIP. Una riduzione dei livelli di GLP-1, ma non di GIP, in risposta al carico di glucosio è stata osservata anche in soggetti con alterata tolleranza al glucosio (*impaired glucose tolerance, IGT*) (40) ed in soggetti obesi non diabetici (41). Le alterazioni dell'asse entero-insulare documentate nel diabete tipo 2 sembrerebbero non essere primitive, bensì secondarie all'effetto tossico dell'iperglicemia a livello delle cellule intestinali, in linea con il noto fenomeno della "glucotossicità". Infatti sia familiari di 1° grado di soggetti diabetici di tipo 2 (42), sia donne con precedente diabete gestazionale (43) hanno livelli plasmatici di GLP-1 simili a soggetti di controllo. Mentre l'infusione di GIP esogeno, anche ad alte dosi, non modifica la secrezione insulinica (44), la somministrazione di GLP-1 esogeno è in grado di ridurre la glicemia (45). Alla luce di queste osservazioni è stato ipotizzato un ruolo terapeutico del ripristino dei livelli di GLP-1 con l'obiettivo di favorire il calo ponderale e migliorare la funzione

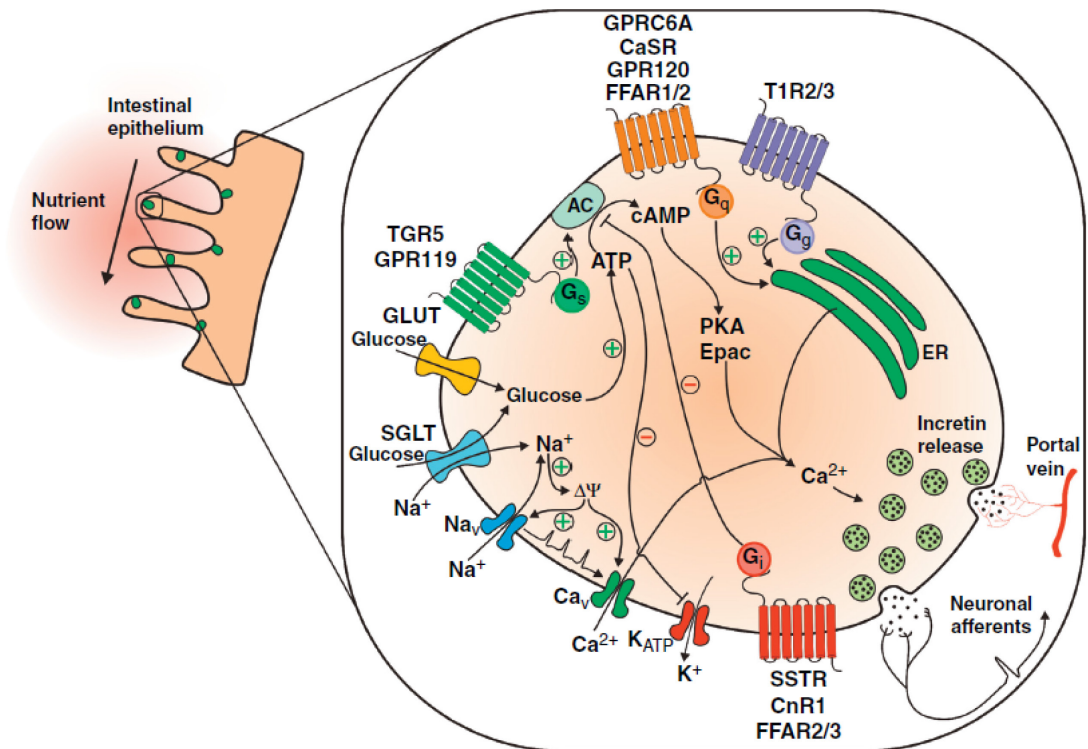
pancreatica attraverso l'aumento della secrezione insulinica e la riduzione dei livelli di glucagone. Negli ultimi anni infatti è stata introdotta nella pratica clinica una nuova classe di agenti ipoglicemizzanti detti incretino-mimetici (analoghi del GLP-1 ed inibitori del DPP-4) che si configurano come una vera e propria "terapia ormonale sostitutiva" con il fine di ripristinare i fisiologici livelli ormonali presenti nei soggetti normali. Tali molecole sono risultate efficaci nel migliorare il compenso glicemico e nell'indurre un modesto calo ponderale nei pazienti con diabete tipo 2 (46). In ultimo, interessante è l'osservazione che la trascrizione del gene che codifica per il GLP-1 è regolata da un fattore di trascrizione (*Transcription factor 7-like 2*, TCF7L2) le cui varianti geniche sono risultate associate a diabete di tipo 2 (47): è stato quindi ipotizzato che il GLP-1 possa essere il mediatore funzionale dell'azione del TCF7L2 ed è stata documentata una riduzione del 20% dell'effetto incretinico nei portatori di queste varianti associate ad un elevato rischio di IGT o diabete di tipo 2 (48). Ulteriori studi saranno necessari per confermare tali correlazioni tra le diverse varianti geniche e i livelli circolanti delle incretine o l'efficacia della somministrazione dei farmaci incretino-mimetici.

1.2. Nutrienti ed asse entero-insulare

Esistono numerose evidenze scientifiche che dimostrano come la composizione della dieta può influenzare direttamente la risposta degli entero-ormoni (Figura 5) (49). Se si dimostra che uno specifico nutriente è in grado di stimolare significativamente la secrezione degli entero-ormoni, si potrebbe sfruttare questa caratteristica per sviluppare nuovi approcci nutrizionali in grado di migliorare il metabolismo postprandiale del glucosio (50).

Figura 5. *Nutrienti e secrezione di GLP-1.*

(da Ezcurra M et al. – *Current Opinion in Pharmacology* 2013)



1.2.a. Carboidrati, fibre e prebiotici

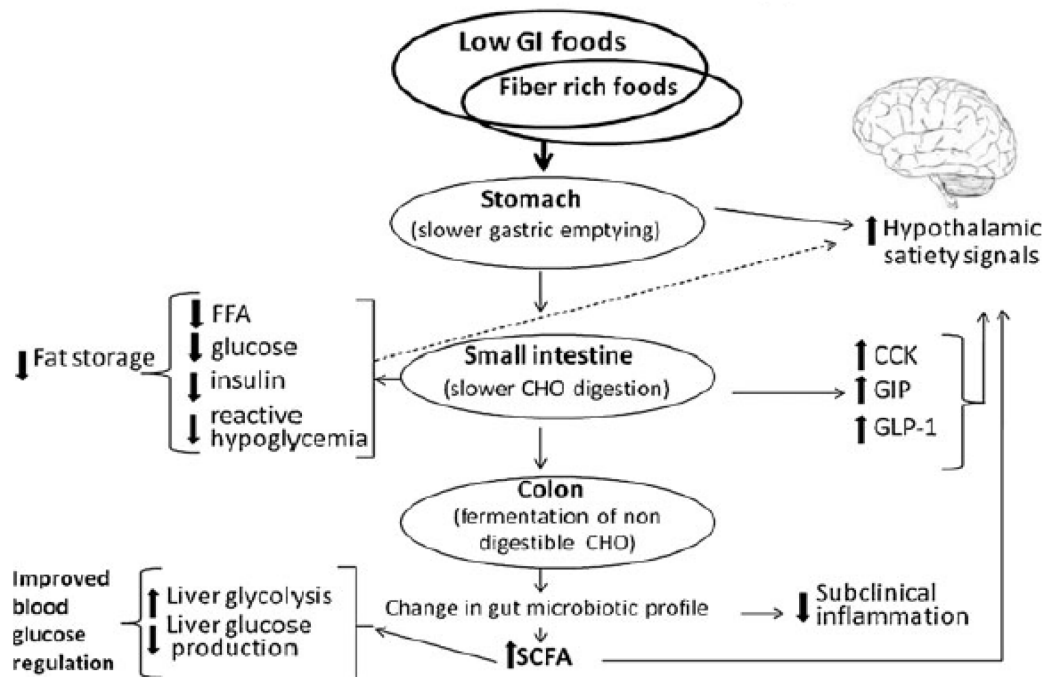
Il glucosio è il principale stimolatore della secrezione incretinica. Alle cellule L e K il glucosio arriva sia attraverso la membrana basolaterale per opera del trasportatore di glucosio GLUT2, sia dalla parte apicale perché facilitato dal recettore specifico (GPCR) e dal trasportatore sodio-glucosio (SGLT1). Attraverso la membrana basolaterale il glucosio entra, ma esce anche dalla cellula, per rispondere alle richieste di glucosio nel sangue. Su una linea cellulare L di intestino di topo è stato dimostrato che la secrezione di GLP-1 è stimolata dal glucosio attraverso la produzione di ATP e chiusura dei canali K-ATP dipendenti. In condizioni di digiuno o di *clamp* euglicemico, quando i livelli di glucosio sono bassi, il rapporto ATP/ADP è basso, si attiva la PKA con l'apertura dei canali K-ATP dipendenti, con il risultato di una ridotta secrezione insulinica. In fase postprandiale, quando i livelli di glucosio sono alti, la concentrazione di ADP è ridotta per aumento di ATP, ed i canali K-ATP dipendenti si chiudono, determinando una depolarizzazione della membrana cellulare che favorisce la secrezione di questi ormoni (51-54). I carboidrati non digeribili e quelli fermentabili che danno luogo ad acidi grassi a catena corta, SCFA, hanno dimostrato di aumentare la secrezione di GLP-1. In una recente revisione sono stati esaminati gli effetti della assunzione di inulina ed oligofruttosio sulla produzione incretinica ed è stato evidenziato come l'oligofruttosio nella

dieta di ratti aumentasse le concentrazioni di GLP-1 attraverso un meccanismo dipendente dalla produzione di SCFAs, prodotti dalla fermentazione di oligofruttosio nel tessuto intestinale (55). In contrasto, Parnell e colleghi non hanno osservato alcun aumento della secrezione di GLP-1 in uomini sovrappeso/obesi che avevano ricevuto 21 g/d di oligofruttosio per 12 settimane (56). La discrepanza tra la stimolazione del GLP-1 nell'uomo e nel modello animale potrebbe dipendere dalla minore dose di oligofruttosio utilizzata. Nello studio *Health Grain* in cui sono stati valutati, in soggetti con sindrome metabolica, gli effetti a medio termine di una dieta ricca in cereali integrali rispetto ad una dieta con cereali raffinati, si osservava un miglioramento dei livelli di insulina e di trigliceridi in fase postprandiale nel gruppo *whole-grain* senza modifiche della secrezione di GLP-1, rispetto al gruppo di controllo, sottolineando l'importanza di altri meccanismi, come le modifiche della flora batterica intestinale sul miglioramento dei fattori di rischio CV (Figura 6) (57). Uno studio randomizzato, in doppio cieco eseguito in 10 soggetti sani che consumavano 16 g/d di prebiotici per 2 settimane confrontati con l'assunzione di 16 g/d di maltodestrine ha dimostrato un aumento della concentrazione di GLP-1 e PYY, indicando che i prebiotici potrebbero essere un utile strumento per la terapia nutrizionale del diabete grazie ai loro effetti benefici sul *food intake* e sull'omeostasi del glucosio (58). Adam e colleghi hanno condotto uno studio *cross-over*

randomizzato registrando un aumento della concentrazione di GLP-1 del 57% dopo aggiunta di 50 g di galattosio e 2,5 g di gomma di guar alla prima colazione in soggetti normopeso (59). Dunque i prebiotici e le diete ad alto contenuto di fibre, favorendo il rilascio di GLP-1 potrebbero avere un impatto positivo sul rischio di malattie CV e sul rischio di sviluppare diabete di tipo 2. Gli acidi grassi SCFA, prodotti dalla fermentazione dei carboidrati non digeribili, potrebbero svolgere un'azione favorevole non solo per le modifiche della flora batterica intestinale, ma soprattutto come importanti stimolatori del rilascio di GLP-1 (60).

Figura 6. *Possibili meccanismi d'azione delle fibre della dieta.*

(da Rivellese AA - *Curr Atheroscler Rep* 2012)



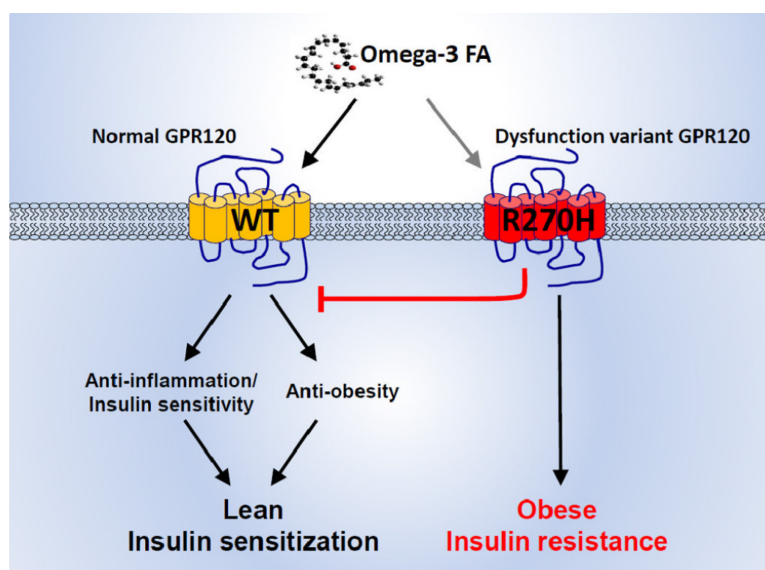
1.2.b. Grassi

I grassi sono potenti stimolatori della secrezione di GIP e GLP-1. La digestione dei lipidi alimentari ad acidi grassi è fondamentale per la stimolazione incretinica, come dimostrato dall'attenuazione della risposta di GIP e GLP-1 in presenza di un inibitore della lipasi, l'orlistat (61). Numerosi studi in vitro e sul modello animale hanno evidenziato un ruolo centrale dei recettori associati alle proteine G (GRP) come sensori degli acidi grassi sulle cellule enteroendocrine. In particolare la GPR40, la GPR120 e la GPR119 sono recettori/sensori sulle cellule L enteroendocrine rispettivamente dei SFA, PUFA e degli acidi grassi derivati dall'oleoil-etanolamide (OA). Gli acidi grassi n-3 a lunga catena, quindi, sono in grado di influenzare la secrezione di GLP-1 da parte della cellule L-enteroendocrine attraverso l'interazione coi recettori GPR120 (62-64). Tanaka e colleghi hanno esaminato gli effetti in vivo della somministrazione orale acuta e a lungo termine di acido alfa linolenico (ALA), un ligando naturale di GPR120, che è abbondantemente espresso nell'intestino (65, 66). In questo studio i livelli di GLP-1 erano migliorati dopo somministrazione acuta di ALA. È stato dimostrato che l'acido 5-idrossi-eicosapentaenoico (5-HEPE), un metabolita degli acidi grassi n-3 PUFA, è un agonista endogeno per la GPR119, in quanto determina un aumento della produzione di GLP-1. Per la prima volta, in nove soggetti sovrappeso con DM2, è stato paragonato l'effetto di una dieta ricca di

MUFA per più di 3 settimane con una dieta ricca di PUFA. Paniagua e colleghi hanno effettuato uno studio in 11 pazienti obesi con diabete di tipo 2 osservando che dopo ingestione con olio di oliva la risposta del GLP-1 era significativamente migliorata e le concentrazioni di glucosio e di insulina postprandiale erano ridotte rispetto a coloro che erano alimentati con un pasto ricco in carboidrati (67). In uno studio *cross-over* ben controllato di 12 settimane Cohen e colleghi hanno dimostrato un effetto sulla secrezione di GLP-1 dopo dieta ricca in MUFA derivati da mandorle in 19 soggetti con DM2 e in individui sani; tuttavia, il consumo di mandorle riduceva la glicemia postprandiale nei soggetti diabetici ma non nei soggetti sani (68). In conclusione, non tutti gli studi sono concordi nel dimostrare la capacità dei MUFA e PUFA sulla stimolazione del GLP-1 postprandiale, pertanto ulteriori approfondimenti sono necessari. Il recettore GRP120, oltre che nella produzione di GLP-1 stimolata da PUFA, svolge un ruolo chiave in diversi processi fisiologici come lo stato infiammatorio, la lipogenesi e il controllo dell'appetito. Recentemente, uno studio genetico condotto nella popolazione europea, ha identificato una mutazione a carico del recettore GRP120 (p.R270H) nei soggetti obesi con insulino-resistenza, cui si associava una perdita di funzione con compromissione di tutti i processi fisiologici da essa regolati, inclusa la secrezione di GLP-1 (Figura 7) (69).

Figura 7. Alterazione della funzione della proteina GPR120.

(da Oh Y et al. Cell Metab 2012)



Oltre alle GPRs, sono stati identificati sulla superficie degli enterociti altri recettori per gli acidi grassi PUFA a lunga catena: il più noto è senza dubbio il recettore CD36 il quale svolge un ruolo cruciale nell'assorbimento/trasporto degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena all'interno dell'enterocita e regola la formazione dei chilomicroni (Figura 8) (70, 71). È interessante notare che CD36 e GPR120 riconoscono entrambi LCFA, ma la loro distribuzione nell'intestino non si sovrappone. GPR120 non è rilevabile nell'intestino prossimale, dove è ben visibile CD36, mentre è abbondante nel colon e, in misura minore, nell'ileo, dove CD36 è relativamente basso. Ciò suggerisce che questi due recettori possono agire in parallelo anziché in modo cooperativo, l'uno nella regolazione degli entero-ormoni, l'altro nella sintesi dei chilomicroni. Anche questa proteina di membrana risponde in maniera

diversa a stimoli alimentari. In particolare, ripetute e prolungate somministrazioni di LCFA possono addirittura down-regolare, mediante ubiquitinazione e successiva degradazione, la proteina di membrana CD36 (Figura 9); questo meccanismo di feedback è potenzialmente protettivo in quanto servirebbe a regolare la formazione dei chilomicroni (Figura 8) (72). Recenti studi condotti in topi knockout per CD36 hanno dimostrato una secrezione ridotta di Apo B-48, rispetto a topi *wild type* (73). Dunque la degradazione di CD36, strettamente dipendente dal contenuto LCFA della dieta, potrebbe essere il segnale alimentare che ottimizza la formazione dei chilomicroni contenenti apo B-48 (73).

Figura 8. *Destino postprandiale degli acidi grassi a lunga catena (LCFA)*

(da Buttet M et al. – Biochimie 2014)

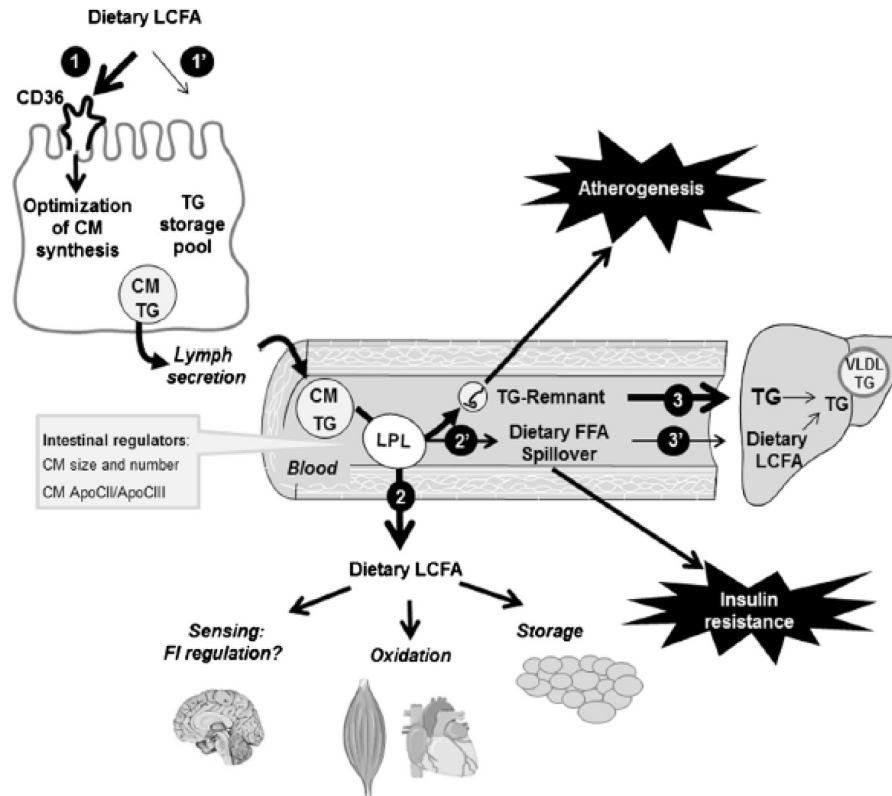
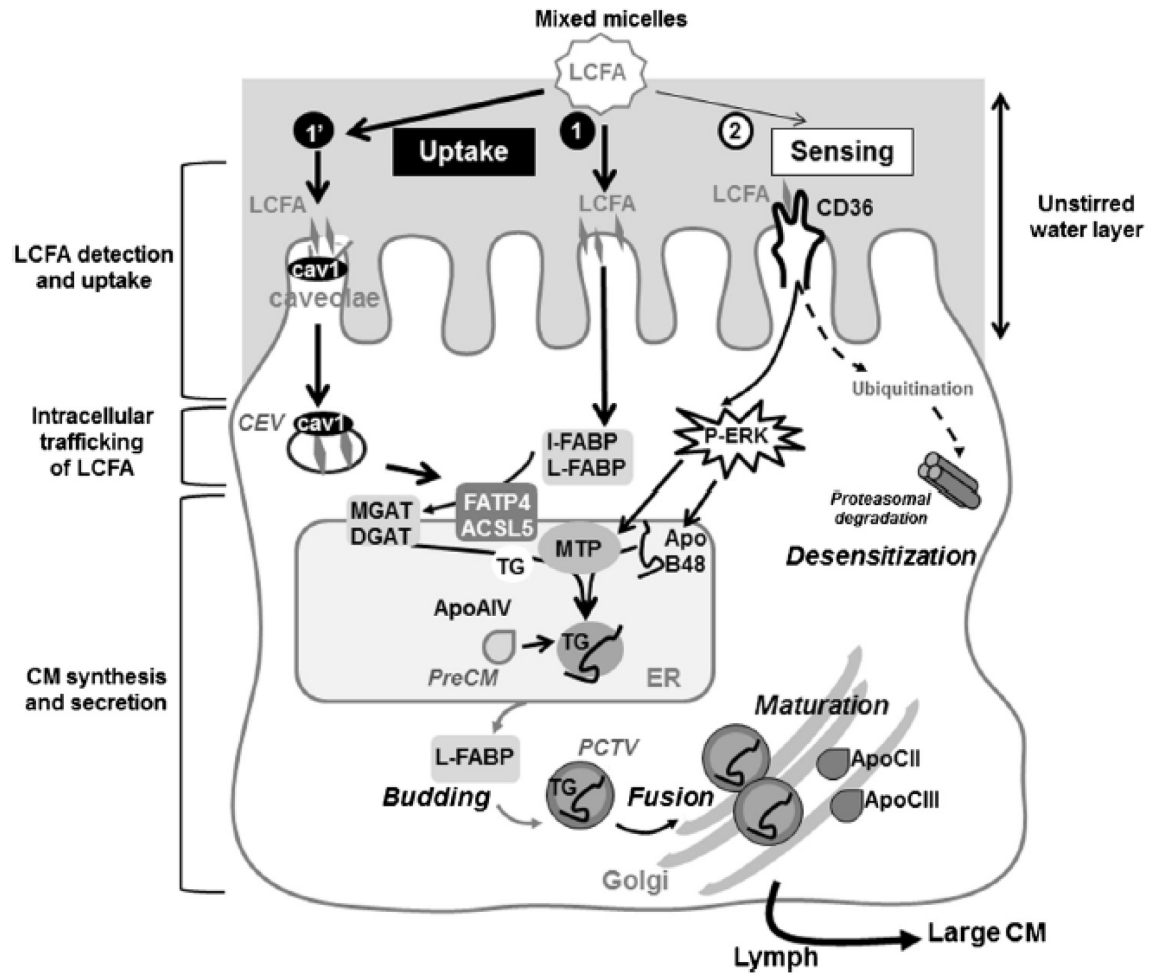


Figura 9. *Principali fasi dell'assorbimento intestinale degli acidi grassi a lunga catena (LCFA)*

(da Buttet M et al. – Biochimie 2014)



1.2.c. Proteine

Alcune evidenze indicano che le proteine potrebbero stimolare la secrezione del GLP-1 in misura maggiore dei carboidrati (74, 75). In 12 soggetti sani che consumavano una dieta ad alto contenuto proteico è stato osservato un aumento della secrezione di GLP-1 che si associava ad un aumento della sazietà (76). In uno studio con 16 uomini sovrappeso/obesi supplementati con 3 grammi al giorno di L-carnitina per 2 settimane si osservavano modifiche nella secrezione di GLP-1 (77). Chen e colleghi (78) inoltre suggerivano che gli amminoacidi a catena ramificata presenti nelle caseine, ma non nel siero del latte, aumentavano la secrezione di GLP-1 in cellule intestinali in coltura; risultati analoghi sono stati ottenuti da Reimer utilizzando amminoacidi essenziali derivati da carne idrolizzata (79), mentre Kett, nel 2012, non ha evidenziato nessuna differenza nel rilascio di GLP-1 quando le alfa e le beta caseine erano aggiunte al mais dei maiali (80). In conclusione, questi risultati suggeriscono che le proteine e gli amminoacidi non sono tutti ugualmente efficaci nell'indurre il rilascio di GLP-1, pertanto, la percentuale di amminoacidi delle proteine è importante nella stimolazione della secrezione incretinica.

1.2.d. Polifenoli

I polifenoli sono gli antiossidanti più abbondanti nelle nostre diete e sono largamente diffusi nella frutta, verdura, cereali, olive, legumi secchi, cioccolata e bevande come il tè, caffè e vino. Recentemente è stato suggerito che i possibili effetti protettivi dei polifenoli su importanti malattie come quelle cardiovascolari, il cancro, l'osteoporosi, il diabete mellito, non sono dovuti esclusivamente alle loro proprietà antiossidanti, ma potrebbero essere dovuti anche alla capacità di modulare molteplici attività cellulari come l'effetto inibente o riducente su alcuni enzimi quali telomerasi, ciclossigenasi, lipossigenasi, e di interagire con i processi di trasduzione del segnale e con i recettori cellulari (Figura 10) (81, 82).

I polifenoli, dal punto di vista chimico, sono derivati del benzene con uno o più gruppi idrossilici associati all'anello benzenico. Vengono distinti in *acidi fenolici*, *alcoli fenolici*, *stilbeni*, *lignani*, *flavonoidi* (Figura 11).

Figura 10. Effetti benefici dei polifenoli sul rischio cardiovascolare

(da Quinones M et al. - Pharmacological Research 2013)

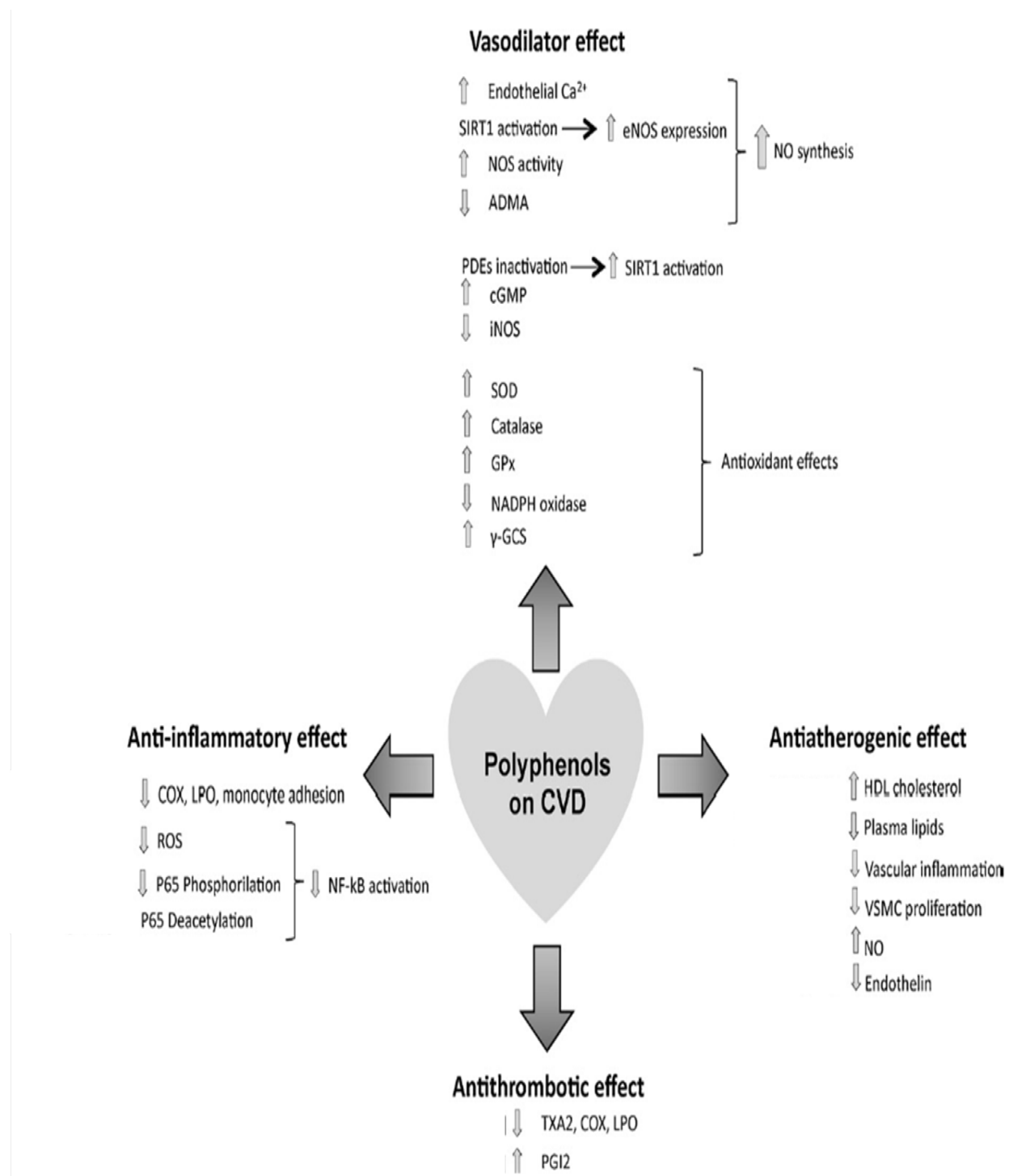
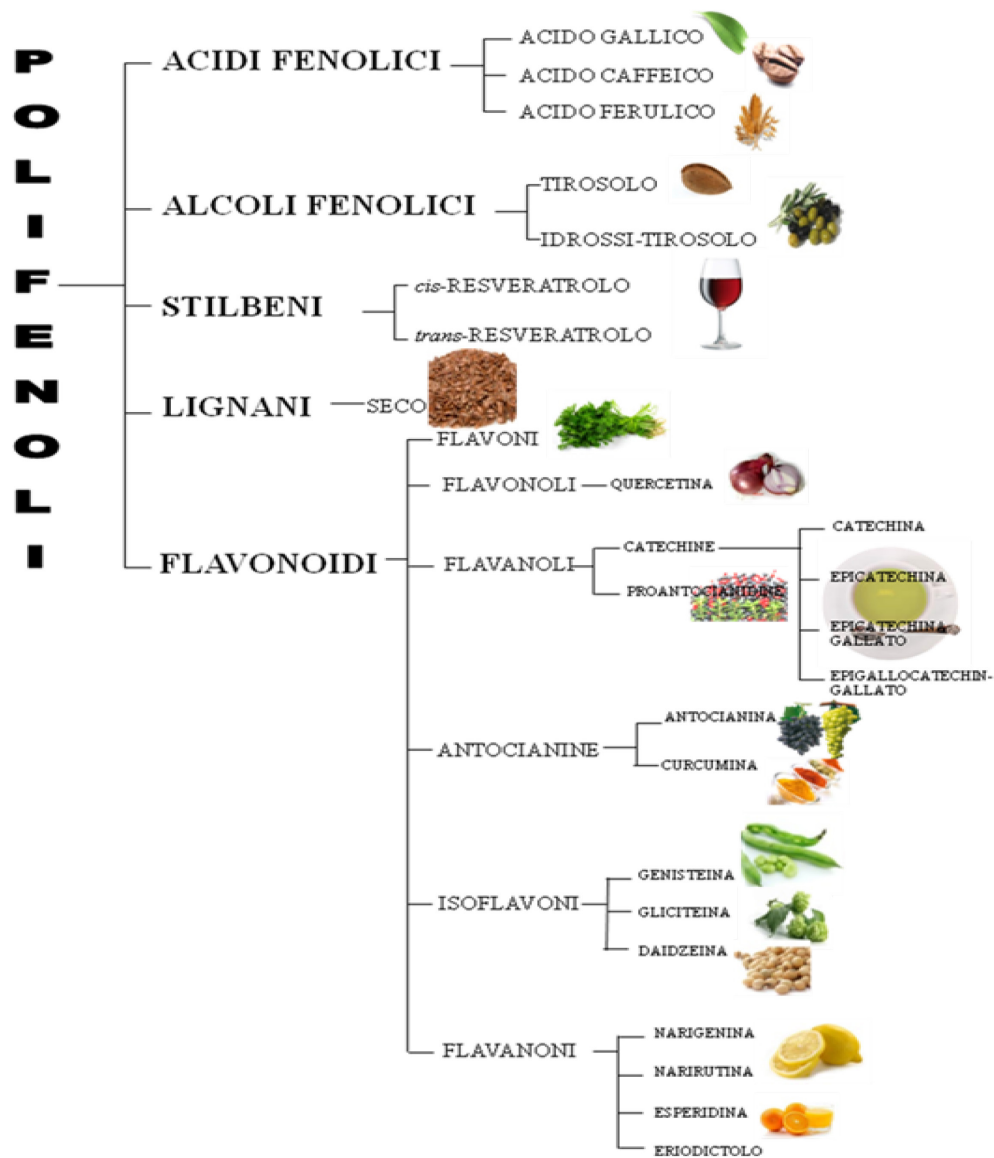


Figura 11. *Classificazione dei polifenoli*



La maggior parte dei polifenoli è presente negli alimenti come esteri, glucosidi o polimeri che non possono essere assorbiti nella loro forma originaria, ma devono essere idrolizzati dagli enzimi intestinali e/o dalla microflora del colon, la quale agisce rapidamente. L'assorbimento a livello gastrico è invece limitato sia per la ridotta area di scambio, confrontata con quella dell'intestino, sia per la resistenza all'idrolisi dovuta al pH acido nello stomaco che agli enzimi gastrici. Per questo

motivo i polifenoli sono poco assorbiti come tali, ma largamente metabolizzati e rapidamente eliminati attraverso un *pathway* comune.

Si stima che l'assunzione media giornaliera della popolazione occidentale con la dieta sia > 1 g di flavonoidi ed acidi fenolici. Studi sul modello animale e pochi studi sull'uomo hanno dimostrato un effetto positivo di diverse molecole, tutte appartenenti alla classe dei polifenoli, sull'omeostasi glicemica e lipidica, attraverso la via che coinvolge gli entero-ormoni (83-88) (Tabella 1).

Tabella 1. *Principali studi che hanno valutato le relazioni esistenti tra polifenoli ed entero-ormoni.*

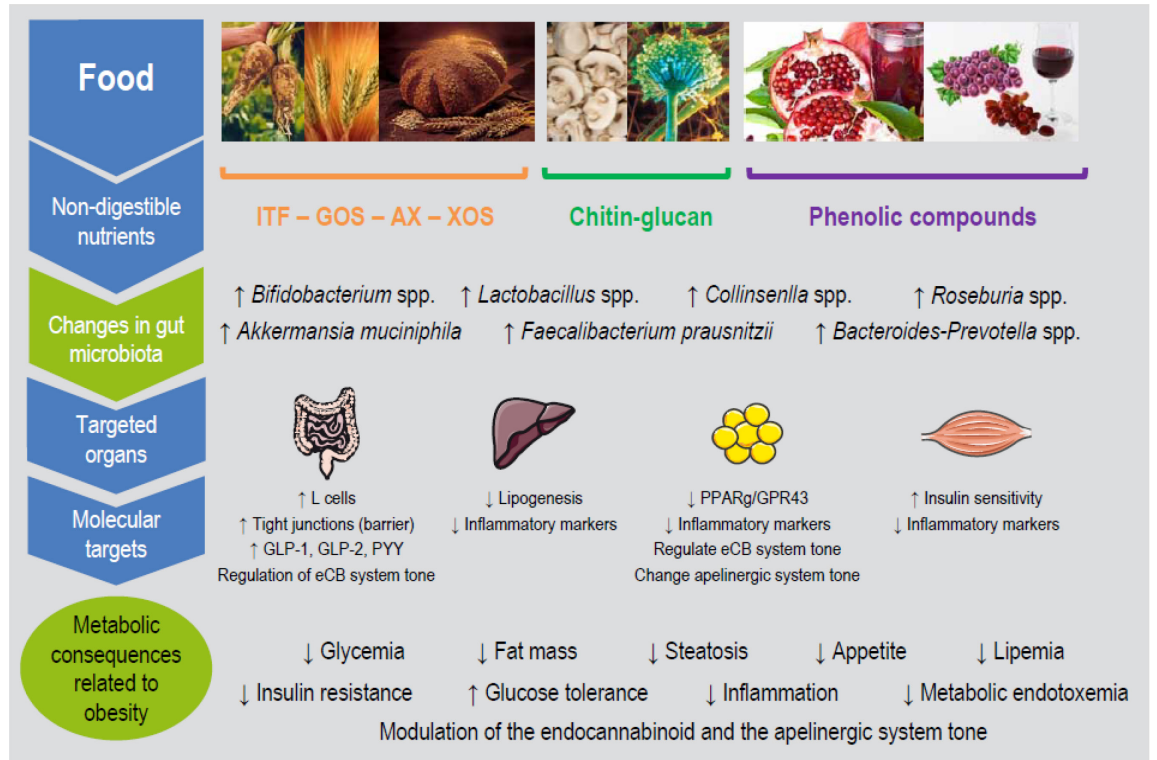
Ref.	Polifenoli utilizzati o alimento fonte di polifenoli	Entero-ormoni studiati	Studio	Effetto osservato
Kishi et al. 2003	resveratrolo	GLP-1	aggiunta di 60 mg/kg PC/die di resveratrolo ad una dieta ad alto contenuto di grassi in ratti diabetici per 5 settimane	aumento della concentrazione di GLP-1
Weickert et al. 2006	isoflavoni della soia	PYY, Grelina	Studio randomizzato, doppio cieco, placebo-controllato, crossover su 34 donne sane alimentate per 8 settimane con 50 mg isoflavoni/die	aumento della concentrazione di PYY
Gruendel et al. 2006	polpa di carruba (acido gallico, flavonoli, galletannini, glicosidi)	Grelina	randomizzato, crossover in 20 soggetti sani, somministrazione acuta di pasti ricchi di 5, 10 o 20 gr di polpa di carruba	riduzione della grelina acilata e miglioramento dell'ossidazione dei lipidi
Hlebowicz et al. 2009	cannella	GLP-1, GIP, Grelina	crossover su 15 soggetti sani, placebo-controllato. Somministrazione acuta di un pasto con 1 o 3 gr di cannella	aumento della concentrazione di GLP-1
Lu et al. 2012	polifenoli del tè verde	Grelina	studio randomizzato, condotto su ratti alimentati per 4 mesi con dieta ad alto contenuto di grassi arricchita di polifenoli del tè verde	riduzione dell'mRNA della grelina
Torronen et al. 2012	bacche rosse	GLP-1	studio randomizzato, crossover, placebo-controllato, su 12 soggetti sani, somministrazione acuta di un 150 gr di puree di frutti rossi con aggiunta di 35 g di sucrosio	miglioramento della risposta del GLP-1 con effetto sull'omeostasi glicemica

Alcune molecole, come la quercitina, i cinnamati, l'acido clorogenico, l'epigallocatechin gallato, la curcumina e i flavonoli migliorano

l'omeostasi glicemica stimolando il rilascio di GLP-1 (89); in particolare l'acido clorogenico, principale polifenolo del caffè, promuove attraverso il GLP-1 la sintesi e la trascrizione del fattore IDX-1, fondamentale per la responsività della beta cellula alle escursioni glicemiche (90, 91). Altri polifenoli, invece, come i lignani hanno mostrato un positivo effetto sull'omeostasi glicemica attraverso l'inibizione del DPP-IV e/o la riduzione dell'assorbimento intestinale del glucosio mediante l'inattivazione delle alfa-glucosidasi (92). Nello studio di Dao (93), invece, è stato osservato come il resveratrolo, appartenente alla classe degli stilbeni, sia in grado di ripristinare la risposta del GLP-1 in topi diabetici attraverso modifiche della flora batterica intestinale (94) e riduzione dello stato infiammatorio (Figura 12).

Figura 12. Effetti dei nutrienti non digeribili sulla flora batterica intestinale e sulle alterazioni metaboliche legate all'obesità.

(da Geurts M et al. - *Beneficial Microbes* 2014)



1.2.Chirurgia bariatrica

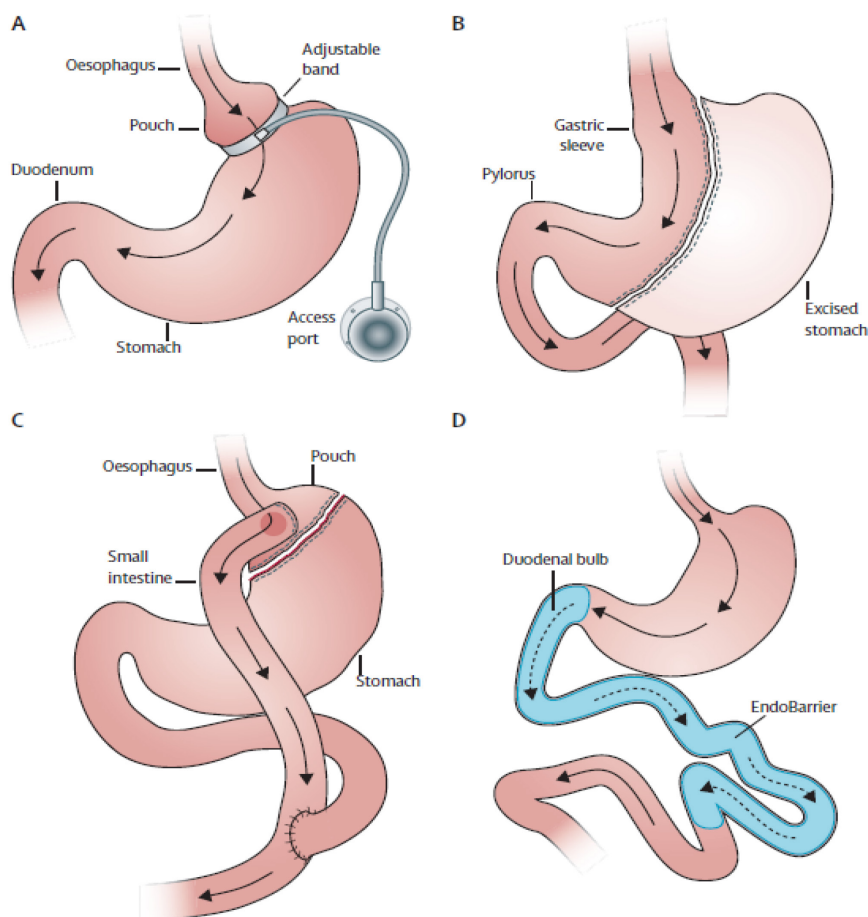
Negli ultimi anni, la chirurgia bariatrica si sta affermando come valido strumento per indurre una significativa e stabile perdita di peso con miglioramento o scomparsa delle co-morbidità associate all'obesità.

1.3.a. Tecniche chirurgiche

Esistono tre principali categorie di interventi bariatrici: restrittivi, malassorbitivi e misti (restrittivo-malassorbitivi) (Figura 13).

Figura 13. Tecniche chirurgiche.

(da Madsbad et al. - Lancet Diabetes Endocrinol 2014)



A: Bendaggio Gastrico Regolabile; B: Gastrectomia Verticale; C: Bypass Gastrico; D: EndoBarrier

Fanno parte delle tecniche restrittive il bendaggio gastrico regolabile (BGR), la gastroplastica verticale (GPV) e la gastrectomia verticale o *sleeve gastrectomy* (SG). Tali procedure si caratterizzano per una riduzione della capacità gastrica mediante creazione di una piccola *pouch* gastrica i cui meccanocettori di parete vengono stimolati dagli alimenti attivando i centri ipotalamici deputati alla riduzione dell'appetito (95). Il mantenimento del senso di sazietà dipende dal grado di *stretching* della parete gastrica che avviene più precocemente quanto più piccola è la *pouch*. E' quindi comprensibile come le norme dietetico-comportamentali fornite ai pazienti che hanno subito restrizione gastrica siano fondamentali non solo per il raggiungimento del senso di sazietà, ma anche per il mantenimento del volume di restrizione e pertanto della perdita di peso. Da ciò si evince come la *compliance* del paziente "responsabile" e l'accettazione di restrizioni dietetiche, svolgano un ruolo fondamentale per la riuscita di questa tipologia di intervento. Un intervento che sta acquisendo una crescente importanza è la gastrectomia verticale o *sleeve gastrectomy* (SG), tecnica originariamente sviluppata da Johnston in Inghilterra e successivamente adottata negli Stati Uniti e in Europa. Essa consiste in una gastrectomia verticale, praticata lungo la grande curvatura, con cui si asporta completamente il fondo gastrico lasciando uno stomaco residuo di 60-150 ml. L'integrità della regione antro-pilorica e dell'innervazione

vagale viene preservata. Tale procedura non è reversibile. Il meccanismo d'azione non è solamente di restrizione del volume ma più complesso e articolato. E' stato, infatti, evidenziato che il transito alimentare nel neo-stomaco è molto veloce, con ingesti che arrivano precocemente all'intestino, stimolando risposte ormonali di sazietà. Questa procedura viene eseguita laparoscopicamente in pazienti con IMC superiore a 50 per ridurre i rischi aggiuntivi della chirurgia laparotomica. La riduzione di peso è sufficiente a migliorare lo stato generale di salute ed a riportare il paziente in una fascia di rischio operatorio più bassa. E' stata, inoltre, adottata come unica procedura per pazienti con BMI < 40 kg/m² dove si è dimostrata efficace nel *follow-up* a 5 anni. Poiché il piloro è conservato, la SG minimizza il rischio di *Dumping Sindrome* ma risulta gravata dal rischio di inadeguata perdita di peso o recupero successivo di peso. Nell'ambito delle procedure malassorbitive, il primo intervento praticato è stato il *by-pass* digiuno-ileale, considerato ormai obsoleto e fortemente criticato per l'elevata morbidità e mortalità. Questa tipologia di pratica chirurgica è stata soppiantata dalla diversione bilio-pancreatica (DBP). Tale tecnica è rappresentata da una gastrectomia distale con una lunga ricostruzione ad Y secondo Roux dove la gastro-entero anastomosi viene confezionata utilizzando l'ileo distale e completata in genere con una colecistectomia per la prevenzione della frequente litiasi post-operatoria. La DBP determina una ritardata commistione del cibo con le

secrezioni bilio-pancreatiche con permanente riduzione della digestione e, pertanto, dell'assorbimento dei cibi ad alto contenuto calorico (grassi ed amidi), assicurando così un mantenimento della perdita di peso a lungo termine (96). La DBP ha un ampio *range* di applicazione attraverso la variazione della lunghezza dei vari segmenti intestinali e, pertanto, può creare vari gradi di malassorbimento intestinale di amidi, grassi e proteine. In tal modo la procedura può essere adattata alle caratteristiche di ciascun paziente allo scopo di ottenere il miglior risultato possibile in termini di calo ponderale riducendo al minimo le complicanze (97). I cosiddetti interventi misti associano alla riduzione del volume gastrico, la derivazione intestinale ottenendo vari gradi di malassorbimento. Tra questi il by-pass gastrico (BPG) sulla scia dell'esperienza maturata negli USA, è senza dubbio l'intervento che ha avuto maggiore diffusione in Europa visti gli ottimi risultati sul calo ponderale nel lungo termine. Tale procedura consiste nella separazione definitiva dello stomaco con creazione di una piccola tasca gastrica di 25-30 ml. La *pouch* viene anastomizzata con un'ansa digiunale sezionata tra 60-120 cm dal legamento di Treitz, mentre il tratto bilio-pancreatico viene anastomizzato tra 100-150 cm a valle dell'anastomosi gastro-digiunale. La perdita di peso si ottiene grazie alla restrizione gastrica ed alla riduzione dell'assorbimento che è tanto maggiore quanto più a valle è lo sbocco delle secrezioni bilio-pancreatiche. Il BPG induce un minor

disagio alimentare per il paziente rispetto alle riduzioni gastriche pure e una minor incidenza di effetti collaterali e complicanze rispetto alla DBP (98).

1.3.b. Decremento ponderale.

L'efficacia delle procedure bariatriche sulla perdita di peso è stata valutata da Buchwald in una recente metanalisi (99). A meno di 2 anni dall'intervento chirurgico la perdita di peso totale, ovvero senza distinzione tra le varie procedure, era di 36.6 kg corrispondenti ad un *Excess Body Weight Loss* (EBWL) di 53.8% mentre a distanza 2 anni o più era di 41.6 kg ovvero 59% EBWL. Inoltre, la diversione bilio-pancreatica è associata al più alto e duraturo calo ponderale; l'effetto sul peso diminuisce gradualmente nel bypass gastrico fino a raggiungere il minimo nel bendaggio gastrico. E' stato rilevato, inoltre, che la perdita di peso ottenuta con BGR avviene in maniera graduale, passando dal 35% di perdita dell'eccesso di peso a 6 mesi, al 40% a 12 mesi e 50% a 24 mesi (100). Il BPG invece, induce una sostanziale perdita dell'eccesso ponderale (60-70%) (100); infine la DBP ha un impatto drammatico sulla perdita di peso nei primi 12 mesi post-operatori e più graduale nei mesi successivi.

1.3.c. Remissione del diabete

Riguardo al drammatico miglioramento dell'omeostasi glicemica dopo interventi di chirurgia bariatrica, è difficile stabilire se si tratti di risoluzione o remissione del diabete, essendo ancora controversa la corretta definizione dei due termini, ed eterogenei gli strumenti di valutazione di tali fenomeni. Per risoluzione si intende la scomparsa di sintomi e segni di malattia e, nel caso del diabete, la risoluzione dopo chirurgia bariatrica viene definita come glicemia <100 mg/dl e HbA1c <6%, in assenza di terapia farmacologica. Tuttavia, in molti studi, soprattutto nel *follow-up* a lungo termine, è stata valutata la sola glicemia basale. Per remissione si intende, invece, il miglioramento, ma non la scomparsa, dei sintomi e dei segni di malattia, e quindi, nel caso specifico, una riduzione della glicemia a digiuno, dell'HbA1c e del dosaggio dei farmaci, oppure la presenza di un intervallo libero dai sintomi di malattia, cioè gli stessi criteri riportati per la risoluzione, ma per un periodo di tempo limitato. Negli ultimi anni numerosissimi autori (101-107) hanno dimostrato che sia procedure restrittive che malassorbitive sono capaci di migliorare il compenso glicemico o di guarire la malattia diabetica, ancor prima che si realizzi un significativo calo ponderale. E' interessante notare che la reversibilità del diabete è stata descritta anche in un esiguo gruppo di soggetti normopeso (<30 kg/m²) affetti da diabete tipo 2 dopo intervento di diversione bilio-

pancreatica (DBP) (108). E' stato documentato che l'effetto della chirurgia bariatrica sul miglioramento/risoluzione del diabete è molto diverso a seconda della tecnica chirurgica adoperata, passando dal 94% in pazienti sottoposti a DBP allo 81.6% dopo BPG, al 81.4% con la GPV e al 55% con il bendaggio gastrico (99). La percentuale di remissione del diabete, quindi, aumenta passando dalla chirurgia restrittiva a quella malassorbitiva pura, in parallelo con la riduzione dell'eccesso ponderale. E' da notare che nei vari studi esaminati, i pazienti che non andavano incontro a remissione dopo le procedure bariatriche avevano una durata di malattia più lunga, suggerendo un maggior grado di esaurimento funzionale della β -cellula, probabilmente non più reversibile; tuttavia, in tutti si verificava un miglioramento dell'omeostasi glicemica ed una riduzione del dosaggio dei farmaci ipoglicemizzanti.

La percentuale di remissione/miglioramento dell'omeostasi glicemica è influenzata da molteplici fattori (familiarità, severità della patologia, presenza di complicanze, intensità del trattamento); infatti particolarmente importanti come fattori predittivi di remissione del diabete tipo 2 sono risultati i livelli pre-chirurgici di HbA1c e, soprattutto, la circonferenza vita e l'assenza di trattamento insulinico (109). In un recente lavoro, Nannipieri e colleghi hanno dimostrato come i valori al basale della sensibilità insulinica e il ristoro della risposta del

GLP-1 siano i principali determinanti della remissione del diabete piuttosto che il tipo di intervento chirurgico utilizzato (110).

1.3.d. Ruolo della chirurgia bariatrica nell'algoritmo terapeutico del paziente con diabete mellito tipo 2 obeso

Sono state finora redatte diverse linee guida per l'utilizzo appropriato della chirurgia bariatrica nel trattamento dell'obesità in generale e del diabete tipo 2 associato ad obesità. Secondo le più recenti linee guida americane (111), che riprendono le precedenti indicazioni fornite dall'NIH Consensus Development Conference Statement del Marzo 1991 (112), è candidato alla chirurgia bariatrica il paziente obeso (IMC ≥ 40 kg/m² o >35 kg/m² in presenza di co-morbidità) che ha fallito ripetuti tentativi dietetico-comportamentali e/o farmacologici per la terapia dell'obesità.

Le numerose evidenze scientifiche che la chirurgia bariatrica è in grado di indurre la remissione del diabete tipo 2 in una vastissima percentuale di casi, hanno recentemente spinto l'International Diabetes Federation (IDF) a redigere un "position statement" per stabilire l'appropriato ruolo che la chirurgia gastrointestinale riveste specificamente nel trattamento del diabete tipo 2 (113). Secondo tale documento la chirurgia bariatrica deve essere considerata un trattamento appropriato per la cura del diabete tipo 2 associato ad obesità e complementare alle terapie mediche nel ridurre il rischio micro-vascolare e cardiovascolare. Secondo tali

linee guida vi è: “eleggibilità” alla chirurgia bariatrica allorquando il paziente diabetico con $IMC > 35 \text{ kg/m}^2$ non raggiunge una significativa perdita di peso e non risulta adeguatamente compensato ($HbA1c < 7\%$) con intervento sullo stile di vita (+/- utilizzo di metformina); “priorità” alla chirurgia bariatrica quando il paziente diabetico presenta un’obesità di terzo grado oppure di secondo grado associata ad uno scadente compenso glicemico ($HbA1c > 7.5\%$) nonostante l’ottimizzazione della terapia convenzionale, un progressivo incremento ponderale o quando sono presenti altre comorbidità quali l’ipertensione arteriosa, la dislipidemia o le apnee notturne. Diversi studi sperimentali sono in corso per valutare l’opportunità di ampliare le indicazioni di tale terapia anche a pazienti con minore grado di obesità.

1.3.e. Meccanismi di risoluzione del diabete tipo 2 dopo chirurgia bariatrica

I meccanismi responsabili della remissione del diabete dopo chirurgia bariatrica sono continuamente oggetto di un’intensa attività di ricerca (Tabella 2 e Figura 14). E’ noto che la glicemia è la risultante di un perfetto equilibrio tra la sensibilità insulinica a livello dei tessuti periferici e la secrezione insulinica, intesa come *quantità* e *timing* dell’attività β -cellulare. E’ verosimile, quindi, che la chirurgia bariatrica possa influenzare uno o entrambi gli eventi fisiopatologici.

In una recente revisione sistematica della letteratura (114) che ha esaminato un totale di 450 pazienti per un periodo di osservazione di circa 25 anni, è stato evidenziato che le procedure bariatriche sono capaci di determinare un notevole aumento dell'insulino-sensibilità apprezzabile già poche settimane dopo l'intervento, quando la riduzione del peso corporeo è ancora modesta (circa 10%). Per quanto riguarda la secrezione insulinica, dopo chirurgia bariatrica si osservano due fenomeni apparentemente opposti (114, 115). Da un lato, si ha una riduzione del *set-point* della capacità secretoria della β -cellula, che si traduce in una riduzione del tasso di secrezione e dell'insulinemia a digiuno così come dell'*output* totale di insulina in risposta ad uno stimolo per effetto di un miglioramento della sensibilità insulinica. Dall'altro lato, si osserva un aumento del comportamento dinamico della β -cellula, che si traduce in un aumento degli indici secretori quali l'HOMA- β , la risposta insulinica acuta (AIR) e l'indice insulinogenico, ad indicare un recupero della responsività della β -cellula al glucosio. Un altro meccanismo alla base del miglioramento sia della secrezione insulinica che della sensibilità insulinica è la riduzione delle gluco- e lipotossicità che consegue al rapido miglioramento del quadro metabolico (114). Numerosi studi hanno rilevato come la remissione del diabete tipo 2 dopo interventi di chirurgia bariatrica, soprattutto malassorbitiva o mista, sia un evento estremamente precoce che si

realizza ancor prima che si determini un significativo calo ponderale. E' verosimile, dunque, che il rapido miglioramento dell'insulino-sensibilità e/o della secrezione insulinica e lo stato euglicemico che consegue all'intervento bariatrico non siano del tutto spiegati dal calo ponderale ma siano frutto, piuttosto, di altri meccanismi "intervento-specifici" ed indipendenti dal decremento ponderale. Uno dei meccanismi ipotizzati risiederebbe nel riarrangiamento della normale anatomia dell'intestino che comporta un transito accelerato dei nutrienti, e l'esposizione dell'intestino distale a materiale alimentare parzialmente digerito con conseguente ripristino di una più fisiologica risposta incretinica che nel diabete tipo 2 e nell'obesità risulta fortemente ridotta (*hindgut hypotheses*). (116-118). Più recentemente molti altri meccanismi sono stati chiamati in causa: la riduzione del tessuto adiposo pro-infiammatorio; modifiche nell'attività delle afferenze vagali digestive; la *down-regulation* di fattori anti-incretinici non ancora identificati dovuta all'esclusione dell'intestino prossimale dal transito di nutrienti (*foregut hypotheses*); la riduzione della secrezione di grelina (119); la riduzione dei livelli plasmatici a digiuno e postprandiali di glucagone (120). Inoltre è sempre più evidente come l'intestino, in particolare il tratto duodeno-digiunale, sia molto più che un organo deputato alla digestione e all'assorbimento ma prenda parte in maniera preponderante alla regolazione dell'equilibrio metabolico. In numerosi studi è stato

osservato che dopo gli interventi malassorbitivi, BPG e diversione biliopancreatica, si verifica un marcato aumento degli acidi biliari che agiscono a livello epatico attraverso la stimolazione del fattore FXR. Questo recettore ha un ruolo chiave in numerosi processi metabolici, incluso l'omeostasi glicemica. Inoltre, studi sperimentali hanno dimostrato come gli acidi biliari aumentano l'espressione del fattore di crescita FGF-19, i cui livelli sono risultati aumentati sia dopo interventi di BPG che SG, suggerendo un possibile ruolo di questo fattore nel miglioramento metabolico osservato dopo chirurgia bariatrica. Infine, ma non meno importante, gli acidi biliari riconoscono anche i recettori TGR5, presenti a livello delle cellule L, a livello del tessuto adiposo bruno e del muscolo scheletrico dove stimolano rispettivamente il rilascio di GLP-1, la termogenesi e il metabolismo basale attraverso la conversione dell'ormone T4 in T3 (121). Rajas e colleghi (122) hanno dimostrato la presenza di Glucosio-6-fosfatasi e fosfoenolpiruvato carbossikinasi, enzimi chiave della gluconeogenesi epatica, anche nel piccolo intestino dell'uomo, soprattutto nel duodeno. Più recentemente è stata documentata un'aumentata gluconeogenesi intestinale in topi sottoposti ad enterogastroanastomosi, una tecnica bariatrica più facilmente realizzabile in modelli animali ma molto simile ad un mini-bypass gastrico (123). Si potrebbe postulare che anche nell'uomo il bypass del foregut induca un'aumentata gluconeogenesi intestinale e che

questo meccanismo possa ridurre l'*intake* di nutrienti (124) e la produzione epatica di glucosio, aumentare la sensibilità insulinica e migliorare così l'omeostasi glicemica. Sempre in modelli animali è stata dimostrata dopo BPG una soppressione dell'assorbimento intestinale di glucosio con una riduzione dell'*uptake* di glucosio del 63% unitamente ad una *down-regulation* del co-trasportatore Na⁺/glucosio che risulta responsabile della maggior parte dell'*uptake* di glucosio ed iper-espresso in pazienti con DM2 (125). Infine, dopo bypass del *foregut*, per effetto delle modifiche dell'acidità gastrica e di un accorciamento dell'intestino tenue, si verificano sostanziali cambiamenti del microbiota intestinale che conducono ad un aumento delle specie dei Gammaproteobatteri anaerobi, in particolare di Enterobatteri generalmente più rappresentati nel grosso intestino, con una riduzione nella quota di metanogeni (126). Questo può associarsi ad una maggiore produzione di acidi grassi a corta catena (SCFAs) che sono noti ridurre la gluconeogenesi epatica e, in modelli animali, stimolare la secrezione degli enterormoni (127). Infine, recentemente Furet e colleghi hanno documentato che accanto agli adattamenti del microbiota intestinale, indotti dalla condizione *starvation-like* determinata dalla chirurgia bariatrica, si verificano, indipendentemente dall'*intake* calorico, una serie di ulteriori variazioni della flora batterica intestinale direttamente correlate alla riduzione dello stato infiammatorio e della resistenza insulinica (128). Sebbene la

precoce remissione del diabete tipo 2 dopo interventi di chirurgia bariatrica sia ormai ben documentata, i meccanismi alla base di tale fenomeno non sono stati completamente elucidati. Inoltre, mentre la remissione del diabete conseguente agli interventi malassorbitivi o restrittivi-malassorbitivi (DBP e BPG) è stata ampiamente esplorata, pochi dati esistono riguardo alle tecniche restrittive di più recente ideazione come la *sleeve gastrectomy*. L'ipotesi che entrino in gioco meccanismi specifici strettamente correlati alla tecnica chirurgica utilizzata impone non solo un attento studio degli effetti delle singole procedure ma anche il raffronto tra esse.

Tabella 2. *Meccanismi potenzialmente coinvolti nella remissione del diabete dopo chirurgia bariatrica.*

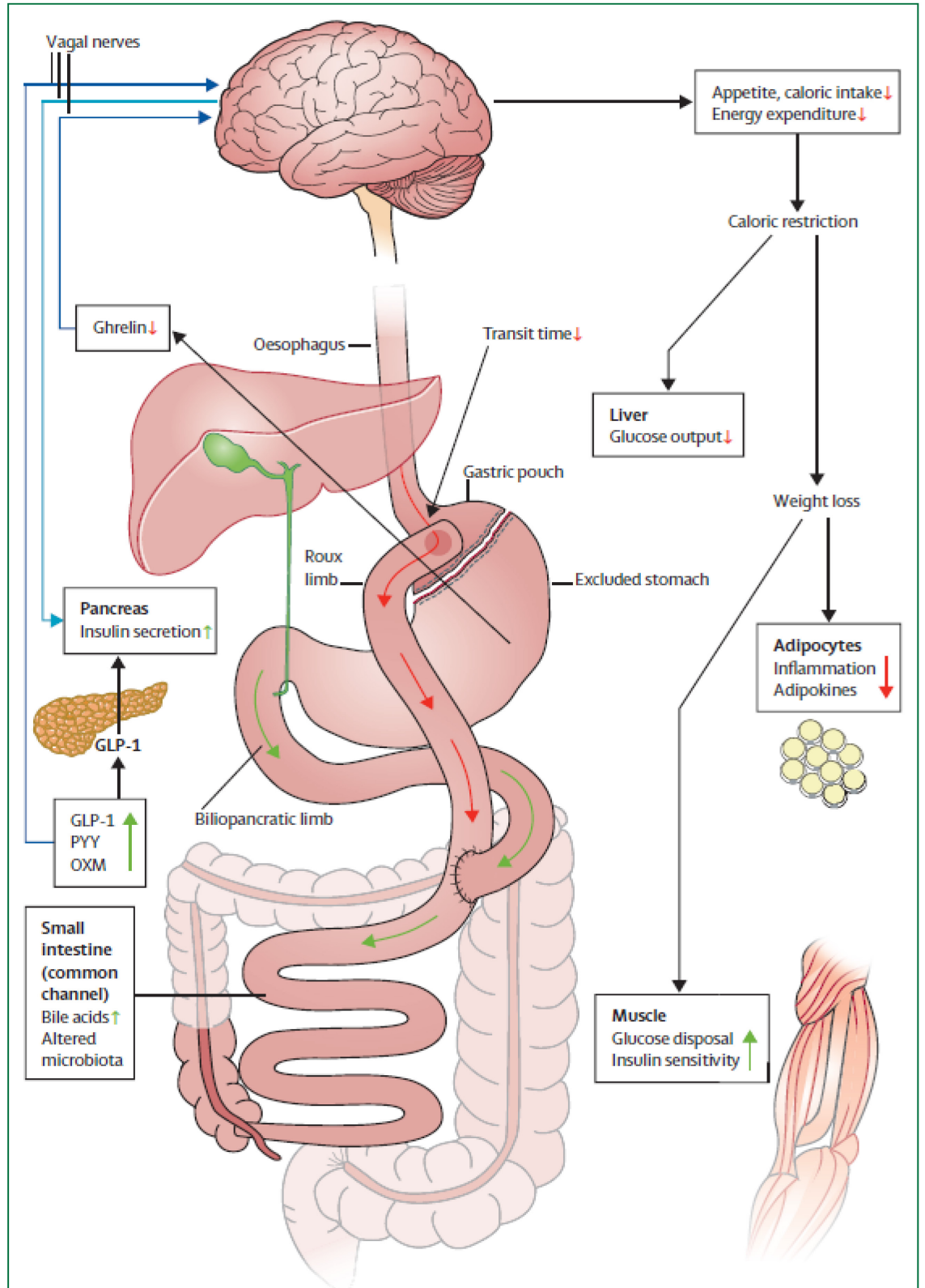
(modificata da Madsbad et al. - Lancet Diabetes Endocrinol 2014)

	AGB	SG	RYGB
GLP-1	⇒↑	↑	↑
PYY	⇒	↑	↑
Oxintomodulina	ND	ND	↑
GIP	⇒	⇒↑	⇒↑↓
CCK	ND	↑	↑
Grelina	⇒↑↓	⇒↑↓	⇒↑↓
Leptina	↓	ND	↓
Spesa energetica	↓	↓	↓
Introito energetico	↓	↓	↓
Acidi biliari	⇒	⇒	↑
Microbiota intestinale	M	M	M
Insulina secrezione	↑	↑	↑
Insulina sensibilità epatica	↑	↑	↑
Insulina sensibilità muscolare	↑	↑	↑
Svuotamento gastrico	⇒	↑	↑

AGB: Bendaggio Gastrico Regolabile; SG: Gastrectomia Verticale; RYGB: Bypass Gastrico; ND: nessun dato disponibile; M: modificato; ⇒ nessuna modifica; ↑ : aumentato; ↓ : ridotto.

Figura 14. *Meccanismi responsabili del miglioramento del controllo glicemico dopo bypass gastrico.*

(da Madsbad et al. - *Lancet Diabetes Endocrinol* 2014)



1.3.f. Effetti della chirurgia bariatrica sul metabolismo lipidico

Un potente effetto della chirurgia bariatrica non è solo quello della riduzione ponderale o del miglioramento della tolleranza al glucosio, ma anche quello di determinare un miglioramento dei lipidi plasmatici. Una recente meta-analisi ha mostrato un miglioramento del profilo lipidico nel 70% dei pazienti sottoposti ad interventi di chirurgia bariatrica (129). In particolare, sono stati documentati miglioramenti dopo BPG (130) , AGB (131) e SG (132). Nonostante questi miglioramenti, è chiaro che alcune procedure bariatriche sono più efficaci di altre nella riduzione della dislipidemia. Sono stati riportati migliorati livelli di HDL dopo le tre procedure prima elencate (131, 133, 134), ma il relativo grado di miglioramento dopo ogni intervento chirurgico non è stato confrontato, mentre sembra chiaro come il BPG sia un intervento chirurgico unico nella sua capacità di ridurre i livelli di colesterolo totale ed LDL (133, 134). Non sono chiari i meccanismi che sono alla base di questi effetti unici del BPG, ma sembrano essere indipendenti dalla riduzione ponderale. Il malassorbimento intestinale dei lipidi che può verificarsi dopo BPG (135, 136) può essere un possibile meccanismo; tuttavia, la maggior parte degli interventi bariatrici di ultima generazione stanno cercando di minimizzare la componente malassorbitiva legata a questo intervento e, pertanto, sembra improbabile che sia il malassorbimento a determinare la riduzione dei livelli plasmatici di colesterolo totale nella

maggior parte dei pazienti dopo BPG. Inoltre, nessuno studio ha confrontato direttamente gli effetti di BPG vs SG sulla composizione fecale, e non si può stabilire quanto il BPG potrebbe influenzare la sintesi de novo del colesterolo ed influenzare i livelli di colesterolo plasmatici. Il BPG determina analoghe riduzioni dei trigliceridi plasmatici rispetto alla SG (134) ma è superiore a AGB (133). Non è chiaro se la SG e il BPG potrebbero agire tramite gli stessi meccanismi per ridurre i livelli di trigliceridi, ma una questione chiave è se il miglioramento della dislipidemia dopo l'intervento chirurgico potrebbe verificarsi indipendentemente dalla perdita di peso. Gli studi su animali offrono l'opportunità di rispondere a tale domanda molto più facilmente rispetto agli studi sull'uomo. Nello studio di Stefater e colleghi la SG nei ratti produce un drammatico miglioramento dei trigliceridi plasmatici indipendentemente dalla riduzione ponderale (137). Sorprendentemente, questa riduzione è dovuta alla ridotta secrezione dei trigliceridi postprandiali dall'intestino in circolo e non è causa di malassorbimento intestinale dei lipidi (137). Date le drammatiche modifiche dei lipidi plasmatici ottenute dopo BPG rispetto alla SG, a parità di perdita di peso, è stato ipotizzato che il BPG produce variazioni nell'omeostasi lipidica peso-indipendenti attraverso modifiche che si verificano a livello intestinale. Mentre è chiaro il miglioramento del profilo lipidico a digiuno dopo chirurgia bariatrica in pazienti obesi e diabetici (138, 139),

solo due studi sull'uomo hanno valutato le modifiche del profilo lipidico postprandiale dopo chirurgia bariatrica, e di questi uno in soggetti con DM2; in particolare Waldmann e colleghi hanno osservato 3 mesi dopo SG, in 15 soggetti obesi non diabetici, un miglioramento in fase postprandiale delle lipoproteine ricche in TG indipendente dalla riduzione ponderale (140). Un possibile meccanismo ipotizzato potrebbe essere dovuto all'aumentata attività della LPL (141) e della proteina di trasporto degli esteri del colesterolo (CETP) che potrebbero subire profonde modifiche in seguito al calo ponderale o al miglioramento del profilo glucidico (142). Umeda e colleghi nel 2013 hanno valutato le modifiche della lipemia postprandiale in 10 soggetti diabetici dopo 7 e 90 giorni dal BPG. Dopo 90 giorni si osservava un miglioramento dei lipidi postprandiali, del GLP-1 e dell'adiponectina, ma solo quest'ultima correlava col miglioramento dei trigliceridi (143). È possibile che dopo chirurgia bariatrica si verifichi un'*up*-regolazione dei recettori PPAR, noti attivatori dell'adiponectina, un ormone coinvolto nella regolazione del metabolismo lipidico (144). I pochi studi, il campione limitato, la diversa durata del *follow-up* e i differenti interventi utilizzati, non permettono di avanzare conclusioni a riguardo.

2. Scopi

Studi in vitro e sul modello animale sembrano mostrare un ruolo chiave dei PUFA n-3 e dei polifenoli sul metabolismo lipidico e sulla secrezione incretinica. Gli studi di intervento sull'uomo che hanno valutato gli effetti degli n-3 o dei polifenoli sulla lipemia postprandiale e sulla secrezione incretinica sono scarsi, contrastanti e nella maggior parte di questi sono stati valutati gli effetti di singole classi di polifenoli o di supplementi di n-3; nessuno ha preso in considerazione l'associazione di entrambi i composti o una dieta naturalmente ricca di alimenti con elevate quantità di questi composti. Pertanto la prima linea di ricerca è stata quella di valutare:

- gli effetti di acidi grassi n-3 e/o polifenoli sulla risposta lipidica ed entero-ormonale in soggetti ad alto rischio cardio-metabolico.

Nonostante sia ben chiaro il ruolo dell'asse entero-insulare nella secrezione insulinica e, quindi, nella regolazione dell'omeostasi glicemica, non vi sono dati certi sul ruolo delle incretine nel miglioramento del controllo glicemico che si verifica in soggetti con DM2 dopo pochi giorni dagli interventi di chirurgia bariatrica in assenza di un significativo decremento ponderale. Pertanto, al fine di chiarire il possibile coinvolgimento degli entero-ormoni nella risoluzione del DM2 dopo chirurgia bariatrica, il secondo obiettivo del mio Dottorato di ricerca è stato quello di:

- valutare il ruolo degli ormoni gastrointestinali nell'omeostasi glicemica a 2 settimane e ad 1 anno in pazienti obesi con DM2 dopo due diversi interventi bariatrici: il Roux-en-Y bypass gastrico e la sleeve gastrectomy.

È noto che gli interventi di chirurgia bariatrica, attuati per la terapia dell'obesità morbigena, sono in grado di influenzare positivamente il metabolismo lipidico a digiuno in soggetti con DM2. Gli studi sul metabolismo lipidico postprandiale sono piuttosto scarsi e non vi sono dati sulle relazioni esistenti tra le modifiche degli entero-ormoni e il metabolismo lipidico. Pertanto, al fine di chiarire queste relazioni e valutare l'impatto della chirurgia bariatrica sui lipidi postprandiali, lo scopo della terza linea di ricerca che ho seguito durante il corso di Dottorato è stata quella di:

- valutare gli effetti a breve e a medio-lungo termine della chirurgia bariatrica sulla lipemia postprandiale e sugli ormoni gastrointestinali in pazienti obesi con DM2.

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati effettuati 3 studi di cui riporterò i risultati nei capitoli seguenti e che sono stati oggetto di pubblicazioni (riportate in Appendice). Le metodologie comuni ai tre studi (dosaggio degli entero-ormoni) vengono riportate una sola volta nell'apposita sezione, prima della descrizione degli studi stessi.

3. METODOLOGIE

Dosaggio degli entero-ormoni

Il GLP-1 attivo è stato dosato con il metodo ELISA (Merck-Millipore) avente il 100% di reattività crociata con le 2 isoforme attive (7-36 amide e 7-37 glicina-estesa) ma nessuna reattività con le isoforme inattive (9-36 amide e 9-37 glicina-estesa), né con il GLP-2 o glucagone. La sensibilità del metodo era compresa nell'intervallo di 2-100 pmol/l, ed i campioni di plasma sono stati esaminati in duplicato. Scongelamenti e ricongelamenti dei campioni di plasma sono stati severamente evitati. I campioni di plasma, conservati a -70°C , nel giorno del dosaggio sono stati rigorosamente scongelati a $+4^{\circ}\text{C}$ immediatamente prima dell'analisi. Ogni dosaggio è stato accompagnato da 2 campioni di controllo, prodotti per sintesi, con concentrazioni basse e alte di GLP-1 (7.7 ± 0.8 e 43.2 ± 2.5 pmol/l, rispettivamente) e da un campione di plasma umano (24.8 ± 1.8 pmol/l). Il GIP totale è stato dosato con metodo ELISA avente il 100% di reattività crociata con il GIP (1-42) e il GIP (3-42). La sensibilità del metodo per il GIP era compresa in un intervallo tra 10 e 2450 pg/ml; i campioni di sintesi ad alta e a bassa concentrazione di GIP totale e il plasma umano, utilizzati come controllo, si collocavano nei seguenti ranges: 595 ± 108 , 141 ± 38 e 28 ± 6 pg/ml, rispettivamente. La grelina totale è stata dosata con metodo ELISA avente il 100% di reattività crociata con la grelina desacilata, 80% con la grelina attiva

(acilata) e il 70% di reattività con la grelina canina. La sensibilità per la grelina totale era compresa in un intervallo tra 181 e 5800 pg/ml; i campioni di sintesi ad alta e bassa concentrazione di grelina totale e il plasma umano di controllo si collocavano nei seguenti ranges: 2465 ± 159 , 344 ± 68 e 1097 ± 279 pg/ml, rispettivamente. I campioni di sintesi e il plasma umano utilizzato come controllo hanno consentito di effettuare, lungo un periodo di 10 mesi, il controllo di qualità “within-day” e “day-to-day” il cui CV% è stato $<5\%$ e $<10\%$, rispettivamente (145).

4. STUDI

4.1. Effetti di acidi grassi n-3 e/o polifenoli sulla risposta lipidica ed entero-ormonale in soggetti ad alto rischio cardio-metabolico

Le alterazioni del metabolismo lipidico postprandiale sono considerati un fattore indipendente di rischio cardiovascolare. Per questo motivo, è importante identificare possibili strategie, basate innanzitutto su fattori nutrizionali, in grado di influenzare positivamente lo stato postprandiale. Tra i fattori dietetici, gli acidi grassi n-3 e, più recentemente, i polifenoli, sono stati indagati sia negli studi a medio termine che in acuto. L'ingestione acuta di acidi grassi sulla lipemia postprandiale può includere alterazioni nella secrezione degli ormoni intestinali. Gli ormoni intestinali che regolano, rallentando, lo svuotamento gastrico sono la CCK ed il GLP-1. La CCK, prodotta dalle cellule I dell'intestino tenue in risposta ad un pasto grasso, stimola la contrazione della cistifellea favorendo l'immissione della bile nell'intestino e la secrezione della lipasi pancreatica nel duodeno (20). Il GLP-1, prodotto dalle cellule L dell'intestino distale, svolge una funzione dose dipendente nel regolare l'attività motoria antro-piloro-duodenale ed inibendo la secrezione della lipasi gastrica. La lipasi gastrica regola il rilascio della CCK secondo un andamento bifasico proprio per assicurare un più graduale svuotamento gastrico. Uno dei promotori del rilascio del GLP-1 è il peptide rilasciante

la gastrina localizzato sugli stessi neuroni enterici di quelli della CCK (146). Un secondo e più importante promotore della secrezione del GLP-1 è il GIP, prodotto dalle cellule K del duodeno, che nei primi 15-30 min dal pasto, trasmette via cefalica, l'impulso alle cellule L del colon distale di secernere il GLP-1 (146). Gli acidi grassi polinsaturi n-3 (PUFA n-3), per la loro configurazione, potrebbero agire su vari meccanismi coinvolti nella digestione ed assorbimento degli acidi grassi esogeni. In cronico è stato dimostrato che il consumo di PUFA n-3 ha effetti benefici sul profilo lipidico. È stato visto, infatti, che gli n-3 a lungo termine riducono la sintesi dei trigliceridi agendo su meccanismi enzimatici che sono coinvolti nella sintesi degli acidi grassi e della loro β -ossidazione, rendendo disponibile infine meno substrati per la sintesi dei trigliceridi. Inoltre i PUFA n-3 inibiscono la lipogenesi de-novo ed aumentano la degradazione delle apo-B di neosintesi. A conferma di ciò, Ooi (147) ha osservato in soggetti sani, dopo 24 settimane di dieta ricca in n-3 (EPA + DHA), una riduzione dei livelli di trigliceridi postprandiali e della secrezione delle lipoproteine ricche in trigliceridi (TRL-apoB-48). Sia in vitro che nell'animale già era stato dimostrato una soppressione, da parte degli n-3 della dieta, della sintesi delle TRL-apoB-48, attraverso una riduzione della espressione dell'mRNA per l'apoB-48 e/o aumento della degradazione post-trasduzionale delle nuove apoB-48 sintetizzate. In acuto, invece, è stato dimostrato, dopo assunzione di un pasto ricco in n-

9 rispetto ad uno ricco in n-3, una aumentata sintesi di apo-B48 e di esteri retinilici (148-150) associata o non ad aumento dei trigliceridi del plasma. Questo dato è stato confermato anche in cellule di carcinoma del colon, Caco-2 (151). A conferma di questi dati lo studio di Robertson (152) dimostra una ridotta secrezione di GLP-1 e di CCK, ed un precoce aumento di trigliceridi dei chilomicroni dopo 120 minuti dall'assunzione di un pasto ricco in acidi grassi n-3. Raman (153) ha dimostrato, invece, una ridotta secrezione di apo-B48, con la sintesi di chilomicroni di dimensioni più grandi, ma numericamente ridotti, associati ad un'aumentata attività della LPL, dopo assunzione di un pasto ricco in acidi grassi n-6. In letteratura sono riportati pochi studi relativi agli effetti dei polifenoli sul metabolismo lipidico postprandiale nell'uomo ed in genere si riferiscono solo ad alcuni tipi di polifenoli. Negli animali è stato ampiamente dimostrato che le proantocianidine riducono nel plasma i livelli di TG delle VLDL e delle LDL, attraverso l'inibizione della secrezione epatica delle VLDL. Questa evidenza non è confermata nell'uomo in quanto i risultati disponibili sono molto contrastanti, forse per le differenti dosi e soprattutto per le differenti composizioni degli estratti polifenolici somministrati. Studi condotti sia sull'animale che sull'uomo riportano, invece, una significativa riduzione del colesterolo totale del plasma e del colesterolo-LDL ed un aumento del colesterolo-HDL dopo supplemento di cibi ricchi soprattutto in proantocianidine.

L'effetto ipolipidemizzante delle proantocianidine potrebbe essere legato alla ridotta idrolisi dei trigliceridi esogeni ad opera della lipasi pancreatica e ad un'aumentata escrezione di steroidi neutri e di acidi biliari riducendo il pool e l'assorbimento degli acidi grassi con la conseguenza di una ridotta sintesi del colesterolo esterificato e di chilomicroni (154). Inoltre è stato identificato di recente il recettore TGR5 sulla superficie della cellule L enteroendocrine, il quale è in grado di interagire con gli acidi biliari determinando una maggiore secrezione di GLP-1 (121). Anche attraverso questo meccanismo le proantocianidine potrebbero contribuire alla regolazione del metabolismo glico-lipidico. Diversi studi nei ratti hanno mostrato come anche le catechine del tè inibiscono l'attività della lipasi pancreatica, riducendo l'ipertrigliceridemia post-prandiale, per rallentato assorbimento dei trigliceridi. Studi condotti con l'uso di estratti di tè verde hanno prodotto risultati confondenti, dovuti alla presenza della *caffeine*. Per tale ragione studi più recenti, condotti nei ratti, hanno comparato gli effetti di supplementi sia di tè verde in polvere decaffeinato, sia di catechine del tè e catechine del tè termicamente trattate. Tutti e tre i trattamenti hanno mostrato una riduzione del peso corporeo, del tessuto adiposo epididimale, mesenterico, perirenale e retro peritoneale (155) ascrivendo alle catechine del tè la capacità di ridurre l'obesità attraverso un ridotto assorbimento intestinale dei lipidi della

dieta e stimolando il loro catabolismo nel fegato. Inoltre anche la caffeina sembra svolgere un ruolo nella regolazione del metabolismo lipidico e della omeostasi del glucosio. Il resveratrolo protegge i lipidi dalla perossidazione lipidica e inibisce l'assorbimento delle LDL-ox nella parete vascolare grazie alla sua capacità di *scavenger* delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di chelare i metalli (particolarmente il rame), prevenendo l'accumulo di LDL-ox nei macrofagi umani colpendo, così, un punto cruciale dell'aterogenesi. Anche con il succo di mirtilli, ricco in flavonoidi ed acido ellagico, somministrato come concentrato o estratto, in polvere, a soggetti con DM2, è stata osservata una significativa riduzione dei livelli di insulina serica e dei livelli di colesterolo-LDL. In modelli animali, invece, sono stati evidenziati effetti antiossidanti ed anti-ipertensivi indotti dall'assunzione degli stessi prodotti di mirtilli (156). Sulla base di questi studi è stato ipotizzato che i polifenoli potrebbero agire a vari livelli del metabolismo lipidico come la digestione, l'assorbimento e la sintesi intestinale dei chilomicroni, la produzione epatica delle VLDL, la captazione extra-epatica dei TG, la captazione epatica delle LDL e dei remnants dei chilomicroni, il metabolismo delle HDL e l'eliminazione del colesterolo (157).

Obiettivi

Valutare gli effetti di acidi grassi ω -3 e/o polifenoli sulla risposta lipidica postprandiale ed entero-ormonale in pazienti sovrappeso/obesi ad elevato rischio cardio-metabolico.

Soggetti

Sono stati arruolati 87 soggetti di ambo i sessi, con età compresa tra 35 e 70 anni, con sovrappeso/obesità e ad alto rischio cardiovascolare. I partecipanti sono stati reclutati in base ai seguenti criteri di inclusione: IMC compreso tra 25 e 35 kg/m², circonferenza vita > 102 cm per gli uomini e > 88 cm per le donne e presenza di almeno una delle seguenti anomalie della sindrome metabolica:

1. Trigliceridi a digiuno \geq 150 mg/dl
2. HDL-colesterolo a digiuno < 40 mg/dl negli uomini e <50 mg/dl nelle donne
3. IFG: glicemia a digiuno tra 100 e 125 mg/dl.
4. IGT: glicemia 2 ore dopo carico orale di 75 mg di glucosio (OGTT) tra 140 e 199 mg/dl.
5. Pressione arteriosa \geq 130/85 mmHg o in trattamento con farmaci antipertensivi.

Sono stati esclusi dallo studio i soggetti con: trigliceridemia a digiuno \geq 400 mg/dl; colesterolemia totale a digiuno >270 mg/dl; eventi cardiovascolari (infarto miocardio e/o ictus cerebrale) negli ultimi sei

mesi; diabete mellito; attività fisica intensa; insufficienza renale (creatinemia > 1.7 mg/dl) e insufficienza epatica (ALT/AST > 2 volte rispetto ai valori normali); trattamento con qualsiasi farmaco in grado di influenzare il metabolismo glicidico e lipidico (farmaci ipolipidizzanti, farmaci anti-infiammatori); anemia (Hb <12 g/dl) o qualsiasi altra malattia cronica.

Disegno dello studio

I pazienti hanno partecipato ad uno studio di intervento nutrizionale approvato dal Comitato Etico dell'Università Federico II e registrato presso ClinicalTrials.gov, NCT01154478. Dopo un periodo osservazionale (*run-in*) della durata di 3 settimane, durante il quale i pazienti continuavano a seguire la loro dieta abituale e le loro abitudini di vita, sono stati assegnati in modo casuale a uno dei quattro interventi nutrizionali, della durata di 8 settimane, differenti per il contenuto in PUFA n-3 e/o polifenoli: (A) dieta di controllo, a basso contenuto in acidi grassi ω -3 e polifenoli; (B) dieta ricca in acidi grassi n-3 e povera in polifenoli; (C) dieta povera in acidi grassi n-3 e ricca in polifenoli; (D) dieta ricca in acidi grassi n-3 e polifenoli. Dopo aver dato il consenso informato allo studio e dopo 12 ore di digiuno, i partecipanti consumavano, all'inizio e dopo 8 settimane, un pasto di circa 1000 kcal, simile alle diete a cui erano stati assegnati. Il pasto test era costituito da riso, burro, parmigiano, bresaola e pane bianco con assunzione di olio di

oliva, olio extra vergine di oliva, salmone e tè verde decaffeinato (Tabella 3).

Tabella 3. *Alimenti caratteristici dei differenti pasti test*

Alimenti	Controllo	PUFA n-3	Polifenoli	PUFA n-3 + Polifenoli
Riso (g)	75	75	75	75
Burro (g)	60	58	60	58
Pane bianco (g)	33	33	33	33
Parmigiano (g)	19	18	19	18
Bresaola (g)	50	10	47	10
Olio d'oliva (g)	6	6	-	
Olio extra-vergine d'oliva (g)	-	-	6	6
Tè verde decaffeinato (ml/bustina)	-	-	250/2	250/2
Salmone (g)	-	70		70

La composizione dei pasti test era simile per proteine (12%), lipidi (57%), CHO (31%) e colesterolo (200 mg) e differiva solo per il contenuto in acidi grassi polinsaturi a lunga catena ω -3 e per il contenuto in polifenoli (Tabella 4).

Tabella 4. *Composizione dei pasti test*

	Controllo	PUFA n-3	Polyphenols	PUFA n-3 + Polyphenols
Energia (kcal)	998	994	998	999
Proteine(%)	12	12	12	12
Grassi (%)	57	57	57	57
SFA (%)	31	31	31	31
MUFA (%)	19	17	19	17
Colesterolo(mg)	201	193	199	193
CHO (%)	31	31	31	31
Zuccheri (%)	0.6	0.8	0.6	0.8
Vitamina E (mg)	274	286	297	286
ω -3 Totali (g)	0.94	2.31	0.92	2.31
Acido Linolenico (g)	0.89	0.84	0.87	0.84
EPA (g)	0.05	0.63	0.05	0.63
DHA (g)	0	0.83	0	0.83
Polifenoli (mg)	50	50	770	770

METODI

Preparazione dei campioni di plasma

Dopo aver effettuato i prelievi di sangue a digiuno, i pazienti consumavano il pasto test entro 10 minuti. Ulteriori campioni di sangue venivano prelevati a distanza di 2, 4 e 6 ore dal pasto. Per i prelievi, allo scopo di preservare i campioni dall'autossidazione e dalla degradazione proteolitica, sono state utilizzate speciali provette sottovuoto contenenti K₃EDTA 15% + Aprotinina 250 KIU (BD Vacutainer cod. 361017, BD-Plymouth, Inghilterra) tenute in ghiaccio ed il plasma è stato separato entro 15 minuti dal prelievo mediante una centrifugazione a 3000 rpm, 4°C per 10 minuti. Per minimizzare ulteriormente la degradazione proteolitica delle apolipoproteine B, veniva aggiunto fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germania) 10 mM disciolto in isopropanolo (1.0 µl/ml di plasma).

Separazione delle lipoproteine

Il giorno successivo alla consumazione del pasto test (riportato successivamente), sui campioni di plasma a digiuno e postprandiali conservati a 4°C, sono state isolate le frazioni e subfrazioni lipoproteiche mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità discontinuo, secondo il metodo di Redgrave e Carlson (158) leggermente modificato da Karpe e colleghi (159) (fig. 6). Questo metodo si basa su un gradiente

salino costituito dalla stratificazione di quattro soluzioni di diversa densità consistenti nel plasma, la cui densità viene incrementata a 1.10 g/ml mediante l'aggiunta NaBr solido (0.1268 g/ml) e tre soluzioni di NaBr di densità decrescente. In pratica, per formare il gradiente, 4 ml di plasma $d=1.10$ g/ml sono stati trasferiti in provette per ultracentrifugazione Beckman Ultra-Clear (14x95 mm) la cui superficie interna era stata precedentemente trattata con un sottile strato di alcol polivinilico per renderla bagnabile e non più idrorepellente (160). Sul plasma sono stati, poi, accuratamente e delicatamente stratificati, 3 ml di ognuna delle soluzioni di $d=1.065$, $d=1.020$ e $d=1.006$ g/ml, rispettivamente. L'ultracentrifugazione è stata effettuata in un rotore SW40 a bracci oscillanti con una ultracentrifuga mod. Optima L-90K (Beckman Instruments, Inc, Palo Alto, CA, USA). Sono state eseguite tre corse consecutive a 15°C e a 40000 rpm per separare, in superficie, rispettivamente particelle con i seguenti indici Svedberg di flottazione (Sf): Sf >400 (chilomicroni, 32 minuti), Sf 60-400 (VLDL grandi, 3 ore e 32 minuti) e Sf 20-60 (VLDL piccole, 17 ore). Dopo ogni corsa, ogni subfrazione veniva accuratamente aspirata dalla superficie della provetta che era, poi, riempita di nuovo con 1 ml di soluzione $d=1.006$ g/ml, prima della corsa successiva. Le particelle con Sf 12-20 (IDL, 2.5 ml), Sf 0-12 (LDL, 3ml) sono state recuperate con successive e consecutive aspirazioni dopo la raccolta delle VLDL piccole. Le lipoproteine HDL

sono state, invece, separate dal plasma mediante il metodo di precipitazione con acido fosfotungstico/cloruro di magnesio (161), che allontana le lipoproteine contenenti apo B e lascia in soluzione soltanto quelle contenenti apo A, ossia le HDL.

Di seguito sono riportati i fattori di diluizione per le subfrazioni lipoproteiche isolate:

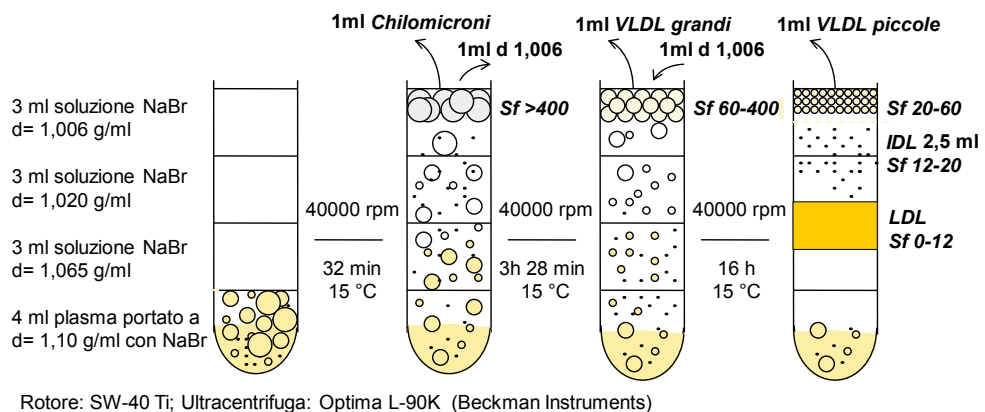
- Chilomicroni, VLDL grandi, VLDL piccole: $\frac{1}{4} = 0.25$
- IDL: $\frac{2.5}{4} = 0.625$
- LDL $\frac{3}{4} = 0.75$
- HDL (100 μ l plasma + 250 μ l reagente precipitante): $\frac{350}{100} = 3.5$

Non sono state effettuate correzioni per i preservanti aggiunti al plasma (K3EDTA, Aprotinina, PMSF) perché la diluizione da essi derivante era trascurabile.

Per lo studio oggetto della tesi di dottorato, si discuteranno soltanto i dati relativi alle lipoproteine ricche in trigliceridi tipiche della fase postprandiale (chilomicroni e VLDL grandi).

Figura 15. *Ultracentrifugazione preparativa in gradiente di densità discontinuo*

(modificata da Patti L et al - Il Giornale Italiano di Diabetologia 1999)



Dosaggio di apolipoproteine B-48 (apoB-48)

Le concentrazioni di apoB-48 sono state analizzate nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche ricche in trigliceridi (VLDL grandi) mediante un metodo ELISA (Shibayagi Co., Ltd., Shibukawa, Gunma, Giappone), automatizzato sull'autoanalizzatore Triturus (Grifolds).

Altre determinazioni

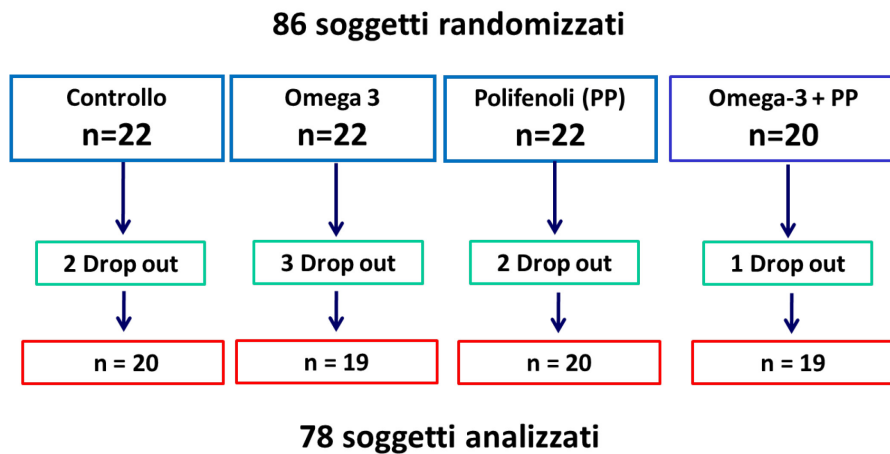
Le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle frazioni e subfrazioni lipoproteiche e le concentrazioni della glicemia sono state determinate mediante metodi enzimatico-colorimetrici (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia; Roche Diagnostics, Milano, Italia) su

un autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, Francia). Il dosaggio dell'insulina e del C-peptide è stato effettuato mediante ELISA (DIAsource ImmunoAssays S.A., Belgium). La concentrazione dell'8-isoprostano è stata valutata su un campione derivato dalla raccolta delle urine delle 24-h, mediante metodo immuno enzimatico (8-isoprostano EIA kit, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Il peso del corpo, l'altezza, la circonferenza vita, la circonferenza fianchi, il rapporto tra la circonferenza vita e la circonferenza fianchi (WHR), la pressione arteriosa sistolica (PAS) e la pressione arteriosa diastolica (PAD) sono state misurate secondo procedure standardizzate. L'indice di massa corporea (IMC) è stato calcolato secondo la seguente formula: peso (kg) / altezza (m²).

Risultati

Degli 86 soggetti reclutati, 78 hanno completato l'intervento. Ci sono stati 8 drop-out, di cui due nel gruppo controllo, tre nel gruppo omega-3, due nel gruppo polifenoli e uno nel gruppo omega-3 + polifenoli (Figura 16).

Figura 16. *Flow diagram dei partecipanti allo studio*



I quattro gruppi, al basale, erano comparabili per età, peso corporeo, BMI, pressione arteriosa, circonferenza vita e livelli a digiuno di glicemia, colesterolo, trigliceridi plasmatici e 8-isoprostano (Tabella 5).

Tabella 5. *Caratteristiche dei soggetti al basale*

	Controllo	Omega 3	Polifenoli	Omega 3 + Polifenoli	<i>p value (ANOVA)</i>
Sesso (M/F)	8/12	8/11	9/11	8/11	
Età (anni)	54±9	56±8	53±9	55±9	0.645
Peso (Kg)	87±10	86±12	87±11	84±12	0.858
BMI (kg/m²)	33±3	32±4	32±3	30±3	0.126
Circonferenza vita(cm)	104±7	105±10	104±9	101±8	0.601
Pressione sistolica (mmHg)	120±7	121±12	126±16	119±9	0.231
Pressione diastolica (mmHg)	76±8	74±7	76±9	73±8	0.663
Trigliceridi a digiuno (mg/dL)	120±47	138±68	120±60	125±78	0.787
Colesterolo a digiuno (mg/dL)	194±38	191±26	194±34	193±27	0.992
HDL colesterolo (mg/dL)	43±10	41±11	43±9	44±14	0.855
LDL colesterolo (mg/dL)	118±30	114±22	117±26	112±30	0.874
Glicemia a digiuno (mg/dL)	104±12	104±12	100±9	103±11	0.498
8-isoprostano (ng·24 h)	1176±486	1037±493	1433±752	1385±660	0.169

I dati sono espressi come M±DS.

La composizione delle diete isoenergetiche era sovrapponibile a quella prevista dal protocollo in tutti i gruppi. Come previsto, le diete erano significativamente diverse esclusivamente per contenuto di PUFA n-3, polifenoli e indice ORAC. Non vi erano differenze in termini di macronutrienti, fibre e contenuto vitaminico nei 4 gruppi (Tabella 6). Pertanto la *compliance* al trattamento dietetico è stata ottimale in tutti i gruppi sperimentali.

Tabella 6. *Adesione al trattamento dietetico nei 4 gruppi sperimentali*

	Controllo		n-3 PUFA		Polifenoli		n-3 + Polifenoli	
	A	S	A	S	A	S	A	S
Proteine (E%)	16	16±1	16	16±1	16	16±1	16	16±1
Grassi (E%)	34	33±2	34	34±1	34	34±2	34	34±2
Saturi (E%)	7	7±0	7	8±1	7	7±1	7	8±1
MUFA (E%)	21	20±2	20	20±1	19	20±2	19	19±1
PUFA n-6 (E%)	3	3±0	3	3±1	3	3±0	3	3±0
Colesterolo (mg)	193	189±31	198	202±32	173	194±17	202	197±29
CHO (%)	51	52±1	51	51±1	51	50±2	51	50±2
Semplici (%)	20	20±1	20	19±2	20	20±2	20	19±2
Fibre (g)	29	27±5	29	29±4	28	27±3	28	27±3
Vitamina C (mg)	279	265±28	284	267±18	279	252±16	275	248±25
Vitamina E (mg)	17	16±3	17	19±1	18	18±3	19	17±2
n-3 PUFA (g)	1.5	1.4±0.3	4.1	4.2±0.5	1.4	1.3±0.1	4.1	3.7±0.8
EPA (g)	0.04	0.06±0.04	1.1	1.2±0.2	0.14	0.11±0.04	1.3	1.2±0.3
DHA (g)	0.02	0.02±0.02	1.5	1.6±0.3	0.02	0.03±0.01	1.6	1.6±0.3
Polifenoli (mg)	361	318±92	365	388±55	2886	2653±254	2848	2566±477
ORAC (mmol TE)	7.0	6.5±1.4	6.8	6.9±0.4	26.8	23.7±2.5	26.4	21.3±4.9

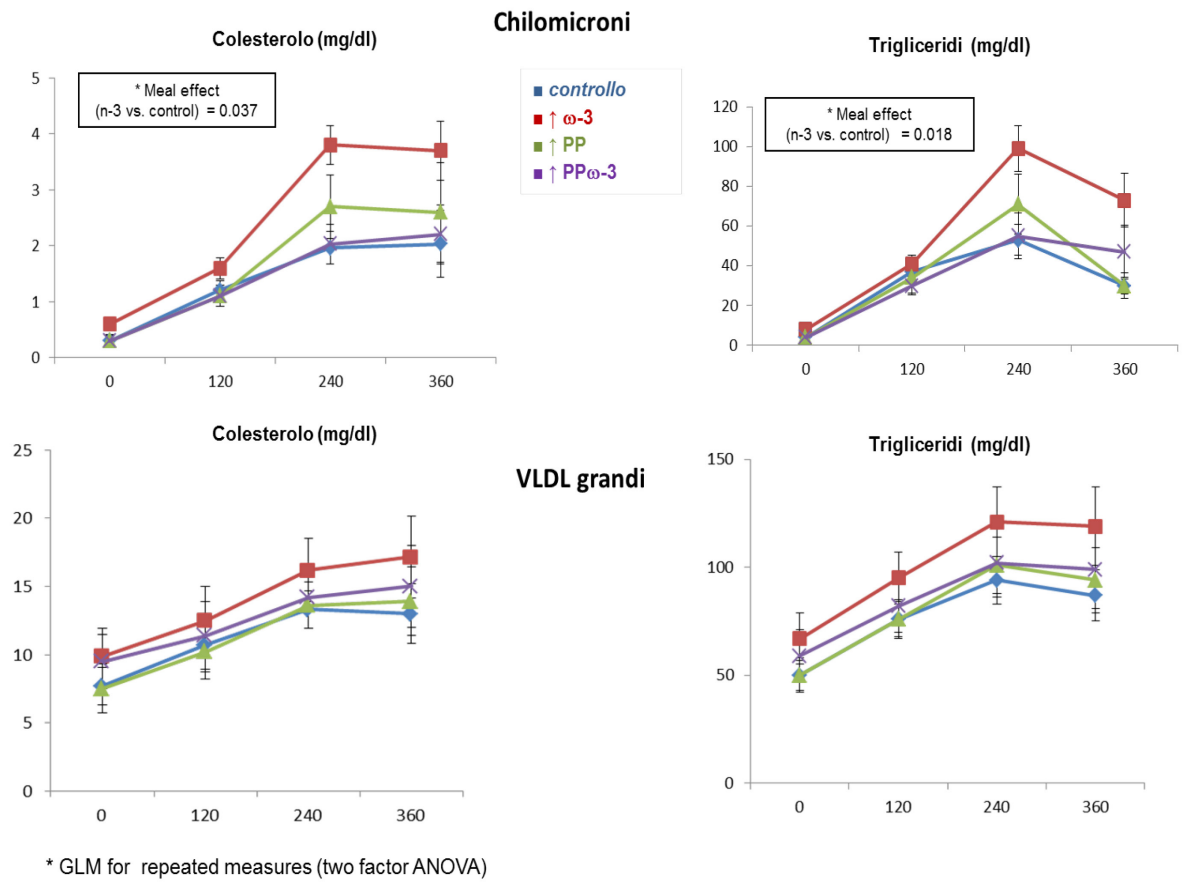
I dati sono espressi come M±DS. A = assegnata; S = seguita

Effetti in acuto dei 4 pasti test

La risposta postprandiale dei trigliceridi e del colesterolo dei chilomicroni dopo pasto test ricco in n-3 era significativamente maggiore rispetto al pasto controllo ($p=0.037$ e $p=0.018$, GLM per misure ripetute). L'aumento dei chilomicroni dopo il pasto ricco in n-3 era particolarmente evidente nella seconda parte della curva. Infatti, l'IAUC del colesterolo e dei trigliceridi dei chilomicroni era più alta rispetto all'IAUC del pasto di controllo quando calcolata tra 240 e 360 minuti (IAUC_{colesterolo} 763±136 vs 404±70 mg/dL · 120 min, $p=0.072$;

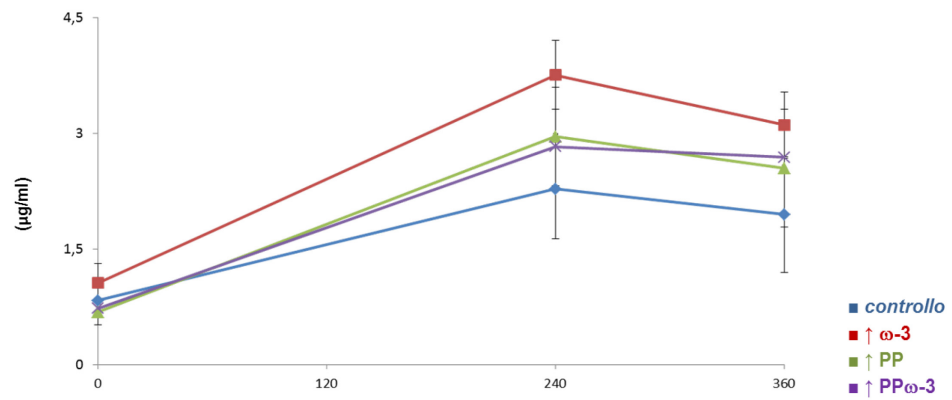
IAUC_{trigliceridi} 20376±3581 vs 10371±145570 mg/dL · 120 min, p=0.036; Dunnett test: n-3 vs controllo) e non quando calcolato tra 0 e 360 minuti. Non sono state osservate differenze significative nei livelli di lipidi postprandiali dopo la somministrazione degli altri test-meal. Per quanto riguarda la risposta del colesterolo e dei trigliceridi nelle VLDL grandi, non si sono osservate differenze dopo ogni pasto test somministrato (Figura 18). I polifenoli, comunque, sembravano controbilanciare gli effetti degli n-3: infatti la risposta lipidica dopo il pasto test ricco di n-3 e polifenoli era sovrapponibile a quella ottenuta dopo il pasto di controllo (Figura 17).

Figura 17. Colesterolo e trigliceridi nei chilomicroni e nelle VLDL grandi dopo i differenti pasti test



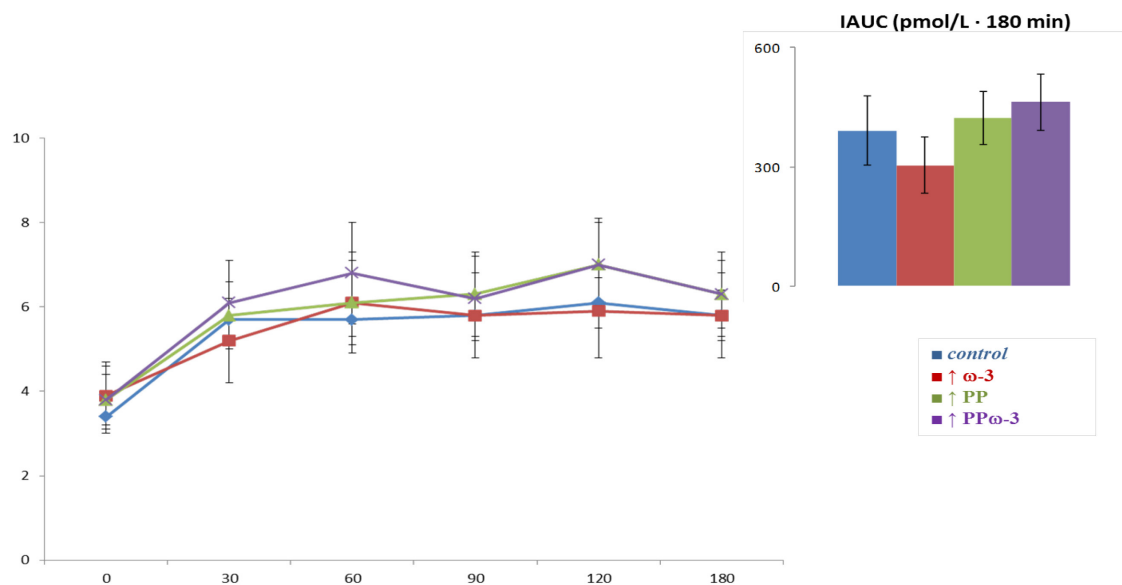
Anche l'apo B-48 delle VLDL grandi ha mostrato la stessa tendenza, ovvero un aumento maggiore dopo il pasto test ricco di n-3, sebbene la differenza non era statisticamente significativa (Figura 18).

Figura 18. Apo-B48 nelle VLDL grandi dopo i differenti pasti test



Il pasto test ricco di n-3 ha indotto anche alcune differenze nella risposta del GLP-1, infatti il GLP-1 tendeva a diminuire a 30 minuti rispetto al pasto di controllo (5.7 ± 2.1 vs 5.2 ± 2.6 pmol/l, n-3 vs controllo, $p=0.581$) ed anche l'IAUC del GLP-1 (303 ± 310 vs 391 ± 385 pmol/l · 180 min, n-3 vs controllo, $p=0.408$), tendeva ad essere più bassa dopo il pasto ricco in n-3 (Figura 19).

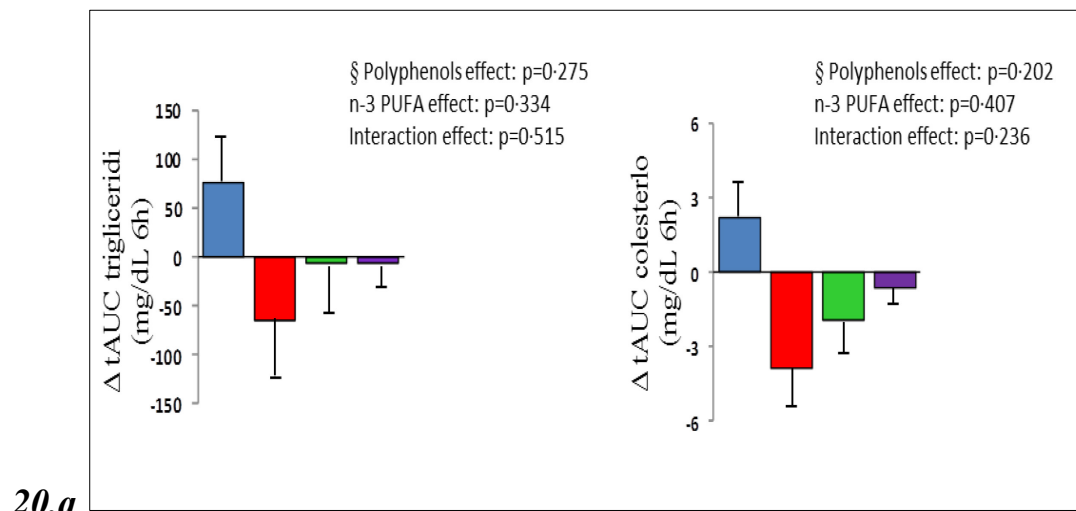
Figura 19. *GLP-1 dopo i differenti pasti test*



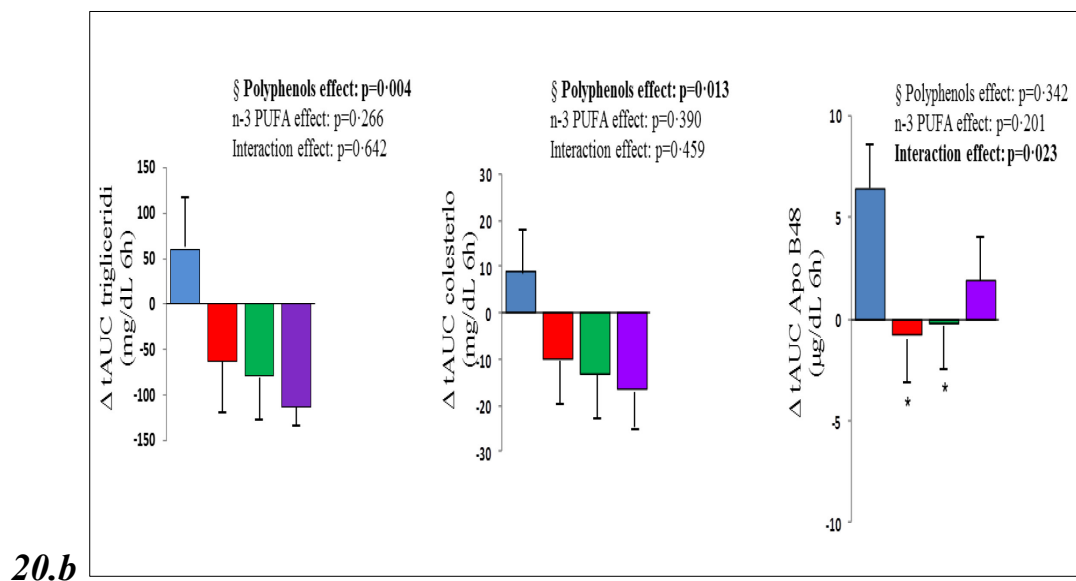
Effetti dopo 8 settimane di differenti diete con polifenoli e/o n-3

L'AUC del colesterolo e trigliceridi dei chilomicroni si riduceva nel gruppo PUFA n-3, ma non in modo significativo. L'AUC dei trigliceridi e del colesterolo delle VLDL grandi era diminuita solo dopo dieta ad alto contenuto di polifenoli ($p=0.004$ e $p=0.013$, rispettivamente), non sono stati trovati effetti significativi dopo dieta ricca in n-3 o dieta ricca in entrambi i composti (Figura 20). L'AUC dell'Apo B-48 delle VLDL grandi si riduceva sia dopo dieta ad alto contenuto di n-3 che dopo dieta ad alto contenuto di polifenoli (Figura 20) ($p<0.05$ per entrambi rispetto alla dieta di controllo) e l'interazione era significativa ($p=0.023$).

Figura 20. *Variazioni dopo le 4 diete sperimentali dell'AUC (8 settimane meno basale) del colesterolo e dei trigliceridi dei chilomicroni (20.a) e del colesterolo, trigliceridi e apo B-48 delle VLDL grandi (20.b).*



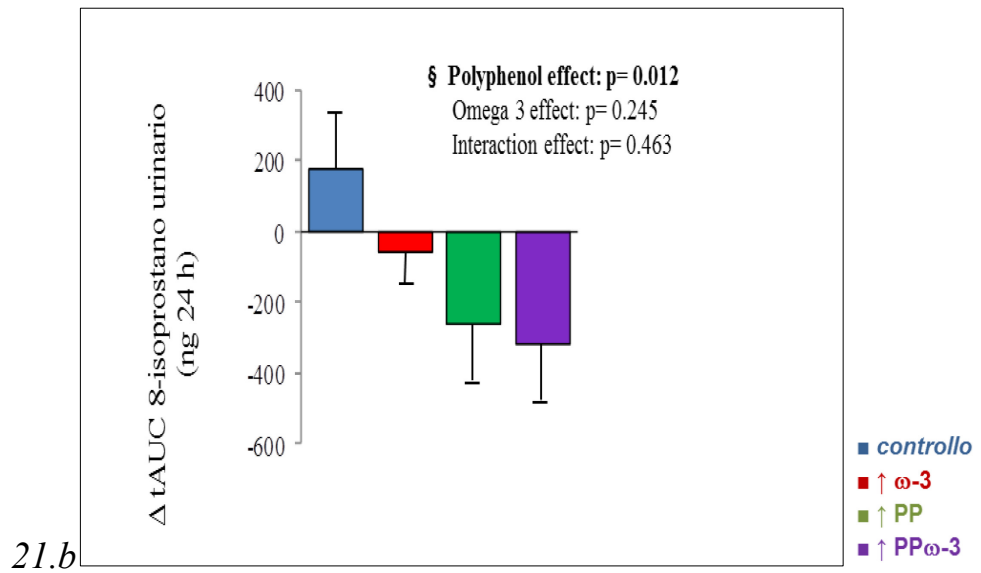
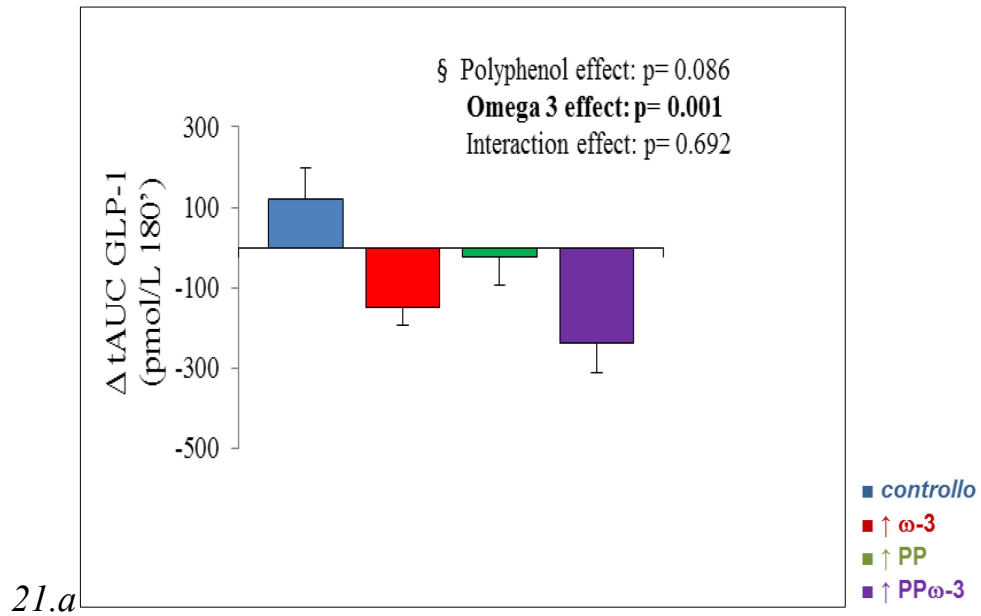
■ controllo
■ ↑ ω-3
■ ↑ PP
■ ↑ PPω-3



*p<0.05 vs controllo

Il GLP-1 si riduceva significativamente dopo dieta ricca in n-3 sia in termini di picco a 30 minuti ($p=0.008$) che in termini di AUC ($p<0.001$) (Figura 21). La concentrazione urinaria di 8-isoprastano (Figura 21), un marcatore dello stress ossidativo, si riduceva significativamente solo dopo dieta ricca in polifenoli e tale riduzione correlava significativamente con la riduzione dell'AUC del colesterolo ($r=0.356$, $p=0.002$) e dei trigliceridi delle VLDL grandi ($r=0.200$, $p=0.088$).

Figura 21. *Variazioni dopo le 4 diete sperimentali dell'AUC (8 settimane meno basale) del GLP-1 plasmatico (21.a) e dell'8-isoprostano urinario (21.b).*



Discussione

I principali risultati in fase acuta indicano che: 1) la risposta ad un pasto grasso ricco in n-3 determina un aumento del contenuto di colesterolo e trigliceridi dei chilomicroni rispetto ad un pasto di controllo; 2) un pasto ricco in polifenoli non influenza la risposta lipidica; 3) i polifenoli sembrerebbero controbilanciare gli effetti acuti degli n-3 sulla risposta postprandiale dei chilomicroni; 4) dopo il pasto test ricco in n-3 vi è una tendenza, nella fase precoce postprandiale, ad una riduzione del GLP-1.

I principali risultati dopo 8 settimane di trattamento dietetico indicano che: 1) diete ricche in n-3 riducono le lipoproteine ricche in trigliceridi in fase postprandiale; 2) diete ricche in polifenoli riducono la concentrazione postprandiale dei trigliceridi e del colesterolo delle VLDL; 3) diete ricche in n-3 tendono a ridurre la concentrazione di GLP-1; 4) diete ricche in polifenoli riducono lo stress ossidativo.

Gli effetti in acuto degli n-3 sui chilomicroni sono alquanto sorprendenti, soprattutto in relazione ai risultati ottenuti dopo 8 settimane. In fase acuta, la riduzione del GLP-1 nella fase precoce postprandiale, determinata probabilmente dagli n-3, potrebbe essere responsabile di un più rapido svuotamento gastrico che comporterebbe un maggiore assorbimento dei grassi alimentari, con conseguente aumento della produzione chilomicroni. Questi risultati sono in linea con gli studi di Robertson e colleghi che hanno evidenziato dopo pasto ricco in PUFA n-

3 un aumento della risposta postprandiale dei chilomicroni ed una riduzione della secrezione di GLP-1 (152). Tuttavia, è anche possibile che gli n-3 possano indurre una secrezione di chilomicroni che subiscono una lenta idrolisi da parte della LPL oppure siano assorbiti lentamente da parte del recettore epatico (150). Gli effetti acuti degli n-3 sui chilomicroni postprandiali non sono mantenuti dopo 8 settimane mentre diventa ben evidente la riduzione del GLP-1 implicando che, nel lungo termine, gli n-3 possono determinare l'instaurarsi di meccanismi di compensazione a livello intestinale e/o a livello del sito catabolico. Infatti studi *in vitro* e sul modello animale hanno dimostrato come la proteina di membrana CD36 coinvolta nell'assemblaggio e nella secrezione di chilomicroni, sia down-regolata in seguito a somministrazione cronica di LCFA, compromettendo così la formazione di chilomicroni (70, 71, 73). È possibile che, dopo 8 settimane di dieta ricca in n-3, la riduzione delle lipoproteine ricche in trigliceridi sia determinata da questo meccanismo.

Un altro risultato interessante del nostro studio è che il pasto ricco in polifenoli non ha un effetto acuto sulla risposta dei lipidi postprandiali, in contrasto con quanto accade cronicamente. Numerosi studi *in vitro* e sul modello animale hanno mostrato gli effetti benefici di diverse classi di polifenoli sui lipidi a digiuno e postprandiali attraverso diversi meccanismi: attivazione degli enzimi epatici coinvolti nel metabolismo

lipidico, riduzione dell'assorbimento di nutrienti, aumento della capacità antiossidante, riduzione di fattori infiammatori e/o proliferativi, modifiche della flora batterica intestinale (157). Nel nostro studio, probabilmente, solo la somministrazione cronica di polifenoli, è in grado di attivare la trascrizione del fattore Nrf2 che induce la trascrizione di geni che codificano per enzimi antiossidanti (glutathione perossidasi, superossido dismutasi, eme-ossigenasi) (162), come dimostrato da una riduzione dell'8-isoprostano; questo meccanismo potrebbe essere alla base del miglioramento della risposta lipidica osservata dopo dieta ricca in polifenoli. Naturalmente anche altri meccanismi che agiscono a livello intestinale possono spiegare il miglioramento della risposta lipidica postprandiale. Inoltre, per la prima volta, sono stati valutati gli effetti della combinazione di questi 2 componenti alimentari, n-3 e polifenoli. In acuto gli effetti degli acidi grassi n-3 sulla risposta del GLP-1 e dei chilomicroni sembrano essere controbilanciati dai polifenoli; ciò può essere legato ad un effetto *scavenger* dei polifenoli nei confronti degli n-3 (162, 163). In cronico il miglioramento dei lipidi postprandiali osservato dopo dieta ricca in n-3 e dieta ricca in polifenoli, non ha mostrato un effetto additivo quando le due componenti erano presenti insieme nella stessa dieta.

4.2. Valutazione degli ormoni gastrointestinali e dell'omeostasi glicemica due settimane ed un anno dopo chirurgia bariatrica in pazienti obesi con diabete di tipo 2: confronto tra Roux-en-Y bypass gastrico e Sleeve gastrectomy.

Introduzione

L'epidemia crescente di obesità e diabete di tipo 2 (T2DM) è da tempo riconosciuta come un grave problema sanitario. La chirurgia bariatrica si è rivelata un'opzione terapeutica molto efficace per l'obesità morbigena, dal momento che essa determina un marcato decremento ponderale ed un notevole miglioramento del controllo glicemico in pazienti con diabete tipo 2 (164) . In una revisione sistematica, Buchwald e colleghi hanno riferito che il miglioramento/risoluzione del diabete di tipo 2 si verifica nel 95% dei pazienti dopo diversione biliopancreatica (BPD), nel 80% dopo bypass gastrico (BPG) e nel 57% dopo bendaggio gastrico regolabile (164). Il miglioramento del metabolismo del glucosio si verifica precocemente, dopo BPG o BPD, prima che si sia raggiunto un significativo decremento ponderale, suggerendo l'intervento di meccanismi indipendenti dalle perdita di peso e, verosimilmente, correlati alle modifiche degli entero-ormoni conseguenti al riarrangiamento anatomico del tratto gastrointestinale (165-167). E' noto che nell'obesità e nel diabete di tipo 2 sono presenti alterazioni dell'asse

entero-insulare (168) ed è plausibile che il ripristino di una fisiologica risposta entero-ormonale indotta dagli interventi di chirurgia bariatrica possa contribuire al miglioramento dell'omeostasi glucidica. Recentemente, la SG, una procedura considerata di tipo restrittivo, ha dimostrato di esercitare effetti metabolici benefici in pazienti obesi con diabete di tipo 2, raggiungendo una percentuale di remissione del DM2 simile a quella ottenuta con BPG (169). Ad oggi, sono disponibili informazioni limitate sull'impatto della SG sulla secrezione degli entero-ormoni e sul preciso meccanismo di remissione del diabete ottenuto con tale procedura. L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare le modifiche della sensibilità insulinica, della secrezione insulinica e degli ormoni gastrointestinali in pazienti obesi con diabete tipo 2, due settimane ed un anno dopo intervento di SG o BPG, al fine di confrontare l'efficacia clinica delle due procedure e di chiarire i meccanismi fisiopatologici coinvolti nella perdita peso e nella remissione del diabete.

Metodi

Sono stati studiati 33 pazienti obesi con DM2 (M/F 14/19), età 46 ± 9 anni, BMI 44 ± 8 kg/m² ed HbA1c $7.8 \pm 2\%$, di cui diciannove sottoposti a SG e quattordici sottoposti BPG. I criteri di inclusione erano i seguenti: età 30-65 anni, indice di massa corporea BMI >40 o ≥ 35 Kg/m² con diabete di tipo 2 non controllato con trattamento medico, assenza di

controindicazioni per SG o BPG. Tutti i partecipanti sono stati esaminati da un team medico multidisciplinare e integrato costituito da un diabetologo, un chirurgo bariatrico, uno psichiatra e un dietista. La valutazione clinica e metabolica dei partecipanti è stata condotta presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia dell'Università degli Studi di Napoli, Federico II mentre le procedure bariatriche sono state eseguite presso il Dipartimento di Chirurgia dell'Ospedale San Giovanni Bosco di Napoli. Tutti i pazienti sono stati informati dei rischi e benefici delle procedure e hanno firmato un consenso informato prima di essere sottoposti all'intervento chirurgico. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Federico II di Napoli (178_2013).

Disegno dello studio

I partecipanti sono stati studiati prima, due settimane ed un anno dopo l'intervento chirurgico. In tutte le occasioni, sono stati raccolti i parametri antropometrici, clinici e di laboratorio insieme ai dati relativi sull'uso del farmaco. Inoltre, tutti i pazienti hanno eseguito un test *meal* liquido con valutazione di substrati ed ormoni nelle successive tre ore. Per evitare possibili fattori confondenti, la terapia ipoglicemizzante è stata sospesa tre giorni prima del test.

Test meal

Dopo 12 ore di digiuno, i partecipanti sono stati invitati a consumare un pasto test liquido di 304 kcal in un volume totale di 175 ml contenenti 41

g di carboidrati, 13 g di proteine e 9 g di grassi (Resource ® ENERGY Nestle Nutrition). I campioni di sangue sono stati raccolti ai tempi 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minuti in provette refrigerate K₃EDTA 15% + Aprotinina 250 KIU, immediatamente centrifugati e il plasma è stato conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

Indici

L'indice EWL (Percent of Excess Weight Lost) è stato calcolato con la seguente formula: $(\text{peso basale} - \text{peso attuale}) / (\text{peso basale} - \text{peso ideale}) \cdot 100$. L'indice EBL (Percent of Excess BMI Lost) è stato calcolato con la seguente formula: $(\text{BMI basale} - \text{BMI attuale}) / (\text{BMI basale} - 25) \cdot 100$ (170).

La secrezione e la sensibilità insulinica sono state calcolate sulla base delle concentrazioni plasmatiche di glucosio ed insulina durante il pasto test.

La *sensibilità insulinica* è stata calcolata mediante l'indice Matsuda o ISI (*Insulin Sensitivity Index*) con la seguente formula : $10.000/\text{radice quadrata } \{ \text{Glu0} \times \text{Ins0} \times (\text{Glu0} + \text{Glu60} \times 2 + \text{Glu120})/2 \times (\text{Ins0} + \text{Ins60} \times 2 + \text{Ins120})/2 \}$ (171) e mediante l'indice OGIS (*Oral Glucose Insulin Sensitivity*) che, in aggiunta ai valori di insulina e glicemia a diversi tempi dopo il carico, tiene conto anche dei parametri di peso, altezza e superficie corporea (172). Sono stati calcolati due indici di *secrezione insulinica*: l'AIR (*Acute Insulin Response*) che esprime la risposta

insulinica precoce al pasto (dopo 30 minuti) e il *disposition index* (DI) che esprime la secrezione insulinica aggiustata per la sensibilità, calcolato come il rapporto tra l'area totale sotto la curva dell'insulina e l'area totale sotto la curva del glucosio moltiplicato per l'indice di sensibilità insulinica $[(AUC_{\text{insulinemia}}/AUC_{\text{glicemia}}) \cdot \text{ISI}]$ (173). La risoluzione del diabete dopo chirurgia bariatrica è stata definita come glicemia <100 mg/dl e HbA1c <6%, in assenza di terapia farmacologica.

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software statistico SPSS versione 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard. Le variabili non normalmente distribuite sono state trasformate in logaritmo o sono stati utilizzati test non parametrici. Le risposte ormonali sono state espresse come area sotto la curva (AUC) utilizzando il modello trapezoidale e le concentrazioni plasmatiche massime (Cmax). I confronti all'interno del gruppo ai vari tempi sono stati eseguiti mediante ANOVA. Per i confronti tra i due gruppi è stato effettuato il *t-test* per dati appaiati, confronto tra medie. Il test del chi-quadrato è stato utilizzato per il confronto tra proporzioni. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Risultati

Perdita di peso e controllo glicemico

Le principali caratteristiche cliniche e metaboliche dei partecipanti sono riportate in tabella 1.

Non vi erano differenze significative prima dell'intervento tra i gruppi BPG e SG per quanto riguarda l'età, il BMI, la durata del diabete, il compenso glicemico ed il profilo lipidico (**Tabella 7**). La maggior parte dei partecipanti erano in trattamento con ipoglicemizzanti orali, il 74% dei pazienti nel gruppo SG e il 64% nel gruppo BPG erano ipertesi, mentre la dislipidemia era presente in circa il 35% dei pazienti in entrambi i gruppi (**Tabella 7**).

Tabella 7. *Caratteristiche cliniche e metaboliche dei soggetti prima dell'intervento*

	BPG	SG
N	14	19
M/F	6/8	8/11
Età (anni)	49±7	44±10
Peso (Kg)	119±20	130±28
BMI (Kg/m²)	42±6	46±9
Durata del DM2	5±5	4±4
Glicemia a digiuno (mg/dl)	173±50	151±45
Insulinemia a digiuno (μU/ml)	27±10	28±15
HbA1c (%)	8.1±2.2	7.6±2
Colesterolo totale (mg/dl)	202±26	207±57
Colesterolo HDL (mg/dl)	44±8	44±10
Colesterolo LDL (mg/dl)	120±25	127±48
Trigliceridi (mg/dl)	195±76	220±120
SBP (mmHg)	129±13	128±15
DBP (mmHg)	75±7	77±7
Uso di ipoglicemizzanti (n)	9	15
Uso di ipoglicemizzanti + insulina (n)	3	2
Uso di anti-ipertensivi (n)	9	14
Uso di ipolipidemizzanti (n)	3	5

I dati sono espressi come M±DS. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale

Dopo 2 settimane dall'intervento, il decremento ponderale era maggiore nel gruppo BPG rispetto a SG (Tabella 8), mentre un anno dopo l'intervento chirurgico la perdita di peso, valutata anche con gli indici EWL% ed BML%, era simile nei due gruppi (Tabella 8).

Tabella 8. *Modifiche dei parametri antropometrici dopo 2 settimane e 12 mesi dagli interventi chirurgici*

	BPG	SG	BPG	SG
<i>Parametri</i>	2 settimane		12 mesi	
Δ peso (Kg)	-16 \pm 9	-10 \pm 4*	-40 \pm 15	-39 \pm 18
Δ BMI (Kg/m ²)	-6 \pm 3	-4 \pm 2*	-14 \pm 5	-14 \pm 6
EWL (%)	25 \pm 12	19 \pm 7	58 \pm 16	66 \pm 15
BMIL (%)	30 \pm 16	23 \pm 7	70 \pm 24	78 \pm 15

I dati sono espressi come M \pm DS. *p<0.05 vs BPG. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale.

Un anno dopo l'intervento, si osservava un marcato miglioramento del compenso glicemico, con una riduzione del 2% dell'emoglobina glicata in entrambi i gruppi. Ad 1 anno, la remissione totale del diabete si verificava in 13 pazienti dopo SG (68%) e in 9 pazienti dopo BPG (64%). Tutti i pazienti, eccetto due pazienti dopo SG e tre pazienti dopo BPG, sospendevano la terapia anti-ipertensiva. Un anno dopo l'intervento chirurgico, un paziente nel gruppo BPG e due pazienti del gruppo SG continuavano il trattamento ipolipidemizzante.

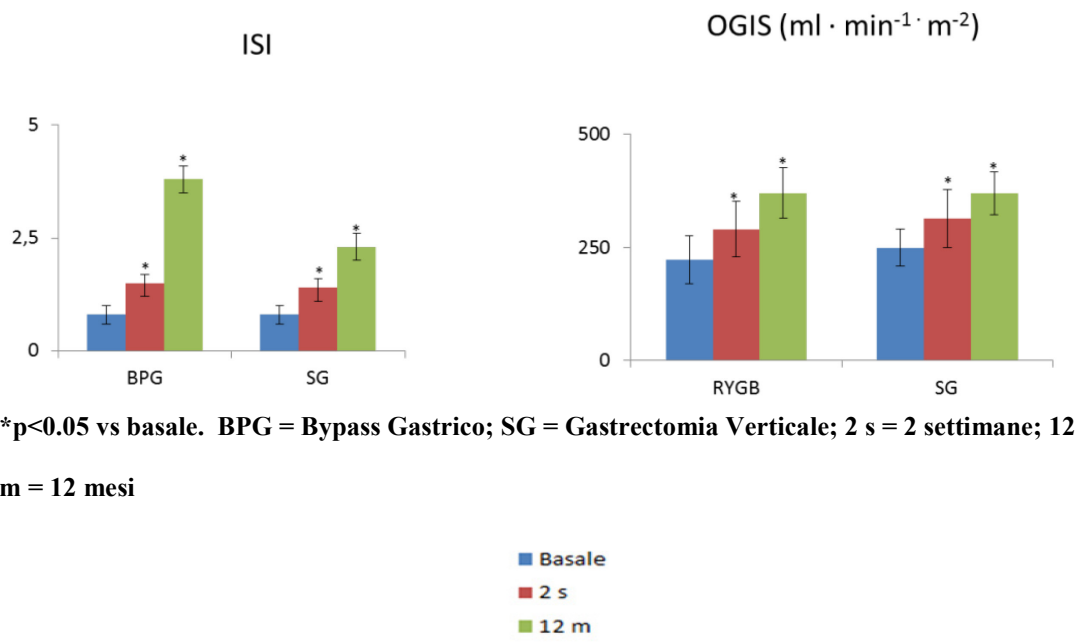
Sensibilità e secrezione insulinica

La sensibilità insulinica, espressa come ISI, aumentava in egual misura dopo i due interventi (circa due volte dopo 2 settimane e circa tre volte dopo un anno) (Figura 21). Anche l'indice OGIS aumentava significativamente sia 2 settimane che 12 mesi dopo gli interventi, senza

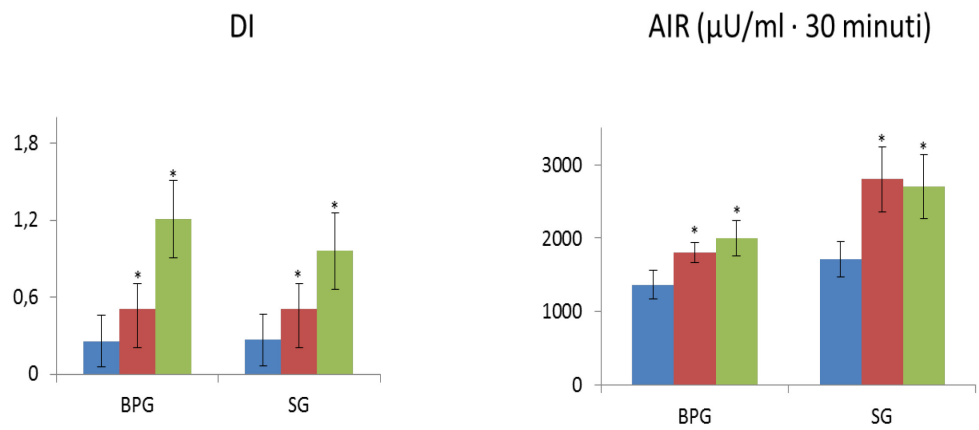
differenze tra le due procedure (SG: 249 ± 41 vs 314 ± 64 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$ vs 369 ± 47 ; BPG: 223 ± 53 vs 290 ± 61 vs 370 ± 55 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$).

L'AIR aumentava significativamente dopo BPG e dopo SG sia a 2 settimane che a 12 mesi (Figura 22) ($p < 0.05$), mentre l'insulinemia 2 ore dopo il pasto si riduceva significativamente dopo entrambi gli interventi (22 ± 15 a 2 settimane e 14 ± 5 $\mu\text{U}/\text{ml} \cdot 180$ minuti 1 anno dopo BPG, $p < 0.001$) e (30 ± 18 a 2 settimane e 18 ± 7 $\mu\text{U} / \text{ml} \cdot 180$ minuti 1 anno dopo SG, $p < 0.001$ per tutti). L'indice DI, che esprime la secrezione insulinica corretta per la sensibilità, aumentava di circa due volte 2 settimane e circa quattro volte un anno dopo le due procedure (0.5 ± 0.2 e 1.0 ± 0.7 , rispettivamente 2 settimane e 1 anno dopo SG e 0.5 ± 0.3 e 1.2 ± 0.9 rispettivamente 2 settimane e un anno dopo BPG).

Figura 22. *Indici di sensibilità e secrezione insulinica prima, 2 settimane e 12 mesi dopo BPG o SG.*



*p < 0.05 vs basale. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale; 2 s = 2 settimane; 12 m = 12 mesi



*p < 0.05 vs basale. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale; 2 s = 2 settimane; 12 m = 12 mesi

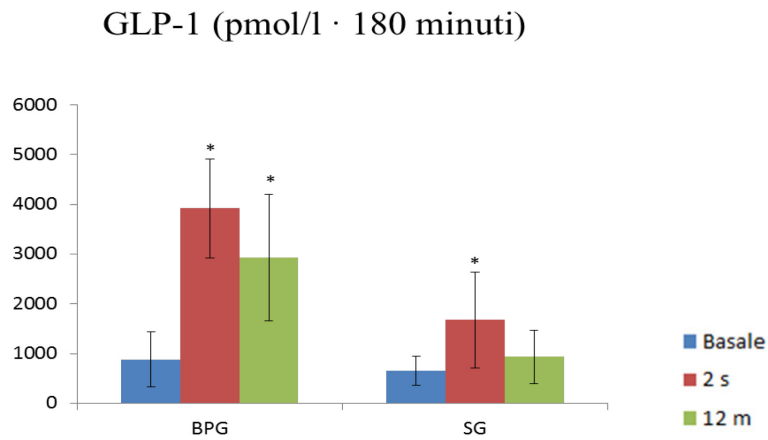
Risposta entero-ormonale al pasto misto

La risposta del GLP-1 al pasto misto era piuttosto piatta in fase pre-operatoria in tutti i pazienti. Dopo due settimane dall'intervento la risposta del GLP-1 al pasto misto, valutata sia in termini di AUC che in termini di C_{max} aumentava significativamente in entrambi i gruppi, sebbene in misura maggiore dopo BPG (AUC_{GLP-1}: 3920±2071 vs 1674±957 pmol/l · 180 minuti, rispettivamente, p <0.001 e C_{max} 30': 35±22 vs 22±14 pmol/l, rispettivamente, p=0.018). Dopo 12 mesi dall'intervento chirurgico, la risposta del GLP-1 si manteneva elevata nel BPG mentre ritornava ai valori basali dopo SG (AUC_{GLP-1}: 2927±1273 vs 935±538 pmol/l · 180 min, rispettivamente, p<0.001 e C_{max} 30': 44±20 vs 9±7 pmol/l, rispettivamente, p<0.001).

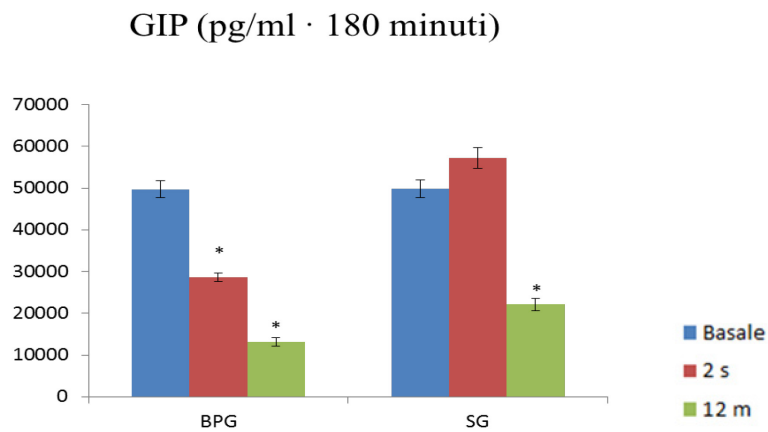
La risposta postprandiale del GIP era pressoché immodificata dopo 2 settimane dall'intervento nel gruppo SG (49769±2253 vs 57283±33581 pg/ml · 180 min, p=0.145), mentre si riduceva significativamente dopo BPG (49727±23793 vs 28718±13108 pg/ml · 180', p=0.002). Dopo 1 anno la soppressione del GIP, rispetto ai valori basali, era significativa dopo entrambi gli interventi e non vi erano differenze tra i due gruppi (Δ AUC_{GIP}: -19419±16052 per SG vs -26768±21798 per BPG pg/ml · 180', p=0.344). Le concentrazioni di grelina a digiuno (372±259 vs 391±49 pg/ml, p=0.813) e postprandiali (AUC_{Grelina}: 41234±24390 vs 39681±29046 pg/ml · 120', p= 0.869) erano simili nei due gruppi in fase

pre-operatoria. La risposta della grelina al pasto misto era marcatamente soppressa dopo SG sia a 2 settimane che a 12 mesi, mentre nessun cambiamento era osservato dopo BPG (Figura 23, Tabella 9).

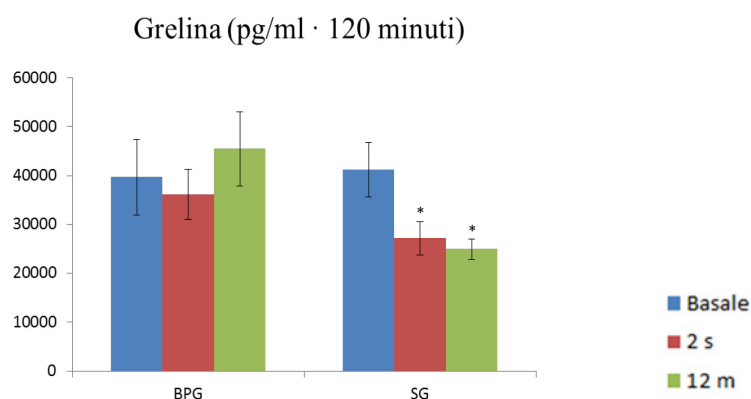
Figura 23. Risposta entero-ormonale (AUC) al pasto misto prima, 2 settimane e 12 mesi dopo BPG o SG.



* $p < 0.05$ vs basale. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale; 2 s = 2 settimane; 12 m = 12 mesi



* $p < 0.05$ vs basale. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale; 2 s = 2 settimane; 12 m = 12 mesi



* $p < 0.05$ vs basale. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale; 2 s = 2 settimane; 12 m = 12 mesi

Tabella 9. Modifiche degli entero-ormoni a digiuno ed in fase postprandiale prima, 2 settimane e 12 mesi dopo BPG o SG.

Parametri	BPG			SG		
	Basale	2 s	12 m	Basale	2 s	12 m
GLP-1 basale (pmol/L)	5±4	3±1	4±3	3±1	4±3	4±3
Cmax GLP-1 (pmol/L)	7±5	35±21*	44±20*	4±1	22±14*	9±7*
GIP basale (pg/ml)	128±53	44±19*	41±18*	90±56	87±56	49±26*
Cmax GIP (pg/ml)	325±132	221±128*	139±46*	407±191	455±347	248±115*
Grelina basale (pg/ml)	372±259	348±162	443±169	391±249	224±116*	200±42*
Soppressione Grelina (pg/ml)	-53±80	-73±46	-88±97	-85±110	-0.5±15*	-0.3±12*

I dati sono espressi come $M \pm ES$. * $p < 0.05$ vs basale in ciascun gruppo. BPG = Bypass Gastrico; SG = Gastrectomia Verticale; 2 s = 2 settimane; 12 m = 12 mesi; Cmax GLP-1 = GLP-1 30 minuti; Cmax GIP = GIP 60 minuti, Soppressione Grelina = Grelina 120 minuti – Grelina basale.

Correlazioni

È stata osservata una correlazione positiva tra la perdita di peso e l'indice di sensibilità insulinica ($p=0.021$), mentre è stata trovata una correlazione negativa tra la perdita di peso e l'HbA1c ($p=0.01$), l'insulinemia a digiuno ($p=0.031$) e la Cmax del GIP ($p=0.014$). La risposta del GIP era significativamente associata con la glicemia a digiuno ($p=0.007$) e con l'indice della funzione β -cellulare ($p=0.05$), mentre la risposta del GLP-1 correlava positivamente con la sensibilità all'insulina ($p=0.029$).

Discussione e conclusioni

In questo studio abbiamo valutato l'omeostasi del glucosio e il profilo entero-ormonale in pazienti gravemente obesi con diabete di tipo 2 a seguito di interventi di chirurgia bariatrica, al fine di chiarire i meccanismi fisiologici sottesi alla perdita di peso e alla remissione del diabete di tipo 2, in relazione al differente riarrangiamento dell'anatomia intestinale. Dopo 12 mesi, i due interventi sono risultati ugualmente efficaci nel determinare un durevole miglioramento del controllo glicemico, della sensibilità e della secrezione insulinica, con una percentuale di remissione del DM2 simile nei due gruppi. Nel presente studio, la sensibilità insulinica è aumentata di circa il 60% con entrambe le procedure e questo miglioramento è correlato in modo significativo con la perdita di peso e con la risposta postprandiale del GLP-1.

Il rapido miglioramento della sensibilità insulinica, ben evidente già dopo due settimane dall'intervento è in linea con i dati della letteratura che evidenziano come tale miglioramento sia quantitativamente molto maggiore di quanto l'entità del decremento ponderale farebbe prevedere. Una recente revisione sistematica riporta una riduzione del 60% dell'insulino-resistenza dopo interventi di bypass o diversione biliopancreatica a fronte di un decremento ponderale dell'11% (174). Questi risultati suggeriscono che meccanismi indipendenti dalla perdita di peso possono contribuire al miglioramento della sensibilità insulinica dopo chirurgia bariatrica, quali riduzione della lipotossicità (175), modifiche dell'espressione dei geni che regolano il metabolismo del glucosio e degli acidi grassi in risposta alla bassa disponibilità di nutrienti (176), riduzione della leptino-resistenza (177), ripristino della pulsatilità dell'adiponectina (178), l'esclusione del duodeno e del digiuno prossimale (179). Un miglioramento della sensibilità insulinica indipendente dal decremento ponderale è stata osservata precocemente anche dopo SG in pazienti diabetici obesi (180). È interessante notare che nel nostro studio abbiamo trovato una stretta associazione tra l'indice di insulino-sensibilità e la risposta post-prandiale del GLP-1, suggerendo che le elevate concentrazioni di GLP-1 contribuiscono alla riduzione dell'insulino-resistenza. La relazione tra GLP-1 e sensibilità insulinica è supportata da studi precedenti nel modello animale che dimostrano come

la sovra-espressione di GLP-1 sia in grado di aumentare l'insulino-sensibilità epatica (181), ed inoltre, l'infusione di GLP-1 nell'uomo è in grado di sopprimere la produzione epatica di glucosio (182). Il trattamento prolungato con agonisti del recettore del GLP-1 è associato ad un miglioramento della sensibilità all'insulina sia in volontari sani (183) che in pazienti con diabete di tipo 2 (184). Per quanto riguarda la funzione β -cellulare, nel nostro studio abbiamo osservato un miglioramento significativo della prima fase di secrezione insulinica di pari entità con i due interventi; inoltre, il DI, che esprime la funzione delle cellule β rispetto alla prevalente insulino-resistenza, risultava notevolmente aumentato dopo chirurgia bariatrica. Questo risultato è in linea con studi precedenti che dimostrano come dopo chirurgia bariatrica vi sia un ripristino della risposta dinamica della β -cellula (185), mentre le concentrazioni di insulina a digiuno o dopo stimolo di glucosio orale o endovena (186,187) si riducano come conseguenza della riduzione della resistenza all'insulina. Nel nostro studio, abbiamo osservato una associazione negativa tra la funzione β -cellulare e la secrezione di GIP, il che implica che il ripristino della funzione β -cellulare è maggiore nei pazienti che hanno mostrato una maggiore riduzione dei livelli di GIP dopo intervento. Questo risultato suggerisce una attenuazione/inversione della GIP-resistenza, anomalia comunemente riscontrata nei soggetti con diabete di tipo 2 (188).

Mentre le due procedure chirurgiche hanno avuto un impatto simile sulla sensibilità e secrezione insulinica, profondamente diverse sono risultate le modifiche del profilo entero-ormonale. Dopo BPG, si è verificato un marcato aumento del GLP-1, come documentato anche nello studio di Rhee e colleghi (189), associato ad una parziale soppressione del GIP mentre i livelli di grelina rimanevano sostanzialmente immutati. Dopo SG, la risposta del GLP-1 aumentava ma rimaneva significativamente più bassa rispetto al BPG, i livelli di GIP si riducevano e, soprattutto, vi era una marcata soppressione dei livelli di grelina sia a digiuno che in fase postprandiale.

I dati sulle modifiche di GIP dopo le diverse procedure bariatriche sono piuttosto discordanti. Whitson e colleghi non hanno trovato alcuna variazione dei livelli di GIP 6 mesi dopo BPG (190), mentre Rubino e colleghi hanno rilevato una riduzione del GIP a digiuno in soggetti diabetici, ma non nei soggetti non diabetici 3 settimane dopo BPG (191). Al contrario, Laferrere e colleghi (165) hanno trovato un aumento dei livelli post-prandiali di GIP nei pazienti diabetici un mese dopo BPG. La ragione di questa discrepanza non è chiara e potrebbe essere correlata alle differenze dei metodi analitici utilizzati (GIP totale vs GIP attivo), le caratteristiche della popolazione studiata (diabetici vs non diabetici) e la durata del *follow-up*. Allo stato attuale, sono disponibili informazioni limitate sulle modifiche del profilo incretinico dopo SG, soprattutto per

quanto riguarda il lungo termine. Recenti studi hanno rilevato un aumento dei livelli di GLP-1 in pazienti obesi 12 mesi dopo SG associati ad una marcata riduzione di grelina (180, 192). Sebbene la SG non comporta diversione intestinale, è possibile che l'effetto osservato sulle incretine sia mediata dalla rimozione dello stomaco con conseguente soppressione di grelina e attivazione di meccanismi neurali o paracrini, secondo l'ipotesi gastrica (193). L'osservazione che le due tecniche bariatriche hanno una simile efficacia clinica ma rilevanti differenze nel *pattern* entero-ormonale, suggerisce che l'esclusione del duodeno dal transito dei nutrienti (*forquet hypothesis*), non è essenziale per il miglioramento/remissione del diabete. In conclusione, il BPG e la SG sono ugualmente efficaci nel migliorare la secrezione e la sensibilità all'insulina nei pazienti obesi con diabete di tipo 2. Il ripristino del GLP-1 dopo BPG, associato ad una riduzione dei livelli plasmatici di GIP e, verosimilmente delle GIP-resistenza, sembra giocare un ruolo predominante nella remissione del diabete, mentre la soppressione della grelina, associata ad una riduzione dei livelli plasmatici di GIP, potrebbe contribuire alla remissione del diabete dopo SG. Alla luce delle evidenze scientifiche, accumulate negli ultimi anni sulle sorprendenti modifiche indotte dalla chirurgia bariatrica, è legittimo ritenere che la cosiddetta "magia metabolica" conseguente alla chirurgia bariatrica non sia ascrivibile alla modifica di un singolo fattore o di un singola

pathway, ma sia la risultante di numerosi eventi di natura metabolica, ormonale e neurale su cui rimane ancora molto da indagare.

4.3. Effetti a breve e a medio-lungo termine della chirurgia bariatrica sulla lipemia postprandiale e sugli ormoni gastrointestinali in pazienti obesi con diabete di tipo 2

Introduzione

È noto che gli interventi di chirurgia bariatrica attuati per la terapia dell'obesità morbigena sono in grado di influenzare positivamente il metabolismo glucidico e lipidico a digiuno in soggetti con DM2. Mentre il miglioramento della glicemia, mediato in parte dal ripristino dell'asse entero-insulare, è stato ampiamente documentato, non vi sono dati sul metabolismo lipidico postprandiale che, verosimilmente, dovrebbe essere fortemente influenzato dalla chirurgia bariatrica. Queste informazioni potrebbero avere un'importante ricaduta clinica dal momento che anche le alterazioni del metabolismo lipidico postprandiale rappresentano un fattore indipendente di rischio cardiovascolare (194). Inoltre, non è stato ancora indagato se le modifiche degli entero-ormoni conseguenti agli interventi bariatrici siano in grado di influenzare il metabolismo lipidico. Questa ipotesi trova supporto in recenti studi che dimostrano che la terapia con incretino-mimetici o inibitori del DPP-IV esercita effetti benefici che vanno ben oltre il controllo glicemico, quali un netto miglioramento delle lipoproteine in fase postprandiale (195,196). Pertanto, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare

gli effetti a breve termine (2 settimane) e medio-lungo termine (12-24 mesi) della chirurgia bariatrica sul metabolismo lipidico a digiuno e post-prandiale in soggetti obesi con DM2 e valutare se tali effetti sono in relazione con le modifiche degli entero-ormoni (GLP-1, GIP), il cui ruolo nella regolazione dell'omeostasi lipidica è ampiamente documentato nel modello animale (32, 36, 37).

Metodi

Partecipanti

Sono stati studiati 25 pazienti obesi con DM2 (12 uomini e 13 donne) che soddisfacevano i seguenti criteri di inclusione: età compresa tra 30 e 65 anni, indice di massa corporea (IMC) ≥ 35 Kg/m², durata del DM2 >6 mesi, scarso controllo del diabete nonostante terapia medica, assenza di trattamento con statine o altri farmaci ipolipidemizzanti, eleggibilità alla chirurgia bariatrica (gastrectomia verticale, SG o Roux-en-Y bypass gastrico, BPG). Tutti i partecipanti sono stati esaminati da un team multidisciplinare costituito da un diabetologo, un chirurgo bariatrico, uno psichiatra e un dietista. Quindici pazienti sono stati sottoposti a SG e dieci a BPG. Le valutazioni cliniche e metaboliche dei partecipanti sono state condotte presso il Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia della Università Federico II, mentre l'intervento chirurgico è stato eseguito presso il Dipartimento di Chirurgia dell'Ospedale S. Giovanni Bosco di Napoli. Tutti i pazienti sono stati informati sui rischi e benefici

relativi ad ogni procedura e hanno firmato il consenso informato prima di sottoporsi all'intervento chirurgico. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Federico II di Napoli (178_2013).

Disegno sperimentale

I partecipanti sono stati studiati prima, due settimane, 12 e 24 mesi dopo l'intervento chirurgico. In tutte le occasioni sono stati raccolti i parametri antropometrici, clinici e di laboratorio insieme ai dati sulla terapia farmacologica. Inoltre, i livelli plasmatici di glucosio, insulina, lipidi ed entero-ormoni (GLP-1, GIP) sono stati valutati a digiuno e per 3 ore dopo l'assunzione di un pasto misto.

Pasto misto

Al mattino, dopo un digiuno di 12 ore, tutti i pazienti hanno consumato un pasto misto (Resource ® ENERGY Nestlé Nutrition), che consisteva in un drink di 175 ml (304 kcal), contenente 41 g di carboidrati, 13 g di proteine e 9 g di lipidi. Tutti i pazienti sono stati invitati a consumare il pasto entro 30 min. I campioni di sangue sono stati prelevati ai tempi 0, 30, 60, 90, 120 e 180 minuti, raccolti in provette K₃EDTA 15% + Aprotinina 250 KIU refrigerate e sono stati immediatamente centrifugati a 4°C. Il plasma è stato conservato a - 80° C fino al momento delle determinazioni.

Calcoli

L'indice HOMA-IR è stato calcolato con la seguente formula: glicemia a digiuno (mg/dl) x insulina a digiuno ($\mu\text{U/l}$)/405. Le aree incrementali della glicemia, insulina, trigliceridi, colesterolo totale, colesterolo HDL ed entero-ormoni postprandiali sono state calcolate con il metodo trapezoidale, come area sotto la curva, escludendo i valori al basale (IAUC).

Risultati

Dal momento che le variazioni di peso e dei principali parametri metabolici ottenute due settimane dopo l'intervento sono risultate simili con i due interventi, l'analisi statistica è stata effettuata sull'intero campione. Le caratteristiche cliniche e la terapia farmacologica dei 25 pazienti al basale sono riportate in tabella 10.

Tabella 10. *Caratteristiche dei partecipanti prima dell'intervento chirurgico*

Caratteristiche dei partecipanti pre-intervento	
N	25
Maschi/Femmine (n)	12/13
Età (anni)	48±8
SG/BPG (n)	15/10
Durata T2DM (anni)	4±4
Peso corporeo (kg)	117±19
BMI (kg/m ²)	44±7
Glicemia a digiuno (mg/dl)	171±79
Insulinemia a digiuno (μU/ml)	24±10
HOMA-IR	10±5
<i>Terapia</i>	
Dieta (n)	2/25
Ipoglicemizzanti orali (n)	21/25
Ipoglicemizzanti orali + insulina (n)	2/25
Insulina (n)	0/25
Farmaci antiipertensivi (n)	15/25

I dati sono espressi come M±DS

Due settimane dopo l'intervento, si osservava una significativa riduzione dell'IMC (44 ± 7 vs 39 ± 7 kg/m², $p<0.001$) che diventava ancora più marcata dopo 12 e 24 mesi, epoca in cui circa il 70% dei pazienti raggiungeva un BMI pari o inferiore a 30 kg/m². La glicemia e l'insulinemia a digiuno si riducevano significativamente dopo CB con un marcato miglioramento della resistenza insulinica, come evidenziato dalla diminuzione del 50% dell'indice HOMA-IR (Tabella 11). Il miglioramento osservato dopo 2 settimane si confermava dopo 12 mesi e 24 mesi, con una riduzione dell'HOMA-IR pari al 70%.

Tabella 11. *Modifiche del BMI, glicemia, insulinemia e HOMA-IR dopo chirurgia bariatrica*

Parametri	Basale	2 sett	12 m	24 m
BMI (Kg/m ²)	44±7	39±6*	30±4*	30±6*
Glicemia (mg/dl)	171±79	132±36*	99±22*	98±18*
Insulinemia (μU/ml)	24±10	18±10*	15±7*	12±7*
HOMA-IR	10±5	5.7±2.8*	3.7±2*	2.9±1.6*

I dati sono espressi come M±DS. *p<0.05 vs basale. 2 sett = 2 settimane; 12 m = 12 mesi; 24 m = 24 mesi.

Lipidi

Dopo 2 settimane dall'intervento chirurgico si è osservato una significativa riduzione delle concentrazioni a digiuno di TG, col-totale e col-HDL (Tabella 12). Tale riduzione si confermava dopo 12 e 24 mesi per i TG e per il colesterolo totale, mentre il col-HDL aumentava significativamente rispetto ai valori basali. L'IAUC dei TG plasmatici durante il *test-meal* diminuiva rispettivamente del 64%, 52% e 61% dopo 2 settimane, 12 mesi e 24 mesi (p<0.001 vs basale), mentre non si osservava nessuna differenza significativa per quanto riguarda l'IAUC del col-totale e del col-HDL (tabella 12). Analizzando la risposta lipidica postprandiale in base al tipo di intervento chirurgico (SG o BPG), non è stata riscontrata alcuna differenza tra le due procedure.

Tabella 12. Modifiche dei lipidi a digiuno e in fase postprandiale (IAUC) dopo chirurgia bariatrica

Parametri	Basale	2 sett	12 m	24 m
Trigliceridi (mg/dl)	186±27	141±13*	79±5*	90±5*
Colesterolo Totale (mg/dl)	171±10	145±6	149±7*	148±10*
HDL-colesterolo (mg/dl)	38±2	32±2*	48±2*	51±4*
IAUC	Basale	2 sett	12 m	24 m
Trigliceridi (mg/dl · 180 min)	4520±1082	1332±564*	2161±537*	1774±803*
Colesterolo Totale (mg/dl · 180 min)	294±952	-463±252	-265±233	-1074±604
HDL-colesterolo (mg/dl · 180 min)	-112±108	-213±108	-186±124	-655±248

I dati sono espressi come M±ES. *p<0.05 vs basale. 2 sett = 2 settimane; 12 m = 12 mesi; 24 m = 24 mesi.

Entero-ormoni

Due settimane dopo CB, la risposta al pasto test, valutata come IAUC (Tabella 13), del GIP non si modificava in modo significativo, mentre la risposta del GLP-1 attivo aumentava significativamente rispetto al pre-intervento (Tabella 13). Dopo 12 e 24 mesi persisteva l'aumento del GLP-1 mentre la l'IAUC del GIP si riduceva progressivamente (Tabella 13).

Tabella 13. *Modifiche degli entero-ormoni in fase postprandiale (IAUC) dopo chirurgia bariatrica*

IAUC	0	2 sett	12 m	24 m
GLP-1 (pmol/l · 180 min)	57±83	1992±434*	1001±263*	1236±345*
GIP (pg/dl · 180 min)	29765±3068	28691±4278	17645±1655*	15728±2829*

I dati sono espressi come M±ES. *p<0.05 vs basale. 2 sett = 2 settimane; 12 m = 12 mesi; 24 m = 24 mesi.

Correlazioni

È stata evidenziata una correlazione significativa tra la riduzione dei TG a digiuno e il miglioramento della resistenza insulinica sia a 2 settimane (r=0.477 e p=0.016) che a 12-24 mesi (r=0.679 e p=0.001, r=0.882 e p=0.025, rispettivamente), mentre non è stata trovata alcuna correlazione tra le variazioni dei lipidi a digiuno e post-prandiali e le altre variabili analizzate, incluso il decremento ponderale e le modifiche entero-ormonali.

Discussione e conclusioni

Il nostro studio è stato il primo a valutare le modifiche del metabolismo lipidico in fase postprandiale sia nel breve che nel medio-lungo termine. Le due procedure bariatriche utilizzate, la SG e il BPG, sono entrambe in grado di influenzare positivamente il profilo lipidico postprandiale sin dai primi giorni dopo l'intervento, quando il decremento ponderale è ancora modesto. Questo risultato indica che l'effetto benefico sui

trigliceridi postprandiali che si manifesta precocemente e che perdura per tutto il periodo di *follow-up* (24 mesi), è indipendente, almeno in parte, dalla riduzione del peso.

Gli effetti della CB sui lipidi plasmatici a digiuno sono stati documentati in numerosi studi. Saboya e colleghi hanno esaminato le variazioni a breve termine del profilo lipidico dopo BG dimostrando che i trigliceridi si riducevano significativamente un mese dopo l'intervento (197). Il col-HDL, invece, tendeva a diminuire nei giorni immediatamente successivi all'intervento per poi aumentare durante il *follow-up* (197). Buzga e colleghi (198) hanno esaminato gli effetti della SG in 35 donne obese, osservando un miglioramento dei trigliceridi a digiuno sia a 3 che a sei mesi dall'intervento e nessuna modifica dei livelli di colesterolo e col-HDL; similmente, Graessler e colleghi (199) non hanno osservato modifiche delle HDL 3 mesi dopo BPG in soggetti obesi con e senza diabete. In linea con le osservazioni di Saboya, nel nostro studio abbiamo riscontrato una significativa riduzione del col-HDL due settimane dopo l'intervento chirurgico. Questo risultato non è del tutto inatteso in quanto il col-HDL tende a diminuire in tutte le condizioni altamente dinamiche, come l'immediato periodo postoperatorio. La diminuzione transitoria del col-HDL è stata osservata anche dopo interventi di tipo nutrizionale volti alla riduzione del peso ed è stata attribuita alla marcata riduzione dell'*intake* calorico e del

contenuto di lipidi della dieta (200). Successivamente, quando si raggiunge una condizione più stabile, il col-HDL tende ad aumentare nuovamente come peraltro riscontrato anche nei nostri pazienti a 12 e 24 mesi dopo l'intervento chirurgico. Il risultato più nuovo del nostro studio è stata la drammatica riduzione dei trigliceridi postprandiali. Già due settimane dopo l'intervento chirurgico, la risposta dei trigliceridi postprandiali era minima con una riduzione rispetto ai valori preoperatori di circa il 70%. Le due procedure, una restrittiva (SG) e l'altra restrittiva/malassorbitiva (BPG), esplicano effetti analoghi sul metabolismo dei trigliceridi postprandiali. Questo risultato è in accordo con un recente studio che indica come il tipo di intervento chirurgico impatta principalmente sul metabolismo del colesterolo, piuttosto che su quello dei trigliceridi. Infatti, Benetti e colleghi hanno riportato una significativa riduzione dei livelli di colesterolo dopo procedure puramente malassorbitive (come la diversione biliopancreatica e il bypass biliointestinale), ma non dopo procedure puramente restrittive (bendaggio gastrico regolabile), mentre i trigliceridi diminuivano nella stessa misura con i due tipi di intervento (201).

Studi su modelli animali hanno dimostrato che il GLP-1 o agonisti del recettore del GLP-1 possono ridurre i trigliceridi postprandiali attraverso molteplici meccanismi: 1) riduzione della sintesi delle apolipoproteine B-48 e A-IV; 2) inibizione della lipasi gastrica e 3) riduzione del flusso

linfatico intestinale (32). Nei pazienti con DM2 la terapia incretinica si è dimostrata in grado di diminuire i trigliceridi postprandiali e le concentrazioni di apo B-48 (202, 203). Nel complesso questi dati indicano che il GLP-1 gioca un ruolo importante nella regolazione del metabolismo lipidico. Nel nostro studio, la risposta del GLP-1 attivo al pasto misto è marcatamente aumentata 2 settimane e permane tale fino a 24 mesi dopo l'intervento chirurgico, a conferma che la chirurgia bariatrica è in grado di ripristinare il profilo entero-ormonale grazie alle modifiche anatomiche che consentono il contatto di materiale alimentare parzialmente digerito con le cellule L dell'intestino distale. Sebbene non abbiamo trovato una correlazione significativa tra la risposta del GLP-1 e quella dei trigliceridi postprandiali dopo l'intervento chirurgico, ai vari tempi di osservazione, non si può escludere che il precoce aumento del GLP-1 possa aver contribuito, almeno in parte, alla risposta completamente piatta dei trigliceridi postprandiali.

Risultati provenienti da studi in vitro e su animali sperimentali suggeriscono che anche il GIP può giocare un ruolo importante nella regolazione del metabolismo lipidico, sebbene non ci sono chiare evidenze nell'uomo. Nel nostro studio non abbiamo riscontrato correlazioni tra le modifiche del GIP e quelle dei trigliceridi plasmatici. Poiché sia la SG che il BPG causano un ridotto assorbimento dei nutrienti, è probabile che la marcata riduzione dei TG postprandiali

possa essere dovuta ad una riduzione dell'assorbimento di lipidi alimentari. Purtroppo, il numero limitato di pazienti studiati non consente di trarre una conclusione definitiva su questo aspetto. Tuttavia, indipendentemente dal meccanismo che ne è alla base, la riduzione dei trigliceridi postprandiali è clinicamente importante in quanto le alterazioni della lipemia postprandiale sono un fattore indipendente di rischio cardiovascolare (194). Nel nostro studio abbiamo trovato una correlazione significativa tra la diminuzione dei TG a digiuno e la riduzione della resistenza insulinica. È noto che i soggetti obesi con DM2 sono insulino-resistenti ed hanno un aumentato deposito di trigliceridi sia nel tessuto adiposo che nei tessuti non adiposi. L'accumulo di grasso innesca una complessa cascata di eventi che riduce ulteriormente la sensibilità all'insulina (204, 205). Su questa base, è ipotizzabile che il miglioramento della resistenza insulinica osservata precocemente dopo la chirurgia bariatrica possa aver causato la riduzione dei trigliceridi plasmatici; tuttavia non si può escludere l'ipotesi inversa cioè che la caduta dei trigliceridi possa aver contribuito a migliorare la resistenza all'insulina, come dimostrato da Mingrone e colleghi in pazienti sottoposti a diversione biliopancreatica (206). Come previsto dal protocollo, i nostri pazienti hanno ridotto drasticamente il loro apporto calorico subito dopo l'intervento chirurgico, e ciò potrebbe aver influenzato la risposta lipidica. Va considerato, tuttavia, che la riduzione

dell'*intake* calorico avrebbe potuto influenzare la riduzione dei lipidi a digiuno, più che la risposta postprandiale in quanto la composizione del pasto somministrato era identica prima e dopo l'intervento chirurgico.

In conclusione, la chirurgia bariatrica determina un miglioramento precoce del metabolismo lipidico sia a digiuno che post-prandiale, che permane nel periodo di *follow-up*. La riduzione dei trigliceridi a digiuno è associata ad una riduzione della resistenza all'insulina mentre la riduzione della lipemia postprandiale è probabilmente correlata al ridotto assorbimento intestinale dei lipidi conseguente alle modifiche del transito intestinale.

5. Bibliografia

1. Unger RH, Eisentraut AM. Entero-insular axis. *Arch Intern Med* 1969; 123: 261-6.
2. Creutzfeldt W. The incretin concept today. *Diabetologia* 1979;16: 75-85.
3. Vetter ML, Cardillo S, Rickels MR, Iqbal N. Narrative review: effect of bariatric surgery on type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2009; 150 (2): 94-103.
4. Baggio LL, Drucker DJ Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007; 132 (6): 2131-57.
5. Holst JJ. The physiology of glucagon-like peptide 1. *Physiol Rev* 2007;87: 1409-39.
6. Cataland,S, Crockett,SE, Brown,JC, Mazzaferri,EL: Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulation by oral glucose in man. *J Clin Endocrinol Metab* 39:223-228, 1974
7. Falko,JM, Crockett,SE, Cataland,S, Mazzaferri,EL: Gastric inhibitory polypeptide (GIP) stimulated by fat ingestion in man. *J Clin Endocrinol Metab* 41:260-265, 1975
8. Krarup,T, Holst,JJ, Larsen,KL: Responses and molecular heterogeneity of IR-GIP after intraduodenal glucose and fat. *Am J Physiol* 249:E195-E200, 1985
9. Creutzfeldt,W: The incretin concept today. *Diabetologia* 16:75-85, 1979
10. Besterman,HS, Cook,GC, Sarson,DL, Christofides,ND, Bryant,MG, Gregor,M, Bloom,SR: Gut hormones in tropical malabsorption. *Br Med J* 2:1252-1255, 1979
11. Fushiki,T, Kojima,A, Imoto,T, Inoue,K, Sugimoto,E: An extract of *Gymnema sylvestre* leaves and purified gymnemic acid inhibits

- glucose-stimulated gastric inhibitory peptide secretion in rats. *J Nutr* 122:2367-2373, 1992
12. Lavin, JH, Wittert, GA, Andrews, J, Yeap, B, Wishart, JM, Morris, HA, Morley, JE, Horowitz, M, Read, NW: Interaction of insulin, glucagon-like peptide 1, gastric inhibitory polypeptide, and appetite in response to intraduodenal carbohydrate. *Am J Clin Nutr* 68:591-598, 1998
 13. Brubaker PL. The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Jul;1070:10-26.
 14. Herrmann C, Göke R, Richter G, Fehmann HC, Arnold R, Göke B. Glucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulin-releasing polypeptide plasma levels in response to nutrients. *Digestion.* 1995;56(2):117-26
 15. Lim GE, Brubaker PL. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. *Diabetes*, Vol. 55, Supplement 2, December 2006
 16. Cendrine Cabou, Remy Burcelin GLP-1, the Gut-Brain, and Brain-Periphery Axes *Rev Diabet Stud.* 2011; 8(3): 418–431.
 17. Delporte C. Structure and Physiological Actions of Ghrelin. *Scientifica (Cairo).* 2013;2013:518909.
 18. Yang H. Central and peripheral regulation of gastric acid secretion by peptide YY Peptides. 2002 Feb;23(2):349-58.
 19. Beglinger C, Degen L. Gastrointestinal satiety signals in humans--physiologic roles for GLP-1 and PYY? *Physiol Behav.* 2006 Nov 30;89(4):460-4.
 20. Fink H, Rex A, Voits M, Voigt JP. Major biological actions of CCK-a critical evaluation of research findings. *Exp Brain Res.* 1998;123(1-2):77-83.
 21. Mössner J. New advances in cell physiology and pathophysiology of the exocrine pancreas. *Dig Dis.* 2010;28(6):722-8.

22. Schirra J, Nicolaus M, Roggel R, Katschinski M, Storr M, Woerle HJ, Göke B. Endogenous glucagon-like peptide 1 controls endocrine pancreatic secretion and antro-pyloro-duodenal motility in humans. *Gut*. 2006;55(2):243-51.
23. Baggio L, Kieffer TJ, Drucker DJ. Glucagon-like peptide-1, but not glucose-dependent insulinotropic peptide, regulates fasting glycemia and nonenteral glucose clearance in mice. *Endocrinology* 2000;141(10):3703-9.
24. Schirra J, Sturm K, Leicht P, Arnold R, Göke B, Katschinski M. Exendin(9-39)amide is an antagonist of glucagon-like peptide-1(7-36)amide in humans. *J Clin Invest*. 1998;101(7):1421-30.
25. Lewis JT, Dayanandan B, Habener JF, Kieffer TJ. Glucose-dependent insulinotropic polypeptide confers early phase insulin release to oral glucose in rats: demonstration by a receptor antagonist. *Endocrinology* 2000;141(10):3710-6.
26. Tseng CC, Kieffer TJ, Jarboe LA, Usdin TB, Wolfe MM. Postprandial stimulation of insulin release by glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP). Effect of a specific glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor antagonist in the rat. *J Clin Invest*. 1996;98(11):2440-5.
27. Zhang W, Chai B, Li JY, Wang H & Mulholland MW. Effect of desacyl ghrelin on adiposity and glucose metabolism. *Endocrinology* 2008;149:4710–4716
28. Gauna C, Delhanty PJ, Hofland LJ, Janssen JA, Broglio F, Ross RJ, Ghigo E & van der Lely AJ. Ghrelin stimulates, whereas desoctanoyl ghrelin inhibits, glucose output by primary hepatocytes. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2005;90:1055–1060.

29. Longo KA, Charoenthongtrakul S, Giuliana DJ, Govek EK, McDonagh T, Qi Y, DiStefano PS & Geddes BJ. Improved insulin sensitivity and metabolic flexibility in ghrelin receptor knockout mice. *Regulatory Peptides* 2008;150:55–61
30. Barazzoni R, Zanetti M, Ferreira C, Vinci P, Pirulli A, Mucci M, Dore F, Fonda M, Ciocchi B, Cattin L & Guarnieri G. Relationships between desacylated and acylated ghrelin and insulin sensitivity in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(10):3935-40.
31. Granata R, Settanni F, Biancone L, Trovato L, Nano R, Bertuzzi F, Destefanis S, Annunziata M, Martinetti M, Catapano F, Ghe C, Isgaard J, Papotti M, Ghigo E & Muccioli G. Acylated and unacylated ghrelin promote proliferation and inhibit apoptosis of pancreatic b-cells and human islets: involvement of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, extracellular signalregulated kinase 1/2, and phosphatidyl inositol 3-kinase/Akt signaling. *Endocrinology* 2007;148:512–529.
32. Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, Zheng S, Sabo M, D'Alessio DA, Tso P. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(5):G943-9.
33. Meier JJ, Gethmann A, Götze O, Gallwitz B, Holst JJ, Schmidt WE, Nauck MA. Glucagon-like peptide 1 abolishes the postprandial rise in triglyceride concentrations and lowers levels of non-esterified fatty acids in humans. *Diabetologia.* 2006;49(3):452-8.
34. Eliasson B, Möller-Goede D, Eeg-Olofsson K, Wilson C, Cederholm J, Fleck P, Diamant M, Taskinen MR, Smith U. Lowering of postprandial lipids in individuals with type 2 diabetes

- treated with alogliptin and/or pioglitazone: a randomised double-blind placebo-controlled study. *Diabetologia*. 2012;55(4):915-25.
35. Hsieh J, Longuet C, Baker CL, Qin B, Federico LM, Drucker DJ, Adeli K. The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice. *Diabetologia*. 2010;53(3):552-61.
36. Wasada T, McCorkle K, Harris V, Kawai K, Howard B, Unger RH. Effect of gastric inhibitory polypeptide on plasma levels of chylomicron triglycerides in dogs. *J Clin Invest*. 1981;68(4):1106-7.
37. Ebert R, Nauck M, Creutzfeldt W. Effect of exogenous or endogenous gastric inhibitory polypeptide (GIP) on plasma triglyceride responses in rats. *Horm Metab Res*. 1991;23(11):517-21
38. Nauck M, Stöckmann F, Ebert R, Creutzfeldt W. Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes. *Diabetologia* 1986;29:46–52.
39. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 2008; 57:678–87.
40. Laakso M, Zilinskaite J, Hansen T, Wellov Boesgaard T, Vanttinen M, Stancakova A et al; for the EUGENE2 Consortium. Insulin sensitivity, insulin release and GLP-1 levels in subjects with IFG and/or IGT in the EUGENE2 study. *Diabetologia* 2008;51:502-11.
41. Vilsboll T, Krarup T, Sonne J et al. Incretin secretion in relation to meal size and body weight in healthy subjects and people with type 1 and type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:2706-2713.

42. Nyholm B, Walker M, Grauholt CH, Alberti KGMM, Holst JJ, Schmitz O. Twenty-four hour profiles of insulin, substrates and gut incretin hormones: early defects in glucose tolerant offspring of type II diabetic patients. *Diabetologia* 1999;42:1314-23.
43. Meier JJ, Gallwitz B, Askenas M, Vollmer K, Deacon CF, Holst JJ et al. Secretion of incretin hormones and the insulinotropic effect of gastric inhibitory polypeptide in women with a history of gestational diabetes. *Diabetologia* 2005;48:1872-81.
44. Nauck MA, Heimesaat MM, Orskov C, et al. Preserved incretin activity of glucagon-like peptide 1 [7-36 amide] but not of synthetic human gastric inhibitory polypeptide in patients with type-2 diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1993;91:301-7.
45. Toft-Nielson M, Madsbad S, Holst JJ. The effect of glucagonlike peptide I (GLP-I) on glucose elimination in healthy subjects depends on the pancreatic glucoregulatory hormones. *Diabetes* 1996;45:552-6.
46. Madsbad S, Krarup T, Deacon CF, et al. Glucagon-like peptide receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in the treatment of diabetes: a review of clinical trials. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008;11:491-9.
47. Cauchi S, El Achhab Y, Choquet H, Dina C, Krempler F, Weitgasser R, et al. TCF7L2 is reproducibly associated with type 2 diabetes in various ethnic groups: a global meta-analysis. *J Mol Med* 2007; 85: 777-82.
48. Lyssenko V, Lupi R, Del Guerra S, Orho-Melander M, Almgren P, Sjogren M, et al. Mechanisms by which common variants in the TCF7L2 gene increase risk of type 2 diabetes. *J Clin Invest* 2007; 117: 2155-63.

49. Mansour A, Hosseini S, Larijani B, Pajouhi M, Mohajeri-Tehrani MR. Nutrients related to GLP1 secretory responses. *Nutrition*. 2013 Jun;29(6):813-20.
50. Cho YM, Fujita Y, Kieffer TJ. Glucagon-like Peptide-1: glucose homeostasis and beyond. *Annu Rev Physiol*. 2014;76:535-59.
51. Reimann F, Gribble FM. Glucose-sensing in glucagon-like peptide-1-secreting cells. *Diabetes*. 2002;51(9):2757-63.
52. Gribble FM, Williams L, Simpson AK, Reimann F. A novel glucose-sensing mechanism contributing to glucagon-like peptide-1 secretion from the GLUTag cell line. *Diabetes*. 2003 ;52(5):1147-54.
53. Tolhurst G, Reimann F, Gribble FM. Nutritional regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *J Physiol*. 2009 Jan 15;587(Pt 1):27-32.
54. Drucker DJ. Minireview: The glucagon-like peptides. *Endocrinology*. 2001 Feb;142(2):521-7.
55. Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM. Modulation of glucagon-like peptide 1 and energy metabolism by inulin and oligofructose: experimental data. *J Nutr* 2007;137:2547S–51S.
56. Parnell JA, Reimer RA. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1751–9.
57. Giacco R, Costabile G, Della Pepa G, Anniballi G, Griffio E, Mangione A, Cipriano P, Viscovo D, Clemente G, Landberg R,

Pacini G, Rivellese AA, Riccardi G. A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 Jan 28

58. Parnell JA, Reimer RA. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* 2009;89:1751–9.

59. Adam T, Westerterp-Plantenga M. Nutrient-stimulated GLP-1 release in normal-weight men and women. *Horm Metab Res* 2005;37:111–7.

60. Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, Sohet FM, Pachikian BD, Naslain D, et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal. *Am J Clin Nutr* 2009;90:1236–43.

61. Enç FY, Ones T, Akin HL, Dede F, Turoğlu HT, Ulfer G, Bekiroğlu N, Haklar G, Rehfeld JF, Holst JJ, Ulusoy NB, Imeryüz N. Orlistat accelerates gastric emptying and attenuates GIP release in healthy subjects. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009 Mar;296(3):G482-9.

62. Beysen C, Karpe F, Fielding B, Clark A, Levy J, Frayn K. Interaction between specific fatty acids, GLP-1 and insulin secretion in humans. *Diabetologia* 2002;45:1533–41.

63. Elliott R, Morgan L, Tredger J, Deacon S, Wright J, Marks V. Glucagon-like peptide-1 (7–36) amide and glucose-dependent

insulinotropic polypeptide secretion in response to nutrient ingestion in man: acute post-prandial and 24-h secretion patterns. *J Endocrinol* 1993;138:159–66.

64. Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, et al. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *J Biol Chem* 2003;278:11303–11.

65. Tanaka T, Yano T, Adachi T, Koshimizu TA, Hirasawa A, Tsujimoto G. Cloning and characterization of the rat free fatty acid receptor GPR120: in vivo effect of the natural ligand on GLP-1 secretion and proliferation of pancreatic beta cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2008;377: 515–22.

66. Brynes AE, Edwards CM, Jadhav A, Ghatei MA, Bloom SR, Frost GS. Diet-induced change in fatty acid composition of plasma triacylglycerols is not associated with change in glucagon-like peptide 1 or insulin sensitivity in people with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2000;72:1111–8.

67. Paniagua JA, de la Sacristana AG, S_anchez E, Romero I, Vidal-Puig A, Berral FJ, et al. A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr* 2007;26: 434–44.

68. Cohen AE, Johnston CS. Almond ingestion at mealtime reduces postprandial glycemia and chronic ingestion reduces hemoglobin A1c in individuals with well-controlled type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2011;60:1312–7

69. Ichimura A, Hirasawa A, Poulain-Godefroy O, Bonnefond A, Hara T, Yengo L, Kimura I et al. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. *Nature*. 2012 Feb 19;483(7389):350-4.
70. Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*. 2006 Oct;131(4):1197-207.
71. Buttet M, Traynard V, Tran TT, Besnard P, Poirier H, Niot I. From fatty-acid sensing to chylomicron synthesis: role of intestinal lipid-binding proteins. *Biochimie*. 2014 Jan;96:37-47.
72. Abumrad NA, Davidson NO. Role of the gut lipid homeostasis. *Physiol Rev*. 2012 Jul;92(3):1061-85.
73. Tran TT, Poirier H, Clément L, Nassir F, Pelsers MM, Petit V, Degrace P, Monnot MC, Glatz JF, Abumrad NA, Besnard P, Niot I. Luminal lipid regulates CD36 levels and downstream signaling to stimulate chylomicron synthesis. *J Biol Chem*. 2011 Jul 15;286(28):25201-10.
74. Blom WAM, Lluch A, Stafleu A, Vinoy S, Holst JJ, Schaafsma G, et al. Effect of a high-protein breakfast on the postprandial ghrelin response. *Am J Clin Nutr* 2006;83:211–20.
75. Raben A, Agerholm-Larsen L, Flint A, Holst JJ, Astrup A. Meals with similar energy densities but rich in protein, fat, carbohydrate, or alcohol have different effects on energy expenditure and

substrate metabolism but not on appetite and energy intake. *Am J Clin Nutr* 2003;77:91–100.

76. Lejeune MPM, Westerterp KR, Adam TCM, Luscombe-Marsh ND, Westerterp-Plantenga MS. Ghrelin and glucagon-like peptide 1 concentrations, 24-h satiety, and energy and substrate metabolism during a high-protein diet and measured in a respiration chamber. *Am J Clin Nutr* 2006;83:89–94.
77. Galloway SDR, Craig TP, Cleland SJ. Effects of oral l-carnitine supplementation on insulin sensitivity indices in response to glucose feeding in lean and overweight/obese males. *Amino acids* 2011;41:507–15.
78. Chen Q, Reimer RA. Dairy protein and leucine alter GLP-1 release and mRNA of genes involved in intestinal lipid metabolism in vitro. *Nutrition* 2009;25:340–9.
79. Reimer RA. Meat hydrolysate and essential amino acid-induced glucagonlike peptide-1 secretion, in the human NCI-H716 enteroendocrine cell line, is regulated by extracellular signal-regulated kinase1/2 and p38 mitogenactivated protein kinases. *J Endocrinol* 2006;191:159–70.
80. Kett AP, Bruen CM, O'Halloran F, Chaurin V, Lawlor PG, O'Mahony JA, et al. The effect of a, b-casein addition to waxy maize starch on postprandial levels of glucose, insulin, and incretin hormones in pigs as a model for humans. *Food & Nutrition Research* 2012;56.

81. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):348-61.
82. Ghosh Dilip and Arjan Scheepens. Vascular action of polyphenols. *Mol. Nutr. Food Res*. 2009, 53, 322 – 331.
83. Hlebowicz J, Hlebowicz A, Lindstedt S, Björgell O, Höglund P, Holst JJ, Darwiche G, Almér LO. Effects of 1 and 3 g cinnamon on gastric emptying, satiety, and postprandial blood glucose, insulin, glucose-dependent insulintropic polypeptide, glucagon-like peptide 1, and ghrelin concentrations in healthy subjects. *Am J Clin Nutr*. 2009 Mar;89(3):815-21.
84. Kishi, T., Aschkenasi, C. J., Lee, C. E., Mountjoy, K. G. et al., Expression of melanocortin 4 receptor mRNA in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol*. 2003, 457, 213–235.
85. Weickert, M. O., Reimann, M., Otto, B., Hall, W. L. et al., Soy isoflavones increase preprandial peptide YY (PYY), but have no effect on ghrelin and body weight in healthy postmenopausal women. *J. Negat. Results Biomed*. 2006, 5, 11.
86. Gruendel, S., Garcia, A. L., Otto, B., Mueller, C. et al., Carob pulp preparation rich in insoluble dietary fiber and polyphenols enhances lipid oxidation and lowers postprandial acylated ghrelin in humans. *J. Nutr*. 2006, 136, 1533–1538.
87. Lu, C., Zhu, W., Shen, C. L., Gao, W., Green tea polyphenols reduce body weight in rats by modulating obesity-related genes. *PLoS One* 2012, 7, e38332

88. Törrönen R, Sarkkinen E, Niskanen T, Tapola N, Kilpi K, Niskanen L. Postprandial glucose, insulin and glucagon-like peptide 1 responses to sucrose ingested with berries in healthy subjects. *Br J Nutr*. 2012 May;107(10):1445-51.
89. Takikawa M, Kurimoto Y, Tsuda T. Curcumin stimulates glucagon-like peptide-1 secretion in GLUTag cells via Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 May 31;435(2):165-70.
90. McCarty MF. A chlorogenic acid-induced increase in GLP-1 production may mediate the impact of heavy coffee consumption on diabetes risk. *Med Hypotheses*. 2005;64(4):848-53.
91. Olthof MR, van Dijk AE, Deacon CF, Heine RJ, van Dam RM. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on incretin hormones. *Nutr Metab* 2011;8:10.
92. Xu Z, Ju J, Wang K, Gu C, Feng Y. Evaluation of hypoglycemic activity of total lignans from *Fructus Arctii* in the spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats. *J Ethnopharmacol*. 2014;151(1):548-55
93. Dao, T. M., Waget, A., Klopp, P., Serino, M. et al., Resveratrol increases glucose induced GLP-1 secretion in mice: a mechanism which contributes to the glycemic control. *PLoS One* 2011, 6, e20700.
94. Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and

- interventions using prebiotics. *Benef Microbes*. 2014 Mar 1;5(1):3-17
- 95.Barber W, Burke TF. Brain-stem response to phasic gastric distension. *Am J Physiol* 1983;245:G242.
- 96.Scopinaro N, Gianetta E, Civalleri D, Bonalumi U, Bachi V. Bilio-pancreatic by-pass for obesity. An experimental study in dogs. *Br J Surg* 1979; 66:613.
- 97.Scopinaro N, Giannetta E, Friedmand D. bilio-pancreatic diversion for obesity. *Prob Gen Surg* 1992;9:362.
- 98.Schauer PR. Open and laparoscopic surgical modalities for the management of obesity. *J Gastrointest Surg* 2003;7:468.
- 99.Buchwald H, Estok R, Fahrenbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ, Bantle JP, Sledge I. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009; 122:248-256.
- 100.Farrell TM, Haggerty SP, Overby DW, Kohn GP, Richardson WS, Fanelli RD Clinical application of laparoscopic bariatric surgery: an evidence-based review. *Surg Endosc*. 2009;23:930-49.
- 101.Mingrone G, DeGaetano A, Greco AV, Capristo E, Benedetti G, Castagneto M et al. Reversibility of insulin resistance in obese diabetic patients: Role of plasma lipids. *Diabetologia* 1997; 40:599-605.
- 102.Guidone C, Manco M, Valera-Mora E, Iaconelli A, Gniuli D, Mari A et al. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes* 2006;55:2025-31.
- 103.Rubino F, Forgione A, Cummings DE, Vix M, Gnuli D, Mingrone G et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small

- intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244:741-9.
104. Camastra S, Manco M, Mari A, Greco AV, Frascerra S, Mingrone G et al. Beta-cell function in severely obese type 2 diabetic patients: Long-term effects of bariatric surgery. *Diabetes Care* 2007;30:1002-4.
105. Salinari S, Bertuzzi A, Iaconelli A, Manco M, Mingrone G. Twenty-four hour insulin secretion and beta cell NEFA oxidation in type 2 diabetic, morbidly obese patients before and after bariatric surgery. *Diabetologia* 2008;51:1276-84.
106. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K et al. Bariatric surgery: A systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2004;292:1724-37.
107. Sjostrom L, Lindroos AK, Peltonen M, Torgerson J, Bouchard C, Carlsson B et al; Swedish Obese Subjects Study Scientific Group. Lifestyle, diabetes, and cardiovascular risk factors 10 years after bariatric surgery. *N Engl J Med* 2004;351:2683-93.
108. Scopinaro N, Adami GF, Papadia FS, Camerini G, Carlini F, Briatore L, D'Alessandro G, Parodi C, Weiss A, Andraghetti G, Catalano M, Cordera R; The Effects of Biliopancreatic Diversion on Type 2 Diabetes Mellitus in Patients with Mild Obesity (BMI 30–35 kg/m²) and Simple Overweight (BMI 25–30 kg/m²): A Prospective Controlled Study. *Obes Surg* 2011
109. Torquati A, Lutfi R, Abumrad N, Richards WO. Is Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery the Most Effective Treatment for Type 2 Diabetes Mellitus in Morbidly Obese Patients? *J Gastrointest Surg* 2005;9:1112–1118.
110. Nannipieri M, Baldi S, Mari A, Colligiani D, Guarino D, Camastra S, Barsotti E, Berta R, Moriconi D, Bellini R,

- Anselmino M, Ferrannini E. Roux-en Y gastric bypass and sleeve gastrectomy: mechanisms of diabetes remission and role of gut hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Nov;98(11):4391-9.
- 111.AACE, TOS, ASMBG Guidelines. Perioperative bariatric guidelines. *Obesity*. Volume 17, Supplement 1, April 2009.
- 112.NIH. Gastrointestinal surgery for severe obesity: National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement. *Am J Clin Nutr* 1992;55:615S-9S.
- 113.Bariatric surgical and procedural interventions in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A position statement from the international diabetes federation taskforce on epidemiology and prevention. 2011.
- 114.Ferrannini E, Mingrone G. Impact of different bariatric surgical procedures on insulin action and beta-cell function in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32:514-520.
- 115.Polyzogopoulou EV, Kalfarentzos F, Vagenakis AG, Alexandrides TK. Restoration of euglycemia and normal acute insulin response to glucose in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery. *Diabetes* 2003;52:1098-1103.
- 116.Rubino F. Bariatric surgery: effects on glucose homeostasis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2006;9:497–507.
- 117.Mingrone G. Role of the incretin system in the remission of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18:574-579.
- 118.W J Pories, M S Swanson, K G MacDonald, S B Long, P G Morris, B M Brown, H A Barakat, R A deRamon, G Israel, J M Dolezal. Who would have thought it? An operation proves to be the most effective therapy for adult-onset diabetes mellitus. *Ann Surg*. 1995; 222(3): 339–352.

119. Cummings DE, Weigle DS, Frayo RS, et al. Human plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss and gastric bypass surgery. *New Engl J Med* 2002;346:1623–30.
120. Swarbrick MM, Stanhope KL, Austrheim-Smith IT et al. Longitudinal changes in pancreatic and adipocyte hormones following Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Diabetologia* 2008; 51: 1901–1911.
121. Thomas C, Gioiello A, Noriega L, et al. TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab* 2009;10:167-177.
122. Rajas F, Bruni N, Montano S, Zitoun C, Mithieux G. The glucose-6 phosphatase gene is expressed in human and rat small intestine: regulation of expression in fasted and diabetic rats. *Gastroenterology*. 1999;117(1):132-9.
123. Troy S, Soty M, Ribeiro L, Laval L, Migrenne S, Fioramonti X, Pillot B, Fauveau V, Aubert R, Viollet B, Foretz M, Leclerc J, Duchamp A, Zitoun C, Thorens B, Magnan C, Mithieux G, Andreelli F. Intestinal gluconeogenesis is a key factor for early metabolic changes after gastric bypass but not after gastric lap-band in mice. *Cell Metab*. 2008 ;8(3):201-11.
124. Mithieux G, Misery P, Magnan C, Pillot B, Gautier-Stein A, Bernard C, Rajas F, Zitoun C. Portal sensing of intestinal gluconeogenesis is a mechanistic link in the diminution of food intake induced by diet protein. *Cell Metab*. 2005;2(5):321-9.
125. Stearns AT, Balakrishnan A, Tavakkolizadeh A. Impact of Roux-en-Y gastric bypass surgery on rat intestinal glucose transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297(5):G950-7.
126. Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE,

- Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(7):2365-70.
127. Cuhe G, Cuber JC, Malbert CH. Ileal short-chain fatty acids inhibit gastric motility by a humoral pathway. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;279(5):G925-30.
128. Furet JP, Kpong LC, Tap J, Poitou C, Basdevant A et al. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery–Induced Weight Loss. Links With Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. *Diabetes* 2010;59(12):3049-57.
129. Buchwald H, Avidor Y, Braunwald E, Jensen MD, Pories W, Fahrback K, Schoelles K 2004 Bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 292:1724–1737
130. Nguyen NT, Varela E, Sabio A, Tran CL, Stamos M, Wilson SE 2006 Resolution of hyperlipidemia after laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass. *J Am Coll Surg* 203: 24–29
131. Dixon JB, O’Brien PE 2002 Health outcomes of severely obese type 2 diabetic subjects 1 year after laparoscopic adjustable gastric banding. *Diabetes Care* 25:358–363
132. Zlabek JA, Grimm MS, Larson CJ, Mathiason MA, Lambert PJ, Kothari SN 2005 The effect of laparoscopic gastric bypass surgery on dyslipidemia in severely obese patients. *Surg Obes Relat Dis* 1:537–542
133. Woodard GA, Peraza J, Bravo S, Toplosky L, Hernandez-Boussard T, Morton JM 2010 One year improvements in cardiovascular risk factors: a comparative trial of laparoscopic Roux-en-Y gastric bypass vs. adjustable gastric banding. *Obes Surg* 20:578–582
134. Benaiges D, Goday A, Ramon JM, Hernandez E, Pera M, Cano JF 2011 Laparoscopic sleeve gastrectomy and laparoscopic gastric

- bypass are equally effective for reduction of cardiovascular risk in severely obese patients at one year of follow-up. *Surg Obes Relat Dis* 7:575–580
- 135.Kumar R, Lieske JC, Collazo-Clavell ML, Sarr MG, Olson ER, Vrtiska TJ, Bergstralh EJ, Li X 2011 Fat malabsorption and increased intestinal oxalate absorption are common after Roux-en-Y gastric bypass surgery. *Surgery* 149: 654–661
- 136.Odstrcil EA, Martinez JG, Santa Ana CA, Xue B, Schneider RE, Steffer KJ, Porter JL, Asplin J, Kuhn JA, Fordtran JS 2010 The contribution of malabsorption to the reduction in net energy absorption after long-limb Roux-en-Y gastric bypass. *Am J Clin Nutr* 92:704–713
- 137.Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, Wilson-Pe´rez HE, Hofmann SM, Jandacek R, Tso P, Woods SC, Seeley RJ 2011 Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. *Gastroenterology* 141:939–949.e1–4
- 138.Al Khalifa K, Al Ansari A, Alsayed AR, Violato C. The impact of sleeve gastrectomy on hyperlipidemia: a systematic review. *J Obes*;2013:643530.
- 139.Graessler J, Bornstein TD, Goel D, Bhalla VP, Lohmann T, Wolf T, Koch M, Qin Y, Licinio J, Wong ML, Chavakis T, Xu A, Shevchenko A, Schuhmann K, Schwarz PE, Schulte KM, Patel A, Bornstein SR. Lipidomic profiling before and after Roux-en-Y gastric bypass in obese patients with diabetes. *Pharmacogenomics J*. 2013 Dec 24.
- 140.Waldmann E, Hüttl TP, Göke B, Lang R, Parhofer KG. Effect of sleeve gastrectomy on postprandial lipoprotein metabolism in morbidly obese patients. *Lipids Health Dis*. 2013;12:82.

141. Pardina E, Lecube A, Llamas R, Catalán R, Galard R, Fort JM, Allende H, Vargas V, Baena-Fustegueras JA, Peinado-Onsurbe J. Lipoprotein lipase but not hormone-sensitive lipase activities achieve normality after surgically induced weight loss in morbidly obese patients. *Obes Surg* 2009;19:1150-8.
142. Laimer MW, Engl J, Tschoner A, Kaser S, Ritsch A, Tatarczyk T, Rauchenzauner M, Weiss H, Aigner F, Patsch JR, Ebenbichler CF. Effects of weight loss on lipid transfer proteins in morbidly obese women. *Lipids* 2009; 44:1125-30
143. Umeda LM, Pereira AZ, Carneiro G, Arasaki CH, Zanella MT. Postprandial adiponectin levels are associated with improvements in postprandial triglycerides after Roux-en-Y gastric bypass in type 2 diabetic patients. *Metab Syndr Relat Disord*. 2013 Oct;11(5):343-8.
144. Kawano Y, Ohta M, Hirashita T, Masuda T, Inomata M, Kitano S. Effects of sleeve gastrectomy on lipid metabolism in an obese diabetic rat model. *Obes Surg*. 2013 Dec;23(12):1947-56
145. Di Marino L, Griffo E, Maione S, Mirabella M. Active glucagon-like peptide-1 (GLP-1): storage of human plasma and stability over time. *Clin Chim Acta*. 2011 Aug 17;412(17-18):1693-4.
146. Lim GE, Brubaker PL. Glucagon-Like Peptide 1 Secretion by the L-Cell. *Diabetes*, Vol. 55, Supplement 2, December 2006
147. Ooi Esther M.M., Theodore W.K. Ng, Gerald F. Watts, and P. Hugh R. Barrett. Dietary fatty acids and lipoprotein metabolism: new insight and updates. *Curr Opin Lipidol* 2013; 24:192-197.

148. Higashi K, Toshitsugu T, Shige H, et al. Olive oil increases the magnitude of postprandial chylomicron remnants compared with milk fat and safflower oil. *J Am Coll Nutr* 1997;16:429-34.
149. de Bruin TWA, Brouwer CB, van Linde-Sibensius Trip M, Jansen H, Erkelens DW. Different metabolism of olive oil and soybean oil: a possible mechanism of the high density lipoprotein conserving effect of olive oil. *Am J Clin Nutr* 1993;58:447-83.
150. Jackson Kim G, M Denise Robertson, Barbara A Fielding, Keith N Frayn, and Christine M Williams. Olive oil increases the number of triacylglycerol-rich chylomicron particles compared with other oils: an effect retained when a second standard meal is fed. *Am J Clin Nutr* 2002;76:942-9.
151. Van Greevenbroek MMJ, van Meer G, Erkelens DW, de Bruin TWA. *Atherosclerosis* 1996;121:139-50.
152. Robertson M Denise, Kin G Jackson, Barbara A Fielding, Linda M Morgan, Christine M Williams, and Keith N Frayn. Acute ingestion of a meal rich in n-3 polyunsaturated fatty acids results in rapid gastric emptying in humans. *Am J Clin Nutr* 2002;76:232-8.
153. Rahman MH, Avella MA, Botham KM. The fatty acid composition of chylomicrons influences the rate of their lipolysis in vivo. *Nutr Metab Cardiovasc D* 2000;10:121-5.
154. Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res*. 2010 Jan;54(1):37-59.
155. Sae-tan S, Grove KA, Lambert JD. "Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea." *Pharmacol Res*. 2011 Aug;64(2):146-54.

156. Basu A, Betts NM, Ortiz J, et al. "Low-energy cranberry juice decreases lipid oxidation and increases plasma antioxidant capacity in women with metabolic syndrome." *Nutr Res.* 2011 Mar;31(3):190-6.
157. Quiñones M, Miguel M, Aleixandre A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 2013 Feb;68(1):125-31
158. T.G. Redgrave, and L.A. Carlson. Changes in plasma very low density and low density lipoprotein content, composition and size after a fatty meal in normo-and-hypertriglyceridemic men. *J Lipid Res* 20:217-230,1979
159. Karpe F, Hamsten A: Determination of apolipoprotein B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *L Lipid Res* 35, 1311-1317, 1994
160. L. Holmquist. Surface modification of Beckman Ultra-Clear centrifuge tubes for density gradient ultracentrifugation of lipoprotein. *J Lipid Res* 23: 1249-1250,1982
161. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis Colwell JA. Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 23:882-884,1997
162. Ali F, Ismail A, Kersten S. Molecular mechanisms underlying the potential antiobesity-related diseases effect of cocoa polyphenols. *Mol Nutr Food Res.* 2014;58:33-48.
163. Osada K, Suzuki T, Kawakami Y, Senda M, Kasai A, Sami M, Ohta Y, Kanda T, Ikeda M. Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary apple polyphenol in rats fed cholesterol. *Lipids.* 2006;41:133-9.

164. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009;122:248-56.
165. Laferrere B, Teixeira J, McGinty J et al Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:2479–85.
166. Guidone C, Manco M, Valera-Mora E et al. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes* 2006;55:2025-31.
167. Rubino F, Forgione A, Cummings DE et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006;244:741–9.
168. Vollmer K, Holst JJ, Baller B, et al. Predictors of incretin concentrations in subjects with normal, impaired, and diabetic glucose tolerance. *Diabetes* 2008;57:678–87.
169. Nosso G, Angrisani L, Saldalamacchia G et al. Impact of sleeve gastrectomy on weight loss, glucose homeostasis, and comorbidities in severely obese type 2 diabetic subjects. *J Obes* 2011;2011:340867.
170. Deitel M, Gawdat K, Melissas J. Reporting weight loss 2007. *Obes Surg* 2007 May;17:565-8.
171. DeFronzo RA, Matsuda M Reduced time points to calculate the composite index. *Diabetes Care* 2010;7:33.

172. Mari A, Pacini G, Murphy E, Ludvik B, Nolan JJ. A model-based method for assessing insulin sensitivity from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care*. 2001 Mar;24(3):539-48.
173. Retnakaran R, Shen S, Hanley AJ et al. Hyperbolic relationship between insulin secretion and sensitivity on oral glucose tolerance test. *Obesity* 2008;16: 1901-7.
174. Ferrannini E, Mingrone G. Impact of different bariatric surgical procedures on insulin action and beta-cell function in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2009;32:514-20
175. Mingrone G, Rosa G, Greco AV et al Intramyocytic lipid accumulation and SREBP-1c expression are related to insulin resistance and cardiovascular risk in morbid obesity *Atherosclerosis* 2003;170:155-61.
176. Rosa G, Mingrone G, Manco M et al Molecular mechanisms of diabetes reversibility after bariatric surgery. *Int J Obes (Lond)* 2007;31:1429-36.
177. Mingrone G, Manco M, Granato L et al. Leptin pulsatility in formerly obese women. *FASEB J* 2005;19:1380–2
178. Calvani M, Scarfone A, Granato L et al. Restoration of adiponectin pulsatility in severely obese subjects after weight loss. *Diabetes* 2004; 53: 939–47.
179. Salinari S, Carr RD, Guidone C et al Nutrient infusion bypassing duodenum - jejunum reverses insulin resistance in normotolerant and diabetic obese subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013;305:E59-66.

180. Basso N, Capoccia D, Rizzello M et al First-phase insulin secretion, insulin sensitivity, ghrelin, GLP-1, and PYY changes 72 h after sleeve gastrectomy in obese diabetic patients: the gastric hypothesis. *Surg Endosc* 2011;25:3540-50.
181. Lee YS, Shin S, Shigihara T et al Glucagon-like peptide-1 gene therapy in obese diabetic mice results in long-term cure of diabetes by improving insulin sensitivity and reducing hepatic gluconeogenesis. *Diabetes* 2007; 56:1671–9
182. Prigeon RL, Quddusi S, Paty B, D'Alessio DA. Suppression of glucose production by GLP-1 independent of islet hormones: a novel extrapancreatic effect. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E701–7.
183. Seghieri M, Rebelos E, Gastaldelli A et al Direct effect of GLP-1 infusion on endogenous glucose production in humans. *Diabetologia* 2013;56:156-61.
184. Meneilly GS, Greig N, Tildesley H, Habener JF, Egan JM, Elahi D. Effects of 3 months of continuous subcutaneous administration of glucagon-like peptide 1 in elderly patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003;26:2835-41.
185. Salinari S, Bertuzzi A, Guidone C, Previti E, Rubino F, Mingrone G Insulin sensitivity and secretion changes after gastric bypass in normotolerant and diabetic obese subjects. *Ann Surg* 2013;257:462-8.
186. Polyzogopoulou EV, Kalfarentzos F, Vagenakis AG, Alexandrides TK: Restoration of euglycemia and normal acute

insulin response to glucose in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery. *Diabetes* 2003;52:1098–103.

187. Mari A, Manco M, Guidone C et al Restoration of normal glucose tolerance in severely obese patients after bilio-pancreatic diversion: role of insulin sensitivity and beta cell function. *Diabetologia* 2006;49:2136–43.

188. Jones IR, Owens DR, Moody AJ, Luzio SD, Morris T, Hayes TM. The effects of glucose-dependent insulinotropic peptide infused at physiological concentrations in normal subjects and type 2 (non-insulin-dependent) diabetic patients on glucose tolerance and B-cell secretion. *Diabetologia* 1987;30:707-12.

189. Rhee NA, Vilsboll T, Knop FK Current evidence for a role of GLP-1 in Roux-en-Y gastric bypass-induced remission of type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2012;14: 291–8.

190. Whitson BA, Leslie DB, Kellogg TA et al Entero-endocrine changes after gastric bypass in diabetic and nondiabetic patients: a preliminary study. *J Surg Res* 2007;141:31–9.

191. Rubino F, Gagner M, Gentileschi P et al The early effect of the Roux-en-Y gastric bypass on hormones involved in body weight regulation and glucose metabolism. *Ann Surg* 2004;240:236–42.

192. Papamargaritis D, le Roux CW, Sioka E, Koukoulis G, Tzovaras G, Zacharoulis D. Changes in gut hormone profile and glucose homeostasis after laparoscopic sleeve gastrectomy. *Surg Obes Relat Dis* 2013;9:192-201.

193. Perez-Tilve D, Nogueiras R, Mallo F, Benoit SC, Tschoep M. Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy balance [corrected] and metabolism. *Endocrine* 2006;29:61-71.
194. Kannel WB, Vasan RS. Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights. *Curr Opin Cardiol*. 2009;24(4):345-50
195. Schwartz EA, Koska J, Mullin MP et al. Exenatide suppresses postprandial elevations in lipids and lipoproteins in individuals with impaired glucose tolerance and recent onset type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):217-22
196. DeFronzo RA, Okerson T, Viswanathan P et al. Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(10):2943-52
197. Saboya C, Arasaki CH, Matos D et al. Relationship between the preoperative body mass index and the resolution of metabolic syndrome following Roux-en-Y gastric bypass. *Metab Syndr Relat Disord*. 2012;10(4):292-6
198. Bužga M, Holéczy P, Svagera Z, Svorc P Jr, Zavadilová V. Effects of sleeve gastrectomy on parameters of lipid and glucose metabolism in obese women - 6 months after operation. *Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne*. 2013 Mar;8(1):22-8
199. Graessler J, Bornstein TD, Goel D, Bhalla VP, Lohmann T, Wolf T, Koch M, Qin Y, Licinio J, Wong ML, Chavakis T, Xu A, Shevchenko A, Schuhmann K, Schwarz PE, Schulte KM, Patel A,

- Bornstein SR. Lipidomic profiling before and after Roux-en-Y gastric bypass in obese patients with diabetes. *Pharmacogenomics J.* 2013 Dec 24.
- 200.Moustarah F, Gilbert A, Després JP, Tchernof A. Impact of gastrointestinal surgery on cardiometabolic risk. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14(6):588-96
- 201.Benetti A, Del Puppo M, Crosignani A et al. Cholesterol Metabolism After Bariatric Surgery in Grade 3 Obesity: Differences between malabsorptive and restrictive procedures. *Diabetes Care* 2012
- 202.DeFronzo RA, Okerson T, Viswanathan P et al. Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, cross-over study. *Curr Med Res Opin.* 2008;24(10):2943-52
- 203.Farr S, Adeli K. Incretin-based therapies for treatment of postprandial dyslipidemia in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol.* 2012;23(1):56-61
- 204.Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the Metabolic Syndrome--an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801(3):338-49
- 205.Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med.* 2005;22(6):674-82
- 206.Mingrone G, DeGaetano A, Greco AV et al. Reversibility of insulin resistance in obese diabetic patients: role of plasma lipids. *Diabetologia.* 1997;40(5):599-605

STUDIO RETROSPETTIVO SULL'EFFICACIA AD 1 ANNO DELLA TERAPIA MEDICA
CON LIRAGLUTIDE E DELLA CHIRURGIA BARIATRICA NEL TRATTAMENTO DEL
PAZIENTE CON DIABETE TIPO 2 ED OBESITA'

A RETROSPECTIVE STUDY ON ONE-YEAR EFFICACY OF MEDICAL THERAPY WITH
LIRAGLUTIDE OR BARIATRIC SURGERY IN OBESE TYPE 2 DIABETIC PATIENTS

¹Vitagliano G, ¹Nosso G, ¹Cotugno M, ¹Saldalamacchia G, ¹Lupoli R, ¹Griffo E, ²Angrisani L,
¹Riccardi G, ¹Capaldo B

¹ Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia Università degli Studi di Napoli Federico II

² Unità di Chirurgia Generale ed Endoscopica Ospedale S. Giovanni Bosco Napoli

Parole chiave: diabete mellito tipo 2, obesità, liraglutide, calo ponderale

Key words: type 2 diabetes mellitus, obesity, liraglutide, weight loss,

Corrispondenza a:

Brunella Capaldo
Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia
Università Federico II
80131 Napoli
Tel: 0817462311
Email: bcapaldo@unina.it

RIASSUNTO

Recenti studi hanno riportato la superiorità della chirurgia bariatrica rispetto al trattamento medico nell'indurre decremento ponderale e migliorare il compenso glicemico in pazienti con diabete mellito tipo 2 (DM2) ed obesità. Tuttavia, mancano allo stato attuale studi di confronto diretto tra il trattamento chirurgico e la terapia con gli analoghi del GLP-1, una nuova classe di farmaci ipoglicemizzanti in grado di influenzare favorevolmente il peso corporeo.

Scopo dello studio Confrontare l'efficacia a 12 mesi della terapia medica con liraglutide e della chirurgia bariatrica sul decremento ponderale, compenso glicemico e profilo di rischio cardiovascolare in pazienti con DM2 ed obesità.

Disegno e metodi. Sono stati esaminati retrospettivamente i dati di 28 pazienti diabetici obesi sottoposti a chirurgia bariatrica (CB) e di 22 pazienti diabetici con comparabile grado di obesità posti in trattamento medico (TM) con liraglutide nel periodo 2009-2012 e che avevano raggiunto una durata di trattamento (medico o chirurgico) di almeno 1 anno. Sono stati analizzati i dati pre e post-trattamento relativi a: antropometria, compenso glicemico, fattori di rischio cardiovascolare, trattamento del diabete e delle altre comorbidità, effetti collaterali.

Risultati. L'età media era 47 ± 9 anni nei pazienti chirurgici e 58 ± 9 anni nel gruppo TM ($p < 0.001$); l'indice di massa corporea (IMC) medio pre-intervento era di 44 ± 7 kg/m² nel gruppo chirurgico e 41 ± 4 kg/m² nel gruppo medico ($p = 0.133$). Il decremento ponderale è stato di 39 kg nei pazienti CB e di 5 Kg nei pazienti in trattamento con liraglutide ($p < 0.001$). Un anno dopo l'intervento si è osservato un miglioramento significativo del compenso glicemico in entrambi i gruppi, ma di maggiore entità nel gruppo chirurgico ($p = 0.027$). Il 57% dei pazienti chirurgici andava incontro a remissione completa del diabete e quasi il 90% dei pazienti sospendeva la terapia ipoglicemizzante; solo il 7% dei pazienti continuava la terapia con statine mentre tutti sospendevano la terapia antipertensiva. Al contrario, nei pazienti in terapia medica non vi era nessuna sostanziale modifica delle terapia farmacologica.

Conclusioni In pazienti diabetici obesi, la chirurgia bariatrica è più efficace della terapia medica con liraglutide in termini di riduzione del peso e miglioramento del compenso glicemico. Tuttavia, è importante rimarcare che quasi il 60% dei pazienti in trattamento con liraglutide raggiungeva il target di emoglobina glicata $< 7\%$ e che il 45% di essi aveva un decremento ponderale di almeno 5 kg. Sono necessari studi randomizzati a più lungo termine per valutare la durevolezza dei benefici osservati ed effettuare un'attenta valutazione del bilancio costo/efficacia dei due trattamenti.

Abstract

Aim: Recent studies have demonstrated that bariatric surgery (BS) leads to greater body weight loss and improvement of glucose control than medical treatment in patients with type 2 diabetes (DM2) and obesity. At present, no study has compared BS with GLP-1 analogues, a novel class of hypoglycemic drugs known to positively influence weight loss. The aim of this retrospective study is to evaluate the 12-month efficacy of medical therapy (MT) with liraglutide *versus* BS on weight loss, glycemic control and cardiovascular risk factors in severely obese DM2 patients.

Research design and methods. We retrospectively examined the clinical records of 28 obese DM2 patients who had undergone BS and 22 DM2 patients with a similar degree of obesity who had started MT with liraglutide in the period 2009-2012. We analyzed anthropometric data, glycemic control, cardiovascular risk factors, drug use for diabetes and other comorbidities and side effects before and 12 months after treatments. *Results.* Mean age was 47 ± 9 years in BS and 58 ± 9 years in the MT group ($p < 0.001$); body mass index (BMI) before treatment was 44 ± 7 kg/m² and 41 ± 4 kg/m² in BS and MT, respectively ($P = 0.133$). One year after treatment, weight loss was 39 Kg in BS and 5 Kg in MT with liraglutide ($p < 0.001$); both groups significantly improved their blood glucose control, although to a greater extent in BS ($p = 0.027$). Among bariatric patients, 57% experienced complete remission of DM2 and ~90% of them discontinued hypoglycemic drugs; all patients withdrew antihypertensive drugs and only two continued lipid-lowering treatment. No significant change in drug consumption occurred in the MT group.

Conclusions. BS is more effective than MT with liraglutide on weight loss and glycemic control in obese DM2 patients. It is important to underscore that 1 year after MT with liraglutide almost 60% of patients achieved HbA1c $< 7\%$ and 45% of them lost almost 5 Kg. Longer-term randomized studies are necessary to assess the durability of these benefits and to evaluate the cost/efficacy of the two treatments.

Introduzione e scopo dello studio

Negli ultimi anni, la chirurgia bariatrica si è affermata come valido strumento per indurre una significativa e stabile perdita di peso con miglioramento o scomparsa delle comorbidità nei pazienti obesi con o senza diabete mellito tipo 2 (DM2). La chirurgia bariatrica è indicata in presenza di un indice di massa corporea (IMC) ≥ 40 kg/m² oppure ≥ 35 kg/m² in presenza di comorbidità quali diabete mellito, a seguito del fallimento di ripetuti tentativi dietetico-comportamentali e/o farmacologici. In una metanalisi condotta su 136 studi, la remissione completa del DM2, definita come glicemia < 100 mg/dl ed HbA1c $< 6\%$ in assenza di terapia farmacologica, è stata riportata nel 77% dei casi, con alcune differenze tra le diverse tecniche (68% dopo gastrectomia verticale, 84% dopo bypass gastrico e 98% dopo diversione bilio-pancreatica)¹. Inoltre, è stato dimostrato un notevole miglioramento della dislipidemia e dell'ipertensione arteriosa e, dato molto importante, una riduzione del 36% della mortalità totale e cardiovascolare².

I farmaci incretino-mimetici, di cui fanno parte gli analoghi del *Glucagon-like peptide 1* (GLP-1) e gli inibitori della dipeptidil-peptidasi-4 (DPP-IV), costituiscono una nuova classe di ipoglicemizzanti, particolarmente innovativi per il loro meccanismo di azione. Questi farmaci mimano o incrementano gli effetti delle incretine (ormoni intestinali prodotti in risposta all'ingestione di nutrienti) che attraverso la stimolazione della secrezione insulinica, l'inibizione della secrezione di glucagone ed il rallentamento dello svuotamento gastrico³ migliorano l'omeostasi glicemica. Numerosi studi clinici hanno dimostrato che gli incretino-mimetici, aggiunti alla terapia con metformina e/o insulina, sono in grado di determinare un significativo miglioramento della glicemia postprandiale, dell'HbA1c e, per quanto riguarda gli analoghi del GLP-1, una significativa riduzione del peso corporeo rispetto all'aggiunta di placebo⁴. In particolare, il trattamento con liraglutide si associa ad un calo ponderale medio di circa 3 Kg dopo 24 settimane di terapia; tale effetto sembra essere mediato dalla riduzione dell'appetito e dal rallentamento dello svuotamento gastrico⁵. Proprio in virtù di queste caratteristiche, gli analoghi del GLP-1 sono gli unici ipoglicemizzanti, insieme alla metformina, in grado di determinare effetti positivi sul peso corporeo e perciò particolarmente indicati per il trattamento dei pazienti con DM2 ed obesità.

Allo stato attuale, non vi sono studi che abbiano confrontato l'efficacia della chirurgia bariatrica con gli analoghi del GLP-1. Il presente studio ha lo scopo di confrontare retrospettivamente gli effetti ad un anno della chirurgia bariatrica (bypass gastrico BPG e gastrectomia verticale GV) rispetto alla terapia medica con liraglutide sul peso corporeo, sul compenso glicemico e sul profilo di rischio cardiovascolare in pazienti con DM2 ed obesità.

Materiali e metodi

Dal database dei pazienti diabetici afferenti all'UOC di Diabetologia dell'AOU Federico II di Napoli sono stati estratti i dati relativi a 28 pazienti con diabete tipo 2 e obesità sottoposti a chirurgia bariatrica (CB) e di 22 pazienti diabetici con comparabile grado di obesità posti in trattamento medico (TM) con liraglutide nel periodo 2009-2012. Sono stati raccolti i dati all'inizio e dopo 12 mesi di trattamento (medico o chirurgico) relativi a: parametri antropometrici, compenso glicemico, profilo lipidico, pressione arteriosa, terapia del diabete e delle altre comorbidità, effetti collaterali.

Nei pazienti in trattamento medico la liraglutide era aggiunta alla terapia ipoglicemizzante in corso (metformina: 14 pz; repaglinide: 1 pz; metformina + repaglinide: 1 pz; metformina + acarbiosio: 1 pz; metformina + glimepiride: 1 pz; metformina + insulina: 3 pz metformina + glibenclamide + insulina: 1 pz); il dosaggio utilizzato è stato di 1.2 mg/die in 20 soggetti e di 1,8 mg/die nei restanti partecipanti.

Le procedure chirurgiche erano eseguite in laparoscopia a meno di controindicazioni o complicazioni richiedenti la conversione laparotomica. La Gastroplastica verticale o sleeve gastrectomy (GV) prevede la sutura delle pareti gastriche in continuazione con una linea ideale che prosegue lungo il margine sinistro dell'esofago creando, così, un sottile canale in continuità con il duodeno che limita l'assunzione di cibo. Il fondo gastrico viene asportato lasciando uno stomaco residuo di 60-150 ml. L'integrità della regione antro-pilorica e dell'innervazione vagale viene preservata.

Il bypass gastrico (BPG) consiste nel creare una piccola tasca gastrica, orientata verticalmente, che ha un volume generalmente inferiore a 30 ml. Questo reservoir viene isolato dalla restante parte dello stomaco ed è anastomizzato, mediante un'anastomosi del tipo Roux-en-Y, col digiuno, il quale viene sezionato a una distanza di 30-75 cm dal Treitz.

Tutti i pazienti bariatrici assumevano multivitaminici e minerali, che includevano calcio, ferro, folati, vitamina D, A e B12 in accordo con le più recenti Linee Guida Internazionali⁶.

Metodi di laboratorio

Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, colesterolo, trigliceridi, HDL-colesterolo, microalbuminuria e uricemia sono state determinate mediante metodo enzimatico. Il valore del colesterolo LDL è stato calcolato mediante la formula di Friedwald.

L'HbA1c è stata misurata mediante metodo HPLC.

Analisi dei dati

I risultati sono stati analizzati ed espressi come media \pm deviazione standard (DS). L'eccesso di peso corporeo perso (EBWL) è stato calcolato con la formula: $((\text{Peso a 12 mesi} - \text{peso ideale}) / \text{peso ideale}) * 100$. La remissione completa del diabete è stata definita come glicemia a digiuno < 100 mg/dl e HbA_{1c} $< 6\%$ in assenza di terapia ipoglicemizzante; la remissione parziale è stata definita come glicemia a digiuno 100-126 mg/dl e HbA_{1c} 6-6.5% in assenza di terapia ipoglicemizzante⁷.

Le differenze all'interno dei gruppi e tra i gruppi sono state valutate mediante t-test di Student per dati appaiati, per confronto tra medie o chi-quadro, quando appropriato. È stato considerato significativo un valore di $p < 0.05$.

Risultati

Nella Tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche cliniche e metaboliche dei partecipanti allo studio: i 28 pazienti del gruppo chirurgico (M/F: 12/16, età media 47 ± 9 anni) presentavano un IMC medio pre-operatorio di 44 ± 7 kg/m², mentre i 22 pazienti del gruppo TM (M/F: 5/17, età media 58 ± 9 anni) presentavano un IMC medio pre-trattamento di 41 ± 7 kg/m². Il compenso glicemico era insoddisfacente in entrambi i gruppi con una HbA_{1c} media di circa 8,0%. La glicemia media a digiuno e i valori del colesterolo totale e del colesterolo LDL erano simili nei due gruppi; tuttavia i pazienti del gruppo chirurgico presentavano livelli pre-operatori di trigliceridi più elevati e HDL-colesterolo più basso rispetto ai pazienti TM. Sei pazienti del gruppo chirurgico e uno del gruppo TM risultavano microalbuminurici. La pressione arteriosa sistolica (PAS) era simile nei due gruppi, mentre la pressione arteriosa diastolica (PAD) era più alta nel gruppo TM (84 ± 13 vs 76 ± 7 mmHg, $p = 0.011$).

Venti pazienti chirurgici (71%) assumevano ipoglicemizzanti orali (metformina da sola o in associazione a sulfoniluree o inibitori del DPP-IV), 5 (18%) seguivano una terapia combinata (metformina più insulina) e 3 (11%) erano in sola terapia dietetica. Inoltre circa l'80% dei partecipanti assumeva farmaci antipertensivi e il 36% era in trattamento ipolipidemizzante. (Tabella 2)

Nel gruppo TM, 19 soggetti (86%) assumevano ipoglicemizzanti orali mentre 3 (14%) erano in terapia combinata (insulina + metformina); il 64% assumeva farmaci antipertensivi e il 45% era in terapia con farmaci ipolipidemizzanti. (Tabella 2)

Dopo 12 mesi (Tabella 1), nei pazienti sottoposti a chirurgia bariatrica si è osservato un importante decremento ponderale (in media: -39 Kg, $p < 0.001$; $p < 0.001$) con una riduzione dell'eccesso di peso del 40% ($p < 0.001$); nei pazienti TM il decremento ponderale medio era di circa 5 Kg ($p = 0.002$). Il

compenso glicemico migliorava in entrambi i gruppi, come evidenziato dalla riduzione dell' HbA_{1c} (-1,1 % nel gruppo TM, p<0.001 e -2.2% dopo chirurgia bariatrica, p<0.001) e della glicemia a digiuno (-39 ± 61 mg/dl nel gruppo TM, p=0.006 e -83 ± 66 mg/dl nel gruppo chirurgico, p<0.001). Nel braccio chirurgico la percentuale di pazienti che andava incontro a remissione completa o parziale del diabete era del 57 e dell'18% rispettivamente, mentre nessun paziente in trattamento medico andava incontro a remissione; tuttavia il 60% di essi raggiungeva il target di HbA_{1c} <7%. Dodici mesi dopo la CB, tutti i pazienti sospendevano la terapia antipertensiva e circa l'80% sospendeva i farmaci ipolipidemizzanti; la riduzione/sospensione dei farmaci era prescritta immediatamente dopo l'intervento, a causa della riduzione dei liquidi e dell'introito calorico, era reintrodotta se necessario. Al contrario nessuno del gruppo TM sospendeva il trattamento farmacologico delle comorbidità.

A 12 mesi il numero di pazienti con microalbuminuria rimaneva invariato nel gruppo CB mentre aumentava da 1 a 4 nel gruppo TM.

In tabella 3 sono descritti gli effetti collaterali registrati nei due gruppi, la frequenza di deficit nutrizionali e di ipoglicemia reattiva sintomatica.

Sono stati registrati complessivamente 34 e 7 eventi avversi, rispettivamente nel gruppo chirurgico e in TM. Il principale effetto collaterale dopo chirurgia bariatrica è stato l'ipoglicemia reattiva sintomatica (8/28). Meno frequenti sono risultati gli effetti collaterali legati al malassorbimento e al ridotto intake di nutrienti quali l'ipoferritinemia (7/28), l'anemia (3/28) e l'ipoalbuminemia (1/28), gli squilibri elettrolitici (ipocalcemia, ipofosfatemia e ipokaliemia, 8/28) e i deficit di vitamina A (2/28) e B12 (1/28). Inoltre, si è verificato un caso di insufficienza renale acuta dopo l'intervento, attribuibile alla severa disidratazione e risolto dopo una settimana. Tra i pazienti TM la nausea è stato il principale effetto collaterale (5/22). Un solo paziente ha riferito vomito ripetuto e dolore addominale regrediti spontaneamente dopo 1 mese. Non è stato registrato nessun caso di sospensione di liraglutide per effetti collaterali.

Discussione

Nel presente studio sono stati confrontati gli effetti a dodici mesi di due procedure bariatriche (BPG e GV) vs la terapia medica con liraglutide in pazienti con DM2 e obesità grave; i nostri dati documentano che la chirurgia bariatrica è più efficace nel ridurre il peso corporeo: oltre l'85% dei pazienti chirurgici e solo il 4% di quelli in trattamento medico raggiungevano a 12 mesi un buon risultato definito, secondo la classificazione di Maclean, da un IMC < 35 Kg/m². In aggiunta la chirurgia bariatrica risulta maggiormente efficace nel raggiungimento di un compenso glicemico

ottimale rispetto alla terapia medica con una percentuale di remissione del DM2 sovrapponibile a quella riportata in letteratura.

I nostri dati sono in linea con recenti studi di confronto tra la terapia medica e la chirurgia bariatrica in pazienti con DM2 e obesità grave⁸⁻¹⁰. Una recente metanalisi¹¹ basata su trials randomizzati controllati con un follow-up di almeno 6 mesi ha comparato gli effetti delle diverse procedure bariatriche vs trattamenti non chirurgici riportando la superiorità della chirurgia sia rispetto alla perdita di peso (con una differenza media di decremento ponderale tra i gruppi di circa 26 Kg) che rispetto alla remissione del DM2 e della Sindrome metabolica, il miglioramento della qualità di vita e la riduzione dell'utilizzo di farmaci. Tuttavia, la maggior parte degli studi esaminati riguardavano casistiche poco ampie e la terapia utilizzata nel braccio medico era rappresentata da ipoglicemizzanti orali e/o insulina. Il nostro studio è il primo a confrontare le procedure bariatriche con la terapia con analoghi del GLP-1, che costituiscono l'opzione terapeutica ottimale per il trattamento del DM2 associato ad obesità.

Nonostante la superiorità della chirurgia bariatrica in termini di remissione del DM2 e delle comorbidità associate, la terapia con incretino-mimetici ha il vantaggio di indurre meno effetti collaterali e, rispetto ad altri ipoglicemizzanti, determina una significativa riduzione ponderale, del senso di fame e non provoca ipoglicemie⁴. I benefici degli analoghi del GLP-1 sono stati evidenziati in uno studio retrospettivo in *real life* in cui i pazienti trattati con liraglutide in associazione ad altri ipoglicemizzanti orali presentavano una riduzione di 2,4 Kg del peso corporeo accompagnata alla riduzione di 0.9% dell'HbA1c rispetto al basale¹².

E' ampiamente riconosciuto che una riduzione ponderale modesta (5 Kg), induce importanti benefici endocrino-metabolici e riduce il rischio cardiovascolare, attraverso il miglioramento del profilo lipidico e della pressione arteriosa¹³. Nella nostra casistica circa la metà dei pazienti in trattamento con liraglutide manteneva dopo 12 mesi un decremento ponderale di almeno 5 Kg, e questo ha contribuito al miglioramento del compenso glicemico. Infatti quasi il 60% dei pazienti in trattamento con liraglutide manteneva a 12 mesi il target di emoglobina glicata <7%. Questo dato è clinicamente rilevante considerato che un buon compenso glicemico (HbA1c <7%) previene/ritarda lo sviluppo delle complicanze croniche del diabete¹⁴.

I risultati ottenuti nei nostri pazienti in trattamento con liraglutide sul calo ponderale e sul compenso glicemico sono sovrapponibili a quelli riportati dalle metanalisi sull'efficacia degli analoghi del GLP-1¹⁵. Inoltre, abbiamo osservato un miglioramento significativo del colesterolo totale e colesterolo-LDL dopo liraglutide, in linea con studi precedenti¹⁶, senza variazioni della trigliceridemia, dei livelli di HDL-colesterolo, né dell'utilizzo di farmaci ipolipidizzanti. E'

ipotizzabile comunque che benefici maggiori possano essere ottenuti associando la liraglutide ad un intervento intensivo sullo stile di vita come dimostrato dallo studio Look AHEAD¹⁷.

Nei pazienti chirurgici abbiamo documentato una riduzione significativa dei trigliceridi ed un aumento del colesterolo HDL di maggiore entità rispetto ad altri studi^{10,18} da attribuirsi a molteplici meccanismi incluso il marcato decremento ponderale ed il ridotto assorbimento dei lipidi; inoltre, complessivamente, il profilo di rischio cardiovascolare era notevolmente migliorato in quanto tutti i pazienti sospendevano i farmaci antipertensivi e oltre il 90% sospendeva l'uso delle statine.

Un effetto collaterale particolarmente rilevante della CB è l'ipoglicemia reattiva che ha interessato circa il 35% dei pazienti; tale condizione è ampiamente documentata in letteratura, soprattutto dopo bypass gastrico; alcuni autori definiscono questa complicanza una forma "estrema" di miglioramento dell'omeostasi glicemica dovuta al miglioramento della sensibilità insulinica e della secrezione insulinica conseguenti all'intervento chirurgico¹⁹.

In conclusione, la CB è molto più efficace della TM con liraglutide nell'indurre calo ponderale e remissione del DM2; è importante, tuttavia, rilevare che i pazienti trattati con liraglutide ottengono un decremento ponderale medio clinicamente rilevante (-5 kg) conseguendo un compenso glicemico ottimale in circa il 60% dei casi. In aggiunta, la chirurgia bariatrica, per la sua invasività, non può essere considerata un'opzione di prima scelta per la totalità dei pazienti DM2 obesi ma deve essere riservata a quei pazienti che hanno fallito molteplici tentativi di trattamento intensivo sia farmacologico che di stile di vita. Il profilo di efficacia e sicurezza di tali interventi nonché la durevolezza dei benefici osservati dovranno essere confermati nel lungo termine attraverso studi di follow-up più prolungato.

Bibliografia

1. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K, Banel D, Jensen MD, Pories WJ et al. *Weight and type diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis*. Am J Med 2009;122: 248-256.
2. Polymeris A, Karoutsou E, Michaiakis K. *The Impact of Bariatric Surgery Procedures on Type 2 Diabetes, Hyperlipidemia and Hypertension*. Hellenic J Cardiol 2013;54:212-217.
3. Druker DJ. *Enhancing incretin action for the treatment of type 2 diabetes*. Diabetes Care 2003;26:2928-40.
4. Suzuki D, Toyoda M, Kimura M, Miyauchi M, Yamamoto N, Sato H et al. *Effects of Liraglutide, a Human Glucagon-like Peptide-1 Analogue, on Body Weight, Body Fat Area and Body Fat-related Markers in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus*. Intern Med 2013; 52:1029-1034.
5. Van derKlaauw MM, Wolffenbutte BHR. *The combination of insulin and GLP-1 analogues in the treatment of type 2 diabetes*. The Netherlands Journal of Medicine 2012; v70; 10:436-443.
6. Mechanick JI, Youdim A, Jones DB et al. *Clinical practice guidelines for the perioperative nutritional, metabolic, and nonsurgical support of the bariatric surgery patient--2013 update: cosponsored by American Association of Clinical Endocrinologists, The Obesity Society, and American Society for Metabolic & Bariatric Surgery*. Obesity 2013;21 Suppl 1:S1-27.
7. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT et al. *How do we define cure of diabetes?* Diabetes care 2009;32:2133-5.
8. Schauer PR, Kashyap SR, Wolski K, Brethauer SA, Kirwan JP, Pothier CE, Thomas S, Abood B, Nissen SE, Bhatt DL. *Bariatric Surgery versus Intensive Medical Therapy in Obese Patients with Diabetes*. NEJM 2012; 366:1567-76.

9. Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaconelli A, Leccesi L, Nanni G, Pomp A, Castagneto M, Ghirlanda G, Rubino F. *Bariatric Surgery versus Conventional Medical Therapy for Type 2 Diabetes*. NEJM 2012;366:1577-85.
10. Ikramuddin S, Korner J, Lee WJ, Connet JE, Inabnet III WB, Billington CJ et al. *Roux-en-Y Gastric Bypass vs Intensive Medical Management for the Control of Type 2 Diabetes, Hypertension, and Hyperlipidemia*. JAMA 2013;309:2240-2249.
11. Gloy VL, Briel M, Bhatt DL, Kashyap SR, Schauer PR, Mingrone G, Bucher HC, Nordmann AJ. *Bariatric surgery versus non-surgical treatment for obesity: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials*. BMJ. 2013;347:f5934.
12. Mulligan CM, Harper R, Harding J, McIlwaine W, Petrukevitch A, McLaughlin DM. *A Retrospective Audit of Type 2 Diabetes Patients Prescribed Liraglutide in Real-Life Clinical Practice*. Diabetes Ther 2013;4:147-151.
13. Wing RR, Lang W, Wadden TA et al *Benefits of Modest Weight Loss in Improving Cardiovascular Risk Factors in Overweight and Obese Individuals With Type 2 Diabetes*. Diabetes Care 2011;34:1481-6.
14. Qaseem A, Vijan S, Snow V, Cross JT, Weiss KB, Owens DK et al. *Glycemic Control and Type 2 Diabetes Mellitus: The Optimal Hemoglobin A1c Targets. A Guidance Statement from the American College of Physicians*. Ann Intern Med 2007;147:417-422.
15. Sun F, Yu K, Wu S et al. *Cardiovascular safety and glycemic control of glucagon-like peptide-1 receptor agonists for type 2 diabetes mellitus: a pairwise and network meta-analysis*. Diabetes Res Clin Pract 2012;98:386-9.
16. Lorber D. *GLP-1 Receptor Agonists: Effects on Cardiovascular Risk Reduction*. Cardiovasc Ther 2012.
17. The Look AHEAD Research Group. *Long-term Effects of a Lifestyle Intervention on Weight and Cardiovascular Risk Factors in Individuals With Type 2 Diabetes Mellitus Four-Year Results of the Look AHEAD Trial*. Arch Intern Med 2010;170:1566-1575.

18. Griffo E, Nosso G, Lupoli R, Cotugno M, Saldalamacchia G, Vitolo G et al. *Early Improvement of Postprandial Lipemia After Bariatric Surgery in Obese Type 2 Diabetic Patients*. *Obes Surg* 2013.

19. Patti ME, Goldfine AB. *Hypoglycaemia following gastric bypass surgery-diabetes remission in the extreme?* *Diabetologia* 2010;53:2276-9.

Tutti gli autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse.

Tabella 1. Parametri clinico-metabolici prima e 12 mesi dopo l'intervento medico o chirurgico

	Terapia Medica N =22	Terapia Chirurgica N = 28
Peso (kg)		
0	106 ± 15	124 ± 25#
12 mesi	101 ± 15*	85 ± 15*#
Δ	-5 ± 6	-39 ± 15°
EWBL (%)		
0	96 ± 28	103 ± 34
12 mesi	80 ± 30	40 ± 21*#
Δ	-16 ± 42	-63 ± 24°
Glicemia a digiuno (mg/dl)		
0	173 ± 60	162 ± 66
12 mesi	134 ± 34*	79 ± 16*#
Δ	-39 ± 61	-83 ± 66°
HbA1c (%)		
0	8,2 ± 1,6	8,0 ± 2,2
12 mesi	7,1 ± 1,5*	5,8 ± 0,7*#
Δ	-1,1 ± 1	-2,2 ± 2,2
Colesterolo totale (mg/dl)		
0	200 ± 36	208 ± 45
12 mesi	177 ± 33*	194 ± 52
Δ	-23 ± 29	14 ± 48°
LDL-Colesterolo (mg/dl)		
0	114 ± 25	127 ± 39
12 mesi	93 ± 33*	116 ± 46
Δ	-22 ± 32	-11 ± 37
HDL-Colesterolo (mg/dl)		
0	59 ± 18	44 ± 10#
12 mesi	57 ± 12	58 ± 15*
Δ	2 ± 13	14 ± 14°
Trigliceridi (mg/dl)		
0	146 ± 37	208 ± 109#
12 mesi	155 ± 57	102 ± 55*
Δ	9 ± 50	-105 ± 101°
Microalbuminuria (mg/L)		
0	16 ± 11	26 ± 24
12 mesi	45 ± 40	17 ± 9
Δ	29 ± 41	-9 ± 58
PAS (mmHg)		
0	132 ± 25	127 ± 14
12 mesi	125 ± 9	128 ± 18
Δ	-7 ± 26	1 ± 10
PAD (mmHg)		
0	84 ± 13	76 ± 7#
12 mesi	83 ± 6	77 ± 10#
Δ	-1 ± 15	1 ± 13

*p<0.05 (12 mesi vs 0)

#p<0.05 (terapia medica vs terapia chirurgica)

°p<0.05 (Δ terapia medica vs Δ terapia chirurgica)

Tabella 2. Terapia del diabete e delle comorbidità prima e 12 mesi dopo l'intervento medico o chirurgico

	Terapia Medica N =22	Terapia Chirurgica N = 28
Solo dieta		
<i>Basale</i>	0/22 (0%)	3/28 (11%)#
<i>12 mesi</i>	0/22 (0%)	25/28 (89%)*#
Metformina		
<i>Basale</i>	17/22 (77%)	18/28 (64%)
<i>12 mesi</i>	17/22 (77%)	3/28 (11%)*#
Altri I.O.		
<i>Basale</i>	2/22 (9%)	2/28 (7%)
<i>12 mesi</i>	2/22 (9%)	0/28 (0%)*#
I.O. + insulina		
<i>Basale</i>	3/22 (14%)	5/28 (18%)
<i>12 mesi</i>	3/22 (14%)	0/28 (0%)*#
Antipertensivi		
<i>Basale</i>	14/22 (64%)	23/28 (82%)
<i>12 mesi</i>	14/22 (64%)	0/28 (0%)*#
Ipolipidemizzanti		
<i>Basale</i>	10/22 (45%)	10/28 (36%)
<i>12 mesi</i>	10/22 (45%)	2/28 (7%)*#

*p<0.05 (12 mesi vs basale)

#p<0.05 (terapia medica vs terapia chirurgica)

Tabella 3. Effetti collaterali nei pazienti in trattamento medico o chirurgico

	Terapia medica (N=22)	Terapia chirurgica (N=28)
Nausea	5	0
Vomito	1	0
Dolore addominale	1	0
Ipferritinemia	0	7
Ipoalbuminemia	0	1
Anemia	0	3
Ipocalcemia	0	5
Ipofosfatemia	0	2
Ipokaliemia	0	1
Deficit vit. A	0	2
Deficit vit. B12	0	1
Ipoglicemia reattiva	0	8
Insufficienza renale acuta	0	1

Rivista trimestrale recensita
da Chemical Abstracts,
Excerpta Medica

Fondatore

Gian Michele Molinatti – Torino

Redattore Capo

Umberto Valentini – Brescia

Comitato di Redazione

Mariano Agrusta – Salerno
Matteo Bonomo – Milano
Franco Cerutti – Torino
Sandro Gentile – Napoli
Francesco Giorgino – Bari
Annunziata Lapolla – Padova
Marina Trento – Torino
Roberto Trevisan – Bergamo

Comitato Scientifico

Emanuele Bosi – Milano
Valerio Miselli – Reggio Emilia
Massimo Porta – Torino
Gabriele Riccardi – Napoli
Fausto Santeusano – Perugia
Antonio Tiengo – Padova

Direttore Responsabile

Massimo Balestri
massimo.balestri@roche.com

Direttore Editoriale Medico

Raffaele Marino
raffaele.marino@roche.com

Redazione e Coordinamento Editoriale

SEA – Adriana Maffei – Novara
Tel./Fax 0321 636949
sea@adrianamaffei.com

Direzione

Giornale Italiano di
Diabetologia e Metabolismo
Viale G.B. Stucchi 10
20052 Monza (MI)

Sito Internet

www.gidm.it

Novara, 24/03/2014

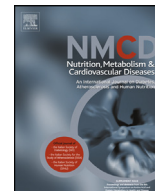
Gent.ma dott.ssa Capaldo,

a nome del Comitato di Redazione del “Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo”, il vostro lavoro *Studio retrospettivo sull’efficacia a un anno della terapia medica con liraglutide e della chirurgia bariatrica nel trattamento del paziente con diabete tipo 2 e obesità* è stato accettato per la pubblicazione.

Ringraziandola per la collaborazione, le porgiamo i nostri più cordiali saluti.

Umberto Valentini
per il Comitato di Redazione
del *Giornale Italiano di
Diabetologia e Metabolismo*





A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome[☆]

R. Giacco^{a,*}, G. Costabile^b, G. Della Pepa^b, G. Anniballi^b, E. Griffo^b, A. Mangione^b, P. Cipriano^b, D. Viscovo^b, G. Clemente^a, R. Landberg^c, G. Pacini^d, A.A. Rivellese^b, G. Riccardi^b

^a Institute of Food Science, National Research Council, Via Roma 64, 83100 Avellino, Italy

^b Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University, Naples, Italy

^c Department of Food Science, BioCentre, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden

^d Metabolic Unit, Institute of Biomedical Engineering, National Research Council, Padova, Italy

Received 24 July 2013; received in revised form 7 January 2014; accepted 8 January 2014

Available online ■ ■ ■

KEYWORDS

Whole-grains;
Cereal fiber;
Glucose metabolism;
Insulin metabolism;
Lipids

Abstract *Background and aim:* Until recently, very few intervention studies have investigated the effects of whole-grain cereals on postprandial glucose, insulin and lipid metabolism, and the existing studies have provided mixed results. The objective of this study was to evaluate the effects of a 12-week intervention with either a whole-grain-based or a refined cereal-based diet on postprandial glucose, insulin and lipid metabolism in individuals with metabolic syndrome.

Methods and results: Sixty-one men and women age range 40–65 years, with the metabolic syndrome were recruited to participate in this study using a parallel group design. After a 4-week run-in period, participants were randomly assigned to a 12-week diet based on whole-grain products (whole-grain group) or refined cereal products (control group). Blood samples were taken at the beginning and end of the intervention, both fasting and 3 h after a lunch, to measure biochemical parameters. Generalized linear model (GLM) was used for between-group comparisons. Overall, 26 participants in the control group and 28 in the whole-grain group completed the dietary intervention. Drop-outs (five in the control and two in the whole-grain group) did not affect randomization. After 12 weeks, postprandial insulin and triglyceride responses (evaluated as average change 2 and 3 h after the meal, respectively) decreased by 29% and 43%, respectively, in the whole-grain group compared to the run-in period. Postprandial insulin and triglyceride responses were significantly lower at the end of the intervention in the whole-grain group compared to the control group ($p = 0.04$ and $p = 0.05$; respectively) whereas there was no change in postprandial response of glucose and other parameters evaluated.

Conclusions: A twelve week whole-grain cereal-based diet, compared to refined cereals, reduced postprandial insulin and triglycerides responses. This finding may have implications for type 2 diabetes risk and cardiovascular disease.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: ARs, alkylresorcinol homologues; CVD, cardiovascular disease; FFA, free fatty acids; GI, glycemic index; GLP-1, glucagon like peptide-1; Homa-IR, homeostatic model assessment-insulin resistance; LPS, lipopolysaccharides; T2D, type 2 diabetes.

[☆] The study was registered with ClinicalTrials.gov identifier NCT00945854.

* Corresponding author. Tel.: +39 0825 299341; fax: +39 0825 781585.

E-mail address: rgiacco@isa.cnr.it (R. Giacco).

Introduction

Diet is an important lifestyle component able to influence the development of chronic diseases. Based on observational studies, a large body of evidence has shown that increased whole-grain consumption is consistently associated with a reduced risk of developing type 2 diabetes (T2D) and cardiovascular diseases (CVD) [1]. However, the mechanisms for this association have not been completely elucidated. The benefits of habitual whole-grain and cereal fiber intake can be mediated by improving one or more risk factors, such as insulin resistance, dyslipidemia, inflammation or oxidative stress. However, intervention studies investigating the effect of whole-grain in the regulation of glucose/insulin metabolism have thus far provided conflicting results. Some clinical trials have shown an improvement in insulin sensitivity [2–4], while other studies have reported no effect on either glucose or insulin metabolism [5–7]. Similarly, there is conflicting data on the effects of increased whole-grain consumption on markers of inflammation [8,9]. As for the effects of whole-grain consumption on lipid metabolism, there is general consensus that whole-grain cereals rich in β -glucans, such as oats and barley, are able to reduce fasting plasma concentrations of both total and LDL cholesterol [10,11]. However, clinical trials utilizing whole-wheat and/or whole-grain rye products have reported mixed results [5,7,12,13].

It is possible that the benefits of whole-grain consumption on reduction of T2D and CVD risk could also be mediated by mechanisms that have not yet been investigated, such as postprandial metabolism. A large body of evidence indicates that metabolic abnormalities in pre-diabetic insulin-resistant subjects and in diabetic patients are more closely related to the postprandial condition than to the fasting state [14]. Indeed, an increase in blood glucose, insulin and lipid concentrations in the postprandial period are risk factors for adverse cardiovascular events that can also be detected in the absence of altered fasting parameters [15]. It can be hypothesized that whole-grain intake exerts its metabolic effects mainly during the postprandial period with minimal impact, at least in the short/medium term, on fasting parameters. In this regard, very few studies have investigated specifically the effects of whole-grain cereals on postprandial metabolism or suggested a beneficial impact of whole-grain on glucose/insulin metabolism. In fact, in acute experimental settings, a reduction in insulin response has been reported with whole-kernel rye/whole-rye bread when compared with white wheat bread [16,17]. This has been confirmed in longer term experimental conditions that demonstrated a reduction of both insulin and glucose postprandial responses after a 2–4 weeks of whole-grain rye or wheat diet in overweight men [18]. A reduction in 2-h glucose response to OGTT after a 12 week diet based on whole-grain cereal products was observed in another study performed in individuals with metabolic syndrome [9,19]. However in this study consumption of whole-grain cereal products was associated with increased fatty fish and

bilberry intake and when the impact of whole-grain was evaluated per se the diet failed to show any significant effect on metabolic parameters.

To clarify the impact of whole-grain on postprandial metabolism, the present study aimed at evaluating the effects of a 12-week intervention comparing a whole-grain-based diet to a refined cereal-based diet on postprandial glucose, insulin and lipid metabolism in individuals with metabolic syndrome, and no weight loss. This study was part of a randomized, controlled, two center (Naples, Italy and Kuopio, Finland) intervention study in which the principal endpoint was peripheral insulin sensitivity [20]. This paper reports data on postprandial metabolism obtained by the Italian research group.

Methods

Population

One hundred and eleven individuals were assessed for eligibility in the study; thirty-five candidates did not meet the inclusion criteria, and fifteen declined to participate. Overall, sixty-one men and women aged between 40 and 65 year, with metabolic syndrome were recruited for a dietary intervention. At screening, the health status and medical history of the subjects were examined by interview, clinical examination and routine laboratory tests. In addition, a 75 g oral glucose tolerance test (OGTT) was carried out to evaluate glucose tolerance and exclude participants with undiagnosed diabetes. The diagnosis of metabolic syndrome was based on the National Cholesterol Education Program Criteria [21]. Subjects were excluded if they were diagnosed with diabetes and/or renal failure (serum creatinine >1.5 mg/dl), liver abnormalities (ALT/AST ratio twice normal values), anemia (Hb <12 g/dl), any other chronic disease, if they used any drug known to influence glucose and lipid metabolism and inflammation, had very high levels of physical activity, or alcohol intake above 40 g/day.

All participants provided written informed consent, and the study was approved by the Ethics Committee of the Federico II Naples University.

Study design

The study was based on a randomized, controlled, parallel group design and consisted of a 4 week run-in period, during which participants were stabilized on their own diet, and a 12-week test period, fully described previously [20]. At the end of the run-in period, participants were randomly assigned to one of two groups, the first assigned to a diet based on whole-grain cereal products (whole-grain group), and the other to a diet based on refined cereal products (control group). Randomization was carried out with stratification for sex, age (5 year increments) and body mass index (BMI) (25–30, 30–35 kg/m²) by means of a computerized random allocation list. Allocation was carried out by personnel not involved in the study; investigators and dieticians were aware of the participants'

group allocation only after completion of the randomization process. Participants were advised not to change their body weight, lifestyle habits and medication unless necessary, throughout the whole duration of the study.

At baseline, 4, 8 and 12 weeks during the intervention, participants underwent clinical investigations including measurements of body weight, waist circumference and blood pressure. Blood samples were taken before and after the intervention, specifically 12 h after an overnight fast and 3 h after lunch to obtain biochemical parameters.

Experimental diets

Participants were encouraged not to change their habitual meat, dairy products, eggs, fish, fruit, vegetable and fat intake during the study; the only difference between the whole-grain and control diets was the inclusion of a fixed amount of whole-grain or refined cereal products as the main carbohydrate source. The whole-grain diet was based on whole-grain products including whole-wheat bread, whole-meal pasta, barley soup, oat biscuits and breakfast cereals plus a small portion of endosperm rye bread. The control diet contained exclusively commercial products based on refined cereals such as wheat bread, rice, pizza, cornmeal porridge, and breakfast cereals (Rice Krispies). The bread consumed by the participants was 90% sour-dough whole-wheat bread (100% whole-grain flour) and 10% endosperm rye bread. Moreover, most cereal products in the experimental diet had a lower glycemic index (GI) than those in the control diet.

To improve adherence to the whole-grain and control diets, the test products in both diets were provided free of charge to participants in amounts sufficient to cover their household consumption for the whole study period. For both diets, cereal products represented approximately 60–80% of the daily carbohydrate intake; the remaining 20–40% of carbohydrates were provided by fruits and vegetables according to each participant's usual dietary habits.

The diets were controlled for energy intake to maintain the participants' body weight stable throughout the intervention.

After the run-in period and at the end of the dietary intervention, the participants spent a day at the Clinical Research Centre where their metabolic profile was evaluated in fasting and postprandial conditions, and where they were served a meal resembling the composition of the recommended diet. The two lunch meals were prepared in the metabolic ward by a dietitian utilizing standardized amounts of refined and whole-grain products in order to make the two meals similar in energy and macronutrient composition (960 kcal, 18% protein, 30% fat, 52% CHO) but different in fiber content, which was higher in the meal based on whole-grain wheat products (17 vs. 12 g). The lunches were consumed in 15–20 min.

Dietary assessment

Compliance with the diets was assessed using a 7-d food record during the run-in period, before starting the

intervention and at the 4th, 8th and 12th week of intervention. All 7-d food records were analyzed by a computerized program using the food database of the Italian National Institute for Food and Nutrition.

Plasma total alkylresorcinol (AR) concentration, a biomarker of whole-wheat and rye intake [22], was measured at baseline and at the end of the intervention in both groups to evaluate compliance to the whole-grain and control diets.

Methods (Appendix)

Sample size calculation and statistical analysis

The primary endpoint was postprandial insulin response. Based on previous studies performed by our group, 61 individuals had to be studied to detect a 25% difference in insulin response between the two groups with 0.05 significance level and 80% power (type II error = 0.2), assuming a 15% drop-out rate.

Energy intake and nutrient composition at the end of the run-in period and during the intervention were calculated from the food records; the intakes during the intervention were expressed as mean of three food records completed at 4, 8 and 12 weeks. Postprandial glucose and insulin response to a lunch meal were expressed as change value, calculated by subtracting the baseline value from that of each time-point of the curve and as mean change over 2 h (for glucose and insulin concentration) or 3 h (for triglyceride, FFA concentrations and other variables).

The results for continuous variables were presented as mean \pm standard error (mean \pm SEM), unless otherwise stated. Variables with skewed distributions by Shapiro–Wilks test were normalized with a logarithmic or square root transformation.

A generalized linear model (GLM) was used to evaluate differences between groups (calculated as change in the parameter concentration between 12-week and the end of the run-in period and indicated by Δ). A paired-samples *t* test was used to examine these changes within each group. For all analyses, the level of statistical significance was set at $p = 0.05$ (two tails). Data were analyzed using SPSS for Windows 11.5 (SPSS Inc., Chicago IL).

Results

Characteristics of participants

Fifty-four subjects completed the dietary intervention: 26 subjects (11 M/15 F) in the control group and 28 (12 M/16 F) in the whole-grain group. Five subjects (16.1%) allocated to the control group and two (6.6%) in the experimental group dropped out because of limited time due to work or family-related problems. The clinical characteristics of the participants are reported in Table 1. At the end of the run-in period, whole-grain and control groups were similar with respect to age (56.7 ± 8.8 vs. 57.7 ± 7.8 years) (mean \pm SD), BMI (31.9 ± 5.8 vs. 31.6 ± 5.4 kg/m²), body

Table 1 Anthropometric and fasting plasma metabolic parameters after run-in and intervention periods.

	Control group (n = 26)			Whole-grain group (n = 28)			p for Δ^c
	Run-in	12-week	Δ^b	Run-in	12-week	Δ	
Body weight (kg)	85.2 ± 19.0 ^a	84.7 ± 19.3	-0.5	87.9 ± 16.7	87.4 ± 15.8	-0.5	0.99
Waist circumference (cm)	105.7 ± 12.0	105.2 ± 12.3	-0.4	107.3 ± 15.5	107.4 ± 14.6	-0.2	0.72
Glucose (mmol/L)	5.8 ± 0.5	5.8 ± 0.7	-0.0	5.6 ± 0.6	5.7 ± 0.7	0.1	0.51
Insulin (pmol/L)	97.2 ± 41.7	97.2 ± 55.6	-0.0	104.2 ± 62.6	111.1 ± 55.6	6.9	0.25
Homa-IR	3.50 ± 1.61	3.24 ± 1.62	-0.26	4.02 ± 2.61	3.99 ± 2.22	-0.03	0.43
Triglycerides (mmol/L)	1.66 ± 0.69	1.58 ± 0.64	-0.08	1.67 ± 1.59	1.62 ± 0.73	-0.05	0.95
Cholesterol (mmol/L)	5.13 ± 0.88	5.20 ± 0.80	0.07	5.23 ± 1.19	5.26 ± 1.24	0.03	0.75
HDL-cholesterol (mmol/L)	0.96 ± 0.18	0.98 ± 0.18	0.02	1.11 ± 0.34	1.09 ± 0.34	-0.02	0.18
LDL-cholesterol (mmol/L)	3.39 ± 0.80	3.47 ± 0.78	0.08	3.37 ± 1.16	3.42 ± 1.14	0.05	0.93
Apo B-48 (μg/ml)	8.05 ± 6.26	8.70 ± 6.56	0.65	7.26 ± 7.82	7.72 ± 4.89	0.46	0.90
Apo B-100 (μg/ml)	0.98 ± 0.19	1.02 ± 0.19	0.04	0.99 ± 0.26	1.00 ± 0.26	0.01	0.31
FFA (mEq/L)	0.64 ± 0.19	0.54 ± 0.15 ^d	-0.10	0.60 ± 0.20	0.57 ± 0.20	-0.02	0.32
GLP-1 (pmol/L)	3.77 ± 2.04	3.64 ± 1.41	-0.13	3.03 ± 1.00	2.91 ± 0.82	-0.12	0.92
Total ARs (nmol/L) ^e	63.4 ± 58.4	43.7 ± 38.0	-19.7	52.0 ± 62.3	140.2 ± 102.0	88.3	0.0001

^a Mean ± SD (all such values).

^b Δ : change of the parameters calculated as 12 week – run-in values.

^c Differences between the two groups (whole-grain vs. control) were evaluated by Generalized linear model (GLM).

^d $p < 0.02$ paired sample t -test (12-week vs. run-in).

^e ARs, alkylresorcinols.

weight, waist circumference, fasting plasma concentrations of glucose, insulin, lipids, Apo B 100, Apo B 48, GLP-1, total AR and Homa-IR.

Dietary compliance

Compliance was good for both diets. During the intervention, both groups reported consuming the recommended portions of breads and whole-grain or refined cereal-based product. At the end of the intervention the intake of whole-grain-ingredients was 136 ± 18 g/day dry weight in the whole-grain group and zero in the control group. After run-in, the energy intake and nutrient composition of the diets were similar between the two groups (Table 2). Compared with the end of the run-in period, both whole-grain and control groups increased their energy ($p = 0.001$) and carbohydrate intakes ($p < 0.05$) and decreased total fat and cholesterol intake ($p < 0.05$) during the intervention. As expected and according to the protocol, at the end of the intervention, the whole-grain group diet was characterized by a significantly higher total and cereal fiber intake ($p < 0.05$) and a decrease in GI ($p < 0.05$) compared with the control group diet.

There were also small differences in protein, PUFA and MUFA intakes (Table 2) but only the variation in PUFA and MUFA was significantly different between the two groups ($p = 0.01$; GLM) (Table 2) likely due to higher PUFA content in whole-grain products compared with refined ones. However GLM for univariate analysis, including Δ PUFA and Δ MUFA as covariate, confirmed the independent effect of whole-grain intake on postprandial triglyceride ($p = 0.002$) and insulin ($p = 0.009$) responses.

Fasting total plasma AR concentrations increased significantly in the whole-grain group and decreased significantly in the control group compared to the end of

the run-in period. There was also a significant difference between the two groups at the end of the intervention (+88.3 vs. -19.7 nmol/L; $p < 0.0001$, GLM analysis) (Table 1).

Effects of dietary intervention on anthropometric and fasting metabolic parameters

Mean body weight and waist circumference ($M \pm SD$) did not change during the intervention period in either group (Table 1).

No effects of the whole-grain and control diets on fasting plasma concentrations of glucose, insulin, lipids, Apo B-100, or Apo B-48 and Homa-IR were observed at the end of the intervention period. A significant decrease in fasting plasma FFA levels was observed only in the control group, but there were no differences between the two groups (Table 1).

Effects of dietary intervention on postprandial parameters

At the end of run-in period, postprandial plasma changes in glucose and insulin were similar in the whole-grain and control group at each time point (Fig. 1).

At the end of the intervention, the postprandial glucose response did not change in either group compared to the run-in period. In contrast, postprandial plasma insulin concentrations at 30, 90 and 120 min decreased significantly compared to the run-in period ($p < 0.05$) only in the whole-grain group (Fig. 1). Consequently, the average postprandial change in insulin 120 min after fasting was significantly reduced (-29%) compared to the run-in period ($p < 0.05$) in the whole-grain group, and the change was significantly different from that observed in the control group ($p = 0.04$; GLM) (Fig. 1).

Table 2 Energy intake and diet composition after run-in and intervention periods.

	Control group (n = 26)			Whole-grain group (n = 28)			p for Δ^c
	Run-in	12-week	Δ^b	Run-in	12-week	Δ	
Energy (kcal/d)	1736 ± 80 ^a	1929 ± 58 ^d	193	1778 ± 95	2058 ± 80 ^d	280	0.33
CHO (%)	51 ± 1.0	55 ± 0.7 ^d	4.0	50 ± 1.0	52 ± 0.7 ^d	2.0	0.30
Protein (%)	17.1 ± 0.5	17.0 ± 0.3	-0.1	17.1 ± 0.6	18.2 ± 0.3 ^d	1.1	0.06
Total fat (%)	32.0 ± 0.9	28.4 ± 0.7 ^d	-3.6	33.1 ± 1.0	29.7 ± 0.7 ^d	-3.4	0.90
SAFA (%)	9.4 ± 0.4	8.8 ± 0.3	-0.6	10.1 ± 0.4	8.7 ± 0.3 ^d	-1.4	0.18
MUFA (%)	14.5 ± 0.5	14.1 ± 0.4	-0.4	14.8 ± 0.6	12.4 ± 0.5 ^d	-2.4	0.01
PUFA (%)	3.9 ± 0.2	2.9 ± 0.7 ^d	-1.0	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.2 ^d	0.0	0.01
Cholesterol (mg/day)	225 ± 17	187 ± 11 ^d	-38	250 ± 18	187 ± 10 ^d	-62	0.28
Total fiber (g/day)	20.4 ± 1.0	22.1 ± 0.9	1.7	20.3 ± 1.1	40.2 ± 1.2 ^d	20.0	0.00
Cereal fiber (g/day)	9.5 ± 0.7	11.8 ± 0.4	2.3	8.4 ± 0.6	28.9 ± 1.1 ^d	20.5	0.00
Glycemic index (%)	64.1 ± 1.0	72.0 ± 0.6	7.9	64.3 ± 1.2	45.8 ± 0.4 ^d	-18.5	0.00

^a Mean ± SEM (all such values).

^b Δ : change of the parameters calculated as 12 week – run-in values.

^c Differences between the two groups (whole-grain vs. control) were evaluated by Generalized Linear Model (GLM).

^d $p < 0.02$ paired sample t -test (12-week vs. run-in).

Postprandial plasma triglyceride levels were similar at baseline in the two groups (Fig. 2). At the end of the intervention, postprandial plasma triglyceride levels did not change in the control group compared to the end of the run-in period. On the contrary, in the whole-grain group, postprandial plasma triglyceride concentrations at 120 and 180 min were significantly lower than at the end of the run-in period ($p < 0.05$) (Fig. 2). Consequently, the average change in postprandial triglyceride levels after fasting for 180 min was significantly reduced (-43%) compared to the end of the run-in period ($p < 0.05$), and

the change in triglyceride response observed in the whole-grain group was significantly lower than that observed in the control group ($p = 0.001$; GLM) (Fig. 2).

Postprandial responses of plasma FFA, Apo B 100, Apo B 48 and GLP-1 were similar at the end of the run-in period in the whole-grain and control group and did not change at the end of intervention in either group (Table 3).

At the end of the intervention postprandial average triglyceride change was inversely correlated with AR plasma levels ($r = -0.283$; $p = 0.05$) and cereal fiber intake ($r = -0.419$; $p = 0.003$) (Additional Figure).

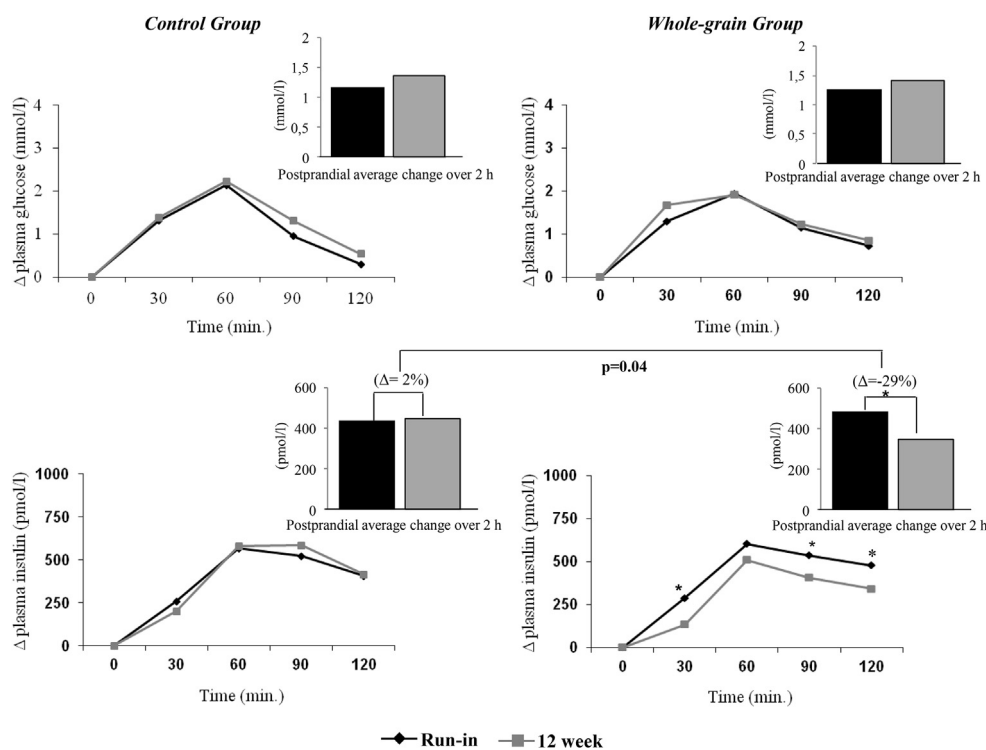


Figure 1 Postprandial plasma glucose and insulin concentrations after run-in and intervention periods (mean values); * $p < 0.05$ paired sample t -test (12-week vs. run-in); $p = 0.04$ GLM (differences between whole-grain vs. control calculated as change between 12-week and the end of the run-in periods).

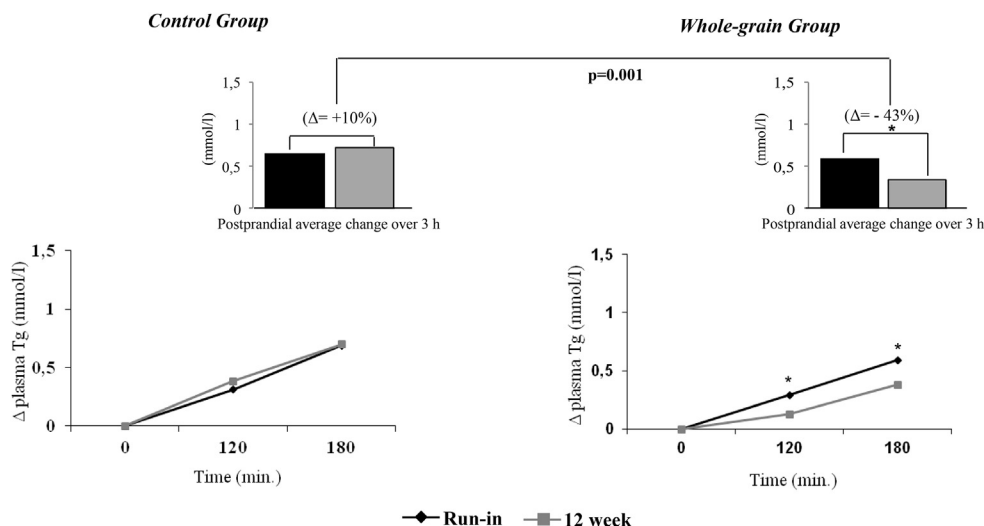


Figure 2 Postprandial plasma triglyceride concentrations after run-in and intervention periods (mean values); * $p < 0.05$ paired sample t -test (12 week vs. run-in); $p = 0.001$ GLM (differences between whole-grain vs. control calculated as change between 12-week and the end of the run-in periods).

Discussion

This study shows that a diet based on whole-grain cereal products, compared to a diet based on refined cereals, reduces postprandial insulin and triglyceride plasma concentrations in individuals with metabolic syndrome. In the whole-grain group, postprandial insulin response decreased by 29% compared to baseline, i.e., significantly lower than that observed in the group assigned to the refined cereal diet. It must be emphasized that the reduced insulin response was not paralleled by changes in plasma glucose response, suggesting that the whole-grain diet was able to improve insulin action in the postprandial period. In a larger cohort that included both these subjects and a group recruited in Kuopio, we previously evaluated peripheral insulin sensitivity in the fasting condition utilizing an intravenous glucose testing, and no effect of whole-grain supplementation was observed [20]. Our results suggest a possible effect of whole-grain diet on insulin sensitivity at the liver level, although this was not directly measured by tracer methodology.

In our study, the reduced postprandial insulin response in the whole-grain group was not mediated by changes in FFA or GLP-1 plasma concentrations – these biomarkers

were not different between the two groups. However, other mechanisms linking whole-grain consumption, large intestinal events and insulin sensitivity may be involved. The fermentation of grain fiber takes place in the large intestine, beneficially affecting the composition of gut microbiota and decreasing the permeability of the gut barrier. An improved gut barrier reduces leakage of endotoxic bacterial lipopolysaccharides (LPS) into the circulation. Lower concentrations of LPS in the blood seem to alleviate peripheral inflammation and insulin resistance. The fermentation of grain fiber also leads to a continuous supply and absorption of metabolites, such as short chain fatty acids and ferulic acid derivatives, which may have anti-inflammatory effects and improve insulin resistance [23].

Whatever the mechanisms, a lower postprandial plasma insulin response has a beneficial effect on health outcomes. Indeed, an increased insulin response to ingested foods is associated with lower plasma glucose values between meals and consequently a greater appetite with a possible negative impact on body weight regulation [24,25]. In addition, postprandial hyperinsulinemia has been identified as a risk marker for the development of T2D and CVD [26,27]. Therefore, in recent years,

Table 3 FFA, apolipoproteins and GLP-1 plasma concentrations after run-in and intervention periods.

	Control group (n = 26)			Whole-grain group (n = 28)			p for Δ^d
	Run-in	12-week	Δ^c	Run-in	12-week	Δ	
FFA (mEq/L*180 min) ^b	-0.39 ± 0.16 ^a	-0.32 ± 0.15	0.07	-0.36 ± 0.16	-0.35 ± 0.18	0.01	0.19
Apo B-48 (μg/ml*180 min) ^b	7.87 ± 0.63	6.30 ± 0.73	-1.57	6.37 ± 0.59	5.38 ± 0.68	-1.00	0.61
Apo B-100 (μg/ml*180 min) ^b	-0.07 ± 0.01	-0.09 ± 0.01	-0.013	-0.07 ± 0.01	-0.09 ± 0.01	-0.014	0.97
GLP-1 (pmol/L*180 min) ^b	0.79 ± 0.15	0.85 ± 0.13	0.04	0.79 ± 0.19	0.64 ± 0.11	-0.15	0.51

^a Data are expressed as Mean ± SEM (all such values).

^b Values calculated as postprandial average change from baseline value over 180 min.

^c Δ : change of the parameters calculated as 12 week – run-in values.

^d Differences between the two groups (whole-grain vs. control) were evaluated by Generalized linear model (GLM).

nutritional research has focused on the identification of carbohydrate-rich foods with a lower insulinemic index, such as rye, barley and other whole-grain cereals.

Finally, in the medium/long term, an improvement in postprandial insulin and glucose metabolism, which reduces β cell stress, might lead to a better preservation of β -cell function and delay the onset of diabetes [28]. In addition to this, another relevant and novel finding of our study is that the whole-grain diet was able to reduce postprandial triglyceride concentrations by as much as 43% compared to the control diet. Whole-grain consumption could reduce postprandial triglycerides by acting either on the synthesis of triglyceride-rich lipoproteins and/or on their catabolism, particularly through an increase in lipoprotein lipase activity. It is possible that the decrease in insulin concentrations in the postprandial period could help reduce the intestinal synthesis of chylomicrons and liver derived VLDL particles [29]. However, the absence of any reduction of Apo B-48 and Apo B-100 plasma concentrations in the whole-grain group does not support the hypothesis of a reduced synthesis of chylomicrons and VLDL. On the other hand, whole-grain consumption could contribute to modify the lipid composition of lipoprotein particles rather than reduce their number. In this case, the fiber present in whole-grain products might have interfered with fat absorption in the small intestine, thus leading to the synthesis of lipoproteins that are less rich in triglycerides [30]. This is consistent with data showing that the addition of wheat fiber to a meal reduced postprandial triglyceride response [31]. Furthermore, we found a significant inverse correlation between cereal fiber intake and postprandial plasma triglyceride changes from baseline in the whole-grain group ($r = -0.419$; $p = 0.003$), suggesting a key role of whole-grain fiber in reducing postprandial triglyceride response.

Whatever the mechanisms, the reduction of plasma triglycerides in the postprandial period is definitively relevant from a clinical point of view, as postprandial lipemia has been proposed as an independent CVD risk factor [15,32]. Moreover, the magnitude of the reduction in postprandial triglyceride concentrations may be clinically meaningful. In fact, based on the results of large prospective studies, we can foresee that the decrease in postprandial triglyceride concentrations obtained in this study could be associated with a significant reduction in CVD risk [15,32].

A main strength of our study was a well-controlled intervention trial of sufficient duration to evaluate the effects of a dietary intervention on glucose and lipid metabolism. An additional strength is that plasma AR was used as a biomarker for the intake of whole-grain. Moreover, our results, obtained after a 12-week period, indicated that modifications in postprandial plasma insulin and triglyceride concentrations induced by the ingestion of whole-grain wheat products were independent of small but significant differences in nutrients between the two dietary interventions, preserved over time and not neutralized by homeostatic mechanisms of counteraction. One limitation of our study is that the duration of the

intervention was relatively short in relation to the natural history of T2D and CVD. However, the duration of the intervention and the sample size were greater than those reported in previous studies that showed no effect of whole-grain consumption on postprandial glucose and insulin metabolism [7,33].

In conclusion, our study indicates that the consumption of whole-grain products reduced postprandial insulin and triglyceride plasma concentrations, which are two important risk factors for T2D and CVD. These effects might partially explain the mechanisms through which increased whole-grain consumption is associated with a reduced risk of T2D and CVD. However, only intervention trials of longer duration and with hard endpoints (onset of T2D, cardiovascular events) could clarify this issue.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by the European Commission in the 6th Framework Programme, Project HEALTHGRAIN (FOOD-CT-2005-514008) and Ministero dell' Istruzione, dell'Università della Ricerca, Rome, Italy, PRIN n. 2010JC WWKM.

Barilla G&R F.lli. SpA, Parma, Italy provided some of the cereal products for the study participants. We thank Angela Giacco and Annamaria Riviaccio from the Department of Clinical Medicine and Surgery of Federico II University, Naples, Italy for their technical assistance in planning the experimental diets, Lidia Patti and Lucrezia Di Marino for their skillful work on the analysis of Apolipoprotein and GLP-1.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.numecd.2014.01.007>.

References

- [1] Liu S. Greater whole-grain intake is associated with lower risk of type 2 diabetes, cardiovascular disease, and weight gain. *J Nutr* 2012;142:1304–13.
- [2] Pereira MA, Jacobs Jr DR, Pins JJ, Raatz SK, Gross MD, Slavin JL, et al. Effect of whole grains on insulin sensitivity in overweight hyperinsulinemic adults. *Am J Clin Nutr* 2002;75:848–55.
- [3] Juntunen KS, Laaksonen DE, Poutanen KS, Niskanen LK, Mykkänen HM. High fiber rye bread and insulin secretion and sensitivity in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2003;77:385–91.
- [4] Landberg R, Andersson SO, Zhang JX, Johansson JE, Stenman UH, Adlercreutz H, et al. Rye whole grain and bran intake compared with refined wheat decreases urinary C peptide, plasma insulin, and prostate specific antigen in men with prostate cancer. *J Nutr* 2010;140:2180–6.
- [5] Andersson A, Tengblad S, Karlström B, Kamal-Eldin A, Landberg R, Basu S, et al. Whole-grain foods do not affect insulin sensitivity or markers of lipid peroxidation and inflammation in healthy, moderately overweight subjects. *J Nutr* 2007;137:1401–7.

- [6] Brownlee IA, Moore C, Chatfield M, Richardson DP, Ashby P, Kuznesof SA, et al. Markers of cardiovascular risk are not changed by increased whole-grain intake: the WHOLE heart study, a randomised, controlled dietary intervention. *Br J Nutr* 2010;104:125–34.
- [7] Giacco R, Clemente G, Cipriano D, Luongo D, Viscovo D, Patti L, et al. Effects of the regular consumption of wholemeal wheat foods on cardiovascular risk factors in healthy people. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2010;20:186–94.
- [8] Katcher HI, Legro RS, Kunselman AR, Gillies PJ, Demers LM, Bagshaw DM, et al. The effects of a whole grain enriched hypocaloric diet on cardiovascular disease risk factors in men and women with metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2008;87:79–90.
- [9] de Mello V, Schwab U, Kolehmainen M, Koenig W, Siloaho M, Poutanen K, et al. A diet high in fatty fish, bilberries and whole-grain products improves markers of endothelial function and inflammation in individuals with impaired glucose metabolism in a randomised controlled trial: the Sysdimet study. *Diabetologia* 2011;54:2755–67.
- [10] Ripsin CM, Keenan JM, Jacobs Jr DR, Elmer PJ, Welch RR, Van Horn L, et al. Oat products and lipid lowering. A meta-analysis. *J Am Med Assoc* 1992; 24:267(24):3317–25. Erratum in: *JAMA* 1992; 268:3074.
- [11] Li J, Kaneko T, Qin LQ, Wang J, Wang Y. Effects of barley intake on glucose tolerance, lipid metabolism, and bowel function in women. *Nutrition* 2003;19:926–9.
- [12] Leinonen KS, Poutanen KS, Mykkänen HM. Rye bread decreases serum total and LDL cholesterol in men with moderately elevated serum cholesterol. *J Nutr* 2000;130:164–70.
- [13] Price RK, Keaveney EM, Hamill LL, Wallace JM, Ward M, Ueland PM, et al. Consumption of wheat aleurone-rich foods increases fasting plasma betaine and modestly decreases fasting homocysteine and LDL-cholesterol in adults. *J Nutr* 2010;140:2153–7.
- [14] Nordestgaard BG, Langsted A, Freiberg JJ, Jang Y, Lee JH, Kim OY, Park HY, et al. Nonfasting hyperlipidemia and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets* 2009;10:328–35.
- [15] Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM. Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *J Am Med Assoc* 2007;298:309–16.
- [16] Leinonen K, Liukkonen K, Poutanen K, Uusitupa M, Mykkänen H. Rye bread decreases postprandial insulin response but does not alter glucose response in healthy Finnish subjects. *Eur J Clin Nutr* 1999;53:262–7.
- [17] Juntunen KS, Niskanen LK, Liukkonen KH, Poutanen KS, Holst JJ, Mykkänen HM. Postprandial glucose, insulin, and incretin responses to grain products in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* 2002; 75:254–62.
- [18] McIntosh GH, Noakes M, Royle PJ, Foster PR. Whole-grain rye and wheat foods and markers of bowel health in overweight middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 2003;77:967–74.
- [19] Lankinen M, Schwab U, Kolehmainen M, Paananen J, Poutanen K, Mykkänen H, et al. Whole grain products, fish and bilberries alter glucose and lipid metabolism in a randomized, controlled trial: the Sysdimet study. *PLoS One* 2011;6:e22646.
- [20] Giacco R, Lappi J, Costabile G, Kolehmainen M, Schwab U, Landberg R, et al. Effects of rye and whole wheat versus refined cereal foods on metabolic risk factors: a randomised controlled two centre intervention study. *Clin Nutr*; 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2013.01.016>.
- [21] National Cholesterol Education Program (NECP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NECP) expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* 2002;106:3143–421.
- [22] Landberg R, Kamal Eldin A, Andersson A, Vessby B, Aman P. Alkylresorcinols as biomarkers of whole grain wheat and rye intake: plasma concentration and intake estimated from dietary records. *Am J Clin Nutr* 2008;87:832–8.
- [23] Lappi J, Kolehmainen M, Mykkänen H, Poutanen K. Do large intestinal events explain the protective effects of whole grain foods against type 2 diabetes? *Crit Rev Food Sci Nutr* 2013;53(6): 631–40.
- [24] Rosén LA, Silva LO, Andersson UK, Holm C, Ostman EM, Björck IM. Endosperm and whole grain rye breads are characterized by low post-prandial insulin response and a beneficial blood glucose profile. *Nutr J* 2009;8:42.
- [25] Rosén LA, Östman EM, Björck IM. Postprandial glycemia, insulinemia, and satiety responses in healthy subjects after whole grain rye bread made from different rye varieties. 2. *J Agric Food Chem* 2011;59(22):12149–54.
- [26] Tanabe N, Saito K, Yamada Y, Takasawa T, Seki N, Suzuki H. Risk assessment by post-challenge plasma glucose, insulin response ratio, and other indices of insulin resistance and/or secretion for predicting the development of type 2 diabetes. *Intern Med* 2009; 48(6):401–9.
- [27] Manchanayake J, Chitturi S, Nolan C, Farrell GC. Postprandial hyperinsulinemia is universal in non-diabetic patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2011; 26(3):510–6.
- [28] Wajchenberg BL. Beta-cell failure in diabetes and preservation by clinical treatment. *Endocr Rev* 2007;28(2):187–218.
- [29] Frayn KN. Insulin resistance, impaired postprandial lipid metabolism and abdominal obesity. A deadly triad. *Med Princ Pract* 2002;11(Suppl. 2):31–40.
- [30] Lairon D, Play B, Jourdhueil-Rahmani D. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 2007;18:217–27.
- [31] Cara L, Dubois C, Borel P, Armand M, Senft M, Portugal H, et al. Effects of oat bran, rice bran, wheat fiber, and wheat germ on postprandial lipemia in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 1992;55: 81–8.
- [32] Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A. Non-fasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *J Am Med Assoc* 2007;298:299–308.
- [33] Ross AB, Bruce SJ, Blondel Lubrano A, Oguey Araymon S, Beaumont M, Bourgeois A, et al. A whole grain cereal rich diet increases plasma betaine, and tends to decrease total and LDL cholesterol compared with a refined grain diet in healthy subjects. *Br J Nutr* 2011;105:1492–502.

Role of Diet and Diet Interventions in Diabetic Patients: Physiological and Metabolic Changes and Reduction in Morbidity and Mortality

Rosalba Giacco · Claudia Vetrani · Ettore Griffo ·
Angela A. Rivellesse

Published online: 13 October 2013
© Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract Evidence of the impact of diet and dietary components on cardiovascular risk factors and morbidity/mortality in diabetic patients over the last 3 years is reviewed. The review comprises a section focusing on the effects of diet on body weight reduction and other cardiovascular risk factors, and a section in which recent evidence on hard endpoints are discussed. Overall, the data accumulated in the period considered seem to confirm the recommendations for diabetes management. More intervention studies focusing on hard endpoints in diabetic subjects are needed to prove in a definitive way the role of diet on the reduction of cardiovascular morbidity and mortality, especially that concerning weight reduction.

Keywords Diabetes · Dietary pattern · Risk factors · Cardiovascular events · Cardiovascular mortality

C. Vetrani · E. Griffo · A. A. Rivellesse (✉)
Department of Clinical Medicine and Surgery, “Federico II”
University of Naples, Via S. Pansini 5, 80100 Naples, Italy
e-mail: rivelles@unina.it

C. Vetrani
e-mail: c.vetrani@libero.it

E. Griffo
e-mail: ettoregri@gmail.com

R. Giacco
Institute of Food Science, CNR- National Research Council,
Via Roma 64, 83100 Avellino, Italy
e-mail: rgiacco@isa.cnr.it

Introduction

Diet is recognized as one of the cornerstones in the treatment of diabetes, having as primary goals not only the improvement in blood glucose control and other metabolic cardiovascular (CV) risk factors [1, 2], but also the reduction of cardiovascular disease (CVD), which accounts for about 70 % of total mortality in these patients [3].

Moreover, since diet and its components may act on the reduction of CV risk through different mechanisms, having pleiotropic effects, a healthy diet may be particularly important in patients characterized by the aggregation of multiple risk factors (overweight/obesity, poor glycemic control, dyslipidemia and high blood pressure). Nevertheless, little is known about this task in diabetic patients, at least for what concerns intervention studies with hard endpoints, such as incidence of CV morbidity and mortality.

Hence, this review will mainly take into account the papers published in the last 3 years that have evaluated the effects and possible mechanisms of action of the diet on metabolic parameters, CVD risk factors, and CV morbidity and mortality in diabetic patients.

Since some studies have investigated the role of diet in primary prevention of diabetes, a brief summary of the evidence on this aspect is included.

Diet and Type 2 Diabetes Prevention

As reported above, almost 70 % of total mortality in patients with type 2 diabetes (T2D) is due to CVD. Since T2D is increasing throughout the world, a reduction in CVD could

be achieved by preventing the development of this disease, which is strongly linked to westernized dietary patterns, physical inactivity and rising rates of obesity.

In the last three decades, several studies have tried to clarify the relation existing between food groups or dietary patterns and the risk of T2D, as well the effects of lifestyle modification and dietary changes on the risk to develop T2D.

More recently, two observational studies have provided further information on the role of food consumption or Mediterranean diet on T2D risk. The first, the EPIC-Potsdam study, has confirmed in line with previous studies that higher intake of whole-grain bread, fruits, raw vegetables and coffee is inversely associated with T2D risk in a large cohort of healthy subjects, during an average follow-up of 8 years [4]. Conversely, high intake of red meat, butter, sauces and low-fat dairy is associated with an increase of T2D risk.

The InterAct study has confirmed that a higher adherence to a Mediterranean dietary pattern is associated with a significant reduction (-12 %) in the risk of developing T2D compared with individuals with lower adherence to Mediterranean diet in a large cohort of healthy subjects from Mediterranean and non-Mediterranean countries [5].

The role of dietary patterns, in particular of the Mediterranean diet, in the reduction of T2D risk has been clearly reinforced by results of the PREDIMED study, investigating the effects of two Mediterranean diets (MedD) supplemented with extra-virgin olive oil or mixed nuts versus a low-fat diet on incidence of diabetes in individuals of middle age having at least three CV risk factors [6]. After a median follow-up of 4 years, a multivariable adjusted hazard ratio has been almost 50 % lower in the participants assigned to the two MedD compared to the control diet. In addition, in all arms of the study, increased adherence to MedD has been inversely associated with diabetes. We underline that in this study, the reduction of T2D risk has been observed in the absence of significant changes in body weight or physical activity, suggesting that the mechanisms involved in diabetes risk reduction are independent of body weight loss and could be linked to other mechanisms, such as improvement in β -cell function, reduction of oxidative stress and inflammation.

In addition to the effect of diet composition, new data from the Diabetes Prevention Study (DPS) have further outlined the importance of overall lifestyle modifications on the reduction of T2D; in fact, the benefits of moderate weight reduction, together with an increase of physical activity, are preserved in the long-term, even many years after the conclusion of the intervention [7].

Although lifestyle interventions are not easily applicable in real-life settings, the European Diabetes Prevention Study (EDIPS) has recently shown that the DPS protocol can be applied in other European countries with success, reducing by 57 % the cumulative T2D incidence during a mean follow-up of 3.1 years [8].

Diet in Diabetic Patients

This section will address evaluating the effects of different diets on body weight and other CV risk factors.

Body Weight

Overweight and obesity are the most important modifiable risk factors for T2D and CVD. As a matter of fact, it is well known that abdominal adiposity induces insulin resistance and, consequently, an increased steady requirement for insulin secretion. This condition represents a stressful state that can lead, over the time, to β -cell function decline with deterioration of blood glucose control. Moreover, excessive body weight is associated with an increase in many of the most important CV risk factors.

Therefore, in overweight or obese individuals with T2D, evidence-based recommendations suggest that weight loss is the first step of T2D management, because the improvement of insulin resistance and of β -cell function may be able to improve glucose metabolism, induce partial or total remission of diabetes and reduce the other CV risk factors linked to overweight/obesity.

In the last 3 years, some studies have clearly shown the benefits of intensive dietary interventions and lifestyle changes on body weight and metabolic parameters.

Intensive individualized dietary intervention, based on the nutritional recommendations of the European Association for the Study of Diabetes, is able to improve blood glucose control, and reduce body weight and waist circumference compared to usual care in diabetic patients not adequately controlled despite optimized hypoglycemic treatment [9].

Regarding lifestyle changes, the long-term results of the Action for Health in Diabetes trial (Look AHEAD) have been published. The Look AHEAD trial is the first study that has investigated the effects of a moderate body weight reduction, obtained by an intensive lifestyle intervention that combined a moderate energy restriction of diet with a daily increase of physical activity, on several CV risk factors and the incidence of CV events and mortality in a large cohort of overweight and obese individuals with T2D. In relation to CV risk factors, results of the study have shown that the intensive lifestyle intervention, compared with an usual education program, represents a good strategy to reduce body weight, and significantly improve blood pressure and metabolic profile in the long-term (4 years of follow-up) [10••]. In addition, in a small number of patients, the intervention is even able to induce a partial or total remission of type 2 diabetes [11]. Noteworthy is the sustained effect of lifestyle intervention on HDL-cholesterol (HDL-col). In contrast to several other risk factors, the effect for HDL-col is greater at 4 years than at 1 year; at each year, HDL-col in the lifestyle group is approximately 8–9 % higher than baseline levels, whereas in the control group,

it is 3–6 % above baseline. Interestingly, although severely obese participants have not reached their ideal body weight, a significant reduction of blood pressure, glucose, HbA1c and triglycerides has been achieved, confirming the benefits of moderate weight loss (7–10 % of initial body weight) in the management of T2D metabolic abnormalities. However, the improvement in CV risk factors reported in this study has been achieved with great investment in terms of economic and professional resources; hence, this approach is not easily applicable in clinical practice, and more feasible strategies should be identified.

An easier approach based on additional time for dietary support (6.5 hours/years more than usual clinical practice) has been applied in the Early ACTID trial [12••] within the context of UK National Health Service. The results have confirmed the effectiveness of dietary intervention to reduce body weight and medication need, and to improve glucose homeostasis in 1 year's time. With respect to the increase of physical activity, no additional benefits have been observed for risk factor improvement or on the magnitude of body weight reduction. It can be hypothesized that this result is due to the lack of real increase in physical activity, since only general advice was given to participants, rather than a controlled physical exercise program.

Considering the importance of weight reduction and the challenge in achieving and maintaining stable weight loss, much attention has been always placed on the most effective dietary composition to decrease body weight and improve other CV risk factors in people with T2D. In this respect, a recent meta-analysis [13•] has tried to give answers to this question. On the basis of 20 clinical trials, the results of this meta-analyses seem to suggest that: a) different types of diet (low-carbohydrate, low-glycemic index, Mediterranean and high-protein diets) are all effective in blood glucose control; b) low-carbohydrate and Mediterranean diets are more effective in reducing body weight. However, as pointed out in the editorial done on this meta-analyses [14], the results should be considered with caution because the studies analyzed are few—especially for some outcomes (i.e. body weight)—quite heterogeneous, and the control diet is often not very well characterized.

Hence, this new evidence reinforces the concept that energy intake reduction seems to be more important than the qualitative composition of the diet, at least for weight loss, as we have recently reviewed [15].

In relation to energy restriction, the potential mechanisms triggered by it, independent from body weight loss, have been investigated by two recent trials, focusing on the effects of a very-low calorie diet (VLCD) in patients with T2D [16, 17]. Findings of these two studies demonstrate that short-term (1 week) caloric restriction per se can improve glucose control, β -cell function and insulin sensitivity, independently from weight-loss.

In particular, Lim and colleagues [16] have demonstrated a clear “multi-step” mechanism behind the observed effects,

primarily involving changes in hepatic insulin sensitivity, followed by a slower change in the β -cell function. Moreover, the normalization of both β -cell function and hepatic insulin sensitivity in T2D is associated with decreased pancreatic and liver triglycerides content, which has been linked to T2D etiology.

Other Cardiovascular Risk Factors

Several trials have been carried out to assess potential benefits of diet quality on CV risk factors in diabetic subjects, independent from body weight changes.

Carbohydrates represent the first target of dietary treatment of diabetes. A recent meta-analysis on randomized controlled trials has shown the importance of the amount and types of carbohydrates in the regulation of glucose levels. The results suggest that increasing dietary fiber intake with high-fiber diets or soluble and insoluble fiber supplements may positively influence glucose homeostasis (decreasing fasting blood glucose by 15.32 mg/dl and HbA1c by 0.26 %) in patients with T2D [18•].

Conversely, in a previous meta-analysis [19•] considering the effect of high carbohydrate/low fat diet compared with low carbohydrate/high fat diet, no diet-related effects on Hb1Ac and blood glucose have been observed. Moreover, the high-carbohydrate diet increases fasting plasma insulin and triglyceride levels by 8 and 13 %, respectively, and lowers the HDL cholesterol level by 6 %. This meta-analysis excluded all studies in which the high-carbohydrate diet was also high in fiber and, thus, clearly demonstrates that replacement of fat by carbohydrate foods low in fiber may adversely affect insulin resistance and the metabolic profile in patients with T2D. This is at odds with what happens when fat is substituted with carbohydrate foods that are also rich in fiber and/or with low glycemic index, reinforcing the concept that the quality of carbohydrates is more important than the amount from a metabolic point of view.

Among fibers, their different properties seem to be important in relation to glucose and lipid control. Soluble fibers are more effective than insoluble ones in reducing fasting glucose, HbA1c, urinary glucose excretion and serum cholesterol, as recently reviewed by Wolever [20].

Oxidative Stress and Inflammation

Oxidative stress and inflammation are considered additional pathophysiological conditions linked to the development of CVD and T2D.

Epidemiological and clinical evidence shows that diet composition can influence oxidative stress in T2D or high CV-risk subjects, as recently reviewed [21]. In particular, fruit and vegetables reduce oxidative damage and this effect could be triggered by several mechanisms, inducing an improvement of antioxidant defenses and DNA repair enzymes. In addition to

this, the type of dietary fat influences oxidative balance: monounsaturated fatty acids (MUFA) and saturated fatty acids (SFA) have opposite actions on oxidative stress (beneficial and detrimental, respectively), possibly because of their different chemical properties. Higher amounts of lipoprotein richer in SFA than in unsaturated fatty acids could affect receptor responsiveness in the liver, inducing an increase in low-density lipoprotein levels and making them more prone to oxidation, a condition linked to an increased atherosclerotic plaques formation.

Moving to inflammation, weight-loss-mediated improvement of C-reactive protein (CRP) has been observed [22], whereas trials focusing on quality of diet have provided inconsistent results. A high carbohydrate/high-fiber/low-glycemic index or a high-MUFA diet have shown similar effects on fasting CRP concentrations, whereas a small but significant decrease in postprandial CRP levels has been observed with the high-MUFA diet [23].

The source of fiber could have a critical role in the influence on inflammatory status. In fact, in our experience, a diet rich in whole wheat-fiber products has no effect on inflammation markers [24], whereas de Mello and colleagues [25] have shown that whole rye bread induces a significant reduction in CRP levels. This difference could be also due to other compounds contained in rye products besides fiber.

Liver Fat

It is well known that T2D is independently associated with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [26], a condition that has been recognized as a possible emerging CV risk factor. Moreover, excessive liver fat content is associated with a reduction of peripheral and hepatic insulin sensitivity that can aggravate metabolic abnormalities in diabetic subjects.

As demonstrated by the Look AHEAD trial, weight loss (8 % of body weight) can significantly reduce liver fat in type 2 diabetic subjects after 12 months [27].

However, the quality of the diet can also significantly affect liver fat independent of weight loss; in fact, it has been shown that a MUFA-rich diet is able to reduce liver fat by almost 30 % in type 2 diabetic subjects, without any change in body weight [28••].

Diet and Cardiovascular Morbidity/Mortality

The inverse relationship between consumption of a healthy diet (Mediterranean diet, Dietary Approach to Stop Hypertension [DASH] diet, Prudent diet, whose quite similar characteristics are shown in Table 1) and CVD has been found in many large prospective studies in non-diabetic populations [29–31].

Now, some data are available also for diabetic patients (Table 2).

First of all, a greater adherence to a healthy diet, characterized by high consumption of vegetables, fruit, whole grains, nuts and a higher intake of fish relative to meat, poultry and eggs, is associated with a significant reduction of recurrent CV events (- 20 %) in a large cohort of patients with previous CVD and/or diabetes. These data show that a healthy diet may be important not only in primary prevention, but also in secondary prevention or in high CV-risk individuals, such as diabetic patients. Moreover, the beneficial effects are in addition to those of pharmacological therapy generally used in secondary prevention [32••].

In a cross-sectional study in a cohort of elderly Japanese diabetics, no significant reduction of diet-related fatal events was observed, even if lower mortality rate was detected in those following a vegetables and fish-rich diet. Furthermore, the survival analyses showed a tendency for worse prognosis in high sugar and fat consumers [33].

The association between diet and mortality in type 1 diabetic subjects has been poorly investigated.

EURODIAB is the first European prospective study considering this task; the results have shown that, in a cohort of almost 2,000 subjects, a 5 g-increase of fiber intake, especially soluble fiber, within the range commonly consumed in patients with type 1 diabetes (11.3–28.3 g/day) is associated with lower CVD mortality (-16 %) and all-cause mortality (-28 %) [34••], confirming the importance of dietary fibers in diabetes management, also concerning type 1 diabetes.

Of course, the association between diet and CV risk in epidemiological studies generates hypotheses, but does not provide a casual relationship.

To answer this question, intervention studies are needed. Very recent evidence from two trials is available on this topic.

First of all, the Look AHEAD [10••] trial has shown that an intensive lifestyle modification program focused on weight reduction is able to improve all CV risk factors, as reported above, whereas it does not reduce the occurrence of CV events and mortality compared to the usual care group in the long term; this finding has induced an early termination of the trial [35••]. The reasons for the lack of difference in CV events may be different: a) a low rate of events that could have reduced the statistical power of the study; b) an improvement in CV risk factors in the usual care group as well; c) a lower use of statins in the intervention group with higher levels of LDL-cholesterol; d) a decrease in body weight may be of paramount importance in the reduction of risk for diabetes, but not so relevant in the reduction of CVD [36, 37].

The results obtained in the PREDIMED study [38••] are completely different; this study was stopped earlier on the basis of clear benefits shown by the two experimental diets. In fact, in this study, two Mediterranean diets supplemented with extra-virgin olive oil or nuts were able to significantly reduce (almost

Table 1 Main characteristics of dietary patterns linked to reduction of cardiovascular disease

Dietary pattern	Main characteristics
Mediterranean diet	↑ vegetables, legumes, fruit, nuts, whole grains, low-glycemic index foods, low-fat cheese or yogurt, fish, poultry, MUFA (from extra-virgin olive oil) ↓ red meats, refined cereals
DASH diet	↑ vegetables, legumes, nuts, fruit, whole grains, low-fat dairy products ↓ sodium, red and processed meat, high fat dairy products, refined cereals, sweetened beverages
Prudent diet	↑ vegetables, fruit, legumes, whole grains, fish ↓ red and processed meat, butter, high fat dairy products, eggs, refined cereals

DASH: Dietary Approach to Stop Hypertension; MUFA: monounsaturated fatty acids

30 % for both diets) the incidence of major CV events compared to the control diet in high-risk individuals, including subjects with T2D ($n=3,614$, almost 50 % of the total population).

Although the early termination of the trial may lead to an overestimation of treatment effects [39], the results suggest that even small changes in diet composition may be really effective, possibly more than weight reduction, in reducing CVD in high-risk individuals such as T2D subjects.

Conclusions

The evidence from studies published in the last 3 years, as a whole, reinforces the principles on which dietary guidelines for diabetes are based.

The only dietary intervention study with hard endpoints (CV events) performed in a population including a relevant

number of diabetic patients shows clear and significant benefits of the Mediterranean dietary pattern, independent from body weight change. The other study with hard endpoints, in which the intervention was performed through an intensive lifestyle education program focused on weight reduction, does not show benefits on CV events. This lack of effect may have different explanations as reported before, but, certainly, does not minimize the importance of diet and physical activity in the treatment of T2D, since these changes are able to reduce body weight, the need and the cost of medications, and the rate of sleep apnea, and to improve quality of life and in some cases, achieve diabetes remission.

Other long-term intervention studies with hard endpoints based not only on weight reduction but also on changes in dietary composition are needed in diabetic patients, even if these studies are more and more complicated to carry out due to the lack of funds.

Table 2 Diet and cardiovascular outcomes in diabetic patients

Observational studies				
Reference	Participants	Study design	Follow-up	Outcome
[32••]	$n=31,546$ Diabetics/ CVD	Prospective	4.8 years	↓ CV events
[33]	$n=912$ Type 2 diabetics	Cross-sectional	-	↓ mortality rate with ↑ vegetables and fish Tendency for worse prognosis with ↑ sugars and fats
[34••]	$n=2,108$ Type 1 diabetics	Prospective	7.3 years	↓ CV mortality with ↑ dietary fiber
Intervention studies				
Reference	Participants	Study design	Duration	Outcome
[35••]	$n=5,145$ Diabetics	Parallel groups a) Intensive lifestyle intervention b) Support and education program	4 years	No difference in CV events
[38••]	$n=7,447$ Diabetics or at least one criteria for MS	Parallel groups a) MedD + EVO b) MedD + nuts c) Control	5 years	↓ CV events for both MedD

CV: cardiovascular; CVD: cardiovascular disease; EVO: extra-virgin olive oil; MedD: Mediterranean diet; MS: metabolic syndrome

↓: reduction; ↑: increase

Compliance with Ethics Guidelines

Conflict of Interest Rosalba Giacco, Claudia Vetrani, Ettore Griffo, and Angela A. Rivellese declare that they have no conflict of interest.

Human and Animal Rights and Informed Consent This article does not contain any studies with human or animal subjects performed by any of the authors.

References

Papers of particular interest, published recently, have been highlighted as:

- Of importance
- Of major importance

1. Franz MJ, Powers MA, Leontos C, et al. The evidence for medical nutrition therapy for type 1 and type 2 diabetes in adults. *J Am Diet Assoc.* 2010;110:1852–89.
2. Lindström J, Peltonen M, Eriksson JG, et al. High-fibre, low-fat diet predicts long-term weight loss and decreased type 2 diabetes risk: the Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetologia.* 2006;49:912–20.
3. Laakso M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Diabetes.* 1999;48:937–42.
4. von Ruesten A, Feller S, Bergmann MM, Boeing H. Diet and risk of chronic diseases: results from the first 8 years of follow-up in the EPIC-Potsdam study. *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:412–9.
5. InterAct Consortium, Romaguera D, Guevara M, et al. Mediterranean diet and type 2 diabetes risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study: the InterAct project. *Diabetes Care.* 2011;34:1913–8.
6. Salas-Salvadó J, Bulló M, Babio N, et al. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care.* 2011;34:14–9.
7. Lindström J, Peltonen M, Eriksson JG, et al. Improved lifestyle and decreased diabetes risk over 13 years: long-term follow-up of the randomised Finnish Diabetes Prevention Study (DPS). *Diabetologia.* 2013;56:284–93.
8. Penn L, White M, Lindström J, et al. Importance of weight loss maintenance and risk prediction in the prevention of type 2 diabetes: analysis of European Diabetes Prevention Study RCT. *PLoS One.* 2013;8:e57143.
9. Coppel KJ, Kataoka M, Williams SM, et al. Nutritional intervention in patients with type 2 diabetes who are hyperglycaemic despite optimised drug treatment—Lifestyle Over and Above Drugs in Diabetes (LOADD) study: randomised controlled trial. *BMJ.* 2010;341:c3337.
10. •• Look AHEAD Research Group, Wing RR. Long-term effects of a lifestyle intervention on weight and cardiovascular risk factors in individuals with type 2 diabetes mellitus: four-year results of the Look AHEAD trial. *Arch Intern Med.* 2010;170:1566–75. *This is the first clinical trial showing that an intensive lifestyle intervention is able to produce sustained weight loss and improvement in cardiovascular risk factors through 4 years of follow-up in patients with type 2 diabetes.*
11. Gregg EW, Chen H, Wagenknecht LE, et al. Association of an intensive lifestyle intervention with remission of type 2 diabetes. *JAMA.* 2012;308:2489–96.
12. •• Andrews RC, Cooper AR, Montgomery AA, et al. Diet or diet plus physical activity versus usual care in patients with newly diagnosed type 2 diabetes: the Early ACTID randomised controlled trial. *Lancet.* 2011;378:129–39. *This trial suggests an easier approach to induce weight loss and improvement of cardiovascular risk factors in the usual clinical practice.*
13. • Ajala O, English P, Pinkney J. Systematic review and meta-analysis of different dietary approaches to the management of type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:505–16. *Although this meta-analysis has some limits, as reported in the text, it offers a good revision of dietary patterns effects on several cardiovascular risk factors.*
14. Mann JI, TeMorenga L. Diet and diabetes revisited, yet again. *Am J Clin Nutr.* 2013;97:453–4.
15. Rivellese AA, Giacco R, Costabile G. Dietary carbohydrates for diabetics. *Curr Atheroscler Rep.* 2012;14:563–9.
16. Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, et al. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia.* 2011;54:2506–14.
17. Malandrucco I, Pasqualetti P, Giordani I, et al. Very-low-calorie diet: a quick therapeutic tool to improve β cell function in morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2012;95:609–13.
18. • Post RE, Mainous 3rd AG, King DE, Simpson KN. Dietary fiber for the treatment of type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. *J Am Board Fam Med.* 2012;25:16–23. *This meta-analysis shows that an increase in fiber, naturally contained in the diet or added, reduces the fasting blood glucose level by 15 mg/dl and the HbA1c level by 0.26 %.*
19. • Kodama S, Saito K, Tanaka S, et al. Influence of fat and carbohydrate proportions on the metabolic profile in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care.* 2009;32:959–65. *This meta-analysis quantifies the effect of high-carbohydrate/low-fat diets as compared with low-carbohydrate/high-fat diets on insulin, triglyceride, and HDL cholesterol levels.*
20. Wolever TM. Is glycaemic index (GI) a valid measure of carbohydrate quality? *Eur J Clin Nutr.* 2013;67:522–31.
21. Vetrani C, Costabile G, Di Marino L, Rivellese AA. Nutrition and oxidative stress: a systematic review of human studies. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64:312–26.
22. Belalcazar LM, Haffner SM, Lang W, et al. Lifestyle intervention and/or statins for the reduction of C-reactive protein in type 2 diabetes: from the look AHEAD study. *Obesity.* 2013;21:944–50.
23. Bozzetto L, De Natale C, Di Capua L, et al. The association of hs-CRP with fasting and postprandial plasma lipids in patients with type 2 diabetes is disrupted by dietary monounsaturated fatty acids. *Acta Diabetol.* 2013;50:273–6.
24. Giacco R, Lappi J, Costabile G et al. Effects of rye and whole wheat versus refined cereal foods on metabolic risk factors: a randomised controlled two-centre intervention study. *Clin Nutr.* 2013. doi:10.1016/j.clnu.2013.01.016.
25. de Mello VD, Schwab U, Kolehmainen M, et al. A diet high in fatty fish, bilberries and wholegrain products improves markers of endothelial function and inflammation in individuals with impaired glucose metabolism in a randomised controlled trial: the Sysdimet study. *Diabetologia.* 2011;54:2755–67.
26. Bozzetto L, Prinster A, Mancini M, et al. Liver fat in obesity: role of type 2 diabetes mellitus and adipose tissue distribution. *Eur J Clin Invest.* 2011;41:39–44.
27. Lazo M, Solga SF, Horska A, et al. Effect of a 12-month intensive lifestyle intervention on hepatic steatosis in adults with type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2010;33:2156–63.
28. •• Bozzetto L, Prinster A, Annuzzi G, et al. Liver fat is reduced by an isoenergetic MUFA diet in a controlled randomized study in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care.* 2012;35:1429–35. *A diet enriched in MUFA may be particular useful for the management of hepatic steatosis in people with type 2 diabetes.*
29. Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.* 2010;92:1189–96.
30. Salehi-Abargouei A, Maghsoudi Z, Shirani F, Azadbakht L. Effects of dietary approaches to stop hypertension (DASH)-style diet on fatal

- or nonfatal cardiovascular diseases—incidence: a systematic review and meta-analysis on observational prospective studies. *Nutrition*. 2013;29:611–8.
31. Hu FB, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Prospective study of major dietary patterns and risk of coronary heart disease in men. *Am J Clin Nutr*. 2000;72:912–21.
 32. •• Dehghan M, Mente A, Teo KK, et al. Relationship between healthy diet and risk of cardiovascular disease among patients on drug therapies for secondary prevention: a prospective cohort study of 31 546 high-risk individuals from 40 countries. *Circulation*. 2012;126:2705–12. *This is a large prospective study showing, in a cohort of 31,546 subjects, the importance of the healthy diet in secondary prevention or in high cardiovascular-risk individuals, such as diabetic patients.*
 33. Imuro S, Yoshimura Y, Umegaki H, et al. Dietary pattern and mortality in Japanese elderly patients with type 2 diabetes mellitus: does a vegetable- and fish-rich diet improve mortality? An explanatory study. *Geriatr Gerontol Int*. 2012;12 Suppl 1:59–67.
 34. •• Schoenaker DA, Toeller M, Chaturvedi N, et al. Dietary saturated fat and fibre and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality among type 1 diabetic patients: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Diabetologia*. 2012;55:2132–41. *This is the first prospective study, performed on 2,108 European patients with type 1 diabetes, showing that an increase of 5 g of total dietary fiber per day is associated with a 16 % reduction in cardiovascular disease mortality and a 28 % reduction in all-cause mortality.*
 35. •• The Look AHEAD Research Group. Cardiovascular Effects of Intensive Lifestyle Intervention in Type 2 Diabetes. *N Engl J Med*. 2013;369:145–54. *This study shows that an intensive lifestyle intervention does not significantly reduce the occurrence of cardiovascular events and mortality compared to the usual care in overweight/obese diabetics, possibly due to several reasons among which the lack of reduction of LDL-cholesterol levels is the most relevant. However, other benefits triggered by intensive lifestyle intervention, such as partial and total remission of diabetes, lower need of insulin therapy, improvement of quality of life, etc, are of paramount importance in this type of patients.*
 36. Gerstein HC. Do lifestyle changes reduce serious outcomes in diabetes? *N Engl J Med*. 2013;369:189–90.
 37. Arterburn DE, O'Connor PJ. A look ahead at the future of diabetes prevention and treatment. *JAMA*. 2012;308:2517–8.
 38. •• Estruch R, Ros E, Salas-Salvadó J, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with a Mediterranean diet. *N Engl J Med*. 2013;368:1279–90. *This trial clearly shows the beneficial effect of the Mediterranean diet in the reduction of cardiovascular disease mortality (-30 %).*
 39. Bassler D, Briel M, Montori VM, et al. Stopping randomized trials early for benefit and estimation of treatment effects: systematic review and meta-regression analysis. *JAMA*. 2010;303:1180–7.



Early Improvement of Postprandial Lipemia After Bariatric Surgery in Obese Type 2 Diabetic Patients

E. Griffo · G. Nosso · R. Lupoli · M. Cotugno ·
G. Saldamacchia · G. Vitolo · L. Angrisani ·
P. P. Cutolo · A. A. Rivellese · B. Capaldo

© Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract

Background Bariatric surgery (BS) is able to positively influence fasting lipid profile in obese type 2 diabetic patients (T2DM), but no data is available on the impact of BS on postprandial lipid metabolism neither on its relation with incretin hormones. We evaluated the short-term (2 weeks) effects of BS on fasting and postprandial lipid metabolism in obese T2DM patients and the contribution of changes in active GLP-1.

Methods We studied 25 obese T2DM patients (age=46±8 years, BMI=44±7 kg/m²), of which 15 underwent sleeve gastrectomy and 10 underwent gastric bypass. Lipid and incretin hormone concentrations were evaluated for 3 h after ingestion of a liquid meal before and 2 weeks after BS.

Results After BS, there was a significant reduction in body weight ($p < 0.001$), fasting plasma glucose ($p < 0.001$), fasting plasma insulin ($p < 0.05$), HOMA-IR ($p < 0.001$), and fasting plasma lipids ($p < 0.05$). The meal response of plasma triglycerides, total cholesterol, and HDL cholesterol was significantly lower compared to pre-intervention ($p < 0.05$, $p < 0.001$). In particular, the incremental area under the curve (IAUC) of plasma triglycerides decreased by 60 % ($p < 0.005$). The meal-

stimulated response of active GLP-1 increased, reaching a statistical significance ($p < 0.001$).

Conclusions BS leads to an early improvement of fasting and postprandial lipemia. The fall in fasting triglycerides is associated with an improvement of insulin resistance, while the reduction of postprandial lipemia is likely related to reduced intestinal lipid absorption consequent to bariatric surgery.

Keywords Bariatric surgery · Lipid metabolism · Postprandial triglycerides · Active GLP-1

Background

Bariatric surgery is known to positively influence glucose metabolism in obese type 2 diabetic (T2DM) patients, resulting in disease remission in a large number of cases [1, 2]. Of note, T2DM remission frequently occurs very early after surgery, even before meaningful weight loss has occurred [3, 4]. Besides glucose metabolism, bariatric surgery exerts long-term favorable effects on fasting lipid levels with reduction of triglycerides and LDL cholesterol and increase in HDL cholesterol concentrations [5]. This effect, consistently documented after different bariatric procedures, is of much greater extent after purely malabsorptive techniques as biliopancreatic diversion [6]. It is now recognized that changes in gastrointestinal hormones and, in particular, the recovery of the meal response of GLP-1, consequent to bariatric procedures, contribute to ameliorate glucose homeostasis and, ultimately, to induce diabetes remission [7]. Although a number of studies have addressed incretin regulation of glucose homeostasis [8, 9], much less is known about the relationship between incretin hormones and lipid metabolism and the effects of bariatric surgery on postprandial lipid profile, which is expected to be primarily affected by this type of surgery. This information would be of great clinical

E. Griffo (✉) · G. Nosso · R. Lupoli · M. Cotugno ·
G. Saldamacchia · A. A. Rivellese · B. Capaldo
Department of Clinical Medicine and Surgery, Federico II University
of Naples, Via S. Pansini 5 80131, Naples, Italy
e-mail: ettoregri@gmail.com

L. Angrisani · P. P. Cutolo
General and Endoscopic Surgery Unit, S. Giovanni Bosco Hospital,
Naples, Italy

G. Vitolo
Department of Clinical Medicine and Surgery,
Federico II University of Naples,
Naples Via S. Pansini, 5 80131 Naples, Italy
e-mail: giulianavitolo@yahoo.it

relevance since impairment of postprandial lipid metabolism is viewed as an independent cardiovascular risk factor [10].

Studies in experimental animals have shown a reduction in postprandial triglycerides after bariatric surgery, which is independent of weight loss [11]. Furthermore, emerging evidence indicates that incretin-based therapies offer benefits beyond glycemic control, with improvement of lipoprotein metabolism [12].

Accordingly, the present study was undertaken to evaluate the short-term (2 weeks) effects of bariatric surgery on fasting and postprandial lipid metabolism in obese T2DM patients and to establish whether changes in lipid profile are related to active GLP-1 changes.

Methods

Participants

Twenty-five obese T2DM2 patients (12 men and 13 women) were studied. The inclusion criteria were as follows: age 30–65 years, body mass index (BMI) ≥ 40 or ≥ 35 kg/m² with poor glycemic control under medical treatment, no use of statins or other lipid-lowering agents, and eligibility for sleeve gastrectomy (SG) or Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). All participants were examined by a multidisciplinary and integrated medical team consisting of a diabetologist, a bariatric surgeon, a psychiatrist, and a dietician. Fifteen patients underwent SG, and ten underwent RYGB. The clinical and metabolic evaluation of participants was conducted at the Department of Clinical Medicine and Surgery of University Federico II, while bariatric surgery was performed at the Department of Surgery, S. Giovanni Bosco Hospital of Naples. All patients were informed of the risks and benefits of each procedure and provided written, informed consent before undergoing surgery. The study was approved by the local ethics committee.

Operative Procedures

All operative procedures were laparoscopically performed by the same surgery team. RYGB: consists of a 40-cm³ gastric pouch. The Roux limb was constructed by transecting the small bowel 100–150 cm distal to the ligament of Treitz. The circular stapler was introduced transabdominally, to create an ante-colic ante-gastric end-to-side gastro-jejunostomy. Gastro-jejunostomy leak was tested by injecting 40–60 cm³ of methylene blue. Side-to-side jejuno-jejunostomy was performed by a 45-mm linear stapler through jejunotomy service, 100–150 cm distal to the gastro-jejunostomy. For SG, the gastric greater curvature was freed up to the cardio-esophageal junction close to the stomach and toward antrum up to 3–5 cm from the pylorus. The gastric lumen was

calibrated with a 40-Fr bougie. Then, the stomach was resected with linear staplers parallel to the orogastric tube along the lesser curve starting 3–5 cm far from the pylorus.

Experimental Design

All participants were studied before and 2 weeks after surgery. In both occasions, anthropometric, clinical, and laboratory parameters were collected together with data on medication use. In addition, plasma levels of glucose, insulin, lipids, and active GLP-1 were evaluated at fasting and after a standard liquid mixed meal test (MMT).

Mixed Meal Test

In the morning after a 12-h overnight fast, all patients consumed a MMT (Resource[®] ENERGY Nestlé Nutrition), which consisted of a standardized 304-kcal in a total volume of 175 ml containing 41 g of carbohydrates, 13 g of proteins, and 9 g of fat. They were asked to consume the meal within a maximum of 30 min. Blood samples were drawn at 0, 30, 60, 90, 120, and 180 min, collected in chilled EDTA tubes, and immediately centrifuged, and plasma was stored at -80 °C for subsequent analysis.

Laboratory Procedures

Cholesterol and triglyceride concentrations were determined by enzymatic-colorimetric methods (ABX Diagnostics, Montpellier, France, Roche Diagnostics, Milan, Italy) on a Cobas Mira autoanalyzer (ABX Diagnostics, Montpellier, France). HDL lipoproteins were separated from plasma by the method of precipitation with phosphotungstic acid/magnesium chloride. Fasting LDL cholesterol was calculated using the Friedewald formula. Plasma glucose concentration was measured using the glucose oxidase method. Plasma insulin (DIAsource ImmunoAssays S.A., Nivelles, Belgium) was determined by ELISA kits on Triturus Analyzer (Diagnostics Grifols, S.A., Barcelona, Spain).

Active GLP-1 was assayed by a non-radioactive, highly specific sandwich ELISA method (Merck-Millipore) with 100 % cross-reactivity with active isoforms of GLP-1 (7–36 amide and 7–37 glycine-extended) but without reactivity with inactive isoforms (9–36 amide and 9–37 glycine-extended), GLP-2, or glucagon.

Calculations

Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) was calculated using the following formula: fasting glucose (mg/dl) \times fasting insulin (μ U/l)/405. Postprandial incremental areas of triglycerides, total cholesterol, and HDL cholesterol were calculated using the

trapezoidal method as the area under the curve above the baseline value (IAUC).

Statistical Analysis

Data are expressed as means±standard deviation unless otherwise stated. Variables not normally distributed were analyzed after logarithmic transformation or by nonparametric tests. Differences before and after bariatric surgery were evaluated by *t* test for paired data. Univariate analysis was performed to evaluate associations between variables. A *p* value <0.05 was considered statistically significant. Statistical analysis was performed according to standard methods using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS/PC; SPSS, Chicago, IL, USA).

Results

The clinical and metabolic characteristics of participants are given in Table 1. Since 2 weeks post operation, there was no difference in weight loss and in the main metabolic parameters between the two procedures, data on lipid and hormone changes were pooled altogether. At week 2 after surgery, there was a significant reduction in body weight, fasting plasma glucose, and insulin as well as a marked reduction in insulin resistance, as evidenced by a 50 % decrease in HOMA-IR. Glucose response to the MMT was significantly reduced (IAUC 8,867±5,733 vs. 5,744±4,676 mg/dl·180 min,

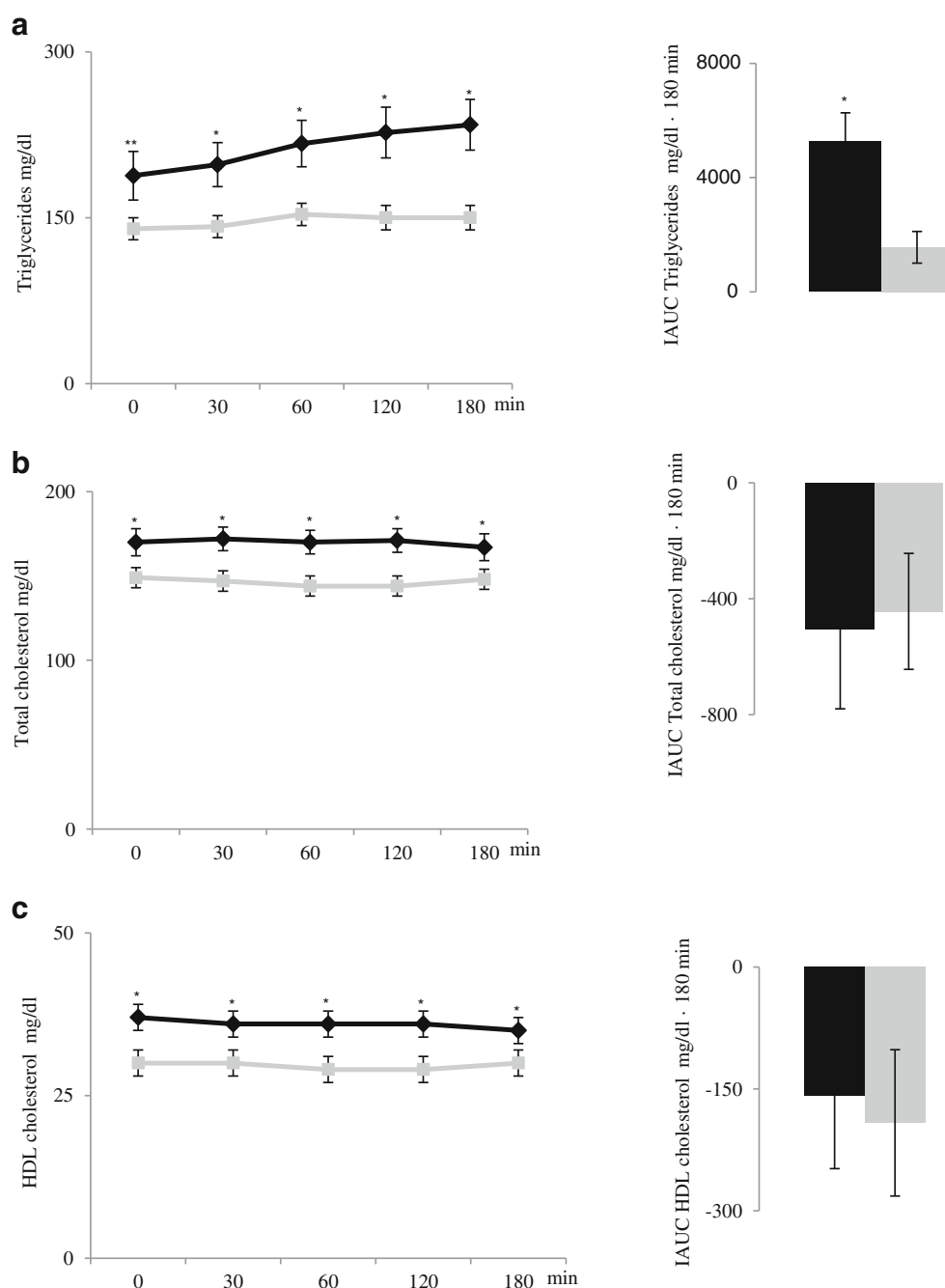
p<0.05) compared to pre-intervention, while insulin response increased without reaching the statistical significance (*p*=0.110). The response of active GLP-1 to the MMT increased significantly after surgery (IAUC 43 pmol/l·180 min (-13, 142) vs. 1,136 pmol/l·180 min (340, 2,455), *p*<0.001; Table 1). The changes in lipid concentrations after surgery are depicted in Fig. 1. After surgery, there was a significant reduction in fasting plasma TG (182 mg/dl (110, 231) vs. 130 mg/dl (104, 165), *p*<0.05), total cholesterol (170±41 vs.148±29 mg/dl, *p*<0.005), LDL cholesterol (119±30 vs. 100±28 mg/dl, *p*<0.05), and HDL cholesterol (37±9 vs. 30±10 mg/dl, *p*<0.001). Post-MMT plasma TG, total cholesterol, and HDL cholesterol were significantly lower compared to pre-intervention. IAUC of plasma TG decreased markedly by 60 % (4,050 mg/dl·180 min (2,019, 8,409) vs. 1,635 mg/dl·180 min (390, -2,603), *p*<0.001), while no difference was observed in IAUC of total and HDL cholesterol (Fig. 1). Analyzing postprandial lipid response according to the type of surgery (SG or RYGB), no difference was found between the two procedures (triglycerides ΔIAUC=-4,099±1,276 mg/dl·180 min in SG and -3,100±1,738 mg/dl·180 min in BPG, *p*=0.640; total cholesterol ΔIAUC=-563±317 mg/dl·180 min in SG and 324±399 mg/dl·180 min in BPG, *p*=0.092; HDL cholesterol ΔIAUC=-106±168 mg/dl·180 min in SG and 82±175 mg/dl·180 min in BPG, *p*=0.465). In addition, the improvement in postprandial lipids was of the same extent both in patients who before surgery were well controlled and in those who were poorly controlled. A significant correlation

Table 1 Clinical and metabolic characteristics of the patients before and two weeks after surgery

	Before surgery	After surgery	<i>p</i> value
Characteristic			
Male/female	12/13	–	
Age (years)	46±8	–	
Diabetes duration (years)	4±4	–	
Weight (kg)	124±23	110±22	0.000
BMI (kg/m ²)	44±7	39±7	0.000
HbA1c (%)	8±2	–	
Fasting glucose (mg/dl)	170±74	125±35	0.000
Fasting insulin (μU/ml)	25 (16, 35)	17 (12, 19)	0.004
HOMA-IR	9 (6, 14)	5 (4, 7)	0.000
Fasting GLP-1 (pmol/l)	3 (2, 4)	3 (2, 4)	0.977
Glucose IAUC (mg/dl)	8,867±5,733	5,744±4,676	0.019
Insulin IAUC (μU/ml·180 min)	5,757 (3,235, 7,513)	6,038 (2,766, 11,987)	0.110
GLP-1 IAUC (pmol/l·180 min)	43 (-13, 142)	1,136 (340, 2,455)	0.000
Therapy			
Diet	2/25	22/25	
Oral antidiabetic drugs	21/25	2/25	
Oral antidiabetic drugs plus insulin	2/25	0/25	
Insulin alone	0/25	1/25	
Antihypertensive drugs	15/25	0/25	

Data are means±SD or median and interquartile range (25, 75)
BMI body mass index, *IAUC* incremental area under curve, *HOMA-IR* homeostasis model assessment of insulin resistance

Fig. 1 Plasma concentration and IAUC of plasma triglycerides (a), plasma total cholesterol (b), and plasma HDL cholesterol (c) after mixed meal before (*black diamond*) and 2 weeks after (*light grey square*) bariatric surgery. Data are means \pm SE. * $p < 0.001$ vs. 2 weeks; ** $p < 0.05$ vs. 2 weeks



was found between the reduction in fasting TG and the improvement of insulin resistance ($r=0.477$, $p=0.016$). No correlation was found between fasting and postprandial lipids and BMI and other variables including incretin hormones.

Discussion and Conclusion

Our data demonstrate that bariatric procedures, namely SG and RYGB, improve fasting as well as postprandial lipid profile and that this effect occurs within 2 weeks after the

intervention. The beneficial effect of bariatric surgery on fasting plasma lipids is well recognized [13–16]. Saboya et al. examined short-term changes in lipid profile after gastric bypass in patients stratified according to initial BMI and demonstrated that triglycerides were significantly reduced in all BMI categories 1 month after surgery. Instead, HDL cholesterol decreased a few days after bariatric procedures and increased later on during the follow-up [17–20]. In line with these observations, we found a significant reduction in HDL cholesterol 2 weeks after surgery. This finding is not unexpected because HDL cholesterol tends to decrease in highly

dynamic conditions, such as that immediately after bariatric surgery. In fact, this temporary decrease in HDL cholesterol has been observed also after nonsurgical weight loss and has been attributed to the marked reduction in calorie and lipid intake [21]. Later on, when a more stable condition is reached, HDL cholesterol tends to increase again as it occurred in our patients who showed a significant increase in HDL cholesterol 1 year after surgery (data not shown).

The major finding of our study is the marked fall in postprandial triglycerides. Already 2 weeks after surgery, the response of postprandial triglycerides was minimal with a reduction from preoperative values of approximately 70 %. The two procedures, one restrictive (SG) and the other one restrictive/malabsorptive (RYGB), appear to exert similar effects on postprandial triglyceride metabolism. This finding is in agreement with recent evidence indicating that the type of surgery impacts primarily cholesterol metabolism rather than triglycerides. In fact, Benetti et al. reported a significant reduction in cholesterol levels after malabsorptive procedures (biliopancreatic diversion and biliointestinal bypass) but not after purely restrictive procedures (adjustable gastric banding), whereas triglycerides decreased similarly with the two types of surgery [22].

Studies in experimental animal have shown that GLP-1 or GLP1 receptor agonists may reduce postprandial triglycerides through several mechanisms: (1) decreased synthesis of apolipoproteins B-48 and A-IV by the intestinal cells thus inhibiting lipoprotein assembling in enterocytes, (2) inhibition of gastric lipase activity, and (3) reduced intestinal lymph flow [23, 24]. In many studies performed in T2DM patients, incretin therapy, such as GLP-1R agonism or DPP-4 inhibitor, are able to decrease postprandial triglycerides and apoB-48 concentrations [25, 26]. Altogether, these data indicate that GLP-1 plays a role in the regulation of lipid metabolism. In our study, the meal response of GLP-1 increased dramatically 2 weeks after surgery, confirming that bariatric surgery is able to restore the enterohormone profile due to the prompt contact of nutrients with the enteroendocrine cells. Although we failed to find a significant correlation between meal-stimulated response of GLP-1 and postprandial triglycerides after surgery, we cannot exclude that the early increase in GLP-1 may have contributed, at least in part, to the very flat postprandial triglyceride curve. Actually, the limited number of patients studied does not allow us to draw a firm conclusion on this issue.

It is worth considering that our patients drastically reduced their calorie intake immediately after surgery and that may have had important metabolic consequences. Actually, there is ample evidence that short-term calorie restriction drastically improves glucose tolerance, hepatic insulin sensitivity, and lipid metabolism [11, 27, 28]. However, animal as well as human studies have shown that, at comparable weight loss, bariatric surgery induces a much greater incretin response and more profound metabolic changes than calorie restriction,

indicating that, beyond fasting, factors specifically related to surgery may play beneficial effects [11, 28, 29]. It should be considered that the negative calorie balance may have influenced the reduction in fasting lipids rather than the response to the meal test since composition of the meal was identical before and after surgery. It is possible that a reduced absorption of dietary lipid may have contributed to the marked reduction in postprandial TG, at least in patients undergoing BPG. Whatever the underlying mechanism, the reduction of postprandial triglyceride is clinically important since it represents an independent cardiovascular risk factor.

In our study, we found a close association between the decrease in fasting TG and the reduction of insulin resistance. It is known that obese as well as type 2 diabetic patients are insulin resistant and have an increased free fatty acid flux, which leads to accumulation of triglycerides in adipose as well as in nonadipose tissues. Fat accumulation triggers a complex cascade of events that further impairs insulin sensitivity [30, 31]. On this basis, it is likely that the improvement of insulin resistance produced by bariatric surgery may have caused a reduction in plasma triglycerides although it is also possible that the fall of triglycerides may have contributed to improve insulin resistance, as demonstrated by Mingrone et al. [32].

Some limitations of the study should be acknowledged. The number of patients evaluated in this study is small, which precludes us from comparing the impact of SG and RYGB on postprandial lipemia; in addition, due to the short-term observation, we cannot exclude that a differential effect of the two procedures may manifest at a longer follow-up.

In conclusion, bariatric surgery leads to an early improvement of lipid metabolism not only fasting but also postprandially. The fall in fasting triglycerides is associated with an improvement of insulin resistance, while the reduction of postprandial lipemia is likely related to reduced intestinal lipid absorption consequent to bariatric surgery.

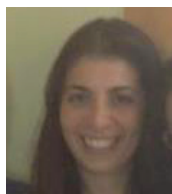
Conflicts of Interest None of the authors have any conflicts of interest to declare.

References

1. Gumbs AA, Modlin IM, Ballantyne GH. Changes in insulin resistance following bariatric surgery: role of caloric restriction and weight loss. *Obes Surg.* 2005;15(4):462–73.
2. Vetter ML, Ritter S, Wadden TA, et al. Comparison of bariatric surgical procedures for diabetes remission: efficacy and mechanisms. *Diabetes Spectr.* 2012;25(4):200–10.
3. Dixon JB, le Roux CW, Rubino F, et al. Bariatric surgery for type 2 diabetes. *Lancet.* 2012;379(9833):2300–11.
4. Lima MM, Pareja JC, Alegre SM, et al. Acute effect of Roux-en-Y gastric bypass on whole-body insulin sensitivity: a study with the euglycemic hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:3871–5.

5. Camastra S, Gastaldelli A, Mari A, et al. Early and longer term effects of gastric bypass surgery on tissue-specific insulin sensitivity and beta cell function in morbidly obese patients with and without type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2011;54:2093–102.
6. Vila M, Ruiz O, Belmonte M, et al. Changes in lipid profile and insulin resistance in obese patients after Scopinaro biliopancreatic diversion. *Obes Surg*. 2009;19(3):299–306.
7. Bradley D, Magkos F, Klein S. Effects of bariatric surgery on glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Gastroenterology*. 2012;143(4):897–912.
8. Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007;132(6):2131–57.
9. Madsbad S. The role of GLP-1 impairment in obesity and potential therapeutic implications. *Diabetes Obes Metab*. 2013. doi:10.1111/dom.12119.
10. Kannel WB, Vasan RS. Triglycerides as vascular risk factors: new epidemiologic insights. *Curr Opin Cardiol*. 2009;24(4):345–50.
11. Stefater MA, Sandoval DA, Chambers AP, et al. Sleeve gastrectomy in rats improves postprandial lipid clearance by reducing intestinal triglyceride secretion. *Gastroenterology*. 2011;141(3):939–49. e1–4.
12. Farr S, Adeli K. Incretin-based therapies for treatment of postprandial dyslipidemia in insulin-resistant states. *Curr Opin Lipidol*. 2012;23(1):56–61.
13. Zambon S, Romanato G, Sartore G, et al. Bariatric surgery improves atherogenic LDL profile by triglyceride reduction. *Obes Surg*. 2009;19(2):190–5.
14. Garcia-Marinrodriga I, Amaya-Romero C, Ruiz-Diaz GP, Fernández S, et al. Evolution of lipid profiles after bariatric surgery. *Obes Surg*. 2012;22(4):609–16.
15. Benaiges D, Flores-Le-Roux JA, Pedro-Botet J, et al. Impact of restrictive (sleeve gastrectomy) vs hybrid bariatric surgery (Roux-en-Y gastric bypass) on lipid profile. *Obes Surg*. 2012;22(8):1268–75.
16. Vix M, Diana M, Liu KH, et al. Evolution of glycolipid profile after sleeve gastrectomy vs. Roux-en-Y gastric bypass: results of a prospective randomized clinical trial. *Obes Surg*. 2013;23(5):613–21.
17. Saboya C, Arasaki CH, Matos D, et al. Relationship between the preoperative body mass index and the resolution of metabolic syndrome following Roux-en-Y gastric bypass. *Metab Syndr Relat Disord*. 2012;10(4):292–6.
18. Jamal M, Wegner R, Heitshusen D, Liao J, Samuel I. Resolution of hyperlipidemia follows surgical weight loss in patients undergoing Roux-en-Y gastric bypass surgery: a 6-year analysis of data. *Surg Obes Relat Dis*. 2011;7(4):473–9.
19. Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI, Clemente-Postigo M, et al. Postprandial hypertriglyceridemia predicts improvement in insulin resistance in obese patients after bariatric surgery. *Surg Obes Relat Dis*. 2013;9(2):213–8.
20. Hady HR, Dadan J, Gołaszewski P, Safiejko K. Impact of laparoscopic sleeve gastrectomy on body mass index, ghrelin, insulin and lipid levels in 100 obese patients. *Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne*. 2012;7(4):251–9.
21. Moustarah F, Gilbert A, Després JP, Tchermof A. Impact of gastrointestinal surgery on cardiometabolic risk. *Curr Atheroscler Rep*. 2012;14(6):588–96.
22. Benetti A, Del Puppo M, Crosignani A, et al. Cholesterol metabolism after bariatric surgery in grade 3 obesity: differences between malabsorptive and restrictive procedures. *Diabetes Care*. 2013;36(6):1443–7.
23. Qin X, Shen H, Liu M, Yang Q, et al. GLP-1 reduces intestinal lymph flow, triglyceride absorption, and apolipoprotein production in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(5):G943–9.
24. Schwartz EA, Koska J, Mullin MP, et al. Exenatide suppresses postprandial elevations in lipids and lipoproteins in individuals with impaired glucose tolerance and recent onset type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*. 2010;212(1):217–22.
25. Hsieh J, Longuet C, Baker CL, et al. The glucagon-like peptide 1 receptor is essential for postprandial lipoprotein synthesis and secretion in hamsters and mice. *Diabetologia*. 2010;53(3):552–61.
26. DeFronzo RA, Okerson T, Viswanathan P, et al. Effects of exenatide versus sitagliptin on postprandial glucose, insulin and glucagon secretion, gastric emptying, and caloric intake: a randomized, crossover study. *Curr Med Res Opin*. 2008;24(10):2943–52.
27. Malandrucio I, Pasqualetti P, Giordani I, et al. Very-low-calorie diet: a quick therapeutic tool to improve β cell function in morbidly obese patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr*. 2012;95(3):609–13.
28. Chambers AP, Jessen L, Ryan KK, et al. Weight independent changes in blood glucose homeostasis after gastric bypass or vertical sleeve gastrectomy in rats. *Gastroenterology*. 2011;141:950–8.
29. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J, et al. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(7):2479–85.
30. Virtue S, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1801(3):338–49.
31. Schinner S, Scherbaum WA, Bornstein SR, et al. Molecular mechanisms of insulin resistance. *Diabet Med*. 2005;22(6):674–82. Review.
32. Mingrone G, DeGaetano A, Greco AV, et al. Reversibility of insulin resistance in obese diabetic patients: role of plasma lipids. *Diabetologia*. 1997;40(5):599–605.

Modifiche a breve e a medio termine degli ormoni gastrointestinali dopo bypass gastrico o gastrectomia verticale in pazienti con diabete mellito tipo 2 ed obesità severa



G. Nossio¹, R. Lupoli¹, M. Cotugno¹, E. Griffo¹, G. Saldalamacchia¹, P.P. Cutolo², L. Angrisani², B. Capaldo¹
gabrinosso@alice.it

¹ Dipartimento di Medicina Clinica e Chirurgia, Università Federico II Napoli

² Dipartimento di Chirurgia, Ospedale S. Giovanni Bosco Napoli

Parole chiave: Diabete tipo 2, Chirurgia bariatrica, Obesità, Incretine, Ghrelina
Key words: Type 2 diabetes, Bariatric surgery, Obesity, Incretin, Ghrelin

Il Giornale di AMD, 2013; 16:308-312

Riassunto

Premesse. La chirurgia bariatrica migliora l'omeostasi glicemica in pazienti con diabete tipo 2 (DM2) ed obesità.

Scopo. Valutare il decremento ponderale, la remissione del DM2 e il profilo degli ormoni gastrointestinali in pazienti con DM2 ed obesità severa sottoposti a bypass gastrico (BPG) o gastrectomia verticale (GV).

Materiali e metodi. In 24 pazienti DM2 obesi [11 sottoposti a BPG (5 M; 49±8 anni; 42±6 kg/m², M±SD) e 13 a GV (6 M; 47±9 anni; 42±6 kg/m²)] abbiamo valutato la risposta di GLP-1, GIP e grelina al pasto misto prima, 2 settimane ed un anno dopo l'intervento.

Risultati. Il decremento ponderale era simile (EBWL ~20% e 60% rispettivamente a 2 settimane e 1 anno) con i due interventi e la remissione del DM2 (glicemia a digiuno <100 mg/dl e HbA1c <6% in assenza di terapia ipoglicemizzante) ad un anno si verificava nel ~65% dei pazienti con entrambe le procedure. La risposta del GLP-1 al pasto, piuttosto piatta prima dell'intervento in tutti i pazienti, raddoppiava dopo GV (p=0.007) mentre incrementava di circa 4 volte 2 settimane dopo BPG (p=0.005); ad un anno tale incremento persisteva solo dopo BPG (p=0.001). A due settimane dall'intervento, i livelli di GIP si riducevano solo dopo BPG (p=0.001) mentre, ad un anno, una soppressione di circa il 50% rispetto ai livelli pre-intervento era evidente sia in BPG che GV. I livelli di grelina sia a digiuno che post-pasto si riducevano marcatamente sia 2 settimane che 1 anno dopo GV rimanendo pressoché invariati dopo BPG.

Conclusioni. GV e BPG sono parimenti efficaci nell'indurre una stabile perdita di peso e nel migliorare l'omeostasi glicemica in pazienti con DM2 ed obesità, a fronte di un diverso profilo entero-ormonale. Dal momento che GV è un intervento tecnicamente più semplice e non determina malas-

sorbimento, esso potrebbe rappresentare la procedura di scelta per i pazienti diabetici obesi.

Summary

Background. Bariatric surgery improves glucose homeostasis in patients with type 2 diabetes mellitus (DM2) and obesity.

Aim. To evaluate weight loss, remission of DM2 and gastrointestinal hormone profile in patients with DM2 and severe obesity who had undergone laparoscopic gastric bypass (BPG) or sleeve gastrectomy (GV).

Materials and methods. In 24 DM2 obese patients [11 subjected to BPG (5 M; 49±8 years; 42±6 kg/m², M±SD) and 13 of GV (6 M; 47±9 years; 42±6 kg/m²)] we evaluated incretin and ghrelin response to a mixed meal before, 2 weeks and 1 year after surgery.

Results. Weight loss was similar (EBWL ~20% and 60% at 2 weeks and 1 year, respectively) with the two interventions. At 1 year, DM2 remitted in ~65% of patients after either BPG and SG. after Meal response GLP-1, rather flat in all patients preoperatively, doubled 2-weeks after GV (p=0.007) and increased 4-fold after BPG (p=0.005); at 1 year, such improvement persisted only after BPG (p=0.001). GIP significantly reduced at 2 weeks after BPG (p=0.001) while at 1-year a ~50% suppression of GIP levels was evident with both procedures. Post-meal ghrelin significantly decreased 2 weeks after GV (p=0.004) with a further reduction after one year; in contrast no change was observed in ghrelin profile after BPG both at 2 weeks and at 1 year.

Conclusion. BPG and GV are able to induce similar weight loss and DM2 remission while the pattern of GI hormones is different between the two interventions. Since SG is a technically simpler operation and is not associated with

Basato sul contributo presentato al XIX Congresso Nazionale AMD, svoltosi a Roma dal 29 maggio al 1 giugno 2013.

malabsorption, it may represent the operation of choice for obese DM2 patients.

Introduzione

Negli ultimi anni, la chirurgia bariatrica si è affermata come valido strumento per indurre una significativa e stabile perdita di peso con miglioramento o scomparsa delle co-morbidità associate all'obesità. Sia negli USA che in Europa lo sviluppo e la diffusione di tali interventi chirurgici ha raggiunto proporzioni notevoli⁽¹⁾. In una interessante metanalisi sull'efficacia delle procedure bariatriche sulla perdita di peso, Buchwald et al.⁽²⁾ hanno riportato una perdita di peso totale, ovvero senza distinzione tra le varie procedure, di 36,6 kg corrispondenti ad un *Excess Body Weight Loss* (EBWL) di 53,8% a 2 anni dall'intervento chirurgico. In particolare, la diversione bilio-pancreatica (DBP) si associava al più alto e duraturo calo ponderale (EBWL ~74%); l'effetto sul peso diminuiva nel bypass gastrico (BPG) aggirandosi intorno al 63%, fino a raggiungere ~ 50% nel bendaggio gastrico che, tuttavia, ha il vantaggio di essere totalmente reversibile. Parimenti all'effetto sul peso, anche le percentuali di miglioramento/risoluzione del DM2 variavano a seconda della tecnica chirurgica, passando dal 94% in pazienti sottoposti a DBP, allo 81,6% dopo BPG, al 81,4% con la GPV e al 55% con il bendaggio gastrico⁽²⁾. Più recentemente, l'applicazione di criteri più stringenti per la definizione di remissione del diabete dopo chirurgia ha dimostrato percentuali di successo decisamente più basse⁽³⁾. È da notare che nei vari studi esaminati, i pazienti che non andavano incontro a remissione avevano una durata di malattia più lunga, suggerendo un maggior grado di esaurimento funzionale della β -cellula, probabilmente non più reversibile. Negli ultimi anni numerosi autori⁽⁴⁻⁷⁾ hanno rilevato come la remissione del DM2 dopo interventi di chirurgia bariatrica, soprattutto malassorbitivi o misti, sia un evento estremamente precoce che si realizza ancor prima di un significativo calo ponderale.

È verosimile, dunque, che il precoce miglioramento dell'omeostasi glicemica dopo chirurgia bariatrica non sia del tutto spiegato dal calo ponderale ma sia la risultante, piuttosto, di altri meccanismi "intervento-specifici" ed indipendenti dal decremento ponderale. Uno dei meccanismi ipotizzati risiederebbe nell'accelerazione del transito dei nutrienti, conseguente al riarrangiamento dell'anatomia intestinale, che comporta il contatto dell'intestino distale con materiale alimentare parzialmente indigerito con conseguente ripristino di una più fisiologica risposta incretinica che nel DM2 e nell'obesità risulta essere fortemente ridotta⁽⁸⁻¹⁰⁾. Le conseguenze del riarrangiamento anatomico dopo interventi malassorbitivi o restrittivi-malassorbitivi (DBP e BPG) sono state ampiamente esplorate, mentre minori informazioni sono disponibili

riguardo alle tecniche restrittive di più recente ideazione come la *sleeve gastrectomy*. In aggiunta, pochi studi hanno confrontato gli effetti di differenti tecniche bariatriche sul pattern di secrezione degli ormoni gastrointestinali nel follow-up post-chirurgico in pazienti affetti da DM2 ed obesità.

Scopo

Il nostro studio ha lo scopo di valutare in pazienti con diabete tipo 2 (DM2) ed obesità di alto grado gli effetti di due interventi bariatrici, uno restrittivo, la *gastrectomia verticale* (GV), l'altro restrittivo/malassorbitivo, il *by-pass gastrico* (BPG) sul peso corporeo, sulla remissione del diabete e sul pattern di secrezione degli ormoni gastrointestinali sia a breve (2 settimane) che a più lungo termine (12 mesi).

Materiali e metodi

Soggetti. Lo studio è stato condotto su 24 pazienti obesi con diagnosi di DM2 secondo i criteri WHO, età compresa tra 30-65 anni ed IMC ≥ 35 kg/m². I criteri di esclusione erano costituiti da: storia clinica positiva per alcolismo, evidenza di cardiopatia ischemica (sia clinica che silente), patologie renali e patologie psichiatriche. Dei 24 soggetti arruolati, 11 sono stati sottoposti ad intervento di BPG e 13 ad intervento di GV.

Disegno dello studio. In tutti i soggetti prima, 2 settimane e 12 mesi dopo l'intervento chirurgico abbiamo effettuato le seguenti valutazioni:

- Compenso glicemico (glicemia a digiuno, profili glicemici giornalieri, emoglobina glicata);
- Profilo lipidico;
- Risposta ormonale ad un pasto misto liquido standard di 175 ml (Resource Energy 1.7, Novartis) (304 Kcal, L 36%, CHO 52%, P 12%) con misurazione dei livelli circolanti di incretine (GLP-1, GIP) e ghrelina.

I prelievi sono stati effettuati ai tempi -10, 10, 0', 30, 60, 90, 120, 150, 180 minuti.

La remissione del DM2 a 2 settimane è stata definita come glicemia a digiuno <100 mg/dl in assenza di terapia ipoglicemizzante mentre a 12 mesi la remissione del DM2 è stata considerata come A1C <6% e glicemia a digiuno <100 mg/dl in assenza di terapia ipoglicemizzante.

I pazienti sono stati sottoposti all'intervento chirurgico dalla stessa *équipe* chirurgica presso l'Unità Operativa di Chirurgia Generale ed Endoscopica, Ospedale "San Giovanni Bosco", ASL NA1.

Metodi di laboratorio. Le concentrazioni plasmatiche di glucosio, colesterolo, trigliceridi e HDL-colesterolo sono state determinate mediante metodo enzimatico. L'emoglobina glicosilata è stata misurata mediante HPLC. Il dosaggio degli ormoni gastrointestinali GLP-1,

GIP e ghrelina è stato effettuato mediante metodica Elisa.

Analisi dei dati. I risultati sono stati analizzati ed espressi come media \pm deviazione standard (DS). L'area totale sotto la curva degli ormoni è stata calcolata mediante la regola dei trapezi. Le variazioni dei diversi parametri esaminati sono state analizzate mediante ANOVA e analisi post-hoc. È stato considerato significativo un valore di $p < 0,05$. L'analisi statistica è stata effettuata mediante il programma SPSS (statistical software package) versione 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Risultati

Nella Tabella 1 sono riportate le principali caratteristiche cliniche e metaboliche dei pazienti studiati. Il gruppo BPG (M/F: 5/6) presentava un'età media di 49 ± 8 anni (range: 36-62) ed un IMC pari a 42 ± 6 kg/m² (M \pm DS), mentre nei 13 soggetti del gruppo GV (M/F: 6/7) l'età media era di 47 ± 9 anni (range: 31-65) e l'IMC di 43 ± 8 kg/m² (M \pm DS). La durata del diabete era di circa 4 anni ed il compenso glicemico era insoddisfacente in entrambi i gruppi (HbA1c: $8.3 \pm 2\%$ in BPG e $7.4 \pm 1\%$ in GV) nonostante la terapia ipoglicemizzante (92 e 72% dei soggetti in terapia con ipoglicemizzanti orali in GV e BPG, rispettivamente; 2 pazienti in terapia combinata ipoglicemizzanti orali + insulina in BPG). La maggior parte dei pazienti (77% nel gruppo GV e 64% nel gruppo BPG) era affetta da ipertensione arteriosa in trattamento farmacologico mentre la dislipidemia era presente in circa il 90% dei partecipanti.

Decremento ponderale e remissione del diabete.

Dopo 2 settimane dall'intervento chirurgico, si riscontrava un decremento ponderale medio rispetto al basale di 10 ± 3 Kg nei pazienti sottoposti a BPG e 17 ± 10 Kg in quelli sottoposti a GV, corrispondente ad una riduzione percentuale dell'eccesso ponderale (EBWL) del $20 \pm 8\%$ nel gruppo BPG e del $19 \pm 6\%$ nel gruppo GV (Tabella 1). Tutti i pazienti nel gruppo BPG ed il 69% de gruppo GV raggiungevano a 12 mesi un buon risultato definito, secondo la classificazione di Ma-lesland, dal raggiungimento di un IMC ≤ 35 kg/m².

La remissione del diabete dopo 2 settimane dall'intervento si verificava in 7/11 pazienti (64%) sottoposti a BPG ed in 9/13 pazienti (77%) nel gruppo GV. Dopo 12 mesi, la remissione del diabete era evidente in $\sim 80\%$ dei pazienti in entrambi i gruppi. La glicemia a digiuno, dai valori pre-intervento di 125 ± 32 e 159 ± 68 mg/dl diminuiva dopo due settimane a valori di 89 ± 21 ($p=0.004$) e 116 ± 31 mg/dl ($p=0.033$) in GV e BPG, rispettivamente. Tale miglioramento si confermava a 12 mesi ($p=0.01$ per entrambi gli interventi) L'emoglobina glicata si riduceva significativamente dopo 12 mesi sia in BPG ($5.5 \pm 0.5\%$, $p=0.015$) che in GV ($5.6 \pm 0.5\%$, $p=0.005$).

Risposta entero-ormonale al pasto misto. La risposta del GLP-1 al pasto misto era sostanzialmente piatta in fase pre-operatoria in entrambi i gruppi (AUC_{GLP-1} 4.7 ± 3 in BPG e 3.4 ± 1 pmol/l*180' in GV). Dopo 2 settimane dall'intervento, essa aumentava di circa quattro volte dopo BPG e di due volte dopo GV. A 12 mesi la risposta del GLP-1 si manteneva sostanzialmente elevata rispetto al pre-intervento solo nel

Tabella 1. Caratteristiche cliniche e metaboliche dei pazienti prima e dopo chirurgia bariatrica espresse come M \pm DS. Nessuna significativa statistica è stata differenza è stata osservata tra i parametri dei due gruppi al basale.

	BPG (n=11)			GV (n=13)		
	basale	2-settimane	1-anno	basale	2-settimane	1-anno
M/F	5/6	-	-	6/7	-	-
Età (anni)	49 \pm 8	-	-	47 \pm 9	-	-
IMC (kg/m ²)	42 \pm 6	38 \pm 5 ^a	29 \pm 2 ^b	43 \pm 8	37 \pm 7 ^a	31 \pm 5 ^b
Durata DM2 (anni)	5 \pm 5	-	-	4 \pm 4	-	-
EBWL (%)	-	20 \pm 8	65 \pm 15	-	19 \pm 6	58 \pm 18
Glicemia digiuno (mg/dl)	159 \pm 68	116 \pm 31 ^a	70 \pm 11 ^b	125 \pm 32	89 \pm 21 ^a	83 \pm 18 ^b
HbA1c (%)	8.3 \pm 2	-	5.6 \pm 0.5 ^b	7.4 \pm 1	-	5.6 \pm 0.5 ^b
Colesterolo Tot (mg/dl)	203 \pm 31	176 \pm 17 ^a	179 \pm 31 ^b	201 \pm 57	185 \pm 48	213 \pm 55
Trigliceridi (mg/dl)	203 \pm 83	157 \pm 64	130 \pm 89 ^b	195 \pm 88	162 \pm 51 ^a	101 \pm 29 ^b
HDL-colesterolo (mg/dl)	45 \pm 8	40 \pm 7	54 \pm 11 ^a	42 \pm 11	38 \pm 12	60 \pm 18 ^b
LDL-colesterolo (mg/dl)	125 \pm 35	104 \pm 12	99 \pm 36 ^a	135 \pm 45	118 \pm 51 ^a	139 \pm 42
Pazienti trattati con IO (%)	72	20	9	92	23	15
Pazienti trattati con I.O.+ins (%)	18	0	0	0	0	0

^a = $P < 0.05$ vs. baseline; ^b = $P < 0.05$ vs. baseline

IMC= indice di massa corporea, T2DM= diabete mellito tipo 2, EBWL= percentuale di eccesso di peso perso, I.O.= ipoglicemizzanti orali.

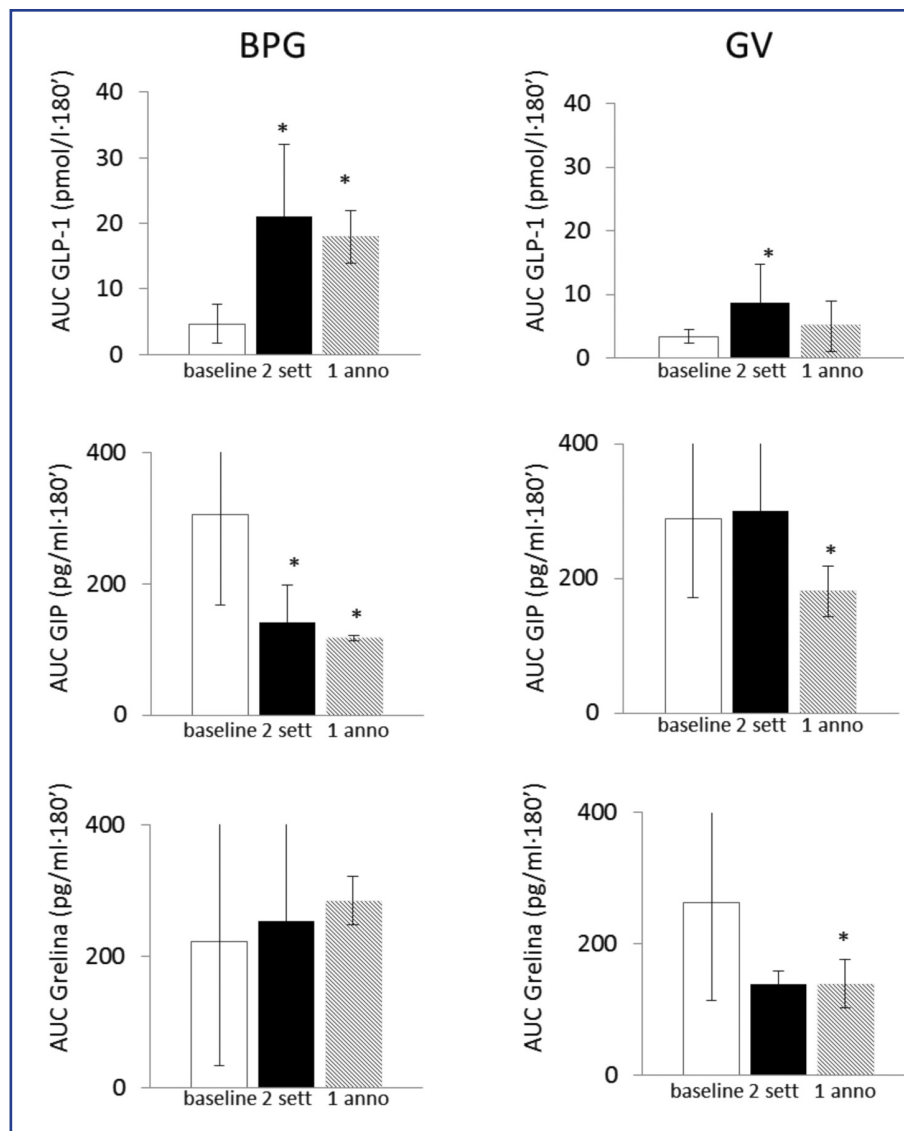


Figura 1. Risposta di GLP-1, GIP e grelina al pasto misto prima e dopo chirurgia bariatrica (BPG - bypass gastrico, GV - gastrectomia verticale). *P<0.05 vs baseline.

gruppo BPG ritornando ai livelli pre-intervento in GV (Figura 1).

Le AUC basali del GIP erano simili nei due gruppi prima dell'intervento. A due settimane, la risposta del GIP tendeva a ridursi significativamente nei pazienti sottoposti a BPG ($AUC_{GIP} 142 \pm 56 \text{ pg/ml} \cdot 180 \text{ min}$; $p=0.001$) mentre rimaneva sostanzialmente immodificata nel gruppo GV ($AUC_{GIP} 301 \pm 129 \text{ pg/ml} \cdot 180 \text{ min}$, $p=0.652$). Dopo 12 mesi, la riduzione della secrezione del GIP era invece evidente con entrambi gli interventi ($p=0.003-0.001$ rispetto al basale) ma con una maggiore soppressione dopo BPG ($p=0.002$ tra i due gruppi). I livelli di grelina a digiuno che dopo pasto misto erano simili nei due gruppi nel preoperatorio. La risposta della grelina al pasto era marcatamente soppressa sia 2 settimane ($p=0.004$) che 12 mesi ($p=0.007$) dopo GV, mentre nessuna variazione significativa era osservata dopo BPG.

Conclusioni

I nostri dati indicano che in pazienti obesi con DM2 sia BPG che GV sono in grado di indurre una significativa e sostenuta perdita di peso associata ad un notevole miglioramento dell'omeostasi glicemica. Infatti circa l'80% dei pazienti andava incontro a remissione del DM2 dopo 12 mesi dall'intervento, un dato in linea con le casistiche nazionali ed internazionali⁽²⁾. Nei restanti pazienti si è ottenuto comunque un miglioramento del controllo glicemico con riduzione del dosaggio dei farmaci ipoglicemizzanti. A fronte di un simile impatto clinico, le due procedure chirurgiche inducono differenti modifiche del profilo di secrezione degli ormoni gastrointestinali con un maggiore recupero della secrezione di GLP-1 e una maggiore soppressione di GIP dopo BPG ed una marcata soppressione della grelinemia dopo GV.

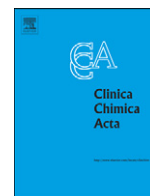
Le modifiche dell'asse entero-insulare dopo chirurgia bariatrica costituiscono senza dubbio un importante fattore contribuente alla remissione del diabete soprattutto in fase precoce^(11, 12). In particolare, per quanto concerne il GLP-1, i risultati del presente studio sono in linea con quelli della letteratura che mostrano dopo intervento di BPG un aumento dell'ormone in risposta al pasto (OGTT o pasto misto) sia a breve che a più lungo termine⁽¹²⁻¹⁵⁾. Tale fenomeno non si verifica, invece, a seguito dell'espletamento di procedure puramente restrittive come il bendaggio gastrico⁽¹⁶⁻¹⁸⁾. Nel nostro studio abbiamo osservato che dopo GV, metodica essenzialmente restrittiva, il picco di secrezione postprandiale di GLP-1 viene precocemente recuperato rispetto al preoperatorio, ma tale recupero non persiste nel tempo, in quanto dopo 12 mesi la concentrazione di GLP-1 ritorna pressoché ai valori pre-intervento. Nonostante la GV non modifichi l'anatomia dell'intestino è probabile che immediatamente dopo l'intervento la restrizione del volume gastrico e la conseguente ipocloridria, stimolino la produzione antrale del peptide stimolante il rilascio di gastrina (GRP), noto stimolatore delle cellule L⁽¹⁹⁾. Nel più lungo termine, meccanismi di riadattamento potrebbero determinare il ritorno della secrezione del GLP-1 ai livelli pre-intervento e, nel contempo, contribuire a sopprimere maggiormente la secrezione delle K-cellule GIP-secerenti, altresì in linea con quanto osservato nella nostra casistica un anno dopo GV. Gli studi sulle modifiche della secrezione di GIP dopo GV sono poco numerosi, specie nei pazienti diabetici, mentre dopo BPG i dati sono contraddittori. Alcuni ricercatori hanno riportato un aumento delle concentrazioni plasmatiche di GIP⁽¹⁴⁾, non confermato da altri⁽⁴⁾. È interessante comunque osservare come le modifiche dei livelli circolanti delle incretine non sembrano essere correlate né proporzionali alla perdita di peso corporeo. Ciò trova conferma negli studi di Laferrere et al. che dimostrano che il calo ponderale indotto da una dieta ipocalorica aumenta solo modestamente il livello delle incretine, e comunque, in misura molto inferiore rispetto all'intervento bariatrico⁽¹³⁾. Pertanto, piuttosto che al calo ponderale, le modifiche entero-ormonali sarebbero da ascrivere specificamente alle tecniche chirurgiche.

In conclusione, i nostri dati dimostrano che GV e BPG sono parimenti efficaci nell'indurre una stabile perdita di peso e nel migliorare l'omeostasi glicemica, a fronte di un diverso impatto sul profilo degli ormoni gastro-intestinali. Dal momento che GV è un intervento tecnicamente più semplice e non determina malassorbimento esso potrebbe rappresentare la procedura di scelta per i pazienti diabetici obesi. Studi di confronto a lungo termine tra le diverse procedure sono necessari per stabilire la procedura ottimale in relazione alla presenza di diabete.

Conflitto di interessi: nessuno

BIBLIOGRAFIA

1. Steinbrook R. Surgery for severe obesity. *N Engl J Med* 2004; 350: 1075-9.
2. Buchwald H, Estok R, Fahrbach K et al. Weight and type 2 diabetes after bariatric surgery: systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 2009; 122: 248-256.
3. Buse JB, Caprio S, Cefalu WT et al. How do we define cure of diabetes? *Diabetes care* 2009 Nov; 32(11): 2133-5.
4. Bradley D, Magkos F, Klein S. Effects of bariatric surgery on glucose homeostasis and type 2 diabetes. *Gastroenterology*. 2012 Oct; 143(4): 897-912.
5. Guidone C, Manco M, Valera-Mora E et al. Mechanisms of recovery from type 2 diabetes after malabsorptive bariatric surgery. *Diabetes* 2006; 55: 2025-31.
6. Raghoebar R. Bariatric surgery-mediated weight loss and its metabolic consequences for type-2 diabetes. *World J Diabetes*. 2013 Jun 15; 4(3): 47-50.
7. Camastra S, Manco M, Mari A et al. Beta-cell function in severely obese type 2 diabetic patients: Long-term effects of bariatric surgery. *Diabetes Care* 2007; 30: 1002-4.
8. Neff KJ, O'Shea D, le Roux CW. Glucagon like peptide-1 (GLP-1) dynamics following bariatric surgery: a Signpost to a new frontier. *Curr Diabetes Rev*. 2013 Mar 1; 9(2): 93-101.
9. Mingrone G. Role of the incretin system in the remission of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2008; 18: 574-579.
10. Ionut V, Burch M, Youdim A et al. Gastrointestinal hormones and bariatric surgery induced weight loss. *Obesity (Silver Spring)*. 2013 Mar 20. [Epub ahead of print]
11. le Roux CW, Aylwin SJ, Batterham RL et al. Gut hormone profiles following bariatric surgery favor an anorectic state, facilitate weight loss, and improve metabolic parameters. *Ann Surg* 2006; 243: 108-114.
12. Rubino F, Forgione A, Cummings DE, et al. The mechanism of diabetes control after gastrointestinal bypass surgery reveals a role of the proximal small intestine in the pathophysiology of type 2 diabetes. *Ann Surg* 2006; 244: 741-74.
13. Laferrère B, Teixeira J, McGinty J et al. Effect of weight loss by gastric bypass surgery versus hypocaloric diet on glucose and incretin levels in patients with type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93: 2479-2485.
14. Laferrère B, Heshka S, Wang K, et al. Incretin levels and effect are markedly enhanced 1 month after Roux-en-Y gastric bypass surgery in obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1709-1716.
15. Jiménez A, Casamitjana R, Flores L et al. GLP-1 and the long-term outcome of type 2 diabetes mellitus after Roux-en-Y gastric bypass surgery in morbidly obese subjects. *Ann Surg*. 2013 May; 257(5): 894-9.
16. Rodieux F, Giusti V, D'Alessio DA, et al. Effects of gastric bypass and gastric banding on glucose kinetics and gut hormone release. *Obesity* 2008; 16: 298-305.
17. Valverde I, Puente J, Martin-Duce A, et al. Changes in glucagonlike peptide-1 (GLP-1) secretion after biliopancreatic diversion or vertical banded gastroplasty in obese subjects. *Obes Surg* 2005; 15: 387-97.
18. Korner J, Bessler M, Inabnet W, et al. Exaggerated glucagon-like peptide-1 and blunted glucose-dependent insulinotropic peptide secretion are associated with Roux-en-Y gastric bypass but not adjustable gastric banding. *Surg Obes Relat Dis* 2007; 3: 597-601.
19. Perez-Tilve D, Nogueiras R, Mallo F et al. Gut hormones ghrelin, PYY, and GLP-1 in the regulation of energy balance [corrected] and metabolism. *Endocrine* 2006; 29(1): 61.



Letter to the Editor

Active glucagon-like peptide-1 (GLP-1): Storage of human plasma and stability over time

Dear Editor,

Active GLP-1, an incretin with <5 min half-life, is rapidly inactivated by the dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), present in circulation and in isolated plasma after sampling [1]. Data in literature on the stability of this molecule in vitro are scanty, inconsistent and limited to only a few hours.

The two active GLP-1 isoforms remain stable up to 30 min at 37 °C, if diprotin-A 0.1 mmol/l or bacitracin 0.1% are added to heparinized [2] or EDTA [3] human plasma. At +4 °C, without additives, they decrease by only 4% [4].

Because plasma samples may undergo long storage before GLP-1 assay, we evaluated the stability of active GLP-1 in EDTA-plasma, stored at –70 °C with aprotinin or a DPP-IV inhibitor (DPP4) and thawed at +4 °C or +37 °C, as part of a dietary intervention trial on the effects of whole grain cereals, approved by the Federico II University Ethics Committee.

Active GLP-1 has been assayed by a non radioactive, highly specific sandwich ELISA method (Linco) with 100% cross-reactivity with 7–36 amide and 7–37 glycine-extended, but no reactivity with 9–36 amide and 9–37 glycine-extended GLP-1 isoforms, GLP-2 or glucagone. The 2 to 100 pmol/l standards, 2 Linco-Quality Controls (devoid of DPP-IV) and plasma samples were examined in duplicate. Refreezing and rethawing of plasma was rigorously avoided.

Study 1 (plasma stored at –70 °C with aprotinin or DPP4 and thawed at +4 °C): from one subject, after a 12 h fast a blood sample was drawn in EDTA-K₃ (36.61 mmol/l) and aprotinin (50 KIU/ml), and a second blood sample in EDTA-K₃ (4.07 mmol/l) and Linco DPP4 (0.025 mmol/l); both samples were immediately stored at –70 °C,

and rigorously thawed at +4 °C before assay, on day 0, and for 13 times during a storage period of 10 months using the same lot kits and quality controls (Table 1). Mean concentration (24.8 ± 1.8 and 24.2 ± 1.4 pmol/l), intra-assay CV (3.9 ± 4.1% and 4.2 ± 2.5%), inter-assay CV (7.1% and 6.0%), mean percent variation compared to time 0 (0.1 ± 6.3 vs –2.3 ± 4.4 pmol/l), respectively, were similar for aprotinin and the inhibitor. The *t*-test for concentrations, CV% and Δ% paired data, for aprotinin vs DPP4, was not significant. The linearity test for aprotinin and DPP4 concentrations did not show variations related to storage time. QC1 and QC2 mean concentrations were 7.7 ± 0.8 and 43.2 ± 2.5 pmol/l and inter-assay CV was 10.4% and 5.7%, respectively. Therefore, 3 different concentrations were monitored through QC1, human plasma and QC2 (7, 25 and 43 pmol/l), and manually assayed 14 times by the same operator, over a storage period of 10 months.

Study 2 (plasma stored at –70 °C with aprotinin or DPP4 and thawed at room temperature): from a 12 h fasted subject, a blood sample drawn in EDTA (4.07 mmol/l) and aprotinin (20 KIU/ml plasma), and a second one in EDTA (4.07 mmol/l) and DPP4 (0.025 mmol/l), were immediately stored at –70 °C until assay; both were analyzed in the spring, summer and winter, thawing them at room temperature. The percent variations compared to time 0 were not strictly related to storage period: minimal after the first 14 days (+2% and 0%), relevant in the summer (–46% and –38%), and decreased in the winter (–13% and –26%) with aprotinin and DPP4, respectively, until 208 days' storage period.

In study 1 EDTA human plasma active GLP-1 remained stable for 10 months if stored at –70 °C, with either aprotinin or DPP4, but strictly thawed at +4 °C; this suggests the need to use cocktails of additives and gives less importance to the concentration of each [5], although the concentrations used seem to ensure the stability of the molecule up to 10 months. EDTA, compared to heparin, has anticoagulant action, but also inhibits calcium-dependent enzymes like phospholipase, provides clearer plasma and less fibrin clots, especially after thawing, improving the reproducibility of ELISA results [6,7]. Aprotinin, however, clearly works by antiproteases, and compared with the inhibitor, is available in 50 KIU/ml vacutainers, does not require specific storage temperatures and/or usage, is commonly used also to stabilize other plasma analytes. We conclude that the active GLP-1 assay should be necessarily associated with one reference human plasma similarly stored and for the same amount of time as protocol samples. These results represent, in our opinion, a novel contribution to the literature.

Table 1

Study 1. EDTA human plasma stored with aprotinin or DPP-IV inhibitor, for 10 months at –70 °C. Active GLP-1 concentration (pmol/l), CV%, Δ% vs time 0 after thawing at +4 °C.

Storage days at –70 °C	Plasma + aprotinin (50 KIU/ml blood)			Plasma + DPP-IV inhibitor (0.025 mmol/l blood)		
	M ± DS pmol/l	CV%	Δ % pmol/l	M ± DS pmol/l	CV%	Δ % pmol/l
0	24.7 ± 0.63	2.5	–	24.7 ± 2.6	10.4	–
21	23.5 ± 0.30	1.3	–5.1	24.3 ± 0.6	2.3	–1.6
29	25.9 ± 2.33	9.0	4.5	23.4 ± 1.3	5.2	–5.3
41	27.0 ± 0.29	1.1	9.2	25.6 ± 1.0	4.3	3.8
63	22.8 ± 1.98	8.7	–7.7	22.3 ± 1.2	5.3	–9.5
77	24.6 ± 2.79	11.3	–0.5	22.5 ± 0.5	2.2	–8.7
83	24.7 ± 0.02	0.1	–0.2	24.1 ± 1.0	4.0	–2.4
125	25.6 ± 0.09	0.4	3.6	23.6 ± 0.3	1.3	–4.5
131	23.0 ± 0.18	0.8	–7.0	24.8 ± 0.5	2.0	0.7
138	22.4 ± 0.22	1.0	–9.3	23.5 ± 0.5	2.2	–4.7
239	27.5 ± 0.21	0.8	11.3	24.2 ± 1.8	7.6	–2.1
288	25.3 ± 1.26	5.0	2.3	24.2 ± 0.9	3.8	–1.8
292	24.8 ± 0.61	2.5	0.0	24.6 ± 1.3	5.2	–0.3
299	24.7 ± 2.54	10.3	–0.3	26.1 ± 0.6	2.3	6.0
M ± DS	24.8 ± 1.76	3.9 ± 4.1	0.1 ± 6.3	24.2 ± 1.4	4.2 ± 2.5	–2.3 ± 4.4

References

- [1] Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology* 2007;132:2131–57.
- [2] Deacon CF, Johnsen AH, Holst JJ. Degradation of glucagon-like peptide-1 by human plasma in vitro yields an N-terminally truncated peptide that is a major endogenous metabolite in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:952–7.
- [3] Wettergren A, Fridal L, Wøjdemann M, et al. Amidated and non-amidated glucagon-like peptide-1 (GLP-1): non-pancreatic effects (cephalic phase acid secretion) and stability in plasma in humans. *Regul Pept* 1998;77:83–7.
- [4] Kieffer TJ, McIntosh CHS, Pederson RA. Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 in vitro and in vivo by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology* 1995;136:3585–96.

- [5] Schuchard MD, Mehig RJ, Cockrill SL, et al. Artfactual isoform profile modification following treatment of human plasma or serum with protease inhibitor, monitored by 2-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Biotechniques* 2005;39:239-47.
- [6] Sadagopan NP, Li W, Cook JA, et al. Investigation of EDTA anticoagulant in plasma to improve the throughput of liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:1065-70.
- [7] Yue B, Pattison E, Roberts WL, et al. Choline in whole blood and plasma: sample preparation and stability. *Clin Chem* 2008;54:590-3.

Simona Maione
Martina Mirabella
*Department of Clinical and Experimental Medicine,
"Federico II" Medical School, Napoli, Italy*

12 July 2010

Lucrezia Di Marino*
Ettore Griffo
*Department of Clinical and Experimental Medicine,
"Federico II" Medical School, Via Pansini 5,
Napoli, Italy*
*Corresponding author. Tel.: + 39 081 7462306;
fax: + 39 081 5466152.
E-mail address: lucrezia.dimarino@unina.it.