

# Fibra alimentare da crusca di avena e segale riduce l'aumento di peso corporeo e l'infiammazione epatica indotti dalla dieta occidentale grazie alla modulazione degli acidi grassi a catena corta, degli acidi biliari e del metabolismo del triptofano

[Zuzanna Maria Kundi](#) , [Jetty Chung-Yung Lee](#) , [Jussi Pihlajamäki](#) , [Chi Bun Chan](#) , [Kin Sum Leung](#) , [Stephanie Sik Yu So](#) , [Emilia Nordlund](#) , [Marjukka Kolehmainen](#) , [Hani El-Nezami](#)

11 giugno 2020

<https://doi.org/10.1002/mnfr.201900580>

Astratto

## Scopo

La fibra alimentare (DF) induce cambiamenti nella funzione del microbiota intestinale e quindi modula l'ambiente intestinale. Il modo in cui questa modulazione è associata alle vie metaboliche legate all'intestino è in gran parte poco chiaro. Questo studio mira a indagare le differenze nei metaboliti prodotti dal microbiota intestinale e le loro interazioni con il metabolismo dell'ospite in risposta all'integrazione con due fibre di crusca.

## Metodi e risultati

I topi maschi C57BL/6N sono alimentati con una dieta occidentale (WD) per 17 settimane. Due gruppi di topi hanno ricevuto una dieta arricchita con il 10% p/p di crusca di avena o di segale, con ciascuna crusca contenente il 50% di DF. I metaboliti microbici vengono valutati misurando gli acidi grassi cecali a catena corta (SCFA), gli acidi biliari ileali e fecali (BA) e l'espressione dei geni correlati al metabolismo del triptofano (TRP). Entrambe le crusche hanno ridotto l'aumento di peso corporeo e migliorato le risposte glicemiche alterate indotte dal WD, l'infiammazione epatica, gli enzimi epatici e i marcatori di integrità intestinale associati alla produzione di SCFA, al metabolismo BA alterato e alla deviazione del TRP dalla via di sintesi della serotonina alla produzione microbica di indolo.

## Conclusioni

Entrambe le crusche sviluppano un ambiente favorevole nell'intestino alterando la composizione dei microbi e modulando i metaboliti prodotti. I cambiamenti indotti nell'ambiente intestinale da una dieta ricca di fibre possono spiegare il miglioramento dei disturbi metabolici legati al WD.

## 1. Introduzione

La prevalenza dell'obesità e delle relative comorbidità è ancora allarmante nei paesi occidentali, con poche indicazioni di un miglioramento della tendenza attuale. <sup>[1]</sup> La causa principale dell'obesità è lo squilibrio energetico sviluppato da una dieta di tipo "occidentale" e la mancanza di attività fisica. Una dieta occidentale (WD) è caratterizzata non solo da un alto contenuto di grassi e zuccheri, ma anche da un basso contenuto di fibre alimentari (DF). <sup>[2]</sup> DF è derivato da componenti vegetali resistenti alla digestione e all'assorbimento nel tratto digestivo superiore. Tuttavia, il DF può subire una fermentazione microbica nel colon, con conseguente produzione di numerosi composti bioattivi e nella modifica delle comunità microbiche, che promuovono la salute. Tali fibre sono considerate prebiotici. <sup>[3-5]</sup> Gli interventi sull'uomo e gli studi osservazionali suggeriscono che una dieta ricca di fibre è collegata a un peso corporeo inferiore, a una migliore sensibilità all'insulina e risposte al glucosio e a una riduzione del colesterolo nel sangue. <sup>[6-10]</sup>

Il DF può modulare il metabolismo del colesterolo. <sup>[11,12]</sup> Inoltre, le diete ricche di fibre integrali inducono miglioramenti clinici relativi al metabolismo e alla sintesi degli acidi biliari (BA). <sup>[10]</sup> BA sono prodotti nel fegato dal colesterolo, immagazzinati nella cistifellea e rilasciati nell'intestino tenue per aiutare la digestione e l'assorbimento dei grassi alimentari. Sono anche potenti stimolatori del recettore nucleare farnesoide X (FXR), che è coinvolto nel metabolismo del colesterolo mediante la mobilitazione intestinale dei fattori di crescita dei fibroblasti 15/19 (FGF15/19). Questo a sua volta attiva il piccolo partner eterodimero epatico/complesso FXR per ridurre la sintesi di BA inibendo l'enzima epatico colesterolo 7 alfa-idrossilasi (CYP7a1). <sup>[13]</sup> La presenza di fibre in un pasto aumenta l'escrezione fecale di BA, stimola la loro sintesi epatica e successivamente abbassa il pool di colesterolo. <sup>[12]</sup> Nel lume intestinale, i BA sono sottoposti a biotrasformazione enzimatica microbica, influenzando la loro struttura chimica e la loro potenza per attivare l'FXR. <sup>[14,15]</sup>

Un altro gruppo di metaboliti microbici, noti come acidi grassi a catena corta (SCFA), è prodotto dal microbiota intestinale che agisce sul DF mediante fermentazione. È stato osservato un aumento degli SCFA sierici in individui che consumano fibre integrali. <sup>[16,17]</sup> Gli SCFA sono noti per i loro effetti protettivi sulle cellule epiteliali intestinali fornendo energia ai colonociti e controllando il pH luminale con la successiva inibizione della proliferazione dei patogeni e la modulazione delle attività microbiche ed enzimatiche dell'ospite. <sup>[18-20]</sup>

L'assunzione di DF è associata a livelli sierici alterati di metaboliti del triptofano di origine intestinale (TRP), vale a dire, diminuzione della serotonina (5-HT) e aumento dell'acido

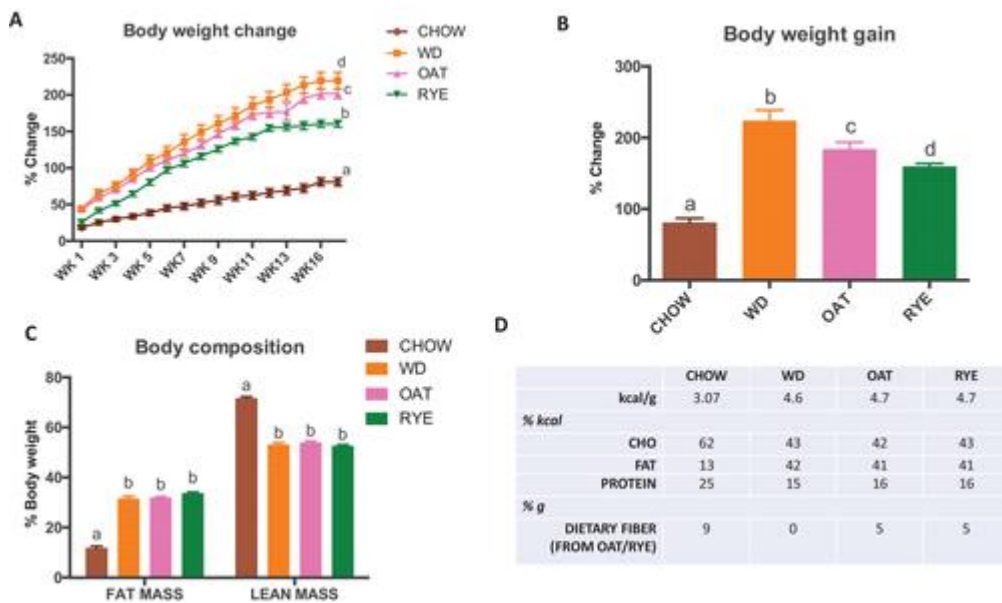
indolepropionico (IPA).<sup>[8, 21]</sup> Gli indoli sono prodotti direttamente dal microbiota intestinale tramite il catabolismo del TRP e hanno la capacità di attivare i recettori degli idrocarburi arilici nucleari intestinali (AHR). Questa stimolazione avvia la cascata di risposte immunologiche mediata dall'interleuchina-22 (IL-22) legata al miglioramento del sistema intestinale attraverso proteine a giunzione stretta, composti antimicrobici e produzione di mucina.<sup>[22, 23]</sup> La 5-HT è sintetizzata dal TRP nelle cellule epiteliali enterocromaffini dall'enzima triptofano idrossilasi 1 (TPH-1) e la sua attività dipende potenzialmente dalla presenza e dalla composizione dei microbi.<sup>[24, 25]</sup> Studi recenti suggeriscono che il microbiota intestinale potrebbe prendere parte al controllo del metabolismo del glucosio attraverso 5-HT derivato dall'intestino, dove i livelli circolanti di 5-HT erano inversamente correlati agli esiti dell'obesità e alla tolleranza al glucosio.<sup>[26]</sup> Questi metaboliti TRP stanno quindi emergendo come il nuovo focus della modulazione dell'attività microbica.

Il DF è evidentemente importante nel supportare il metabolismo intestinale sano e quindi nel ridurre il rischio di complicanze metaboliche dell'obesità. Tuttavia, ad oggi, mancano studi che indaghino le risposte metaboliche differenziali ai diversi tipi di fibre nella dieta. Ad esempio, le crusche di avena e di segale hanno composizioni DF distinte, dove predominano rispettivamente il beta-glucano e l'arabinoxilano.<sup>[27, 28]</sup> In questo studio, abbiamo mirato a chiarire i meccanismi protettivi conferiti da entrambe queste fibre in giovani topi alimentati con un WD. Abbiamo ipotizzato che le differenze metaboliche in risposta alle diete di avena e segale potrebbero essere mediate da differenze nelle vie che coinvolgono la segnalazione e il metabolismo intestinale di colesterolo, BA, SCFA e TRP.

## 2 risultati

### 2.1 L'assunzione di fibre ha influito sul peso corporeo ma non sulla composizione corporea

I topi alimentati con un WD arricchito con avena o crusca di segale hanno mostrato una significativa attenuazione dell'aumento di peso corporeo rispetto ai topi che ricevevano una dieta priva di fibre, con la segale che è più efficace dell'avena ( **Figura 1A,B** ). La variazione di peso complessiva differiva tra i gruppi (  $p < 0.05$  per gruppi  $\times$  interazione temporale), dove CHOW ha avuto il guadagno più basso, seguito da RYE, OAT e WD. La tendenza all'aumento del peso corporeo è stata coerente nel periodo di 17 settimane, determinando un aumento significativo alla fine del periodo di alimentazione per ciascun gruppo (Figura **1A,B**,  $p < 0,05$ ). WD ha mostrato un aumento della massa grassa e una diminuzione della massa magra nei topi rispetto a CHOW. È interessante notare che l'analisi della composizione corporea non ha mostrato differenze nel contributo percentuale della massa grassa o della massa magra tra i gruppi WD, OAT e RYE (Figura **1C** ). Va notato che tutti i WD erano isocalorici (Figura **1D** ).



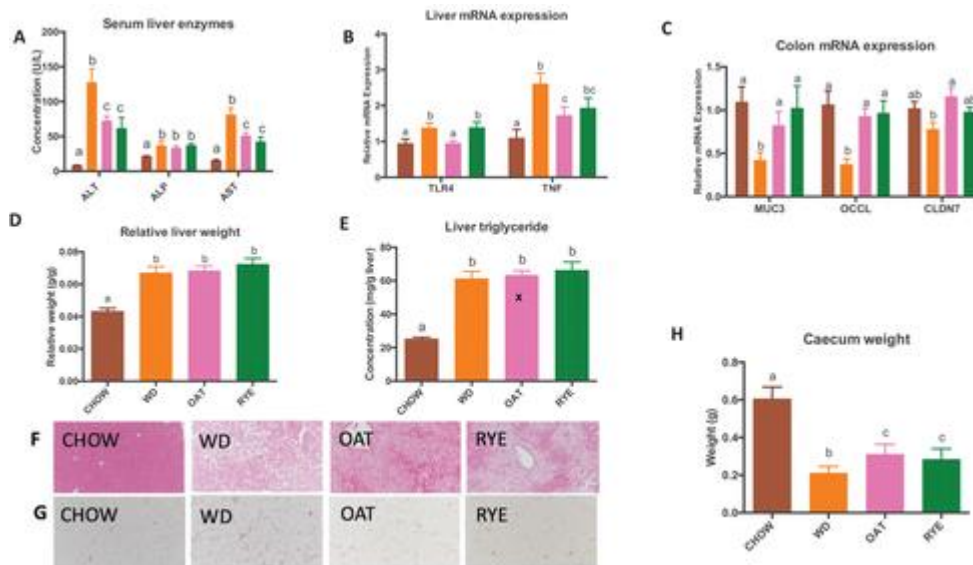
**Figura 1**  
[Apri nel visualizzatore di figure](#) **Presa della corrente**

Cambiamenti del peso corporeo e della composizione dopo l'intervento dietetico: A) cambiamenti nell'aumento di peso corporeo durante il periodo di studio (17 settimane); B) aumento di peso corporeo finale; C) composizione corporea alla settimana 15, dove massa grassa e massa magra sono espresse come % peso corporeo; D) contenuto energetico e macronutriente delle diete. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). Lettere diverse indicano la significatività statistica tra i gruppi per ciascun parametro ( $p < 0,05$ ).

## 2.2 L'assunzione di fibre protegge dai danni al fegato indotti da WD riducendo l'infiammazione epatica e migliorando l'integrità dell'intestino, ma non è riuscito a migliorare la steatosi epatica

Il WD ha aumentato gli enzimi correlati alla funzione epatica, vale a dire, alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST) e fosfatasi alcalina (ALP) ( **Figura 2A** ), indicando tossicità e danno agli epatociti. L'integrazione con avena e segale ha ridotto le concentrazioni sieriche di ALT e AST rispetto a WD, mentre i livelli di ALP sono rimasti simili al gruppo WD. Le riduzioni di ALT e AST nei gruppi OAT e RYE sono risultate associate all'attenuazione dell'infiammazione epatica in particolare, al fattore di necrosi tumorale (TNF) e al recettore toll-like 4 nei livelli di espressione dell'mRNA del fegato (Figura **2B** ). Sia ALT che AST erano correlati con l'espressione dell'mRNA epatico per i marcatori infiammatori, in modo più significativo con TNF ( $r = 0,98, p = 0,02$  e  $r = 0,97, p = 0,03$ , rispettivamente; Tabella S6, Informazioni di supporto). Inoltre, le espressioni di mRNA della mucina del colon e della proteina a giunzione stretta, vale a dire Mucin 3, Occludin e Claudin 7 (Figura **2C** ), sono state aumentate sia nell'avena che nella segale rispetto a WD, suggerendo una migliore funzione della barriera intestinale. Inoltre, è stato dimostrato che propionato e butirato correlano con quei parametri della barriera intestinale, principalmente con i livelli di espressione dell'mRNA di Occludina (entrambi  $r = 0,95, p = 0,05$ ), mentre gli SCFA totali e

l'acetato in particolare erano inversamente correlati con il TNF ( $r = 0,99, p < 0,05$  e  $r = -0,97, p < 0,05$ , rispettivamente; Tabella S6, Informazioni di supporto).



**figura 2**

[Apri nel visualizzatore di figure](#) [Presenza della corrente](#)

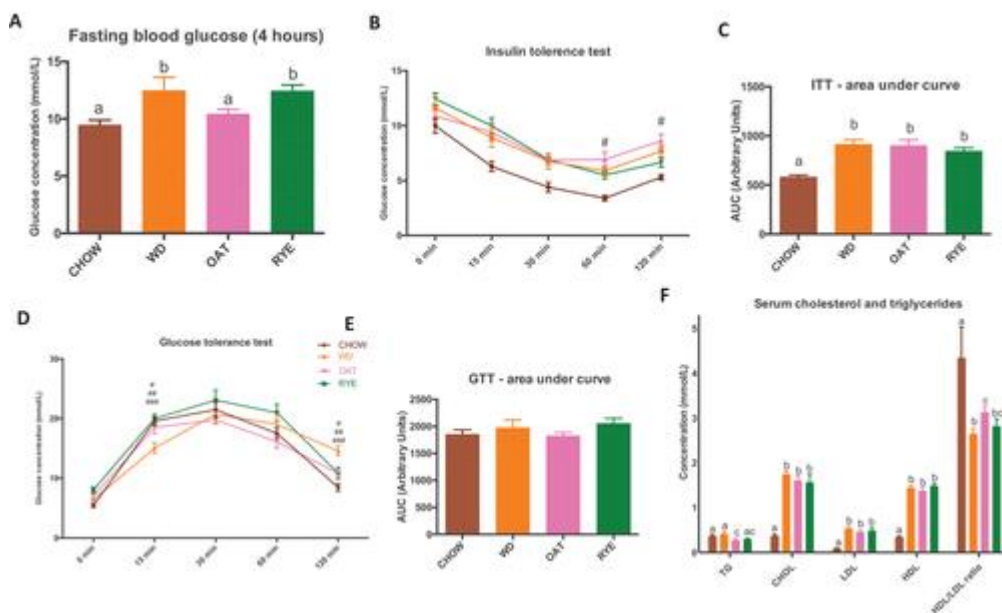
Marcatori di danno epatico e infiammazione: A) enzimi della funzionalità epatica sierica; B) Espressioni dell'mRNA di TLR4 e TNF. Marcatori di permeabilità intestinale: C) espressione dell'mRNA del colon per la mucina (MUC3) e le proteine a giunzione stretta (OCCL e CLDN7). Valutazione della steatosi epatica: D) peso del fegato espresso rispetto al peso corporeo; E) contenuto di trigliceridi del fegato per milligrammo di tessuto; F) immagini rappresentative di sezioni colorate con H&E (100x) del fegato, lobo laterale sinistro. G) Immagini rappresentative di sezioni colorate con H&E (100x) di tessuto adiposo dell'epididimo. H) Peso del cieco. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM ( $n = 12$ ). Lettere diverse denotano significatività statistica tra i gruppi ( $p < 0,05$ ). ALT: alanina aminotransferasi; ALP: fosfatasi alcalina; AST: aspartato aminotransferasi; TLR4: recettore Toll-like 4; TNF: fattore di necrosi tumorale; MUC3: mucina 3; OCCL: occludina; CLDN7: claudina 7.

Contrariamente alle nostre aspettative, l'avena e la segale non hanno migliorato l'ingrossamento del fegato indotto da WD (Figura [2D](#)). Inoltre, la concentrazione di trigliceridi epatici è stata elevata da WD rispetto a CHOW e non è stata modificata da OAT e RYE (Figura [2E](#)). WD ha sviluppato una significativa steatosi epatica rispetto a CHOW (Figura [2F](#)). Tuttavia, c'era una tendenza per i gruppi OAT e RYE ad avere adipociti più piccoli rispetto al gruppo WD (Figura [2G](#)). Il peso cecale, un indicatore dell'attività microbica del colon, è stato ridotto significativamente in WD rispetto a OAT e RYE; tuttavia, era il più alto nel gruppo CHOW (Figura [2H](#)).

## 2.3 Il metabolismo del glucosio e del colesterolo è stato parzialmente migliorato nel gruppo OAT

Per valutare se i gruppi OAT e RYE hanno avuto qualche effetto sul metabolismo del glucosio e dell'insulina, abbiamo prima misurato la glicemia a digiuno negli animali. L'iperglicemia è stata riscontrata nei topi dopo l'alimentazione WD, che è stata alleviata in modo significativo nel gruppo

OAT. Al contrario, il trattamento con RYE non ha mostrato alcun miglioramento della glicemia a digiuno ( **Figura 3A** ). La risposta al test di tolleranza all'insulina (ITT) variava tra i gruppi (  $p < 0.05$  per gruppi  $\times$  interazione temporale) con tutti i gruppi WD che presentavano insulino-resistenza sistemica rispetto a CHOW, mentre l'integrazione con avena e segale non ha migliorato le risposte al glucosio negli animali in qualsiasi momento durante il test (Figura **3B,C** ;  $p < 0,05$ ). Il test di tolleranza al glucosio (GTT) ha rivelato una migliore clearance del glucosio nei gruppi OAT e RYE poiché i loro livelli di glucosio nel sangue erano significativamente inferiori al WD alla fine del GTT (  $p < 0,05$ ; Figura **3D** ), sebbene il regime dietetico non abbia avuto alcun effetto complessivo sul risposta del glucosio nel dosaggio (Figura **3E** ;  $p > 0,05$  per gruppi  $\times$  interazione temporale).



**Figura 3**

[Apri nel visualizzatore di figure](#) [Presenza della corrente](#)

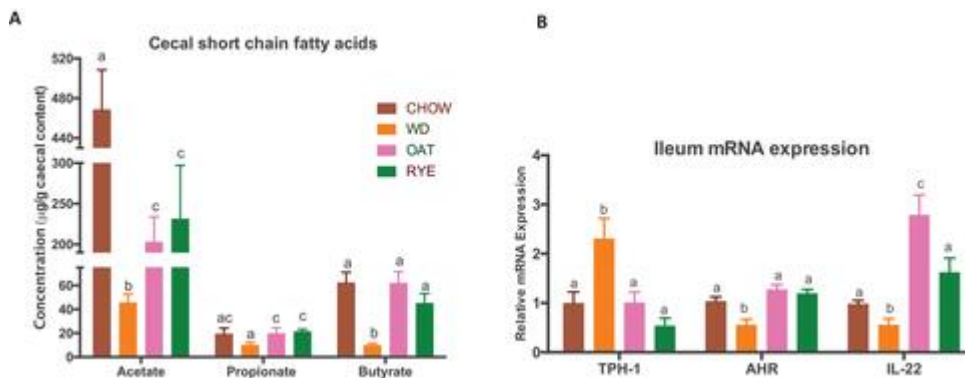
Parametri ematici misurati dopo l'intervento dietetico: A) glicemia a digiuno (misurata dopo 4 h di digiuno); B) test di tolleranza all'insulina; C) area sotto curva (AUC) per ITT; D) test di tolleranza al glucosio (GTT); E) AUC per GTT; F) colesterolo e trigliceridi sierici. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM (  $n = 8-10$ ). Lettere diverse indicano la significatività statistica tra i gruppi per ciascun parametro (  $p < 0,05$ ). ANOVA unidirezionale con misure ripetute presentate come differenza significativa rispetto a WD per CHOW (#), OAT (##) e RYE (###), dove  $p < 0.05$ . AUC: area sotto curva; GTT: test di tolleranza al glucosio; TG: trigliceridi; CHOL: colesterolo; LDL: lipoproteine a bassa densità; HDL: lipoproteine ad alta densità.

I livelli sierici di trigliceridi sono stati ridotti nel gruppo OAT, mentre né OAT né RYE hanno avuto alcun effetto sui livelli individuali di lipoproteine a bassa densità (LDL) e lipoproteine ad alta densità (HDL). Tuttavia, il rapporto HDL:LDL è stato migliorato nel gruppo OAT rispetto al gruppo WD (Figura **3F** ).

## 2.4 Sia l'avena che la segale hanno aumentato le concentrazioni di SCFA Cecal



Per valutare i cambiamenti nei metaboliti microbici in risposta all'integrazione di segale e avena, nei campioni ciecali sono stati misurati gli SCFA, ovvero acetato, butirato e propionato. Il WD ha ridotto significativamente tutti e tre gli SCFA e sia l'avena che la segale hanno ripristinato le loro concentrazioni, in particolare propionato e butirato, che hanno raggiunto livelli simili a quelli osservati in CHOW ( **Figura 4A** ).



**Figura 4**

[Apri nel visualizzatore di figure](#) [Presa della corrente](#)

Analisi degli acidi grassi a catena corta (SCFA) cecale ed espressioni geniche dell'mRNA ileale: A) SCFA cecali; B) l'espressione genica dell'mRNA ileale dei marker del metabolismo del triptofano. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). Lettere diverse denotano significatività statistica tra i gruppi ( $p < 0.05$ ). TPH-1: triptofano idrossilasi 1; AHR: recettore per gli idrocarburi arilici; IL-22: interleuchina 22.

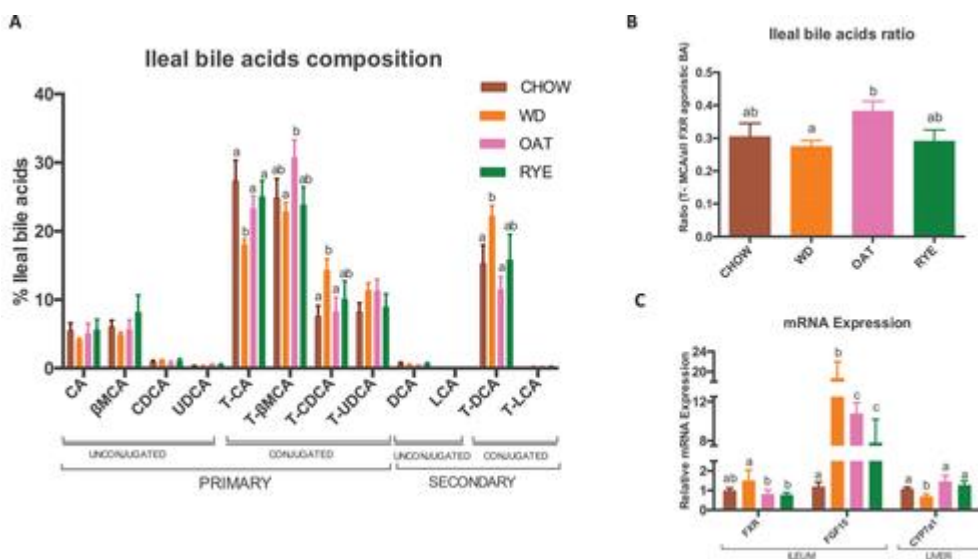
## 2.5 Il destino del metabolismo del triptofano potrebbe dipendere dalle attività microbiche stimolate da avena e segale in modo simile

In questo studio sono state determinate misurazioni indirette delle vie del metabolismo del TRP attraverso i livelli di espressione genica dell'mRNA intestinale (Figura 4B). È stato dimostrato che WD ha portato a un aumento significativo dell'espressione del mRNA di TPH-1 ileale, mentre sia l'avena che la segale lo hanno ridotto ai livelli osservati in CHOW. Inoltre, l'espressione di AHR, un recettore attivato dagli indoli derivati da TRP, sembrava essere inversamente associata all'espressione di TPH-1 ( $r = -0,93$ ,  $p = 0,07$ ; Tabella S6, Informazioni di supporto). Inoltre, l'espressione di IL-22, che viene rilasciata tramite stimolazione AHR, è stata ridotta anche in WD rispetto a CHOW. I livelli sono stati ripristinati da OAT e RYE, con OAT più potente. È stato notato che la concentrazione di SCFA era inversamente associata a TPH-1, dove l'abbondanza di propionato in particolare era altamente correlata con la sua espressione di mRNA ( $r = -0,99$ ,  $p = 0,05$ ; Tabella S6, Informazioni di supporto).

## 2.6 Il profilo BA dipendeva dal tipo di crusca nella dieta

I BA sono stati misurati nell'ileo e nelle feci. L'ileo è l'ultimo segmento dell'intestino tenue, dove la maggior parte dei BA viene riassorbita e la loro attivazione dei recettori nucleari è la più

importante. L'attivazione ileale di BA dell'FXR porta al reclutamento di FGF15 per la stimolazione dell'FXR epatico per ridurre l'attività del CYP7a1, un enzima che limita la velocità per la sintesi di BA dal colesterolo. [29] Nel gruppo OAT, la proporzione di un potente antagonista FXR, l'acido tauro-β-muricolico (T-βMCA), nell'ileo era aumentata rispetto a tutti gli altri gruppi ed era significativamente più alta di quella nel gruppo WD ( **Figura 5A**). Inoltre, il rapporto tra T-βMCA e un pool di BA agonisti noti (acido taurocolico, acido taurochenodesossicolico, acido taurodesossicolico, acido taurolitocolico, acido colico, acido chenodesossicolico, acido desossicolico e acido litocolico) ha mostrato un andamento simile, essendo il più alto in AVENA (Figura 5B). Ciò potrebbe contribuire alla diminuzione dell'attivazione di FXR e all'aumento dell'espressione dell'mRNA del CYP7a1 epatico (Figura 5C) rispetto al WD. Mentre il gruppo OAT ha mostrato un profilo FXR-antagonista dei BA, il gruppo RYE aveva livelli fecali considerevolmente più alti di BA coniugati ( **Figura 6A,B**) rispetto al gruppo OAT. Nelle loro forme coniugate, la velocità di riassorbimento dei BA e di conseguenza l'attivazione del loro recettore nucleare FXR sono diminuiti. Ciò è in accordo con i risultati dell'mRNA, che hanno mostrato una ridotta espressione dell'mRNA di FXR ileale, che era anche associata a un'elevata espressione dell'mRNA del CYP7a1 epatico rispetto a WD (Figura 5C) ( $r = -0,95, p = 0,05$ ; Tabella S6, Informazioni di supporto). Il pool BA di tutti i compartimenti misurati era il più alto in WD e ridotto in entrambi i gruppi di fibre (Figura 6C).

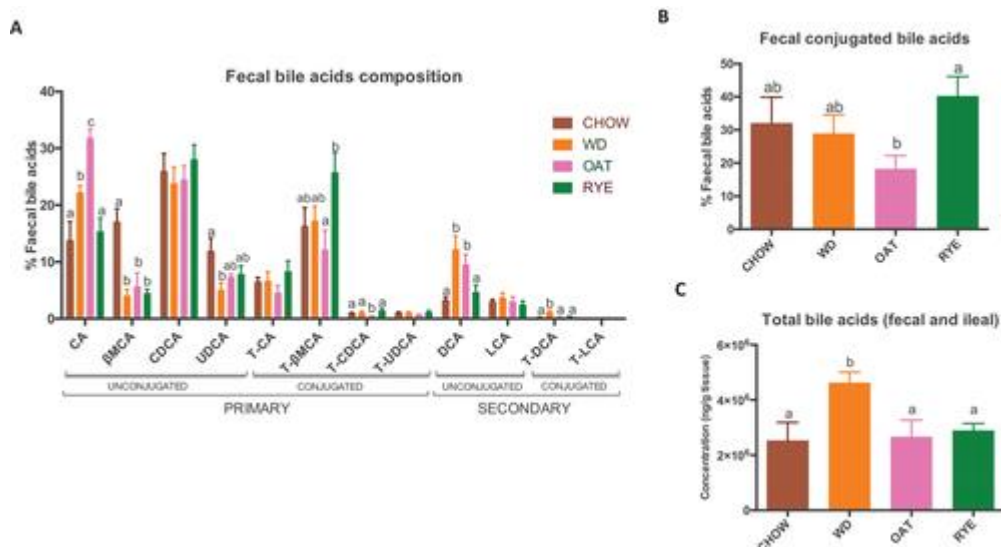


**Figura 5**

[Apri nel visualizzatore di figure](#) [Presenza della corrente](#)

Composizione ileale degli acidi biliari (BAs) ed espressione dell'mRNA di geni coinvolti nella segnalazione e nel metabolismo dei BA: A) livelli di BA primari e secondari; B) rapporto tra T-βMCA (antagonista FXR) e il pool di BA agonisti FXR (TCA, TCDCA, TDCA, TLCA, CA, CDCA, DCA, LCA); C) livello di espressione di mRNA dei geni coinvolti nella segnalazione di FXR e nel metabolismo di BA. I dati sono espressi come media ± SEM ( $n = 8-10$ ). Lettere diverse denotano significatività statistica tra i gruppi ( $p < 0,05$ ). CA: acido colico; -MCA: acido beta-muricolico; CDCA: acido chenodesossicolico; UDCA: acido ursodesossicolico; DCA: acido desossicolico; LCA: acido litocolico; la lettera "T" denota una forma coniugata con taurina; FXR: recettore farnesoide X; FGF15: fattore di crescita dei fibroblasti 15; CYP7a1: colesterolo 7 alfa-idrossilasi.





**Figura 6**

[Apri nel visualizzatore di figure](#) [Presenza della corrente](#)

Composizione fecale degli acidi biliari (BA) e pool totale di BA: A) livelli di BA primari e secondari; B) proporzione (%) di BA fecali coniugati; C) Pool BA misurato come cumulativo di BA fecali e ileali. I dati sono espressi come media  $\pm$  SEM ( $n = 10$ ). Lettere diverse denotano significatività statistica tra i gruppi ( $p < 0.05$ ). CA: acido colico; -MCA: acido beta-muricolico; CDCA: acido chenodesossicolico; UDCA: acido ursodesossicolico; DCA: acido desossicolico; LCA: acido litocolico; la lettera "T" denota una forma coniugata con taurina.

## 2.7 Il microbiota intestinale è stato alterato in modo diverso da entrambe le fibre di crusca

WD ha causato cambiamenti significativi nel microbiota intestinale a livello di phyla e generi rispetto a CHOW (Figura S1, Tabella S5, Informazioni di supporto). L'integrazione con avena o segale ha causato un piccolo aumento della proporzione di Bacteroidetes, con la SEGALE che ha esercitato effetti maggiori. Il gruppo OAT, d'altra parte, ha causato una significativa diminuzione dell'abbondanza di batteri del phylum Firmicutes. Di conseguenza, sia l'avena che la segale hanno dimostrato di avere un rapporto Bacteroidetes:Firmicutes più elevato rispetto a WD. Inoltre, il gruppo OAT, ma non il gruppo RYE, ha ridotto significativamente la proporzione di Proteobacteria e aumentato Saccharibacteria, ai livelli osservati nel gruppo CHOW. A livello di genere, OAT ha aumentato la quantità di Lactobacillus, mentre RYE ha mostrato un aumento significativo di Bifidobacterium (Tabella S5, Informazioni di supporto).

## 3 Discussione

Questo studio riafferma i benefici per la salute delle fibre di avena e segale, che hanno dimostrato di migliorare con successo un aumento di peso corporeo indotto da WD, ridurre l'infiammazione epatica mediante la modulazione del microbiota intestinale e migliorare la funzione di barriera intestinale. Inoltre, mostriamo che l'espressione dell'mRNA di TPH-1 era sottoregolata nelle diete arricchite di crusca di avena e segale, indicando una diminuzione della direzione della via da TRP a

5-HT. È concepibile che questo cambiamento sia dovuto anche alla modulazione correlata alle fibre del microbiota intestinale, che molto probabilmente è stata alterata a livello di specie e generi. I nostri risultati hanno mostrato una maggiore abbondanza di *Lactobacillus* nel gruppo OAT e di *Bifidobacterium* nel gruppo RYE, che si presume sia direttamente correlato al contenuto di beta-glucani e arabinoxilano in ciascuna crusca, rispettivamente. [27,28,30,31]

La nostra scoperta principale è stata la riduzione dell'aumento di peso corporeo grazie all'integrazione di avena e segale. Gli effetti positivi della fibra sull'aumento di peso corporeo sono stati riportati in precedenza in studi sull'uomo e sui roditori, dove i miglioramenti erano associati all'integrità intestinale e all'infiammazione epatica e sistemica. [32-34] Abbiamo ipotizzato che i miglioramenti nel nostro studio potrebbero essere mediati attraverso la produzione ripristinata di SCFA da parte del microbiota intestinale che agisce sulle fibre, poiché abbiamo osservato cambiamenti significativi nei livelli di SCFA in risposta all'integrazione di avena e segale. Infatti, è stato suggerito che gli SCFA possono indurre o promuovere la riduzione del peso corporeo agendo tramite specifici recettori SCFA, GPR43 e GPR41. [35-37] GPR43 e GPR41 sono espressi rispettivamente nell'intestino e negli adipociti e promuovono la secrezione intestinale di GLP-1, inducendo così la secrezione di insulina dell'ospite, migliorando la secrezione di leptina e stimolando il sistema nervoso simpatico, tutte attività che promuovono la riduzione del peso corporeo. [35-37] Il ruolo cruciale di GPR43 è stato ulteriormente elaborato in uno studio in cui l'integrazione con probiotici che hanno stimolato la produzione di SCFA ha mostrato un aumento dei livelli di plasma e acetato cecale, riduzione del peso corporeo e della massa del tessuto adiposo e miglioramento delle risposte al glucosio durante la sfida HFD. [38] Lo studio ha mostrato che la delezione di GPR43 nell'intestino non ha modificato l'aumento di peso indotto da HFD e le complicanze metaboliche, nonostante aumenti simili di SCFA plasmatici e cecali nel gruppo integrato con probiotici. La somministrazione di propanoato a pazienti obesi è stata anche associata ad un aumento della secrezione di GLP-1 e ad una riduzione del peso corporeo. [39]

Nonostante la mancanza di miglioramento nella deposizione di grasso epatico da parte di entrambe le fibre di crusca nel nostro studio, i topi che ricevevano avena e segale erano protetti dalla progressione verso la NASH, molto probabilmente guidata dal miglioramento della funzione di barriera intestinale come osservato in precedenza. [40,41] Poiché la sensibilità all'insulina non era diversa tra i gruppi WD nonostante l'arricchimento di fibre, è improbabile che le alterazioni nell'azione dell'insulina spieghino le differenze nella progressione della NASH.

Il nostro studio ha anche mostrato un aumento delle concentrazioni cecali di SCFA, che, a parte i loro effetti sul peso corporeo, potrebbero essere in parte responsabili dei migliori marcatori osservati della funzione di barriera intestinale. Un aumento della sintesi di SCFA è stato segnalato comunemente sia negli studi sull'uomo che negli studi sugli animali che coinvolgono l'integrazione di avena e segale DF. [9,42] Gli effetti protettivi degli SCFA sulle cellule epiteliali intestinali sono ben

consolidati e la loro maggiore sintesi in presenza di DF è stata osservata nel nostro studio e in precedenti rapporti. <sup>[18, 43, 44]</sup>

Ipotizziamo che un WD a basso contenuto di fibre abbia potenzialmente portato a un aumento dell'attività per produrre e quindi aumentare i livelli sierici di 5-HT e ridurre le vie alternative (protettive) per il metabolismo TRP, possibilmente tramite meccanismi che coinvolgono gli SCFA. Non abbiamo misurato gli effettivi livelli sierici di 5-HT, ma la sovraregolazione dell'espressione dell'mRNA di TPH-1, che è responsabile della sintesi di 5-HT da TRP, potrebbe indicare l'aumentata attività intestinale in ambienti privi di fibre e può essere corretta con l'aggiunta di segale o crusca d'avena, come è stato mostrato con l'espressione dell'mRNA downregolata di TPH-1 nei gruppi OAT e RYE. Inoltre, abbiamo osservato che è inversamente associato ai livelli di SCFA cecali, in particolare propionato. Gli SCFA potrebbero quindi prendere parte al metabolismo del TRP riducendo l'attività del TPH-1 intestinale e quindi deviando il TRP verso la sintesi dell'indolo.<sup>[20]</sup> È quindi plausibile che in un sistema intestinale sano sia necessaria un'adeguata produzione di SCFA per creare un ambiente che influenzi non solo la comunità microbica ma anche le attività enzimatiche endogene. Altri studi hanno infatti dimostrato che l'attività del TPH-1 è molto dipendente dalla presenza del microbiota. <sup>[25, 45]</sup> Inoltre, è stato dimostrato che la delezione genetica di TPH-1 protegge i topi dall'obesità indotta da una dieta ricca di grassi, attraverso una ridotta infiammazione sistemica, una ridotta deposizione di grasso epatico e una maggiore tolleranza al glucosio e sensibilità all'insulina. <sup>[46]</sup> Inoltre, uno studio osservazionale sull'uomo ha anche fortemente suggerito che un'elevata assunzione di fibre potrebbe essere associata a livelli sierici significativamente aumentati del metabolita TRP IPA, che era collegato a una migliore sensibilità all'insulina. <sup>[8]</sup> È stato dimostrato altrove che i metaboliti endogeni di TRP attivano la cascata di risposte immunoprotettive mediate dall'AHR che coinvolgono IL-22. <sup>[47]</sup> I miglioramenti nei confronti dei parametri della sindrome metabolica da parte di DF (inulina) nei topi sono stati associati a un'attività ripristinata dell'IL-22 intestinale; nonostante questo fatto, l'origine dell'attivazione di IL-22 non è stata estrapolata. <sup>[34]</sup> Inoltre, uno studio di intervento sull'uomo ha mostrato che durante la dieta contenente pane di segale integrale, i livelli plasmatici di 5-HT sono diminuiti significativamente rispetto alla dieta con pane bianco. <sup>[21]</sup> Gli autori hanno incluso anche un esperimento su animali, in cui l'integrazione di crusca di segale nei topi alimentati con una dieta ricca di grassi ha portato a livelli di 5-HT nel colon significativamente più bassi. <sup>[21]</sup> Nel loro insieme, questi studi, così come i nostri, indicano che la mancanza di fibra nei WD crea un ambiente luminale che incoraggia l'attività di TPH-1 a sintetizzare 5-HT dal TRP. Questo, a sua volta, si traduce in una ridotta velocità di conversione del TRP in indolo e di conseguenza in una diminuzione delle risposte immunologiche stimulate da IL-22. Questo squilibrio sembra essere invertito con l'aggiunta di fibre di crusca di avena e segale. Dato che entrambi i percorsi del metabolismo del TRP, ovvero la produzione di 5-HT e indolo, dipendono dalle attività microbiche, è concepibile che questi DF modulano cambiamenti specifici nel microbiota intestinale attraverso una maggiore produzione di SCFA, come suggeriscono anche i nostri risultati. <sup>[8, 21, 24, 25]</sup> Va sottolineato che finora nessuno

studio ha studiato il legame tra SCFA e metaboliti TRP in vivo per spiegare i diversi destini del TRP nell'ambiente intestinale mutevole. Tuttavia, i nostri risultati consentono solo conclusioni presunte in termini di effetti delle fibre tramite metabolismo TRP alterato. È essenziale che la nostra ipotesi venga ulteriormente sperimentata per valutare metaboliti rilevanti, come gli indolo luminali e sistemici e 5-HT, nonché gli effetti degli SCFA su tali metaboliti e sull'attività enzimatica di TPH-1, con conseguenti impatti sulla risposte infiammatorie indo-mediate.

Il pool BA totale è stato aumentato nel gruppo WD privo di fibre in questo studio, il che è in accordo con le osservazioni riportate in precedenza. <sup>[44,48]</sup> L'aumentata escrezione di BA nei gruppi OAT e RYE è stata associata ad un aumento della sintesi di BA, portando a un miglioramento simultaneo del rapporto HDL: LDL nel gruppo OAT. È altamente possibile che ciascuna delle fibre della crusca abbia aumentato la sintesi epatica di BA diminuendo l'attivazione dell'FXR intestinale per due vie diverse. FXR e altri recettori nucleari sono attivati dal legame dei BA, sebbene le loro potenze varino in modo significativo. <sup>[49]</sup> È stato dimostrato in precedenza che il rapporto tra BA agonisti e antagonisti di FXR determinava il livello di attivazione di FXR e di altre vie stimulate da BA. <sup>[50]</sup> Attraverso l'analisi di questo rapporto, il nostro studio ha mostrato che la composizione di BA nel gruppo OAT ha favorito le proprietà FXR-antagoniste, rivelando i meccanismi attraverso i quali l'avena ha aumentato la sintesi di BA e ha migliorato i profili di colesterolo e trigliceridi. Questo cambiamento nel profilo BA potrebbe essere collegato alla composizione batterica unica che supporta la deconiugazione specifica, sebbene siano necessarie analisi metagenomiche di sequenziamento profondo per svelare queste dipendenze.

Il gruppo RYE, d'altra parte, ha presentato un'elevata escrezione fecale di BA coniugati in questo studio. Poiché la deconiugazione microbica promuove il riassorbimento intestinale di BA, si può ipotizzare che la composizione microbica alterata riduca la deconiugazione di BA. Ciò potrebbe portare a un ridotto riassorbimento di BA e all'attivazione di FXR, con la upregulation a valle della sintesi di BA. Tuttavia, data l'attuale comprensione che la deconiugazione BA potrebbe trasmettere meccanismi protettivi, questa ipotesi richiede ulteriori indagini. <sup>[51]</sup> Il meccanismo alternativo potrebbe essere attraverso la teoria convenzionale in cui l'adsorbimento di BA dovuto alla fibra presente nel lume intestinale previene l'attività microbica e aumenta l'escrezione fecale, con conseguente riduzione dell'attivazione di FXR e aumento a valle della sintesi di BA. <sup>[52]</sup>

Questo studio ha studiato gli effetti dell'avena e della segale DF incorporati in un tipico WD. In conclusione, i nostri risultati suggeriscono che entrambe le crusche hanno la capacità di creare un ambiente favorevole nell'intestino supportando la crescita di microbi benefici, cioè i generi *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, in modo fibra-specifico. Questa differenziazione ha portato alla generazione di BA FXR-antagonisti da parte dell'avena e di BA coniugati con la loro maggiore escrezione fecale mediante l'integrazione di segale, che di conseguenza ha migliorato i BA sistemici e il metabolismo del colesterolo. Inoltre, entrambe le fibre di crusca hanno potenziato la produzione di SCFA, portando a una migliore integrità intestinale, ridotta infiammazione epatica e

possibilmente determinando il percorso del metabolismo del TRP, in particolare, l'attività del mRNA di TPH-1 e la produzione di indolo.

## 4 Sezione Sperimentale

### Esperimenti e diete sugli animali

La manipolazione dei topi è stata approvata dal Committee on the Use of Live Animals in Teaching and Research (CULATR 4648-18), dell'Università di Hong Kong. Topi maschi C57BL/6N di 3-4 settimane sono stati ingabbiati in gruppi di sei in un ambiente controllato con un ciclo luce/buio di 12 ore a una temperatura ambiente di 22 °C. Cibo e acqua sono stati forniti ad libitum. Dopo 10 giorni di acclimatazione, i topi sono stati assegnati in modo casuale a uno dei seguenti gruppi ( $n = 12$  per gruppo): controllo chow standard (CHOW); WD; WD con il 10% di crusca d'avena (OAT); e WD con crusca di segale al 10% (RYE) per 17 settimane. Poiché ogni crusca era composta dal 50% di DF (misurato con il metodo AOAC 2011.25 per la segale; informazioni nutrizionali ottenute da OatWell), le concentrazioni di fibre di avena e segale in ciascuna dieta erano pari al 5%. Inoltre, le frazioni fermentabili ben caratterizzate di ciascuna crusca, beta-glucani nell'avena e arabinosilani nella segale, erano rispettivamente del 30% e del 35% circa (informazioni ottenute dalle informazioni nutrizionali di OatWell e da Bender et al.), il che significa che ciascuna dieta forniva tra il 3% e il 3,5% di fibra fermentescibile.<sup>[53]</sup> Le diete (eccetto CHOW) sono state acquistate da Research Diets: WD (D12079B) e premix (D17041501px), che è stata miscelata con crusca d'avena (OatWell) o crusca di segale (classificata all'aria presso il VTT Technical Research Center of Finland Ltd. per rimuovere parte dell'amido e per arricchire il DF nel prodotto) internamente, per raggiungere concentrazioni del 5% di DF (p/p). Tutte le diete, WD, OAT e RYE, fornivano la stessa quantità di energia e macronutrienti per grammo di mangime. I dettagli degli ingredienti e le informazioni nutrizionali delle crusche e delle diete sono riportati nelle Tabelle S1 e S2, Informazioni di supporto. L'assunzione di cibo e il peso corporeo sono stati registrati settimanalmente. La composizione corporea è stata analizzata utilizzando un analizzatore di composizione corporea (LF90 Burkert, USA) alla settimana 15. Alla fine delle 17 settimane, i topi sono stati sacrificati e campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena cava inferiore e centrifugati a 7000 × g per 10 minuti per l'estrazione del siero. Campioni di tessuto di fegato, ileo e colon sono stati rimossi e lavati in soluzione fisiologica, mentre il cieco è stato rimosso con cura, pesato e il suo contenuto è stato delicatamente spinto con una lama sterile. Tutti i campioni sono stati congelati in azoto liquido e conservati a -80 ° C fino a ulteriori analisi. Una porzione del fegato e del tessuto adiposo dell'epididimo è stata fissata in formalina per le analisi istologiche.

### Test di tolleranza al glucosio e all'insulina

I test di tolleranza all'insulina (ITT) e i test di tolleranza al glucosio (GTT) sono stati condotti nelle settimane 15 e 16. Per i GTT, i topi sono stati a digiuno per 12 ore. La punta della coda è stata utilizzata per il prelievo di sangue al punto temporale 0 (glicemia a digiuno) e a 15, 30, 60 e 120

minuti dopo un'iniezione di glucosio intraperitoneale (IP) ( $2 \text{ g kg}^{-1}$  peso corporeo; Sigma-Aldrich, G7528, USA). Per l'ITT, i topi sono stati a digiuno per 4 ore, seguiti da un'iniezione di insulina IP di  $0,75 \text{ U kg}^{-1}$  di peso corporeo (Actrapid Penfil Human Insulin, Novo Nordisk) e dal test della glicemia come descritto per GTT. La glicemia è stata misurata con un glucometro Roche OneTouch Ultra2 (USA) ed espressa come mmol L.

### **Misurazioni degli acidi biliari ileali e fecali**

I BA sono stati estratti dall'ileo e dalle feci secondo un metodo precedentemente descritto, con modifiche. <sup>[54]</sup> In breve, 50 mg di tessuto ileale con contenuto/campioni fecali sono stati omogeneizzati in 200  $\mu\text{L}$  di soluzione di metanolo (50%) utilizzando un omogeneizzatore a lama (T25, ULTRA-TURRAX, IKA, Germania). I campioni omogeneizzati sono stati miscelati con 2 mL di metanolo ghiacciato contenente lo standard interno e agitati su vortex continuamente per 1 h. La miscela è stata quindi centrifugata a  $12.000 \times g$  per 10 min. Il surnatante è stato raccolto in una fiala pulita e un'altra estrazione dai residui rimanenti è stata ripetuta con un ulteriore mL di metanolo ghiacciato. I surnatanti sono stati combinati, essiccati completamente sotto azoto gassoso e ricostituiti in 100  $\mu\text{L}$  di metanolo. I campioni sono stati quindi filtrati attraverso 0. Membrane in politetrafluoroetilene (PTFE) da 45  $\mu\text{m}$  per rimuovere le impurità insolubili e analizzate immediatamente mediante cromatografia liquida-(quadrupolo-time-of-flight)-spettrometria di massa tandem (LC-(QToF)-MS/MS). Le condizioni dettagliate stabilite per le analisi LC-(QToF)-MS/MS dei BA sono descritte nella Sezione S1, Tabella S3, Informazioni di supporto.

### **Analisi degli acidi grassi a catena corta Cecal**

Gli SCFA sono stati estratti dal cieco come descritto in precedenza, con modifiche. <sup>[55]</sup> In breve, 25 mg di  $1-^{13}\text{C}$  feci C SCFA-spiked è stato mescolato con 1 mL di 0,005 M NaOH (contenente  $10 \text{ ug mL}^{-1}$  acido acetico- $\text{d}_4$  come standard interno), omogeneizzato per 45 s utilizzando un omogeneizzatore a lama (T25, ULTRA-TURRAX) e centrifugato a  $13.200 \times g$  per 20 min a  $4^\circ \text{C}$ . Il surnatante è stato raccolto e sono stati aggiunti 0,5 mL di una miscela 1-propanolo/piridina (3:2, v:v), seguiti da 100  $\mu\text{L}$  di propil cloroformiato e miscelazione vortex per 1 min. I campioni sono stati incubati per 1 ora a  $60^\circ \text{C}$  per derivatizzare gli SCFA. Successivamente, sono stati aggiunti 0,5 mL di esano, miscelati e centrifugati a  $2000 \times g$  per 5 minuti. È stato prelevato un volume totale di 400  $\mu\text{L}$  degli estratti del campione, filtrato attraverso membrane in PTFE da 0,45  $\mu\text{m}$  e conservato a  $-20^\circ \text{C}$  per la quantificazione della gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). GC-MS (6890N GC-5973 MS, Agilent, USA) è stato impostato secondo il metodo di Zheng et al. <sup>[56]</sup> Le concentrazioni di SCFA sono state determinate utilizzando le curve di calibrazione costruite per l'acido grasso determinato.

### **Analisi biochimica del siero e dosaggio dei trigliceridi epatici**

I campioni di siero sono stati analizzati per i seguenti parametri: ALT, AST, ALP, LDL, HDL, colesterolo totale e trigliceridi utilizzando un analizzatore Cobas c111 (Roche, USA). Il contenuto di



trigliceridi epatici è stato misurato con un kit di analisi colorimetrica dei trigliceridi (Cayman Chemical, USA) seguendo le istruzioni del produttore.

### **Estrazione dell'RNA e qPCR**

L'RNA è stato estratto da campioni di fegato, ileo e colon utilizzando un Illustra RNAspin Mini Kit (GE Healthcare, USA) seguendo le istruzioni del produttore. La concentrazione di RNA è stata misurata mediante uno spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Nano-Drop Technologies, USA) dove è stato accettato per l'analisi un rapporto  $>1,8$  (A260/A280). L'integrità dell'RNA è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio. Il cDNA è stato sintetizzato dall'mRNA tramite trascrizione inversa utilizzando un HiScript II Q RT SuperMix per qPCR (+DNA wiper) (Vazyme, Cina). La qPCR è stata eseguita su cDNA (e DNA cecale) con un sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, CA, USA) utilizzando un AceQ qPCR SYBR Green Master Mix (High ROX Premixed, Vazyme). I primer per i geni bersaglio sono stati sintetizzati da Life Technologies (Hong Kong).

### **DNA cecale e qPCR**

Il DNA Cecal è stato estratto utilizzando un kit QIAamp PowerFecal DNA (Qiagen, Germania) seguendo le istruzioni del produttore. La qPCR è stata eseguita sui campioni di DNA come descritto nella Sezione 2.6. L'abbondanza di comunità microbiche per ogni phylum o genere è stata calcolata utilizzando una formula descritta in precedenza ed espressa come percentuale di quella popolazione all'interno della comunità batterica totale misurata. <sup>[57]</sup> Le sequenze di primer sono elencate nella Tabella S4, Informazioni di supporto. <sup>[58 - 60]</sup>

### **Istologia del fegato e del tessuto adiposo**

Campioni di fegato e tessuto adiposo dell'epididimo (circa  $5 \times 5$  mm) sono stati lavati in soluzione salina tamponata con fosfato, fissati in formalina per 24 ore e processati utilizzando un Tissue Processor (Leica ASP300S, Germania) seguendo il metodo di Feldman e Wolfe (2014). <sup>[61]</sup> I blocchi inclusi in paraffina (Embedding Centre, Leica EG1150, Germania) sono stati sezionati in fette sottili  $5 \mu\text{m}$  (Microtomo Leica RM2265, Germania) e quindi colorati su vetrini (Leica ST5020 Multistainer, Germania) utilizzando l'emotossilina e l'eosina (H&E) metodo di colorazione. <sup>[61]</sup>

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando GraphPad Prism 6.0 per Mac (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Tutti i dati sono stati espressi come media  $\pm$  SEM. Le differenze tra i gruppi sono state determinate mediante l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA), inclusi i test di confronto multiplo di Tukey, e i confronti tra due gruppi dati sono stati analizzati utilizzando i test *t* di Student non appaiati a due code. L'ANOVA unidirezionale per misure ripetute è stata testata per i dati relativi a peso corporeo, GTT e ITT. Per alcuni dati sono stati eseguiti i test del coefficiente di correlazione di Pearson. La significatività statistica è stata considerata a  $p < 0,05$ .

## Ringraziamenti

Gli autori desiderano ringraziare il Dr. Outi Mattila del VTT Technical Research Centre of Finland Ltd. per aver preparato e fornito fibra di segale per l'integrazione. Gli autori desiderano inoltre ringraziare Yau Yu Fung di HKU per la costruzione del protocollo e l'ottimizzazione delle condizioni per l'analisi SCFA e Sanutha Shetty di RVCE per aver aiutato con gli esperimenti di laboratorio.

## Conflitto d'interesse

Gli autori dichiarano assenza di conflitto di interesse.

## Contributi dell'autore

ZMK e JC-YL hanno contribuito in egual modo a questo lavoro. ZMK, JC-YL e HEN hanno progettato lo studio. ZMK ha preparato e analizzato i dati. ZMK e JC-YL hanno redatto il manoscritto. SSYS e KSL hanno assistito con l'analisi BA. JC-YL, JP, CBC, EN, HEN e MK hanno finalizzato il manoscritto.