

INDICE

1.	INTRODUZIONE	3
1.1	Lipemia postprandiale	3
1.2	Ruolo dell'insulino-resistenza e del tessuto adiposo nel determinismo delle alterazioni lipidiche in fase posprandiale	7
1.2.1	LPL e HSL: struttura, sintesi e funzione	10
1.3	Iperlipidemia postprandiale nel diabete tipo 2 e nell'obesità	15
1.4	Effetti di interventi nutrizionali sulla lipemia postprandiale e sulle attività lipolitiche del tessuto adiposo	17
2.	SCOPI	20
3.	METODOLOGIA UTILIZZATE	21
3.1	Misurazione della LPL e della HSL	21
3.1.a	Misurazione dell'attività della LPL del tessuto adiposo	23
3.1.b	Attività della LPL nel plasma dopo stimolo con eparina	24
3.1.c	Misurazione dell'attività della HSL nel tessuto adiposo	24
3.1.d	Espressione genica della LPL e della HSL del tessuto adiposo	25
3.2	Valutazione della lipemia postprandiale	26
3.2.a	Separazione delle lipoproteine	29
3.2.b	ApoB-48 e ApoB-100	29
3.2.c	Altre determinazioni	30
4.	STUDI	31
4.1	I chilomocroni postprandiali e l'attività della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo sono alterati nel diabete di tipo 2 indipendentemente dall'obesità e dalla condizione di insulino-resistenza. Studio n.1	31
4.2	Attività ed espressione della LPL e della HSL nel tessuto adiposo a digiuno e dopo pasto ricco in grassi in individui normopeso, obesi e obesi diabetici. Studio n. 2	41
4.3	Effetti di una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi verso una dieta ricca in acidi grassi saturi sulla lipemia postprandiale e sulle lipasi del tessuto adiposo nel diabete di tipo 2. Studio n. 3	48

4.4	Effetti di una dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico sulle alterazioni lipidiche postprandiali del diabete tipo 2. Studio n. 4	58
5.	CONCLUSIONI	67
6.	BIBLIOGRAFIA	68
7.	APPENDICE: Pubblicazioni	

1. INTRODUZIONE

1.1 LIPEMIA POSTPRANDIALE

E', ormai, ampiamente dimostrato che le maggiori modificazioni delle concentrazioni e delle proprietà delle lipoproteine plasmatiche si verificano nella fase postprandiale.

Recentemente l'interesse per queste variazioni si è notevolmente intensificato. Ciò è dovuto, essenzialmente, al fatto che dati recenti della letteratura sembrano provare che la concentrazione dei trigliceridi plasmatici nel periodo postprandiale è molto più strettamente correlata al rischio cardiovascolare rispetto ai livelli plasmatici dei trigliceridi a digiuno¹⁻². Tuttavia, ancora oggi, i livelli di trigliceridi sono valutati esclusivamente in condizioni di digiuno (12-14 ore dopo il pasto). Poiché, al contrario, la maggior parte della vita umana si svolge in fase postprandiale, lo studio del metabolismo delle lipoproteine in questa fase permetterebbe, senz'altro, di ottenere informazioni più chiare e dettagliate sulle proprietà delle particelle coinvolte che, invece, i dati a digiuno non sono in grado di fornire. Ciò consente anche di valutare il contributo delle particelle esogene (di origine intestinale) e di quelle endogene (di origine epatica) alla lipemia postprandiale, soprattutto se si dispone di adeguati metodi di studio che permettono di differenziare, in modo chiaro e quantitativo, questi due tipi di particelle.

La lipemia postprandiale, quindi, è un processo fisiologico nel quale le lipoproteine plasmatiche e le loro subfrazioni subiscono specifiche variazioni in concentrazione e composizione a seguito dell'assunzione di un pasto e, in particolare, di un pasto ricco in grassi. Nella fase postprandiale sono in circolo, soprattutto, lipoproteine ricche in trigliceridi ossia chilomicroni, lipoproteine a densità molto bassa (VLDL) e i loro "remnant", cioè particelle residue del loro catabolismo. Tutte queste particelle sono caratterizzate da una notevole eterogeneità riguardo la loro origine (intestinale o epatica), struttura, dimensioni, densità, destino metabolico e, probabilmente potenziale aterogeno.

L'aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi nella fase postprandiale e il loro tempo di permanenza in circolo sono regolati, in primis, da un meccanismo di competizione tra chilomicroni e loro remnant, da una parte, e VLDL di origine endogena dall'altra. Infatti tutte queste particelle seguono una comune via catabolica di rimozione che vede impegnati, tra l'altro, due enzimi lipolitici: la lipasi lipoproteica (LPL) che agisce sulle particelle più grandi e la lipasi epatica (LE) che agisce sulle particelle più piccole. Questi due enzimi delipidizzano, progressivamente, chilomicroni

e VLDL, determinando, attraverso questa “cascata lipolitica” particelle di dimensioni sempre più piccole. La figura 1 mostra, schematicamente, appunto questo processo.

Rappresentazione schematica del metabolismo di chilomicroni e VLDL

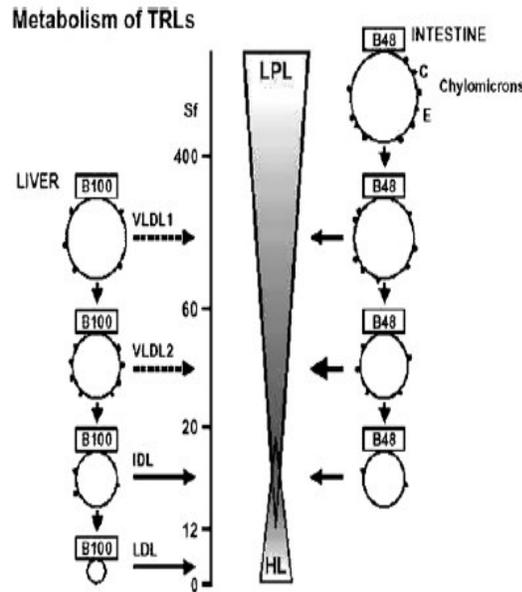


Fig.1

I chilomicroni sono secreti dall'intestino dopo l'assunzione di un pasto grasso. Essi sono particelle grandi e molto ricche in trigliceridi ($Sf > 400$) la cui componente proteica strutturale è l'apoproteina B 48, sintetizzata a livello intestinale. Nel plasma essi acquistano sulla loro superficie apoC e apoE e il loro contenuto in trigliceridi viene rapidamente idrolizzato dalla LPL. Il protrarsi del processo di delipidizzazione dei chilomicroni determina lo scambio con altre lipoproteine (LDL e HDL) dei lipidi contenuti nella parte centrale (vengono ceduti trigliceridi in cambio di colesterolo esterificato) e, quindi, la composizione finale delle particelle. Infine, a livello del fegato, esse sono captate da recettori cellulari che si legano all'apoE delle particelle stesse, rimuovendole dal circolo. Le VLDL, invece, sono secrete dal fegato già come classe molto eterogenea. Si distinguono, infatti, essenzialmente, VLDL più grandi (VLDL1 Sf 60-400) e VLDL più piccole (VLDL2 Sf 20-60). In principio esse condividono la stessa via metabolica dei chilomicroni, tranne che nella parte finale. Infatti, le VLDL, verso la fine del loro processo di delipidizzazione operato dalla LPL, sono rimosse dal plasma attraverso il recettore B/E che riconosce sia l'apoB 100, che è la loro proteina strutturale, che l'apoE. Inoltre, una certa quantità di VLDL è convertita a IDL (Sf 12-

20) e LDL (Sf 0-12), per ulteriore delipidizzazione, operata dall'altro enzima lipolitico, la LE.

Ne segue che una normale risposta postprandiale ad un pasto grasso è il risultato di un equilibrio tra particelle di origine intestinale (chilomicroni e loro remnant) e particelle di origine epatica (VLDL e loro subfrazioni)^{3,4}.

Da quanto detto scaturisce che, data la complessità del metabolismo lipoproteico, oltre che per effetto diretto dei chilomicroni, delle VLDL e dei loro remnant, la lipemia postprandiale potrebbe contribuire al processo aterogeno anche indirettamente, attraverso la formazione di lipoproteine prodotte durante il loro catabolismo nel periodo postprandiale ma che permangono a digiuno come, per esempio, le LDL piccole e dense, il cui aumento in circolo è indice di aumentato rischio cardiovascolare^{5,6}.

L'elevata persistenza in circolo dei chilomicroni, delle VLDL e dei loro remnant determina la cosiddetta "iperlipidemia postprandiale", con la quale si intendono le alterazioni quantitative, o anche solo qualitative, del normale processo fisiologico della lipemia postprandiale. La rilevanza clinica di queste alterazioni lipoproteiche consiste nel ruolo importante che esse sembrano avere nello sviluppo delle malattie cardiovascolari.

L'importanza dell'iperlipidemia postprandiale nello sviluppo dell'aterosclerosi è stata suggerita dagli studi di Zilvermit, nei quali si dimostrava in modelli animali come il colesterolo esterificato dei remnant dei chilomicroni si accumulasse nell'intima dell'aorta⁷.

Le evidenze a sostegno dell'effetto aterogeno delle lipoproteine plasmatiche postprandiali sono numerose. Si tratta principalmente di studi che hanno confrontato la risposta lipemica postprandiale di pazienti con diverse forme cliniche di aterosclerosi con quella di soggetti di controllo senza vasculopatia, mediante la valutazione del grado di ostruzione coronaria⁸⁻¹⁰ e della presenza di arteriopatia periferica¹¹⁻¹³ ma anche di indicatori precoci di coinvolgimento vascolare quali lo spessore medio-intimale carotideo¹⁴⁻¹⁶. Questi studi indicano abbastanza chiaramente che una lenta rimozione dal circolo dei remnant dei chilomicroni costituisce un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo di aterosclerosi. Mancano, invece, studi di intervento che abbiano valutato gli effetti della correzione delle alterazioni lipidiche in fase postprandiale sul rischio cardiovascolare.

I meccanismi attraverso i quali le alterazioni lipidiche postprandiali esercitano il loro effetto aterogeno possono essere molteplici. I remnant delle lipoproteine ricche in trigliceridi potrebbero agire direttamente in senso aterogeno. Essi sono stati rilevati,

infatti, in placche aterosclerotiche umane¹⁷ e possono promuovere una risposta infiammatoria nella parete arteriosa¹⁸. I remanenti potrebbero anche agire intervenendo nei processi della coagulazione, in quanto è stato osservato che essi promuovono l'attivazione del fattore VII, un fattore importante nella produzione di trombina, che a sua volta converte il fibrinogeno a fibrina nella formazione del coagulo^{19,20}. L'attivazione delle piastrine e dei monociti è un processo potenzialmente coinvolto nello sviluppo della malattia cardiovascolare che sembra essere associato alla lipemia postprandiale²¹.

È stato ipotizzato che la fase postprandiale corrisponda anche ad una condizione infiammatoria che coinvolge i leucociti e contribuisce potenzialmente alla disfunzione endoteliale. Infatti, durante la fase postprandiale ed in relazione con i livelli di lipemia postprandiale è stato osservato un aumento nel sangue di neutrofili, dell'interleukina (IL-8) e degli idroperossidi in associazione con una riduzione della vasodilatazione flusso-mediata²². Sembra inoltre che un consistente aumento dell'iperlipidemia postprandiale sia associato con una riduzione della vasodilatazione endotelio-mediata a livello dell'arteria brachiale²³⁻²⁵. Questo marker funzionale e strutturale di aterosclerosi precoce si correla proporzionalmente al grado di iperlipidemia postprandiale in quanto esso è in relazione con la riduzione delle HDL, dotate di potenziale antiossidante, e l'aumento di LDL piccole e dense che al contrario si ossidano facilmente²⁵. Anche Evans e coll.²⁶ hanno osservato che il deterioramento postprandiale della funzione endoteliale era correlato direttamente con i livelli di trigliceridi nelle VLDL e nelle LDL e inversamente con il colesterolo delle HDL. In questo studio, nella fase postprandiale l'arricchimento di trigliceridi delle VLDL era l'unico parametro correlato con lo stress ossidativo valutato come livello di radicali liberi.

In conclusione, ci sono buone evidenze che la lipemia postprandiale alteri la funzione dell'endotelio predisponendolo alla vasoconstrizione e determinando uno stato proinfiammatorio e procoagulante.

1.2 RUOLO DELL'INSULINO-RESISTENZA E DEL TESSUTO ADIPOSO NEL DETERMINISMO DELLE ALTERAZIONI LIPIDICHE IN FASE POSTPRANDIALE.

Nella patogenesi delle alterazioni della lipemia postprandiale, l'insulino-resistenza, che si esplica a livello del tessuto muscolare, del fegato, del pancreas e del tessuto adiposo, svolge senza dubbio un ruolo di primo piano. Il tessuto adiposo, tradizionalmente considerato solo come un organo di deposito energetico, è stato riconosciuto negli ultimi dieci anni come un sito principale di insulino-resistenza²⁷ nonché un vero e proprio organo endocrino, avente la capacità di produrre molteplici peptidi bioattivi, detti adipochine, i quali influenzano numerose vie metaboliche²⁸, molte delle quali regolate dall'insulina.

Ogni adipocita secreta piccolissime quantità di citochine nell'ambiente circostante, ma essendo il tessuto adiposo l'organo presente in maggiore quantità nel corpo umano, e peraltro ben irrorato, le quantità totali di adipocitochine nel torrente sanguigno raggiungono livelli significativi ed, interagendo anche con altri tessuti e organi, influenzano una varietà di funzioni che includono l'omeostasi del glucosio, l'infiammazione, il bilancio energetico, il metabolismo lipidico, il sistema fibrinolitico e l'omeostasi vascolare. Nella tabella 1 si riportano alcune di queste adipochine ed i loro effetti principali²⁹.

Il tessuto adiposo può essere diviso in due maggiori compartimenti, grasso sottocutaneo e grasso viscerale, diversi fra loro per distribuzione e funzione, e rappresentanti, rispettivamente, l'80% e il 10% del grasso corporeo totale³⁰. Individui con obesità centrale (grasso intraddominale o viscerale) hanno un aumentato rischio di malattie metaboliche e cardiovascolari mentre quelli con obesità periferica (grasso sottocutaneo) hanno un rischio più basso. Questo è legato, almeno in parte, a differenze regionali nella velocità della lipolisi tra i 2 compartimenti. Negli adipociti viscerali il rilascio di acidi grassi liberi dai trigliceridi di deposito è più alto rispetto agli adipociti sottocutanei, sui quali l'insulina ha un effetto antilipolitico più pronunciato³¹.

Poiché il grasso viscerale drena nella vena porta, elevate quantità di FFA, derivanti dal metabolismo lipidico viscerale, sono inviate rapidamente e direttamente al fegato. Questo stimola la produzione epatica di glucosio con aumento della gluconeogenesi e aumenta la sintesi dei trigliceridi e la produzione di VLDL con risultato ultimo dello sviluppo della dislipidemia.

Adipochine e loro principali effetti

ADIPOCITOCHINE	EFFETTI SU
LPL	Metabolismo lipidico
HSL	Metabolismo lipidico
Perilipina	Metabolismo lipidico
aP2	Metabolismo lipidico
CETP	Metabolismo lipidico
RBP	Metabolismo lipidico
IL-6	Infiammazione, aterosclerosi, insulino-resistenza
TNF- α	Infiammazione, aterosclerosi, insulino-resistenza
Adipsina/ASP	Risposta allo stress immunologico
Metallotioneina	Risposta allo stress immunologico
Angiotensinogeno	Omeostasi vascolare
PAI-1	Omeostasi vascolare
Adiponectina	Infiammazione, aterosclerosi, insulino-resistenza
PPAR- γ	Metabolismo lipidico, infiammazione, omeostasi vascolare
CRP	Infiammazione, aterosclerosi, insulino-resistenza
IGF-1	Metabolismo lipidico, insulino-resistenza
TGF- β	Migrazione e adesione cellulare, differenziazione e crescita
Monobutirina	Vasodilatazione dei microvasi
Proteine non coniugate	Bilancio energetico e termoregolazione
Ormoni steroidei	Metabolismo lipidico, insulino-resistenza
Leptina	Introito alimentare, riproduzione, angiogenesi, immunità
Resistina	Infiammazione, insulino-resistenza
Aroma P450	Metabolismo lipidico
Apelina	Insulino-resistenza
Visfatina	Insulino-resistenza
ZAG	Metabolismo lipidico, cachessia da cancro

Tab.1

Tornando all'insulina e alla sua azione a livello del tessuto adiposo, essa è il principale ormone regolatore delle funzioni di questo tessuto e gli adipociti sono le cellule più altamente sensibili all'insulina. Essa ha un ampio raggio di azione:

- stimola la differenziazione dei pre-adipociti ad adipociti
- negli adipociti maturi stimola il trasporto del glucosio incrementando la disponibilità di glicerolo-3 fosfato per la sintesi dei trigliceridi (lipogenesi Fig.2),
- inibisce l'attività della lipasi ormono-sensibile (HSL), riducendo così la lipolisi intracellulare dei trigliceridi citoplasmatici (Fig.2),
- promuove la captazione degli acidi grassi derivanti dall'idrolisi delle lipoproteine circolanti per azione della lipasi lipoproteica (LPL) (Fig.2).

Ruolo dell'insulina nella stimolazione della captazione, esterificazione e immagazzinamento degli acidi grassi nel tessuto adiposo³².

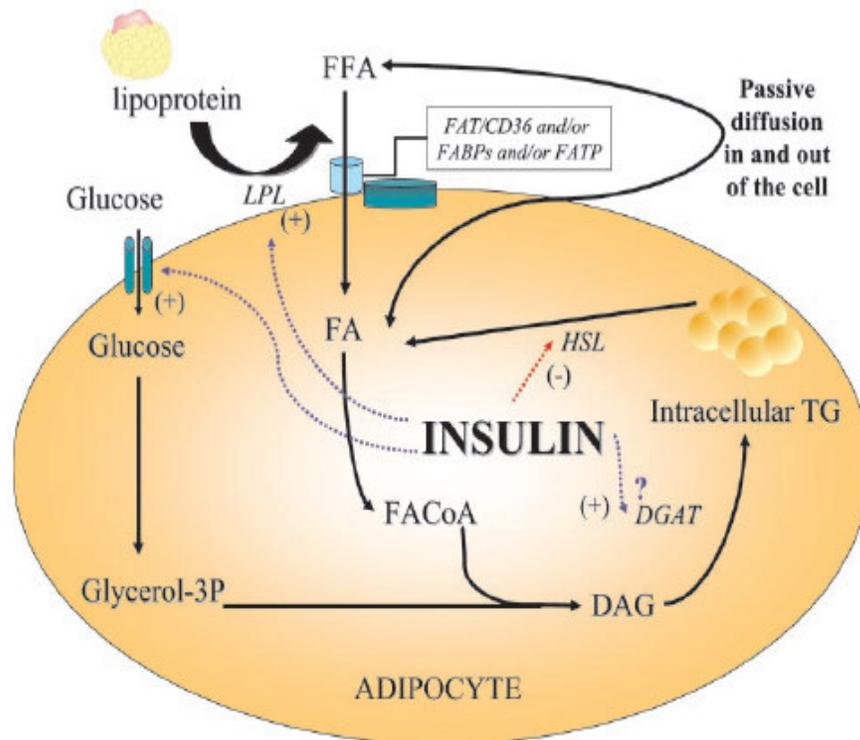


Fig. 2

Pertanto molte delle azioni dell'insulina a livello del tessuto adiposo si esplicano tramite l'attività di due enzimi lipolitici, la LPL e la HSL.

1.2.1 LPL E HSL: STRUTTURA, SINTESI E FUNZIONE.

Per una trattazione più ampia di questo argomento si rimanda alla rassegna “Lipasi Lipoproteica: funzione e significato clinico”, corrispondente alla pubblicazione n.1 di questa tesi. In questa sede si riportano i dati più rilevanti riguardanti questi due enzimi.

LPL. La lipasi lipoproteica (LPL), insieme con la lipasi pancreatica e la lipasi epatica, appartiene alla cosiddetta superfamiglia delle lipasi. Essa è una glicoproteina, composta da due subunità identiche, ciascuna del peso di 51 kDal e con un contenuto in carboidrati pari all'8-12%³³⁻³⁶. Ogni subunità è organizzata in due regioni strutturalmente distinte, consistenti in un dominio più grande N-terminale e in uno, più piccolo, C-terminale. Il dominio N-terminale comprende la triade catalitica (Ser¹³², Asp¹⁵⁶ e His²⁴¹) e il sito di legame per il cofattore apoproteina C-II. Il dominio C-terminale include un sito di legame per l'eparina e per l'eparan-solfato dei proteoglicani, e un sito di legame per i substrati lipidici, il quale conferisce specificità alla lipasi.

La sequenza di DNA responsabile della sintesi della lipasi lipoproteica è situata sul braccio corto del cromosoma 8, banda 22= 8p22. Il gene della LPL umano è ampio 30 kb e codifica per un peptide di segnale di 27 aminoacidi e per una proteina matura di 448 aminoacidi^{37,38}.

La lipasi lipoproteica è presente in numerosi tessuti ma prevalentemente è sintetizzata nel tessuto adiposo, nel tessuto cardiaco, in quello muscolare e nella ghiandola mammaria. Essa viene sintetizzata come precursore inattivo nel reticolo endoplasmatico ruvido delle cellule parenchimali e viene attivata dopo una serie di trasformazioni post-traslazionali nell'apparato del Golgi, da dove è secreta in vescicole secernenti e diretta o ai lisosomi, per la degradazione cellulare, o alla superficie delle cellule parenchimali, dove va a legarsi all'eparan-solfato dei proteoglicani. Infine, in presenza di fattori stimolanti, come l'eparina, la LPL viene trasportata sulla superficie dell'endotelio vasale, dove si lega alla parte terminale dei proteoglicani, cioè alle catene di eparan-solfato del glicocalix, grazie ad interazioni di natura elettrostatica^{39,40}. Sulla superficie luminale dei vasi sanguigni l'enzima può interagire con le lipoproteine circolanti, soprattutto lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni e VLDL, generando di- e mono-gliceridi, acidi grassi liberi e lipoproteine a densità intermedia.

Per la sua ottimale attività, la LPL richiede la presenza del suo cofattore, l'apoproteina C-II, parte integrante dei chilomicroni e delle VLDL. Infatti, il deficit genetico di apo C-II in vivo è responsabile di ipertrigliceridemia e aumento di chilomicroni; in vitro la

LPL può idrolizzare i suoi substrati anche in assenza di apo C-II, ma l'enzima esibisce una velocità di catalisi molto ridotta^{41,42}.

HSL. La lipasi ormono-sensibile (HSL) è una lipasi/esterasi non specifica e mostra caratteristiche molto diverse dalle altre lipasi umane, essendo l'unico tra gli enzimi della stessa famiglia ad essere soggetto ad una regolazione ormonale e neuronale⁴³. Oltre che nel tessuto adiposo, l'HSL è espressa in una varietà di altri tessuti, tra cui il tessuto muscolare, il tessuto steroideo, la ghiandola mammaria e il pancreas endocrino⁴⁴. Nell'uomo il gene responsabile della sintesi della HSL è localizzato sul cromosoma 19q13.3 e codifica per un polipeptide di 786 aminoacidi (85,5KDa)⁴⁵. Questa proteina risulta organizzata in 3 regioni strutturalmente distinte: una regione N-terminale, considerata primo dominio, probabilmente deputata all'interazione e al legame con i lipidi e le proteine; un breve tratto di 18 aminoacidi con la sola funzione di legame tra i domini maggiori; ed una regione C-terminale, secondo dominio, che racchiude il sito catalitico dell'enzima e 3 residui di serina, che svolgono un'importante azione modulatoria.

La forma funzionale dell'HSL è un omodimero, sebbene anche la forma monomericamente abbia mostrato un'attività enzimatica significativa⁴⁶. L'enzima è attivo verso una varietà di substrati lipidici tra cui trigliceridi, digliceridi, monogliceridi ma anche esteri del colesterolo, esteri degli acidi grassi steroidei e retinil esteri. Sui trigliceridi essa mostra una marcata preferenza per i legami esterei in posizione sn-1 e sn-3, generando digliceridi, 2-monogliceridi e acidi grassi liberi⁴⁷. Una specifica lipasi monoacilglicerolica agisce poi sui 2-monogliceridi nella cellula adiposa completando, in tal modo, il processo idrolitico a carico dei trigliceridi⁴⁸.

In condizioni basali l' HSL risiede nel citoplasma della cellula adiposa. La sua attività è regolata da meccanismi di fosforilazione reversibili strettamente dipendenti dall'azione di diversi ormoni lipolitici.

Tra questi, i fattori β -adrenergici, come le catecolammine, sono i maggiori attivatori della HSL; essi incrementano i livelli intracellulari di cAMP e promuovono l'attivazione della proteina chinasi A cAMP-dipendente (PKA). Quest'ultima fosforila sia l'HSL citosolica sia la perilipina A, una fosfoproteina predominante nell'adipocita, localizzata prevalentemente sulla superficie delle gocce lipidiche. In queste condizioni, la perilipina fosforilata sembrerebbe facilitare l'accesso della HSL alla goccia lipidica, suo substrato di idrolisi, promuovendo un cambiamento conformazionale della superficie della goccia lipidica stessa. In presenza di insulina e di altri agenti

antilipolitici, sia l'HSL che la perilipina sono invece defosforilate. In queste condizioni la perilipina, non fosforilata, sembrerebbe ostacolare l'interazione dell' HSL con la goccia lipidica, formando una barriera attorno ad essa. Quindi, la fosforilazione di entrambe le proteine è senza dubbio una fase importante e necessaria per dare inizio al processo di idrolisi mediato dalla HSL⁴⁹.

Alla luce di quanto detto, si può dedurre che questi due enzimi, la LPL e la HSL, nel tessuto adiposo giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi di lipogenesi/lipolisi e quindi nella ripartizione dei grassi, soprattutto nel periodo postprandiale. Come abbiamo detto in precedenza, la LPL agisce sulla componente trigliceridica delle lipoproteine ricche in trigliceridi, quali chilomicroni e VLDL, generando di- e mono-gliceridi, acidi grassi liberi e lipoproteine a densità intermedia. Gli acidi grassi generati dall'attività idrolitica dell'enzima sono poi diretti o al tessuto adiposo, per l'esterificazione e l'immagazzinamento, in un momento di surplus energetico, quale è la fase postprandiale⁵⁰, oppure al tessuto muscolare e/o cardiaco, dove gli acidi grassi vengono ossidati a scopo energetico, durante il periodo di digiuno⁵⁰⁻⁵².

L'HSL è, invece, il principale enzima responsabile della mobilizzazione intracellulare dei trigliceridi nel tessuto adiposo. Durante il periodo postprandiale l'attività della HSL si riduce ed è stimolata l'esterificazione degli acidi grassi nel tessuto adiposo. A digiuno, invece, l'attività della HSL aumenta, la LPL è inibita e il meccanismo di esterificazione non è stimolato. Pertanto gli acidi grassi sono diretti dagli adipociti ai capillari, per essere poi distribuiti ad altri tessuti tramite il circolo sanguigno.

Esiste, quindi, una regolazione altamente coordinata di LPL, HSL ed esterificazione degli acidi grassi, la quale governa la mobilizzazione e la deposizione degli acidi grassi nel tessuto adiposo, ed è strettamente regolata dall'insulina⁵³.

L'aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo, a cui si assiste nel periodo postprandiale e, contrariamente, la ridotta attività della HSL in questa fase, sono da associarsi all'aumentata secrezione insulinica che si ha in seguito ad un apporto di alimenti^{54,55}. Infatti, l'insulina stimola l'attività della LPL mentre inibisce l'attività della HSL del tessuto adiposo, tramite diversi meccanismi e, se solo uno di questi risulta alterato, ne consegue una ridotta clearance delle lipoproteine ricche in trigliceridi.

Da quanto detto, è facile dedurre che in tutte le condizioni caratterizzate o da deficit più o meno assoluto dell'insulina o da insulino-resistenza, come diabete tipo 1 all'insorgenza, obesità, diabete tipo 2 e sindrome metabolica, possano essere presenti

alterazioni dei processi di esterificazione e di re-esterificazione degli acidi grassi nel tessuto adiposo, come pure una ridotta soppressione insulino-mediata della HSL.

Ne deriva, in queste condizioni, un aumento del flusso di acidi grassi dal tessuto adiposo ad altri tessuti, mentre quelli che derivano dalla lipolisi delle lipoproteine plasmatiche (chilomicroni e VLDL) vengono convogliati ad altri tessuti non-adiposi, come il fegato, il muscolo, il cuore e il pancreas, dove possono esercitare il loro effetto deleterio.

A livello epatico, in condizioni caratterizzate da insulino-resistenza e nel diabete di tipo 2, l' aumentato flusso di acidi grassi va ad incrementare il pool intraepatico degli stessi, e di conseguenza viene stimolata la lipogenesi e l'esterificazione in maniera preferenziale a danno dell'ossidazione. Gli acidi grassi esterificati vengono immagazzinati come trigliceridi citoplasmatici oppure diretti alla sintesi delle VLDL (Fig.3).

Ruolo degli acidi grassi nell' aumentata produzione epatica delle VLDL

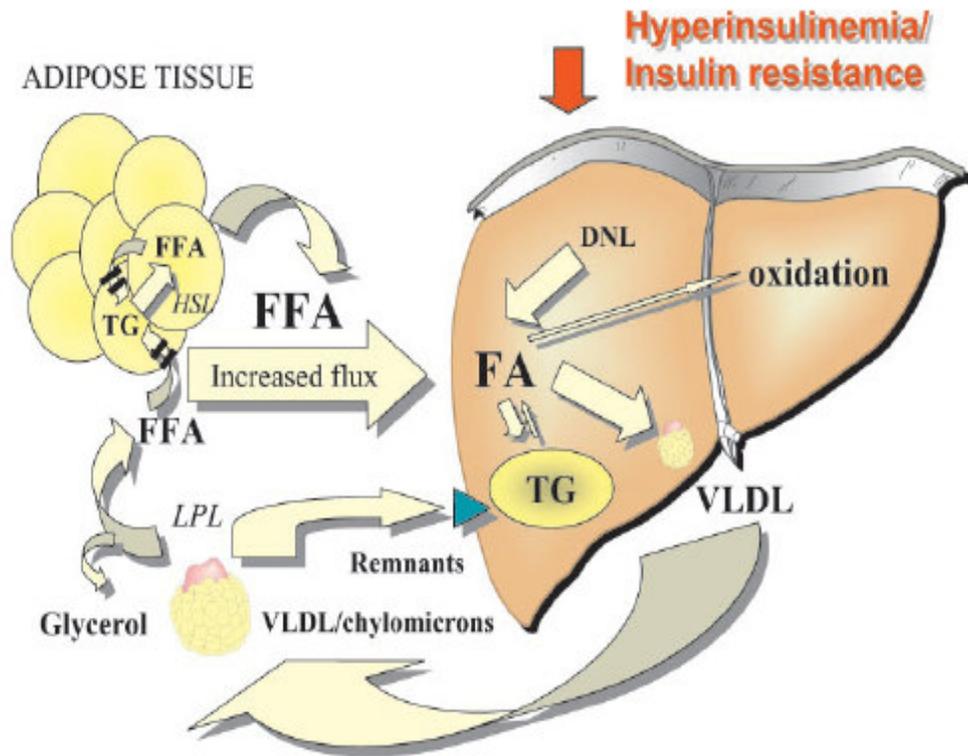


Fig.3

L'aumento della secrezione delle VLDL dal fegato condiziona anche i bassi livelli di colesterolo HDL e la formazione di LDL piccole e dense. Infatti, nel plasma il prolungato contatto tra VLDL, LDL e remnants con le HDL, in presenza della proteina di trasporto degli esteri del colesterolo (CETP) rende possibile il trasferimento di trigliceridi dalle altre lipoproteine alle HDL in scambio con gli esteri del colesterolo. Le HDL arricchite in trigliceridi rappresentano un ottimo substrato per la lipasi epatica che idrolizzando i trigliceridi determina la formazione di particelle HDL più piccole, catabolizzate più rapidamente ed eliminate a livello renale. Analogamente si formano le LDL piccole e dense che sono più aterogene perché più facilmente ossidabili e perché capaci di penetrare più facilmente nella parete vasale. Questi fenomeni sono esaltati nella fase postprandiale durante la quale la produzione epatica di VLDL non viene soppressa come di norma dall'insulina e quindi i lipidi esogeni (chilomicroni) si sovrappongono a quelli endogeni ed entrambi competono per la LPL periferica. L'eccesso di VLDL si associa anche ad un incremento della produzione di remnants in periferia contestuale ad una ridotta clearance degli stessi a livello epatico. La conseguenza è un netto e prolungato incremento di remnants circolanti.

1.3 IPERLIPIDEMIA POSTPRANDIALE NEL DIABETE TIPO 2 E NELL'OBESITÀ

L' elevata persistenza in circolo dei chilomicroni, delle VLDL e dei loro remnant, è un elemento caratterizzante la dislipidemia dei pazienti con diabete tipo 2⁵⁶⁻⁵⁸. Il picco trigliceridemico postprandiale è ritardato (4-6 ore) e ciò comporta che, per il susseguirsi dei pasti, i pazienti diabetici presentano alte concentrazioni di trigliceridi per tutto il giorno, come è stato rilevato in studi in cui il profilo giornaliero della trigliceridemia è stato determinato in pazienti con diabete tipo 2 mediante un apparecchio portatile⁵⁹ (fig.4).

**Profilo giornaliero dei trigliceridici in pazienti con diabete tipo 2 (n=145)
e in un gruppo di controllo di soggetti non diabetici (n=30). (media±DS).
*p<0.0001 vs digiuno; § p<0.0001 vs soggetti non diabetici (ANOVA).**

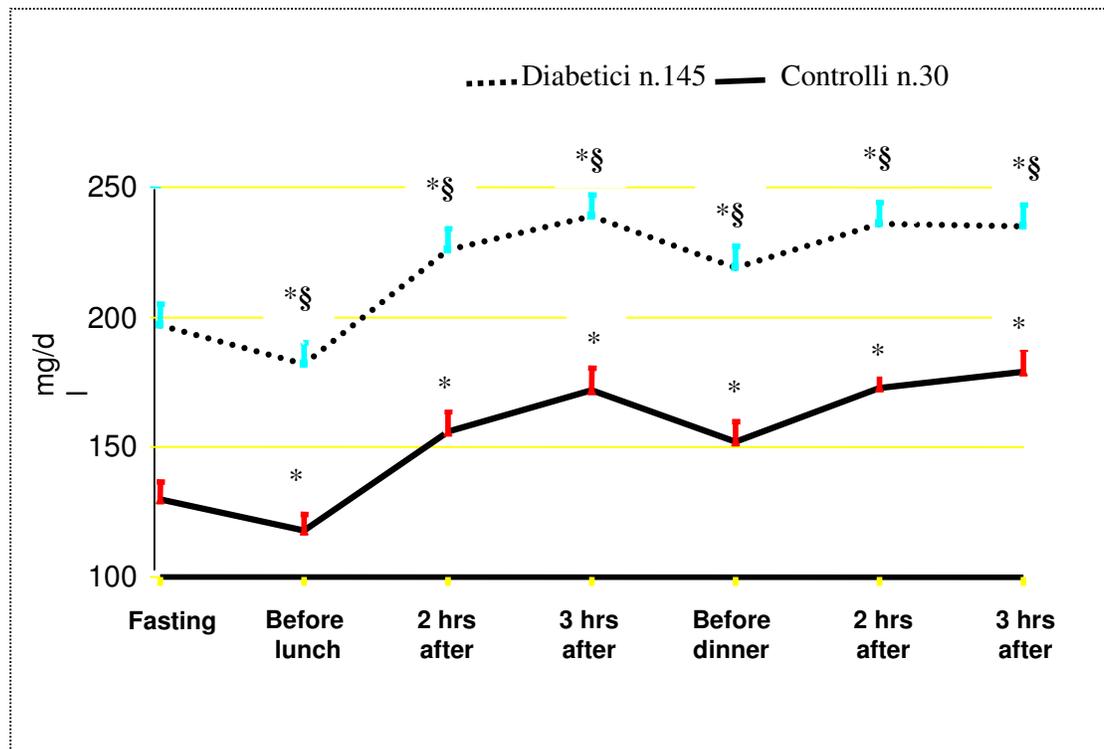


Fig. 4

Recentemente è stato dimostrato che anche i soggetti con diabete tipo 2, normotrigliceridemici a digiuno e con ottimale compenso glicemico, presentano

alterazioni delle lipoproteine in fase post-prandiale che riguardano le lipoproteine di origine sia esogena sia endogena⁶⁰. Sono numerose le evidenze a sostegno della relazione tra l'insulino-resistenza, che è un elemento fondamentale nella patogenesi del diabete tipo 2, e le alterazioni del metabolismo lipidico postprandiale.

Jeppesen e coll.⁶¹ hanno, infatti, osservato che in individui sani non diabetici la resistenza all'utilizzazione del glucosio insulino-mediata era un fattore indipendente associato con alterazioni dei lipidi nella fase postprandiale. Axelsen e coll.⁶² inoltre, hanno riportato un aumento dell'area incrementale postprandiale dei trigliceridi dopo un pasto misto standard in familiari di primo grado di pazienti diabetici tipo 2, che presentavano insulino-resistenza, ma erano normoglicemici e normotrigliceridici.

Annuzzi⁶³ ha dimostrato sperimentalmente per la prima volta il ruolo specifico dell'insulino-resistenza in pazienti diabetici tipo 2, in assenza di fattori confondenti quali l'iperglicemia e l'iperinsulinemia, che sono caratteristiche di questi pazienti. Infatti, la loro risposta lipemica a un pasto ricco in grassi durante un clamp glicemico iperinsulinemico, confrontata con quella di soggetti di controllo non diabetici, è risultata alterata per un aumento postprandiale delle lipoproteine ricche in trigliceridi di origine sia esogena che endogena.

Anche l'obesità è caratterizzata dalla presenza di insulino-resistenza, di ipertrigliceridemia e di bassi livelli di colesterolo-HDL.

Pazienti con obesità di tipo androide, con livelli di trigliceridi a digiuno nella norma e non differenti da quelli dei controlli sani, mostrano un'anomala risposta postprandiale dei lipidi plasmatici, indicata da un aumento dei trigliceridi nelle subfrazioni non chilomicronemiche, significativamente superiore rispetto ai controlli sani⁶⁴. Queste alterazioni potrebbero essere dovute, in particolare, alle modificazioni delle lipoproteine endogene conseguenti alla insulino-resistenza. In particolare, Couillard e coll.⁶⁵ hanno studiato la relazione intercorrente tra lipemia postprandiale, trigliceridemia a digiuno, e accumulo di tessuto adiposo a livello viscerale. I risultati di questo studio hanno suggerito che l'aumento della lipolisi a livello degli adipociti viscerali, dovuto allo stato di insulino-resistenza correlato all'obesità, determina un aumento dei livelli plasmatici dei trigliceridi e delle VLDL in seguito alla riesterificazione epatica degli alti livelli di acidi grassi liberi immessi nel circolo portale.

Anche se sia il diabete che l'obesità sono caratterizzate da un'anomala risposta lipidica in fase postprandiale, non è chiaro se vi sono alterazioni lipidiche specifiche per le due condizioni e se queste alterazioni siano legate a specifiche alterazioni delle attività lipolitiche a livello del tessuto adiposo.

1.4 EFFETTI DI INTERVENTI NUTRIZIONALI SULLA LIPEMIA POSTPRANDIALE E SULLE ATTIVITÀ LIPOLITICHE DEL TESSUTO ADIPOSO

È ben noto a tutti il ruolo che il tipo di alimentazione può avere nell'influenzare il rischio cardiovascolare⁶⁶⁻⁶⁸. Uno dei meccanismi principali tramite cui la dieta può influenzare tale rischio è la sua azione a livello dei lipidi plasmatici. L'influenza di diversi interventi nutrizionali sulla concentrazione plasmatica dei lipidi è stata ampiamente studiata nella fase post-assorbitiva, mentre molto meno si sa per quanto riguarda il metabolismo lipidico in fase postprandiale. Inoltre i pochi dati disponibili in letteratura riguardano per lo più effetti acuti di pasti test, non di interventi dietetici veri e propri, e molto spesso, i pochi dati esistenti, sono abbastanza controversi. Inoltre ancor meno si sa sul possibile ruolo che modifiche delle attività lipolitiche del tessuto adiposo, indotte dai diversi tipi di dieta, potrebbero avere nella modulazione della lipemia in fase postprandiale.

Studi su animali. Gli studi condotti su animali hanno dimostrato risposte trigliceridemiche postprandiali più basse in risposta a diete contenenti acidi grassi insaturi, in particolare acidi grassi PUFA n-3⁶⁹⁻⁷³. Levy ed al.⁷² hanno riscontrato più alti livelli di attività della LPL del tessuto adiposo e una migliore clearance dei chilomicroni postprandiali in animali alimentati con diete ricche in acidi grassi n-3 rispetto a diete ricche in grassi saturi (SAFA). Anche altri autori hanno mostrato una maggiore velocità di attivazione della LPL postprandiale in risposta a diete ricche in PUFA n-3 rispetto a diete ricche in SAFA^{71,73}. A tal proposito, Murphy e collaboratori hanno rilevato più basse concentrazioni di trigliceridi postprandiali ed una maggiore attività ed espressione della LPL del tessuto adiposo in animali alimentati con diete ricche in acidi grassi n-3, suggerendo che la diminuzione della concentrazione dei trigliceridi in fase postprandiale, osservata in seguito alla somministrazione della dieta ricca in n-3, sia dovuta in larga parte alla maggiore velocità di clearance dei trigliceridi plasmatici indotta da una maggiore attività della LPL⁷⁴.

Studi nell'uomo in acuto. Alcuni studi nell'uomo in acuto, effettuati con pasti test, hanno mostrato una riduzione della risposta lipidica postprandiale in seguito all'assunzione di pasti test ricchi in acidi grassi n-3 rispetto ad altri tipi di acidi grassi⁷⁵. Altri studi, che hanno confrontato gli effetti acuti di pasti ricchi in PUFA n-6 rispetto a pasti ricchi in MUFA (acido oleico, n-9) hanno mostrato o una più bassa risposta lipidica postprandiale con PUFA n-6⁷⁶ o, più spesso, un uguale risposta^{77,78}. Controversi

sono anche i risultati degli studi che hanno valutato l'effetto di pasti ricchi in MUFA, PUFA n-3 o n-6, o di acidi grassi saturi (SAFA). Infatti Thomsen e collaboratori hanno dimostrato che pasti ricchi in acidi grassi monoinsaturi (olio d'oliva) determinano una minore concentrazione di trigliceridi plasmatici postprandiali e più alti livelli di colesterolo HDL rispetto a pasti ricchi in SAFA (burro)⁷⁹. Contrariamente, Mekki et al. hanno concluso che il consumo di pasti ricchi in SAFA, ottenuti mediante aggiunta di burro, risulta in una più bassa risposta lipidica postprandiale e in un minor accumulo di trigliceridi in circolo rispetto a pasti ottenuti con aggiunta di olio di girasole, fonte di omega-6 e olio di oliva, fonte di MUFA⁸⁰.

Studi nell'uomo in cronico. Come già detto, gli studi che hanno cercato di valutare gli effetti a medio termine di diversi interventi nutrizionali sulla lipemia postprandiale sono pochi e i risultati abbastanza contraddittori. I soli più chiari riguardano il possibile effetto degli acidi grassi polinsaturi ed in particolare n-3.

Infatti, Weintraub e collaboratori hanno dimostrato una riduzione della lipemia postprandiale del 36 e del 47% rispettivamente in seguito alla somministrazione a soggetti sani di diete ricche in PUFA n-6 o n-3⁸¹. In particolare, non verificando nel loro studio nessun cambiamento nei livelli di attività della LPL plasmatica rilasciata dall'eparina, gli autori hanno concluso che l'effetto primario di diete ricche in PUFA sia una riduzione della sintesi delle lipoproteine di origine epatica. Diversamente, altri ricercatori hanno mostrato un incremento dell'attività postprandiale della LPL in seguito ad un apporto di 3-4 g al giorno di acidi grassi polinsaturi della serie n-3 che potrebbe rendere ragione del loro effetto ipotrigliceridemizzante^{82,83}. La riduzione dei trigliceridi in fase postprandiale con un supplemento di 2.7 g/giorno di acidi grassi n-3 è stata confermata anche in uno studio più a lungo termine (3 mesi) effettuato in individui sani⁸⁴.

Se l'effetto ipotrigliceridimizzante anche in fase postprandiale degli acidi grassi polinsaturi, in particolare della serie n-3, è abbastanza chiaro, gli effetti di diete ricche in acidi grassi monoinsaturi nei confronti di diete ricche in acidi grassi saturi sulla lipemia postprandiale e sui possibili meccanismi che la regolano sono ancora molto poco studiati. A tal proposito, mancano completamente studi su queste problematiche effettuati in pazienti diabetici, che, invece, potrebbero trarne maggiori benefici, considerando che le alterazioni lipidiche postprandiali sono tipiche di questa patologia^{85,59}. Un altro aspetto interessante particolarmente nei pazienti con diabete di tipo 2 è quello riguardante lo studio dell'effetto di diete ricche in MUFA rispetto a diete ricche in carboidrati (CHO) nel modulare l'entità della lipemia postprandiale. La

dislipidemia diabetica, infatti, è caratterizzata da ipertrigliceridemia e questa alterazione sembrerebbe essere esacerbata da diete ad alto contenuto in carboidrati, i quali, se assunti cronicamente in eccessiva quantità (soprattutto se si tratta di saccarosio e di fruttosio) possono indurre un'eccessiva formazione di VLDL da parte del fegato e quindi ipertrigliceridemia⁸⁶. In queste condizioni potrebbe essere aumentata anche la risposta lipemica postprandiale⁸⁷. Ma ancora una volta, i pochi dati provenienti da studi clinici controllati sono estremamente contraddittori. Infatti in due lavori che hanno valutato diete isoenergetiche a diverso contenuto in acidi grassi monoinsaturi e carboidrati non si sono avute differenze nella risposta postprandiale tra le due diete^{88,89}. Invece, in uno studio di tipo cross-over effettuato in pazienti con diabete tipo 1, la dieta ad alto contenuto in MUFA (40% di energia proveniente dai grassi, in predominanza MUFA) ha determinato una più ampia risposta lipidica postprandiale rispetto ad una dieta ricca in CHO (25% di grassi e 61% di CHO)⁹⁰. Infine Jeppesen ad al hanno mostrato che diete ad alto contenuto in carboidrati, rispetto a diete ricche in grassi, amplificano l'entità della lipemia postprandiale in individui sani⁹¹.

I possibili effetti negativi dell'alto consumo di CHO sulla trigliceridemia a digiuno e probabilmente su quella postprandiale, osservati in alcuni studi, possono essere evitati se gli alimenti ricchi in carboidrati utilizzati fossero anche ricchi in fibre e/o con basso indice glicemico, come è già stato dimostrato per quanto riguarda gli effetti sui lipidi a digiuno.

Le fibre alimentari hanno diversi effetti sull'assorbimento dei grassi e del colesterolo a livello intestinale e quindi possono influenzare il metabolismo lipidico postprandiale tramite diversi meccanismi⁹². Infatti, in modelli animali ed umani, le fibre alimentari si sono mostrate capaci di ritardare lo svuotamento gastrico, rallentare o ridurre la digestione e l'assorbimento dei grassi e del colesterolo della dieta, promuovere l'eliminazione di acidi biliari e steroli ed aumentare la produzione di acidi grassi volatili a catena corta⁹³⁻⁹⁷. Esse, quindi, sono dotate di un ben documentato effetto ipocolesterolizzante. Infatti pasti ricchi in fibra si sono mostrati capaci di abbassare il contenuto di colesterolo dei chilomicroni e delle LDL nello stato postprandiale, anche se i cambiamenti sui livelli di trigliceridi postprandiali si sono mostrati di entità minore anche se statisticamente significativi⁹⁸⁻¹⁰⁰.

Gli effetti di una dieta ricca in carboidrati, ricca in fibre e con alimenti a basso indice glicemico sul metabolismo lipidico in fase postprandiale sono a tutt'oggi completamente sconosciuti, in particolare per quanto riguarda i pazienti con diabete tipo 2.

2. SCOPI

Nonostante l'importanza della relazione tra sensibilità insulinica, attività lipolitiche del tessuto adiposo e metabolismo lipidico sia a digiuno che in fase postprandiale sia riconosciuta da molti, pochi sono gli studi che hanno cercato di valutare sperimentalmente tale relazione nell'uomo, in particolare nel contesto di situazioni caratterizzate da insulino-resistenza come l'obesità, soprattutto quella di tipo viscerale, ed il diabete. Un punto essenziale che resta da chiarire è il possibile ruolo che il diabete di per sé, indipendentemente dall'insulino-resistenza, possa avere nel determinismo delle alterazioni lipidiche postprandiali e nella modulazione delle attività lipolitiche a livello del tessuto adiposo.

Come è stato detto, molto poco si sa sulla possibile modulazione delle attività lipolitiche del tessuto adiposo e delle alterazioni lipidiche postprandiali da parte di differenti interventi dietetici, in particolare in pazienti con diabete tipo 2.

Per tanto, al fine di chiarire queste problematiche, gli scopi della linea di ricerca che ho seguito durante il corso di Dottorato sono stati:

1. Valutare gli effetti indipendenti dell'obesità e del diabete tipo 2 sulla lipemia postprandiale e sull'attività delle lipasi del tessuto adiposo.
2. Valutare l'attività e l'espressione delle lipasi del tessuto adiposo (LPL e HSL) in pazienti obesi con e senza diabete e in soggetti di controllo a digiuno in relazione ad un pasto ricco in grassi.
3. Valutare gli effetti degli acidi grassi monoinsaturi vs gli acidi grassi saturi sulla lipemia postprandiale e sulle lipasi del tessuto adiposo nel diabete di tipo 2.
4. Valutare gli effetti a medio termine di diete a diverso contenuto in carboidrati e fibre sulla lipemia postprandiale e sulle lipasi del tessuto adiposo in pazienti con diabete tipo 2.

Per raggiungere questi obiettivi, sono stati effettuati 4 studi di cui riporterò i risultati nei capitoli seguenti e che sono stati oggetto di pubblicazioni (riportate in Appendice). Poiché le principali metodologie utilizzate, studio delle lipasi del tessuto adiposo e della lipemia postprandiale, sono comuni ai 4 studi, esse vengono riportate una sola volta, prima della descrizione degli studi stessi.

3. METODOLOGIE UTILIZZATE

3.1 MISURAZIONE DELLA LPL E DELLA HSL

Considerando il ruolo fondamentale della LPL e della HSL sia in condizioni fisiologiche che patologiche, è importante avere a disposizione dei metodi per la loro valutazione. A tal proposito, è necessario tener presente che i metodi fino ad ora validati sono piuttosto complessi e, pertanto, non possono essere proposti per la comune routine clinica. Di seguito cercherò di illustrare brevemente i metodi a nostra disposizione e i campioni biologici su cui è utile effettuare le valutazioni.

Innanzitutto, c'è da dire che è possibile misurare sia la massa che l'attività della LPL e della HSL. La misurazione della massa di questi due enzimi ha il grosso svantaggio di non fornire indicazioni circa la loro attività, che è l'informazione che più interessa dal punto di vista fisiopatologico. Per il dosaggio della massa della LPL e dell' HSL si usano metodi immunologici, i quali, utilizzando l'enzima purificato e anticorpi monoclonali, sfruttano la reazione antigene-anticorpo. I metodi immunologici includono soprattutto i metodi radioimmunoenzimatici (EIA oppure ELISA)¹⁰¹ e quelli immunofluorescenti (DELFA)¹⁰².

L'attività della LPL può essere misurata in diversi campioni biologici (plasma, tessuto adiposo e tessuto muscolare). Una delle fonti più utilizzate, per la sua minore invasività è senz'altro il plasma post-eparinico¹⁰³. La somministrazione endovenosa di eparina promuove il rapido rilascio della LPL in circolo, dopo averla liberata dall'eparan-solfato dei proteoglicani adesi alla superficie endoteliale¹⁰⁴.

L'attività della LPL può essere misurata anche nel plasma senza stimolo di eparina (plasma pre-eparinico), ma la scarsa sensibilità del metodo, in relazione alla bassa attività in assenza dello stimolo, fa sì che i dati ottenuti non siano molto attendibili. Inoltre non è ancora ben chiaro il significato funzionale della LPL presente in circolo in condizioni basali.

Poiché le attività della LPL e della HSL dei diversi organi e tessuti sono regolate in maniera diversa, gli studi di risposta enzimatica richiedono a volte misurazioni dirette dell'attività dei due enzimi in campioni di tessuto prelevati con agobiopsia. Si distingue un'attività totale della LPL, che rappresenta l'attività dell'effettivo pool intra- ed extra-cellulare della LPL, compresa la frazione dell'enzima fisiologicamente attiva presente sulla superficie endoteliale, ed un'attività della LPL rilasciata in vitro dall'eparina, che è una stima della capacità del tessuto di rilasciare l'enzima sotto stimolo di eparina.

La misurazione dell'attività dei due enzimi tiene conto del fatto che la LPL agisce sulla componente trigliceridica delle lipoproteine plasmatiche (VLDL e chilomicroni) e che la HSL agisce sui trigliceridi intracellulari degli adipociti generando di- e monogliceridi e acidi grassi liberi. Attualmente, la determinazione dell'attività catalitica della LPL e della HSL viene in genere effettuata valutando il rilascio dei prodotti della reazione di idrolisi e, in particolare, degli acidi grassi che si liberano dai trigliceridi per azione dei due enzimi.

I metodi più in uso per la misurazione dell'attività della LPL e dell'HSL, che offrono una maggiore sensibilità, prevedono l'uso di un substrato radioattivo, in genere di una miscela emulsionata di trioleina marcata con trizio e trioleina non marcata, dal quale è possibile isolare e quantizzare gli acidi grassi liberati per azione idrolitica dell'enzima¹⁰⁵.

Utilizzando un substrato non radioattivo, formato da un'emulsione di trioleina, gli acidi grassi liberati dall'attività idrolitica della LPL possono essere determinati anche mediante metodo enzimatico¹⁰⁶. Un'altra possibile alternativa ai metodi radioisotopici è rappresentata dalle tecniche fluorimetriche per il dosaggio dell'attività catalitica della LPL¹⁰⁷. Il substrato su cui la lipasi lipoproteica va ad agire è di solito un alchildiacylglicerolo fluorogenico, contenente un pirene, la cui fluorescenza è intramolecolarmente bloccata da un gruppo trinitrofenilico^{107,108}. In presenza della LPL attiva, il trinitrofenile è idrolizzato e la fluorescenza del pirene può essere rilevata. La cinetica con cui aumenta l'intensità della fluorescenza a 37°C è proporzionale all'attività della LPL.

Recentemente, è stato proposto un nuovo metodo di analisi dell'attività della LPL, che prevede l'uso di un sistema HPLC con rivelatore fluorescente¹⁰⁹. In questo modo è stato possibile rivelare l'acido oleico, generato dalla trioleina per azione della LPL, in seguito alla sua derivatizzazione con 9-antildiazometano (ADAM), un derivatizzatore fluorescente. Questa tecnica offre due importanti vantaggi: la utilizzazione di un substrato non radioattivo e la velocità e semplicità, con le quali può essere misurata l'attività della LPL. C'è da dire che, sia per quanto concerne i metodi fluorometrici, sia per la più recente metodologia che si avvale dell'uso di un sistema HPLC, sono necessari ulteriori approfondimenti, al fine di validare queste due procedure e correlarle con i metodi radio isotopici.

Di seguito illustriamo i metodi da noi utilizzati per la misurazione dell'attività della LPL e dell'HSL.

3.1.a Misurazione dell'attività della LPL nel tessuto adiposo

Il tessuto adiposo è stato prelevato, sotto anestesia locale con lidocaina, dal sottocute dell'addome mediante aspirazione con ago ipodermico d'acciaio sterile (d.i. 2x80 mm). E' stato privato dei coaguli, lavato con soluzione fisiologica e frazionato in aliquote di circa 30 mg che sono state raccolte in criotubi da 2 ml e poste immediatamente in azoto liquido, per poi essere trasferite a -80°C fino al momento dell'analisi.

L'attività della LPL rilasciata *in vitro* dall'eparina è stata determinata secondo la procedura di Taskinen et al¹¹⁰, da noi modificata. Campioni di tessuto adiposo (5-10 mg), ancora congelati e tagliati su ghiaccio secco, sono stati incubati, in duplicato, a 37°C, con agitazione di 70 cicli/min., in 450µl di Krebs-Ringer Buffer 0.1mol/l, pH 8.4 (contenente 1g/100 ml di albumina bovina e 45µl di siero umano normale) e 50µl di eparina bovina (3,5mg/ml di soluzione fisiologica). Dopo 45 min. esatti, i frammenti di tessuto adiposo sono stati allontanati e 100µl, in triplicato, del mezzo di incubazione, sono fatti reagire con 100µl di substrato per 110 min a 37°C. Il substrato è composto da una miscela di trioleina e trioleina marcata con trizio, precedentemente purificata mediante cromatografia su acido silicico¹¹¹. 7 mg di trioleina sono stati sonicati in presenza di 0.4 mg di L-α fosfatidilcolina dioleoil, e 2.5 ml di Tris-HCl buffer (Tris-HCl 0.2M, pH 8.0) per 3 min. in ghiaccio, ad una forza di 1.4 g in acqua (Sonicatore Branson 250). All' emulsione sono stati aggiunti 300 µl di albumina di siero bovino al 4% in NaCl 0.15M (p/v) e 200 µl di apo C-II di siero normale. La reazione è stata bloccata con l'aggiunta di 3.25 ml di miscela di estrazione (cloroformio/metanolo/eptano 9:10:7 v/v/v) e 1.05 ml di buffer pH 10.5 (0.1 M carbonato di potassio/ 0.1 M acido borico)¹¹². Dopo agitazione per 2 min, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm per 20 min a 20°C, e 1.6 ml di surnatante, contenenti gli acidi grassi liberi, sono stati letti in 10 ml di Instagel-Plus in uno Scintillatore Liquido Wallac 1410 per 3600 secondi. L'attività enzimatica è stata espressa come nmoli di acidi grassi rilasciati per grammo di tessuto adiposo per ora a 37°C.

Attività totale della LPL. La procedura è stata descritta da Panarotto et al.¹¹³ ma da noi modificata. Frammenti di 10 mg circa di tessuto adiposo, in duplicato, sono stati omogenati, con un omogenizzatore Heidolph DiAx-900 (26000 rpm), in 80 µl di buffer/mg di tessuto adiposo (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.5 a 25°C, sucrosio 0.02 M, albumina bovina 1%, eparina bovina 1U/300 µl buffer, e come detergenti sodio-deossicolato 0.3% + IGEPAL CA-630 0.012%) e centrifugati per 15 min., 12000 rpm, 4°C. Dell'infranatante, diluito 12 volte con Buffer (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.5 a 25°C, sucrosio 0.02 M, albumina bovina 1%), 100 µl sono stati fatti reagire con 100 µl dello

stesso substrato sopra riportato per 110 min. a 37°C. Gli acidi grassi sono stati estratti e misurati come descritto per l'attività della LPL rilasciata in vitro dall'eparina.

3.1.b Attività della LPL nel plasma dopo stimolo con eparina.

Al soggetto a digiuno da 12/14 ore e a riposo da almeno 10 minuti è stata somministrata, mediante endovena, una quantità di eparina pari a 100 U.I./Kg peso corporeo. Dopo 15 minuti è stato eseguito il prelievo di sangue venoso dal braccio controlaterale all'infusione di eparina, in vacutainers contenenti EDTA. Questi sono stati agitati e immersi immediatamente in ghiaccio e centrifugati subito a +4°C, per 10 minuti a 3000 rpm. Il plasma è stato frazionato in aliquote di 0.3 ml, poi conservate a -20°C. Al momento delle analisi, 100 µl del plasma post-eparinico, già diluito 1:11 con NaCl 0.15 M, sono stati incubati con 100 µl di substrato come sopra descritto, a 37°C per 30 minuti. Gli acidi grassi liberi prodotti dalla LPL sono stati estratti secondo il metodo di Belfrage¹¹² e la radioattività di 1 ml del volume della fase di estrazione sciolto in 10 ml di Instagel-Plus è stata contata per 15 minuti in uno Scintillatore Liquido Wallac 1410. L'attività enzimatica è stata espressa come nmoli di acidi grassi rilasciati per ml di plasma al minuto a 37°C.

3.1.c Misurazione dell'attività della lipasi ormono-sensibile (HSL) nel tessuto adiposo.

Questa procedura è stata descritta da Watt¹¹⁴ e da noi modificata. Aliquote di tessuto adiposo (15-20 mg), in duplicato, sono state omogenate per 15 sec. in ghiaccio, in 450 µl di Buffer di omogeneizzazione (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA-Na₂, 0.25M sucrosio, 1 mM dithioerytritol, 20 µg/ml di leupeptina e 20 µg/ml di antipaina, come inibitori di proteasi) usando un omogenizzatore Heidolph-Diax 900, alla velocità di 26000 rpm. Dopo centrifugazione (14500 rpm, 45 min, 4°C), 30 µl di infranatante sono stati incubati a 37°C, 50 cicli/min, con 70 µl di Buffer di diluizione (20mM Tris-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA-Na₂, 1 mM dithioerytritol e albumina di siero bovino, 0.02% p/v) e 100 µl di substrato. Il substrato è composto da una miscela di trioleina e trioleina marcata con trizio, precedentemente purificata mediante cromatografia su acido silicico¹¹¹. 7 mg di trioleina sono stati sonicati in presenza di 0.6 mg di fosfolipide (fosfatidilcolina/fosfatidilinositolo 3:1 v/v), 2.7 ml Tris-HCl buffer (Tris-HCl 20mM, pH 7.4, NaCl 0.15 M) e 300 µl di albumina di siero bovino al 20% per 3 min. in ghiaccio, ad una forza di 1,4 g in acqua (Sonicatore Branson 250). La reazione è stata bloccata dopo 45 min di incubazione con l'aggiunta di 3.25 ml di miscela di estrazione

(cloroformio/metanolo/eptano: 9:10:7 v/v/v) e 1.05 ml di buffer pH 10.5 (0.1 M carbonato di potassio/ 0.1 M acido borico). I tubi sono stati agitati vigorosamente su Vortex per 13 sec., e le due fasi sono state separate mediante centrifugazione (3000rpm, 20°C, 20 min). Su 1 ml della fase superiore, contenente gli acidi grassi rilasciati, diluito in 10 ml di Instagel Plus, è stata misurata la radioattività per 3600 sec. in uno Scintillatore Liquido Wallac 1410. L'attività enzimatica è stata espressa come nmoli di acidi grassi rilasciati per grammo di tessuto adiposo per ora a 37°C.

3.1.d Espressione genica della LPL e della HSL del tessuto adiposo.

L'espressione dell'mRNA della LPL e dell'HSL è stata valutata mediante RT-PCR. L'estrazione di RNA, la sintesi di cDNA e le condizioni di esecuzione della PCR sono state effettuate secondo quanto descritto in passato^{115,116}. I primers usati per la LPL (Acc. M15856) erano: senso 5'-CCT GGA GAT GTG GAC CAG C-3', e antisenso 5'-GTG CCA TAC AGA GAA ATC TC-3'. Il gene umano dell'HSL consisteva di almeno 10 esoni codificanti (Acc.NM_005357). Una forma alternativa, definita hHSL-S, è stata identificata negli adipociti umani; l'mRNA dell'h-HSL-S risultava dalla combinazione di 6 esoni ed era cataliticamente inattiva¹¹⁷. La PCR è stata eseguita con primers derivanti da sequenze localizzate negli esoni 5 e 8: senso 5'-TGG AGG AGT GCT TCT TCG CCT AC- 3'; antisenso 5'-GTC TCA GCT GAC AGC GAC ATC T -3" che generavano prodotti di 616 e 388 coppie di basi, corrispondenti alle hHSL-L e hHSL-S rispettivamente. La differenza di misura era approssimativamente di 230 coppie di basi. Tutti i prodotti della PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1.2% e le bande sono state visualizzate mediante colorazione con bromuro di etidio. L'analisi semiquantitativa è stata eseguita mediante un sistema video immagine di scansione densitometrica su gel 'Gel Doc 2000' (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA).

I risultati sono stati espressi come rapporto tra il gene di interesse e il GAPDH in ciascun campione analizzato.

3.2 VALUTAZIONE DELLA LIPEMIA POSTPRANDIALE

Come illustrato nella tabella 2 esistono diversi metodi per lo studio della lipemia postprandiale¹¹⁸. L'obiettivo metodologico è la precisa caratterizzazione e quantificazione delle lipoproteine ricche in trigliceridi che si formano nel periodo postprandiale. L'esatta differenziazione delle particelle per quanto riguarda la loro composizione lipidica e la loro origine epatica o intestinale, è di difficile esecuzione in quanto le metodiche attualmente disponibili sono complesse e costose. D'altra parte, la semplice determinazione della trigliceridemia postprandiale, possibile mediante l'uso, anche domiciliare, di riflettometri portatili, può fornire indicazioni utili per l'individuazione e la correzione della condizione di iperlipidemia postprandiale¹¹⁹⁻¹²¹.

L'ultracentrifugazione è una metodologia molto complessa che permette di separare le lipoproteine in base alla loro densità e quindi in base al loro coefficiente di flottazione Sf¹²². Esistono varie tecniche di ultracentrifugazione (analitica, preparativa in densità di solvente e in gradiente di densità, zonale ecc.) che consentono non solo di separare le principali classi di lipoproteine, ma anche le loro subfrazioni. L'isolamento, tra le varie classi di lipoproteine, di subfrazioni diverse per origine, caratteristiche chimico-fisiche e destino metabolico, è fondamentale per ottenere informazioni dettagliate sul metabolismo lipoproteico in fase postprandiale.

Il dosaggio quantitativo dell'apoB 48 e apoB 100, l'una di origine intestinale, l'altra di origine epatica, ossia delle specifiche proteine strutturali rispettivamente di chilomicroni e delle VLDL, è l'unico metodo che consente di differenziare le particelle postprandiali esogene di origine intestinale, da quelle endogene di origine epatica. Infatti, contrariamente alle altre apolipoproteine, l'apoB 48 come l'apoB 100, non viene scambiata con nessun'altra lipoproteina durante i processi di catabolismo e, quindi, essa potrebbe essere un ottimo marker delle lipoproteine postprandiali di origine intestinale.

Le tecniche utilizzate per questo metodo sono, essenzialmente, di due tipi: immunologiche ed elettroforetiche. Le tecniche immunologiche, sebbene molto sensibili e specifiche, non sono tuttavia, facilmente applicabili perché mancano, al momento, anticorpi altamente specifici per l'apoB 48 e l'elevata specificità dell'anticorpo è un requisito indispensabile per l'eterogeneità della particelle ricche in trigliceridi¹²³.

Metodi per la valutazione della lipemia postprandiale

<i>METODO</i>	<i>VANTAGGI</i>	<i>SVANTAGGI</i>
Dosaggi dei trigliceridi plasmatici	Molto semplice	Non distingue lipoproteine esogene ed endogene
Separazione di frazioni e sub frazioni di lipoproteine ricche in trigliceridi mediante ultracentrifugazione e dosaggio di apo B-48 ed apo B-100 con metodi elettroforetici (SDS-PAGE)	Separa lipoproteine esogene ed endogene. Stima il numero di particelle	Costoso, dispendioso in termini di tempo e risorse umane
Marcatura delle lipoproteine esogene con retinil palmitato (HPLC)	Distingue chiaramente le lipoproteine esogene, almeno nella fase postprandiale precoce. Abbastanza semplice	Non distingue i chilomicroni dei remnant. Mancanza di informazioni sulle lipoproteine endogene. Possibile scambio del tracciante con le lipoproteine endogene nella fase postprandiale tardiva Nessuna informazione sul numero delle particelle
Isolamento di “remnants like particles” con metodi immunologici	Distingue particelle esogene ed endogene	Complesso (doppio anticorpo di elevata specificità) Stima il numero delle particelle
Isotopi stabili (D_3 -e ^{13}C leucina)	Permette la marcatura sia dei lipidi che delle proteine	Complessità di modelli multi compartimentali Potenzialmente utile ma al momento non esplorata nella fase postprandiale
Risonanza magnetica nucleare con spettrometria di massa	Relativamente semplice Distingue un ampio spettro di particelle lipoproteiche	Potenzialmente utile ma al momento non esplorata nella fase postprandiale. Apparecchiatura costosa.

Tab.2

Le tecniche elettroforetiche permettono, invece, di dosare quantitativamente le due isoforme dell'apo B, separandole in base al loro peso molecolare, ossia in base alla loro dimensione (apoB 48: PM 237 kDalton, apoB 100: PM 500 kDalton). La tecnica elettroforetica attualmente più utilizzata è l'elettroforesi verticale in sodiododecilsolfato su gel con gradiente lineare di poliacrilammide 3-20% (SDS-PAGE)¹²⁴. La metodologia è piuttosto indaginosa perché, in realtà, essa è costituita dall'insieme di più tecniche analitiche, le quali si sviluppano nelle diverse fasi della metodologia di cui l'SDS-PAGE rappresenta la fase finale. Le fasi principali del metodo prevedono, dopo

somministrazione di un pasto test e di prelievi di sangue eseguiti a tempi determinati, la separazione, dal plasma isolato da tali prelievi, di frazioni e subfrazioni delle lipoproteine ricche in trigliceridi mediante la tecnica dell'ultracentrifugazione preparativa in gradiente di densità discontinuo^{125,126}. Su tali particelle si effettua:

- dosaggio del colesterolo e dei trigliceridi
- delipidizzazione e denaturazione per l'estrazione dei costituenti proteici che caratterizzano le lipoproteine di origine intestinale e quelle di origine epatica
- SDS-PAGE per il dosaggio quantitativo di apoB 48 e di apoB 100.

Attualmente per lo studio della lipemia alimentare sono utilizzati pasti molto diversi tra di loro e ciò naturalmente rende difficile il confronto tra i risultati di studi diversi e rende impossibile stabilire dei criteri di normalità della risposta lipemica^{127,128}. Per una auspicabile standardizzazione del pasto bisogna considerare diverse variabili fra cui principalmente il tipo di nutrienti da includere nel pasto (grassi/carboidrati), la composizione chimica dei grassi (saturi, monoinsaturi, polinsaturi), il contenuto calorico del pasto e il momento della sua assunzione, oltre alle variabili ambientali che sono in grado di influenzare la lipemia postprandiale, quali il fumo, l'esercizio fisico e l'assunzione di alcool^{129,128}.

Un elemento chiave è l'inclusione o meno di nutrienti diversi dai lipidi. Sono stati utilizzati, infatti, pasti composti solamente da grassi o contenenti una proporzione variabile di carboidrati, spaziando da un carico di panna a un pasto misto liquido o, più aderente alla vita reale, solido. Naturalmente un pasto costituito per il 100% da grassi, utilizzando per esempio la panna come unico componente, ha il vantaggio di essere di semplice realizzazione e più riproducibile e confrontabile in situazioni e aree geografiche diverse rispetto a un pasto misto. D'altro canto esso è troppo lontano dall'alimentazione abituale in quanto un pasto "normale" completamente privo di carboidrati è di difficile realizzazione.

Riguardo all'entità del pasto bisogna tenere conto che questa dovrebbe essere tale da stimolare il metabolismo senza compromettere l'assorbimento e i tempi di svuotamento gastrico e, in ogni caso, la palatabilità. Il quantitativo ottimale di grassi in un pasto dovrebbe essere compreso tra i 50 e gli 80 g^{130,131}. Condizione necessaria all'esecuzione del pasto è che questo avvenga a digiuno in quanto i livelli plasmatici di trigliceridi prima di un carico di grassi sono un elemento predittivo della risposta lipemica postprandiale¹³². Sarebbe inoltre opportuno vietare l'assunzione di alcol il giorno prima del test così come l'esecuzione di attività fisica strenua in quanto essa è in grado di modificare la capacità di rimozione dei trigliceridi circolanti¹³³. Nelle donne, poi,

bisogna considerare l'eventuale assunzione di contraccettivi a base di estrogeni in quanto questi ultimi sembrano influenzare il metabolismo dei remnant dei chilomicroni¹³⁴.

Di seguito illustriamo i metodi da noi utilizzati per la caratterizzazione e quantificazione delle lipoproteine plasmatiche e delle loro sub frazioni.

3.2.a Separazione delle lipoproteine

I campioni sono stati posti a 4°C prima, durante e dopo la centrifugazione. Per minimizzare la degradazione proteolitica dell' apo B, per ogni ml di plasma sono stati aggiunti fenilmetilsulfonilfluoruro 10 mM (1µl/ ml) e aprotinina alla concentrazione di 1400 µg/L (2µl/ml).

Le varie frazioni lipoproteiche sono state separate mediante la tecnica di ultracentrifugazione preparativa in gradiente di densità discontinuo secondo Redgrave e Carlson¹³⁵, Karpe e Hamsten¹³⁶. Il metodo si basa su di un gradiente di densità a quattro livelli, costituito da plasma portato a densità di 1.10 g/ml per l'aggiunta di NaBr solido (0.1268 g/ml) e da tre differenti soluzioni di NaBr di densità decrescente (1.065, 1.020, 1.006 g/ml rispettivamente). La centrifugazione è stata effettuata in un rotore SW 40 Ti, utilizzando una ultracentrifuga Beckman Optima L-90K. In breve, con 3 corse consecutive a 15°C ed a 40000 rpm sono stati separati i chilomicroni (unità di flottazione Svedberg (Sf) > 400), le VLDL larghe (Sf 60 – 400) e le VLDL piccole (Sf 20 – 60) e ciascuna frazione recuperata dal gradiente. Da tutto ciò che rimaneva sono state isolate le HDL mediante il metodo di precipitazione¹³⁷. In tutte le subfrazioni lipoproteiche sono state determinate le concentrazioni di colesterolo e di trigliceridi.

3.2.b Apo B-48 e Apo B-100.

Le concentrazioni di Apo B-48 e Apo B-100 sono state quantizzate nei chilomicroni, nelle VLDL più grandi e nelle VLDL più piccole tramite elettroforesi su gradiente di gel di SDS-poliacrilamide 3-20%^{138,139}. In breve: le aliquote delipidizzate dei campioni sono state disciolte in un buffer e fatte correre su di un gel con gradiente 3 a 20%. Come calibratore è stato utilizzata Apo B-100 altamente concentrata derivata da LDL a digiuno. I controlli per Apo B-48 e Apo B-100 sono stati preparati a partire da frazioni concentrate di lipoproteine ad alto contenuto in trigliceridi non a digiuno. 6 campioni standard di quantità compresa tra i 0.125 ed 0.725 µg/ml di Apo B-100 e 4 campioni di controllo sono stati inclusi in ogni corsa. I gels sono stati colorati con blue Coomassie G-250 e decolorati in una soluzione acquosa di acido acetico al 7% e metanolo al 12%

overnight. La lettura densitometrica è stata effettuata con un densitometro laser a 595 nm, connesso con un personal computer provvisto di un software in grado di provvedere automaticamente all'integrazione dei picchi di Apo B-48 e Apo B-100; la misurazione è stata espressa come aree sotto la curva; le concentrazioni di Apo B-48 e Apo B-100 sono state calcolate mediante le aree sotto la curva riferite alla curva standard. I limiti inferiori di rilevazione per Apo B-48 e Apo B-100 sono compresi tra 0.01 e 0.02 µg/ml.

3.2.c Altre determinazioni.

Le concentrazioni di colesterolo e trigliceridi sono state misurate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) su un autoanalizzatore Cobas Mira (ABX Diagnostics, Montpellier, France). Le concentrazioni di acidi grassi liberi plasmatici sono state determinate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). I livelli di insulina plasmatici sono stati misurati tramite ELISA (Technogenetics, Milan, Italy).

Antropometria e composizione corporea. Il peso corporeo, l'altezza e la circonferenza vita sono state misurate in accordo a procedure standardizzate. La massa magra (FFM, fat-free body mass) è stata determinata tramite bioimpedenziometria. La massa grassa è stata calcolata sottraendo la massa magra al peso corporeo.

Clamp euglicemico iperinsulinemico. L'insulina umana è stata somministrata endovena ad una velocità costante di 1.5 mU/ kg di peso corporeo/min per 2 ore. Le concentrazioni di glucosio plasmatiche sono state mantenute costanti ad una concentrazione di 90mg/dl modificando la velocità di infusione glucidica, in accordo alle misurazioni della concentrazione di glucosio plasmatiche su un analizzatore Acccheck (Roche, Svizzera). Come misura della sensibilità insulinica sono stati calcolati la velocità di infusione di glucosio durante gli ultimi 30 minuti del clamp (valore M) e il rapporto M/I (Il valore di M è stato diviso per la concentrazione plasmatica di insulina corrispondente).

4. STUDI

4.1 I chilomocroni postprandiali e l'attività della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo sono alterati nel diabete di tipo 2 indipendentemente dall'obesità e dalla condizione di insulino-resistenza. STUDIO n.1 (Pubblicazione in estenso n.2 accettata su Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease).

Introduzione

Le anomalie del metabolismo lipidico postprandiale sono molto frequenti nel diabete tipo 2 e in altre condizioni caratterizzate da insulino-resistenza, come ad esempio nell'obesità¹³⁹⁻¹⁴³. Tuttavia non è chiaro se nei pazienti diabetici siano presenti delle specifiche alterazioni della risposta lipidica postprandiale rispetto agli individui obesi o non diabetici ma insulino-resistenti. Inoltre ancora controverso è il ruolo della lipasi lipoproteica nel modulare la risposta lipidica postprandiale in diverse condizioni caratterizzate da insulino resistenza.

Per tanto, lo scopo di questo studio è stato quello di caratterizzare la dislipidemia postprandiale del diabete tipo 2 valutando: a) il ruolo dell'insulino-resistenza, confrontando soggetti obesi con e senza diabete di tipo 2 vs. soggetti di controllo, normopeso, non diabetici; b) qualsiasi effetto aggiuntivo del diabete di per se, paragonando i soggetti obesi diabetici verso i soggetti solamente obesi; c) il ruolo della LPL del tessuto adiposo nell'eziologia di queste anomalie.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 10 pazienti con diabete tipo 2 ed obesità, 11 pazienti solo con obesità e 11 soggetti sani normopeso. Le caratteristiche generali dei soggetti, tutti maschi, sono riassunte nella tabella 4.1.a.

Tutti i soggetti presentavano normali livelli plasmatici a digiuno di trigliceridi (< 150 mg/dl) e di colesterolo (< 210 mg/dl). Nessuno aveva storia o sintomi di alcuna malattia, a parte il diabete, né era vegetariano o impegnato in attività fisica intensa. Nessuno assumeva farmaci ipolipidizzanti ed i diabetici erano in compenso glicemico stabile con la sola dieta (HbA1c = 6.5 ± 1.5%).

Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Università Federico II e tutti i partecipanti hanno dato il loro consenso informato.

Caratteristiche generali, valori metabolici a digiuno, insulino-sensibilità e attività della LPL rilasciata dall'eparina del tessuto adiposo dei soggetti partecipanti allo studio.			
Media ± [DS]; ^ap<0.05 ANOVA; ^bp<0.05 vs. controlli e ^cp<0.05 vs. obesi			
	Obesi diabetici	Obesi	Controlli
Maschi (n)	10	11	11
Età (anni)	45.6 [6.4]	45.8 [8.7]	39.1 [8.3]
<i>Misure antropometriche</i>			
BMI (kg/m ²) ^a	32.8 [2.0] ^b	34.5 [2.7] ^b	24.0 [1.3]
Circonferenza vita (cm) ^a	112 [8] ^b	113 [7] ^b	85 [4]
Massa grassa (kg) ^a	31.7 [4.4] ^b	32.9 [4.9] ^b	13.1 [1.4]
<i>Valori plasmatici a digiuno</i>			
Colesterolo (mg/dl)	175 [24]	187 [35]	160 [24]
Trigliceridi (mg/dl)	103 [24]	99 [34]	78 [27]
Colesterolo-HDL (mg/dl) ^a	35 [4] ^b	43 [11]	47 [10]
Glicemia (mg/dl) ^a	131 [36] ^{bc}	90 [9]	86 [9]
<i>Clamp euglicemico iperinsulinemico</i>			
M value (velocità di infusione del glucosio = mg/kg/min) ^a	4.1 [0.9] ^b	4.5 [1.5] ^b	8.2 [2.2]
M/I ^a	2.1 [1.1] ^b	1.7 [0.8] ^b	7.5 [3.2]
<i>Attività della LPL del tessuto adiposo (nmol FA/g/ora)^a</i>			
digiuno	99 [34] ^{bc}	217 [92]	252 [155]
6 ore dopo il pasto	89 [51] ^{bc}	231 [99]	278 [130]

Tab. 4.1.a

Disegno sperimentale

A digiuno, al mattino, i soggetti hanno consumato un pasto test ricco in grassi, costituito da un gateau di patate, del contenuto calorico di 944 kcal, rappresentate per il 57 % da grassi (il 34% acidi grassi saturi), il 31% da carboidrati e il 12% da proteine. Prima del pasto e nelle sei ore successive sono stati effettuati prelievi ematici seriali per la determinazione nel plasma dei livelli di glucosio, insulina, C-peptide, acidi grassi liberi, lipidi e lipoproteine, apoB-48 ed apo B-100. Sei ore dopo il pasto è stata effettuata un'agobiopsia del tessuto adiposo sottocutaneo nei quadranti inferiori addominali per la

determinazione dell'attività della LPL. In un altro giorno, con le stesse modalità è stata effettuata un'altra agobiopsia del tessuto adiposo a digiuno e, successivamente, un clamp euglicemico iperinsulinemico per la valutazione della sensibilità insulinica. In tutti i partecipanti sono state determinate la composizione corporea (impedenziometria) e la distribuzione del grasso corporeo (misurazione circonferenze).

Analisi statistica.

I dati sono espressi come Media \pm DS. La risposta postprandiale è stata valutata come area incrementale sotto la curva (*Incremental Area Under Curve*, IAUC) calcolata con il metodo trapezoidale. Le differenze tra i gruppi sono state valutate mediante test ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) e test post hoc tra i gruppi (LSD). Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o tramite test non parametrici. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo a metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

Risultati.

La sensibilità insulinica valutata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico si è mostrata similmente ridotta negli obesi con diabete e senza diabete, rispetto ai controlli ($p < 0.01$) (Tab. 4.1.a). I diabetici presentavano valori più alti di glucosio sia a digiuno che dopo il pasto ($p < 0.01$ per tutti i punti della curva postprandiale, Fig.4.1.a). I livelli di insulina a digiuno e postprandiali sono risultati significativamente più alti nei soggetti obesi con e senza diabete rispetto ai controlli ($p < 0.01$ per tutti i punti della curva postprandiale, Fig.4.1.a). Rispetto ai soggetti obesi, i soggetti diabetici hanno mostrato una tendenza ad una risposta insulinica precoce più bassa (2 ore dopo il pasto). Le concentrazioni plasmatiche di C-peptide hanno esibito un profilo simile a quello dell'insulina (Fig.4.1.a). Gli acidi grassi liberi del plasma non sono stati significativamente differenti tra i tre gruppi (Fig.4.1.a).

Le concentrazioni a digiuno di trigliceridi e colesterolo del plasma non si sono mostrate significativamente differenti tra i tre gruppi (Tab. 4.1.a). L'area incrementale sotto la curva postprandiale per i trigliceridi è risultata più alta nei soggetti diabetici rispetto agli obesi e ai controlli ($p < 0.02$) (Tab. 4.1.b). I livelli di colesterolo sono diminuiti in fase postprandiale, senza nessuna differenza tra i gruppi (Tab. 4.1.b).

**Concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina, C peptide, e FFA
prima e dopo pasto standard in soggetti obesi, obesi diabetici e controlli
normopeso. $M \pm SEM$; * $p < 0.05$ vs. controlli, § $p < 0.05$ vs. obesi.**

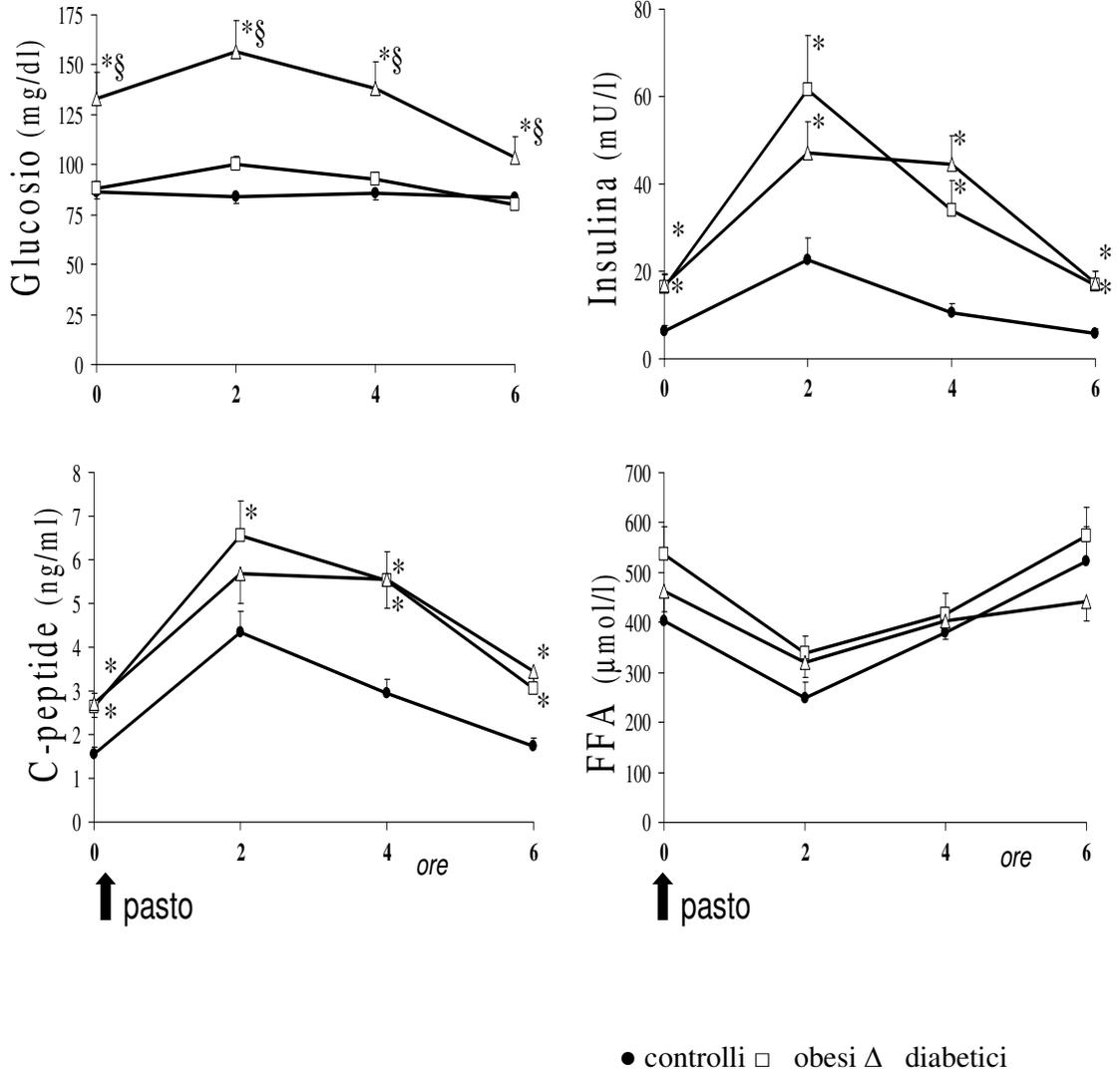


Fig. 4.1.a

Aree incrementali di trigliceridi (TG) (mg/dl-6ore), colesterolo (Chol) (mg/dl-6ore), apo B-48 (mg/l-6ore), and apo B-100 (mg/l-6ore) nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche dopo un pasto standard in soggetti obesi diabetici, obesi, e controlli normopeso. Media ± [DS]; ^a p<0.05 ANOVA; ^b p<0.05 vs. controlli e ^c p<0.05 vs. obesi				
		Obesi Diabetici	Obesi	Controlli
Plasma	TG	343 [52] ^{bc}	222 [37]	208 [34]
	Chol	-8.7 [9.9]	-16.6 [9.7]	-14.3 [7.3]
Chilomicroni	TG	132 [23] ^c	75 [14]	107 [20]
	Chol	5.1 [0.9] ^{bc}	3.1 [0.6]	3.1 [0.5]
	B-48	0.48 [0.22]	0.13 [0.04]	0.27 [0.12]
	B-100	1.5 [0.7]	0.78 [0.35]	0.42 [0.22]
VLDL grandi	TG ^a	188 [28] ^b	135 [22] ^b	87 [13]
	Chol ^a	25.6 [3.9] ^b	19.2 [3.3] ^b	10.0 [2.0]
	B-48	5.0 [1.4]	3.3 [0.7]	3.0 [1.1]
	B-100	61 [23]	80 [18]	51 [12]
VLDL piccole	TG ^a	-11.9 [5.3] ^b	-2.9 [4.0]	3.5 [3.3]
	Chol	-5.2 [2.8] ^b	-0.3 [1.3]	0.01 [1.6]
	B-48	0.9 [0.5]	2.2 [1.1]	1.0 [0.5]
	B-100	-10.8 [13.7]	33.6 [23.9]	15.6 [9.1]
IDL	TG	-3.0 [1.2]	-3.3 [1.3]	-0.9 [1.1]
	Chol	-1.8 [1.5]	-6.7 [2.3]	-1.8 [1.7]
LDL	TG	-5.7 [2.2]	-6.2 [2.3]	-2.1 [1.0]
	Chol	-24.1 [7.1]	-16.0 [12.3]	-16.9 [7.4]
HDL	TG	2.1 [4.9]	-0.2 [2.9]	-6.6 [7.3]
	Chol	-10.1 [2.3]	-12.3 [5.9]	-10.4 [3.1]

Tab. 4.1.b

I pazienti diabetici hanno mostrato più alti livelli di trigliceridi nei chilomicroni postprandiali rispetto agli altri due gruppi, differenza che è risultata significativa 6 ore

dopo il pasto test, sia per i trigliceridi sia per il contenuto in colesterolo dei chilomicroni ($p < 0.05$ vs. gli obesi) (Fig.4.1.b)

Concentrazioni di trigliceridi, colesterolo, apo B-48, e apo B-100 nei chilomicroni del plasma prima e dopo pasto standard in soggetti obesi, obesi diabetici e controlli normopeso. $M \pm SEM$; * $p < 0.05$ vs. controlli, § $p < 0.05$ vs. obesi.

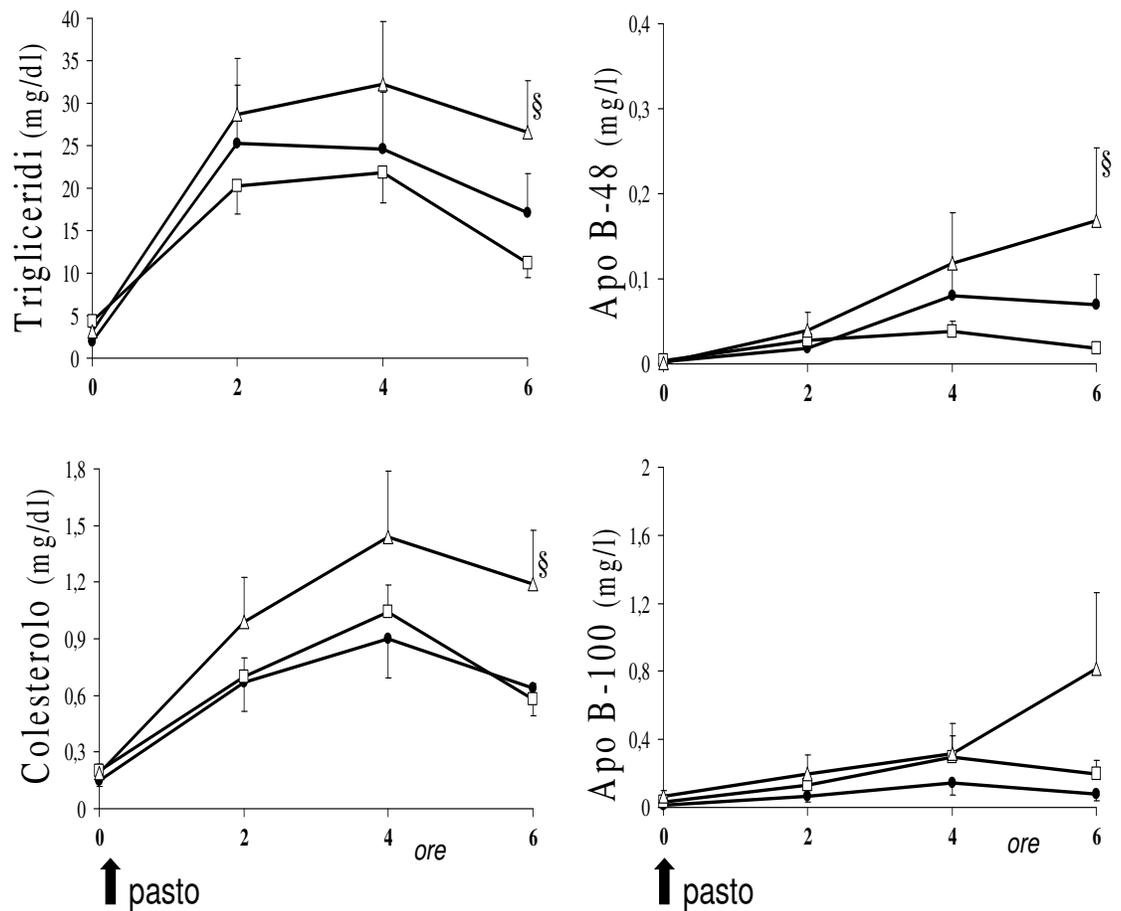


Fig. 4.1.b.

● controlli □ obesi △ diabetici

I pazienti diabetici hanno mostrato anche valori significativamente più alti delle aree incrementali sotto la curva dei trigliceridi ($p < 0.05$ vs obesi) e del colesterolo ($p < 0.05$ vs obesi e controlli) dei chilomicroni (Tab.4.1.b). Analogamente si è osservato un aumento

significativo dei livelli di apo B-48 a 6 ore dal pasto nei soggetti diabetici rispetto ai soggetti obesi ($p < 0.05$), mentre i livelli di apo B-100, sia prima che dopo il pasto, non si sono mostrati differenti tra i tre gruppi studiati.

Le concentrazioni a digiuno di trigliceridi, colesterolo ed apo B-100 delle VLDL grandi sono risultate più alte (sebbene non in maniera significativa) negli obesi e negli obesi con diabete tipo 2 rispetto ai controlli (Fig. 4.1.c, Tab.4.1.b).

Concentrazioni di trigliceridi, colesterolo, apo B-48, e apo B-100 nelle VLDL grandi del plasma prima e dopo pasto standard in soggetti obesi, obesi diabetici e controlli normopeso. $M \pm SEM$; * $p < 0.05$ vs. controlli

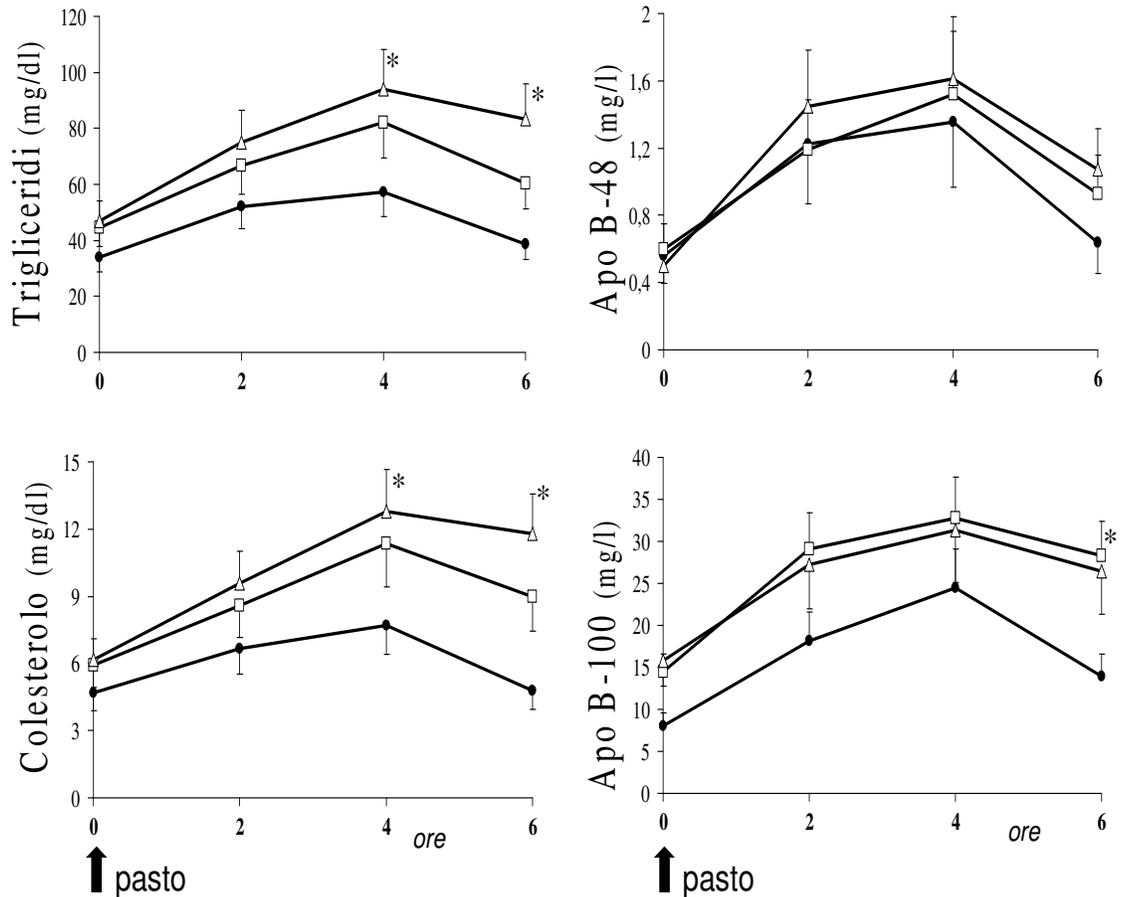


Fig. 4.1.c.

Dopo il pasto, i livelli di trigliceridi, colesterolo e apo-B100 nelle VLDL larghe sono aumentate maggiormente nei due gruppi di soggetti obesi e sono diventate significativamente più alti nell'ultima parte della curva postprandiale. Nei soggetti diabetici è stata anche evidente una tendenza a più alti valori postprandiali di apoB-48 in questa frazione lipoproteica (Fig. 4.1.c).

Nei soggetti diabetici si è avuta una leggera diminuzione dei livelli di trigliceridi e colesterolo in fase postprandiale, mostrata da una riduzione significativa delle aree incrementali rispetto ai controlli (Tab.4.1.b)

Per quanto riguarda l'attività della LPL rilasciata in vitro dall'eparina, espressa per grammo di tessuto adiposo, essa è risultata significativamente ridotta nei soggetti diabetici a digiuno (99 ± 11 vs. 217 ± 35 e 252 ± 51 nmol FA/g/ora, negli obesi e controlli, rispettivamente, ANOVA $p < 0.05$) e dopo il pasto (89 ± 16 vs. 231 ± 31 e 278 ± 40 nmol FA/g/ora, ANOVA $p < 0.01$) (Tab.4.1.a). L'attività della LPL è risultata più bassa nei soggetti con diabete tipo 2 anche quando è stata espressa per massa grassa totale. L'attività della LPL si è mostrata inversamente correlata con l'area incrementale sotto la curva postprandiale dei trigliceridi dei chilomicroni ($r = -0.42$, $p < 0.05$).

Discussione

Mentre le anomalie lipidiche postprandiali nel diabete tipo 2 sono ampiamente riconosciute, le alterazioni di specifiche classi di lipoproteine e i meccanismi implicati in tale alterazioni non sono ancora pienamente caratterizzati. Infatti, sono pochi gli studi che hanno valutato le frazioni lipoproteiche postprandiali, includendo misure di apoB-48 e apoB-100. Inoltre si tratta di studi effettuati su pazienti con diverso grado di controllo glicemico ed obesità, la cui insulina sensibilità è stata raramente quantificata. Prestando attenzione a questi fattori, in questo studio abbiamo voluto considerare gli effetti specifici del diabete di per sé, dell'obesità e dell'insulina resistenza sulle alterazioni delle singole lipoproteine nella fase post-prandiale.

L'alterazione postprandiale quantitativamente più rilevante è stata riscontrata a carico delle VLDL larghe nei pazienti obesi e in quelli diabetici. Questa anomalia è da associarsi all'insulino-resistenza, poiché essa è similmente osservata negli individui obesi con e senza diabete, ma aventi lo stesso livello di insulino-resistenza. Le VLDL sono lipoproteine di origine endogena e la loro concentrazione è stimata attraverso la misura dell'apo-B100. I più alti livelli postprandiali di apoB-100, riscontrati nei due gruppi di individui obesi, non sono direttamente dovuti a modifiche indotte dal pasto, ma piuttosto al fatto che i livelli di apoB-100 sono già più alti in condizione di digiuno in soggetti insulino-resistenti rispetto ai controlli. Questo risultato indica che anche in

individui con trigliceridemia normale l'aumento delle VLDL larghe in fase postprandiale è correlato ai livelli a digiuno e alla condizione di insulino-resistenza epatica.

Il secondo risultato interessante di questo studio è relativo all'aumento dei chilomicroni che si verifica nei pazienti diabetici tipo 2, e non allo stesso modo negli obesi, indicando quindi, per queste lipoproteine esogene, un'assenza di una stretta relazione con l'insulino-resistenza. Cioè l'incremento delle lipoproteine esogene ricche in trigliceridi sembra correlato al diabete di per sé, indipendentemente dalla condizione di insulina resistenza. L'aumentata produzione di chilomicroni potrebbe essere in relazione con la più bassa attività della LPL nel tessuto adiposo, da noi qui riscontrata nei pazienti diabetici ($r = -0.42$, $p < 0.05$). In questo studio i pazienti diabetici presentano una riduzione significativa dell'attività della LPL rilasciata dall'eparina del tessuto adiposo rispetto ai soggetti con un simile grado di adiposità, sia quando l'attività è espressa per peso di tessuto adiposo sia quando è espressa per massa grassa totale. In questo studio, non è stata riscontrata alcuna differenza tra l'attività della LPL del tessuto adiposo a digiuno e 6 ore dopo il pasto test. Al di là del tempo di prelievo del campione biotico di tessuto adiposo, 6 ore vs 3,5-4 dopo il pasto, così come viene spesso effettuato, questo risultato potrebbe essere dovuto al tipo di stimolo, nel nostro caso un pasto ricco in grassi. Infatti l'attività della LPL sembra aumentare dopo l'ingestione di un carico di glucosio ma non dopo l'ingestione di grasso¹⁴⁴.

I fattori che potrebbero essere responsabili della riduzione dell'attività della LPL nei diabetici non sono ancora ben conosciuti e, a tal proposito, due ipotesi possono essere suggerite. La lipasi lipoproteica è un enzima insulino-sensibile e nell'uomo l'insulina incrementa la LPL del tessuto adiposo¹⁴⁵. Perciò è possibile che l'iperinsulinemia presente in tutti e due i gruppi di pazienti obesi, sia sufficiente a compensare gli effetti dell'insulino-resistenza sull'attività della LPL nei pazienti con sola obesità, mentre non lo sia nei pazienti diabetici, dove, in particolare nella fase più precoce della curva postprandiale, tende ad essere più bassa. Inoltre deve essere preso in considerazione anche il possibile ruolo dell'iperglicemia nel determinismo di più bassi valori di attività della LPL nei pazienti diabetici¹⁴⁶, essendo essa il principale fattore discriminante tra gli individui diabetici ed obesi.

In conclusione, questo studio dimostra che in individui obesi, con e senza diabete di tipo 2, l'alterazione quantitativamente più rilevante è un incremento della VLDL grandi di origine epatica, che riflette i più alti livelli di questa frazione lipoproteica a digiuno e che è probabilmente correlata all'insulino-resistenza. Inoltre, il diabete di per se è

caratterizzato da un aumento della risposta postprandiale dei chilomicroni, indipendentemente dall'obesità e dell'insulino-resistenza, probabilmente conseguente ad una ridotta attività della LPL del tessuto adiposo.

4.2 Attività ed espressione della LPL e della HSL nel tessuto adiposo a digiuno e dopo pasto ricco in grassi in individui normopeso, obesi e obesi diabetici.

STUDIO n.2 (Pubblicazione in extenso n.3 inviata a European Journal of Clinical Investigation, Pubblicazione come Abstract n.1 su Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease)

Introduzione

Le attività, a livello del tessuto adiposo, sia della lipasi lipoproteica (LPL) che di quella ormono-sensibile (HSL), giocano un ruolo fondamentale nella regolazione dei processi di lipogenesi/lipolisi e, perciò, potrebbero essere molto importanti anche nella ripartizione dei grassi durante il periodo postprandiale¹⁴⁷. In realtà, i dati presenti in letteratura sull'attività di questi enzimi in fase postprandiale sono pochi e abbastanza contraddittori^{113,148}. La variabilità dei risultati può dipendere da vari motivi: 1) il tipo di pasto utilizzato, ricco in carboidrati o in grassi e, perciò, con diversi effetti sulla secrezione dell'insulina, ormone chiave nella regolazione dell'espressione e dell'attività sia della LPL che della HSL e, più in generale, nella regolazione dei processi di lipogenesi/lipolisi; 2) il tempo dopo il pasto test al quale vengono valutate le attività lipolitiche; 3) la tipologia di soggetti studiati, normopeso o obesi, normo- o ipertrigliceridemicici, pazienti con diabete tipo 2, ecc.

Per tanto, lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le attività lipolitiche del tessuto adiposo (LPL e HSL) e la loro espressione genica in condizioni di digiuno e 6 ore dopo un pasto test ricco in grassi in due gruppi di soggetti obesi con lo stesso livello di insulino-resistenza, ma uno con diabete tipo 2 e l'altro senza, e in un gruppo di soggetti di controllo.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio 9 pazienti con diabete mellito tipo 2 ed obesità, 10 pazienti solo con obesità e 9 soggetti sani normopeso. Le caratteristiche generali dei soggetti sono riassunte nella tabella 4.2.a. Entrambi i gruppi di pazienti obesi avevano lo stesso indice di massa corporea e la stessa circonferenza vita rispetto ai controlli ed anche livelli simili di insulino-resistenza, come riportato in precedenza (Studio 1). Tutti i soggetti presentavano normali livelli plasmatici di trigliceridi (< 150 mg/dl) e di colesterolo a digiuno (< 210 mg/dl). Nessuno era vegetariano, impegnato in attività fisica intensa e nessuno assumeva farmaci ipolipidemizzanti. Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico della Università Federico II e tutti i partecipanti hanno dato il proprio consenso informato.

CARATTERISTICHE DEI SOGGETTI PARTECIPANTI ALLO STUDIO			
[M± [DS]*p<0.05 ANOVA			
	OBESI DIABETICI	OBESI	CONTROLLI
Maschi, (n)	9	10	9
Età (anni)	48 ± 8	47 ± 8	37 ± 8
BMI (Kg/m ²)*	33 ± 2	34 ± 2	24 ± 1
Circonferenza vita (cm)*	109 ± 6	110 ± 6	83 ± 4
Glicemia (mg/dl)*	131 ± 37	92 ± 13	87 ± 10
Colesterolo (mg/dl)	170 ± 22	188 ± 36	162 ± 26
Trigliceridi (mg/dl)	104 ± 26	100 ± 37	75 ± 28
Colesterolo HDL (mg/dl)*	33 ± 4	40 ± 7	47 ± 9
M/I*	2.1 ± 1.2	1.7 ± 0.8	7.6 ± 3.4

Tab.4.2.a

Disegno sperimentale

Al mattino dopo almeno 12 ore di digiuno, tutti i soggetti hanno consumato un pasto test ricco in grassi la cui composizione è riportata nello Studio 1. Prima del pasto e nelle sei ore successive sono stati effettuati prelievi ematici seriali per la determinazione nel plasma di glucosio, insulina e trigliceridi. Sei ore dopo il pasto è stata effettuata un'agobiopsia del tessuto adiposo sottocutaneo nei quadranti inferiori addominali per la misurazione dell'attività della lipasi lipoproteica (LPL) e della lipasi ormono-sensibile (HSL). In un altro giorno, a digiuno, con le stesse modalità e per le medesime valutazioni, è stata ripetuta un'agobiopsia del tessuto adiposo.

Analisi statistica

I dati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Per il confronto tra il periodo post-prandiale e il digiuno, nell'ambito di ciascun gruppo, è stato utilizzato il t-test per dati appaiati. Le differenze tra i 3 gruppi sono state valutate mediante ANOVA (Analysis of Variance) e mediante test post hoc (LSD) tra i gruppi. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o tramite test non parametrici. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo a metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

Risultati.

I dati relativi alle concentrazioni di glucosio, insulina e trigliceridi nel plasma a digiuno e dopo il pasto sono mostrati in fig. 4.2.a. Come ci si poteva aspettare, i livelli di glucosio nel plasma sono più alti nei soggetti diabetici sia a digiuno che dopo il pasto, rispetto ai controlli. I livelli di insulina sono, invece, significativamente più alti in entrambi i gruppi di obesi anche se i pazienti diabetici mostrano una tendenza ad una rallentata risposta insulinica nelle prime 2 ore dopo il pasto; la risposta trigliceridica postprandiale è più alta nei pazienti diabetici rispetto agli obesi e ai controlli.

I risultati relativi all'attività e all'espressione genica delle lipasi del tessuto adiposo (LPL e HSL) a digiuno e 6 ore dopo il pasto test ricco in grassi nei tre gruppi studiati sono riportati nella tabella 4.2.b.

L'attività della LPL rilasciata in vitro dall'eparina è significativamente più bassa nei pazienti diabetici rispetto ai soggetti obesi e di controllo, sia a digiuno che in fase postrandiale. L'attività totale della LPL, misurata in frammenti omogenati di tessuto adiposo è più bassa nei due gruppi di soggetti obesi rispetto ai controlli sia a digiuno che in fase postprandiale, raggiungendo la significatività statistica dopo il pasto test ($p < 0.05$). Dal confronto tra i valori dell'attività della LPL, sia totale che rilasciata dall'eparina, a digiuno e 6 ore dopo il pasto test non si evidenziano differenze sia nell'ambito di ciascun gruppo (obesi diabetici, obesi e controlli) sia in tutti i soggetti partecipanti allo studio. Anche i livelli di mRNA della LPL non si modificano in fase postprandiale rispetto ai livelli a digiuno (Tab.4.2.b), anche se a digiuno essi risultano significativamente più bassi solo nei diabetici verso i controlli ($p < 0.05$) e non verso gli obesi.

Concentrazioni di glucosio, insulina, e trigliceridi nel plasma a digiuno e dopo pasto test ricco in grassi in soggetti obesi, obesi diabetici e controlli normopeso.

M±SEM; *p<0.05 vs. controlli, §p<0.05 vs. obesi.

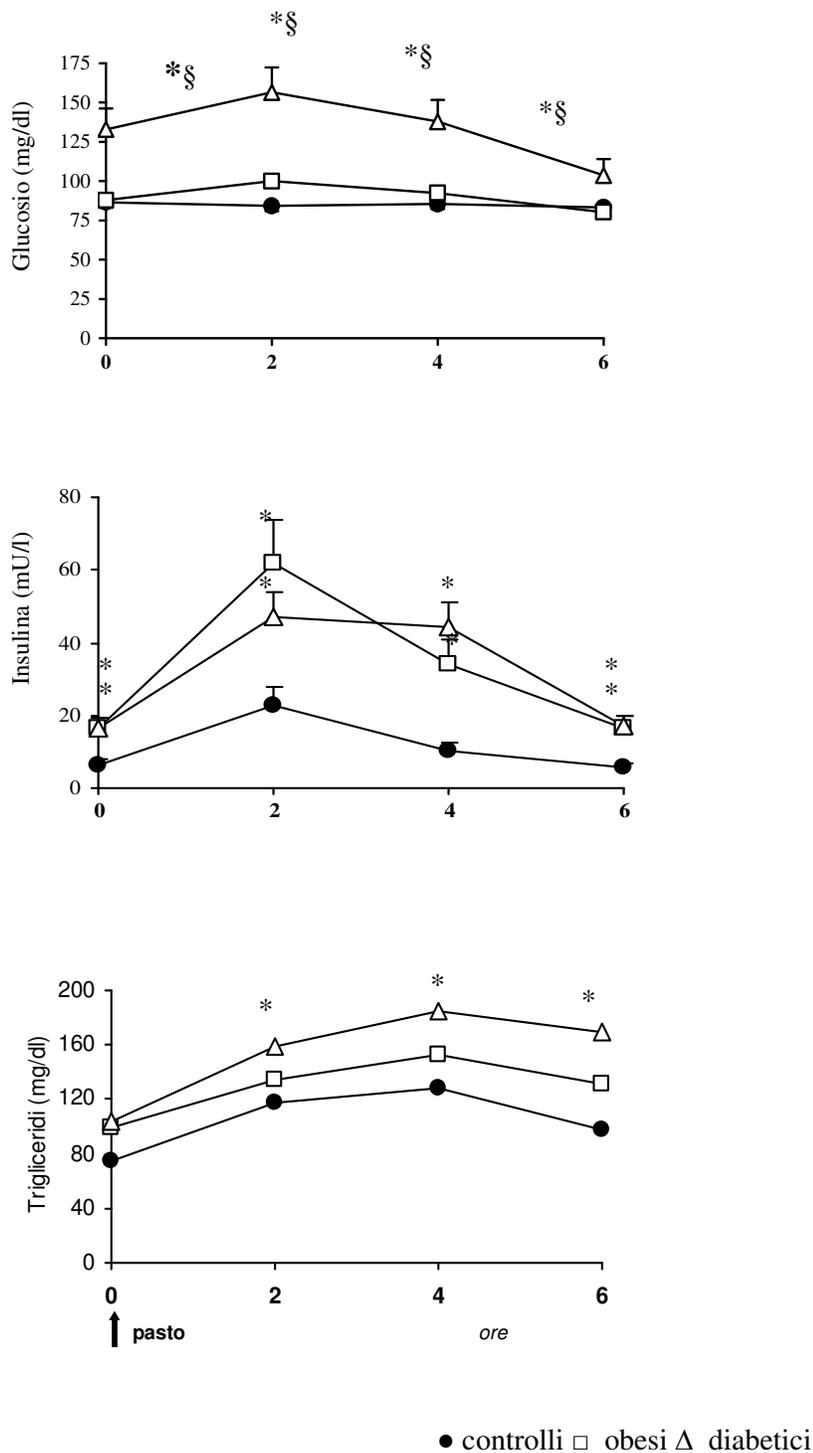


Fig.4.2.a

Attività ed espressione delle lipasi del tessuto adiposo a digiuno e 6 ore dopo pasto test ricco in grassi. *p<0.05 vs controlli, °p<0.05 vs pazienti obesi

	TUTTI		OBESI DIABETICI		OBESI		CONTROLLI	
	Digiuno	Postprand.	Digiuno	Postprand.	Digiuno	Postprand.	Digiuno	Postprand.
Attiv Totale LPL (nmolFA/g/ora)	4083±2535	4386±2430	3196±1603	*3280±1442	3884±1504	*3631±1388	5192±3775	5400±2098
Attiv. LPL rilasc. da eparina (nmolFA/g/h)	224±213	197±126	*°101±48	*°102±63	231±129	212±108	236±121	263±146
mRNA LPL	0.62±0.23	0.64±0.28	*0.53±0.06	0.59±0.23	0.57±0.14	0.67±0.33	0.72±0.35	0.66±0.30
Attività HSL (nmolFA/g/ora)	845±334	954±345	*761±238	*798±208	*736±329	*890±388	1085±337	1182±312
mRNA HSL	0.89±0.36	0.78±0.28	0.94±0.40	0.88±0.32	0.82±0.33	0.78±0.22	0.91±0.39	0.60±0.22
HSL616	0.91±0.39	0.89±0.33	1.01±0.42	0.95±0.34	0.79±0.38	0.84±0.30	0.94±0.38	0.88±0.39
HSL388	1.12±0.36	1.30±0.57	1.09±0.27	0.98±0.15	1.06±0.36	1.52±0.68	1.25±0.48	1.46±0.64

Tab. 4.2.b

L'attività della HSL del tessuto adiposo è significativamente ridotta in entrambi i gruppi di soggetti obesi rispetto ai controlli (736±329 negli obesi, 761±238 negli obesi con diabete, 1085±337 nmol FA/g/ora nei controlli, $p<0.05$ per entrambi) sia in condizioni di digiuno sia 6 ore dopo il pasto test (890±388 negli obesi, 798±208 negli obesi con diabete, 1182±312 nmol FA/g/ora in controlli, $p<0.05$ per entrambi) (Tab.4.2.b). I valori dell'attività della HSL non si modificano 6 ore dopo il pasto rispetto ai valori a digiuno sia nei tre gruppi di soggetti considerati separatamente sia in tutti i partecipanti allo studio. Lo stesso dicasi per i livelli di della HSL mRNA e delle due isoforme (HSL 616 e HSL 388) del tessuto adiposo, i quali non subiscono alcuna variazione in fase postprandiale rispetto ai valori a digiuno né mostrano differenze tra i gruppi.

Discussione

I risultati di questo studio dimostrano che non c'è alcuna variazione nell'espressione e nell'attività sia della LPL che dell' HSL del tessuto adiposo 6 ore dopo un pasto test ricco in grassi rispetto ai valori a digiuno. Le differenze trovate a digiuno tra i gruppi rimangono invariate anche in fase postprandiale. Questo significa che i pazienti diabetici sono caratterizzati, sia a digiuno che in fase postprandiale, da una ridotta attività della LPL rilasciata dall'eparina nel tessuto adiposo rispetto sia ai soggetti obesi che ai soggetti di controllo. Per quanto riguarda l'espressione genica della LPL, i soggetti diabetici, rispetto ai soggetti obesi senza diabete, sono caratterizzati solo da una lieve riduzione dell'espressione genica della LPL, mentre invece mostrano una più evidente e significativa riduzione dell'attività della LPL nel tessuto adiposo. La maggiore riduzione dell'attività della LPL a confronto con la sua espressione genica, indica che le differenze osservate sono principalmente basate su processi post-translazionali, probabilmente riguardanti la trasposizione della LPL alla parete vasale, come infatti, è suggerito anche dai dati riguardanti l'attività totale della LPL.

Entrambi i gruppi di soggetti obesi, con e senza diabete, sono caratterizzati da una ridotta attività della HSL del tessuto adiposo, suggerendo che questa diminuzione non è una caratteristica tipica del diabete, ma potrebbe essere più legata alla condizione di insulino-resistenza tipica di questi soggetti. Questi risultati sono, in realtà, inaspettati, poiché l'insulino-resistenza dovrebbe essere associata ad una maggiore attività lipolitica nel tessuto adiposo, anche se risultati simili sono stati riportati da altri autori¹⁴⁹. Una possibile spiegazione a questi dati potrebbe essere la presenza di altri tipi di lipasi nel tessuto adiposo¹⁵⁰, molto più importanti nella regolazione del processo di lipolisi, o che l'attività della HSL è ridotta nel tessuto adiposo sottocutaneo ed aumenta invece nel tessuto adiposo viscerale. Un'altra possibile spiegazione è che l'iperinsulinemia cronica

presente in entrambi i gruppi di soggetti obesi potrebbe aver un effetto inibente sulla HSL nel cercare di compensare la condizione di insulino-resistenza¹⁴⁹.

Per quanto riguarda l'effetto del pasto, la mancanza di variazione dei valori postprandiali rispetto ai valori a digiuno, soprattutto per quanto riguarda l'attività della LPL, potrebbe essere in relazione con il fatto che nel nostro studio il prelievo di tessuto adiposo è stato effettuato 6 ore dopo il pasto test, un periodo che si potrebbe ritenere troppo lungo per poter evidenziare ancora variazioni delle attività enzimatiche. Infatti alcuni studi in letteratura sembrerebbero essere in linea con questa ipotesi, in quanto mostrano un aumento dell'attività della LPL circa 3 ore dopo il pasto che poi ritorna quasi a valori preprandiali dopo 6 ore¹⁵¹. In ogni caso, anche il tipo di pasto potrebbe influenzare l'attività postprandiale della LPL e la mancanza di cambiamenti trovata nel nostro studio potrebbe essere proprio legata al tipo di pasto usato, molto ricco in grassi, specialmente grassi saturi. E' stato dimostrato, infatti, che l'assunzione di un carico di glucosio rispetto ad un carico di grasso determina un aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo, probabilmente dovuto al fatto che pasti ricchi in carboidrati, rispetto a quelli ricchi in grassi, stimolano una maggiore secrezione insulinica tale da indurre un aumento significativo dell'attività della LPL del tessuto adiposo¹⁵². Al contrario, il carico di grassi, olio di girasole, non determina alcuna variazione della LPL in tutto il periodo postprandiale anche dopo 6 ore.

I dati in letteratura riguardanti l'attività postprandiale della HSL del tessuto adiposo sono molto pochi e, in ogni caso, essi mostrano anche per questo enzima una curva temporale dopo il pasto caratterizzata da una soppressione per circa 5 ore e poi un ritorno ai valori preprandiali¹⁵³. Anche per l'HSL, il tipo di pasto potrebbe essere importante e, per tanto, i nostri risultati, anche in questo caso, potrebbero essere correlati al tipo di pasto test usato e non solo al tempo al quale è stata fatta la valutazione.

Un'altra considerazione importante che si evince dai risultati di questo studio è che i soggetti da noi studiati, obesi con e senza diabete e individui di controllo, si comportano in maniera identica per quanto riguarda la mancata risposta postprandiale delle lipasi. Naturalmente questo significa che la ridotta attività della LPL, che caratterizza i pazienti diabetici sia a digiuno che in fase postprandiale, può diventare di maggiore rilevanza in una condizione di stress metabolico, quale è il periodo postprandiale, inducendo alterazioni lipoproteiche postprandiali anche in soggetti normolipidemicici a digiuno.

4.3. Effetti di una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi verso una dieta ricca in acidi grassi saturi sulla lipemia postprandiale e sulle lipasi del tessuto adiposo nel diabete di tipo 2. Studio n. 3. (Pubblicazione in extenso n.4 su Clinical Nutrition 2007; pubblicazione come Abstract n.2 su Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo 2007)

Introduzione

Diversi studi negli ultimi anni hanno cercato di valutare nell'uomo i possibili effetti di diversi interventi dietetici sulla lipemia post-prandiale¹⁵⁴⁻¹⁵⁶. I dati che confrontano gli effetti dei grassi monoinsaturi (MUFA) verso i grassi saturi (SAFA) sono scarsi. La gran parte di essi riguardano gli effetti acuti di pasti test, non di interventi dietetici, ed i risultati sono abbastanza controversi^{154,155}. Inoltre, non è stato effettuato nessuno studio di medio o lungo termine su individui con diabete di tipo 2.

Un intervento dietetico capace di migliorare il metabolismo lipidico postprandiale può essere particolarmente rilevante in questi pazienti, tenendo presente che le anomalie dei lipidi postprandiali sono particolarmente frequenti e strettamente correlate con la loro tipica resistenza insulinica^{85,119,139}.

In particolare, considerando il ruolo essenziale degli enzimi del tessuto adiposo (LPL e HSL) nella distribuzione dei grassi della dieta e quindi nella regolazione del metabolismo lipidico nel periodo postprandiale¹⁴⁷ è probabile che essi rappresentino il meccanismo attraverso il quale la dieta, in generale, ed i diversi tipi di grassi in particolare possono influenzare il metabolismo lipidico postprandiale. Perciò in questo studio abbiamo voluto valutare gli effetti di diete ricche in grassi monoinsaturi o saturi sulla tolleranza ad un pasto grasso in pazienti diabetici di tipo 2, indagando anche sul ruolo del tessuto adiposo nel modulare questi effetti.

Soggetti

Hanno partecipato allo studio, dopo aver dato il loro consenso informato scritto, 11 pazienti diabetici, di sesso maschile, con età media di 53 ± 9 anni ($M \pm DS$), in sovrappeso o obesi ($BMI 31 \pm 3 \text{ Kg/m}^2$), con circonferenza vita 99 ± 8 cm, in buon compenso glicemico ($HbA1c 6.9 \pm 0.7\%$) e con normali livelli di lipidi plasmatici a digiuno (colesterolo 183 ± 26 mg/dl, trigliceridi 117 ± 59 mg/dl, HDL colesterolo 40 ± 10 mg/dl). Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico della Università Federico II di Napoli.

Disegno dello studio:

Lo studio è stato eseguito secondo un disegno sperimentale randomizzato di tipo cross-over. Dopo un periodo di osservazione (run-in) di 3 settimane, durante il quale tutti i pazienti hanno seguito la loro dieta abitale, essi hanno seguito, in ordine random, due diete isoenergetiche, una ricca in grassi monoinsaturi (dieta MUFA) ed una ricca in grassi saturi (dieta SAFA) per un periodo di 3 settimane ognuno.

Diete:

Le due diete isoenergetiche seguite dai pazienti differivano solamente per il tipo di grassi: la dieta MUFA era ricca in acidi grassi monoinsaturi (23% delle calorie totali vs 15% della dieta alternativa), mentre la dieta SAFA era più ricca in acidi grassi saturi (17% della calorie totali vs 8% della dieta alternativa). Tutte le altre componenti erano simili nelle due diete (proteine 17%, carboidrati 46%, grassi totali 37%, fibre 21 g/giorno), mentre il contenuto in colesterolo era più basso nella dieta MUFA rispetto alla dieta SAFA (130 vs 248 mg/giorno).

Per migliorare l'adesione alla dieta, tutte le pietanze per pranzo e cena, preparate con burro o con olio extra vergine, sono state congelate e somministrate settimanalmente ai pazienti per l'intero periodo dell'esperimento. Ai pazienti è stata fornita anche una lista dettagliata dei cibi ricchi in grassi monoinsaturi e grassi saturi, da utilizzare nel caso essi fossero impossibilitati a consumare il pasto fornito. I pazienti sono stati invitati a restituire i pasti non consumati e a registrare in un diario gli alimenti che avevano sostituito. L'adesione alla dieta è stata testata da una dietista settimanalmente.

Procedure sperimentali.

Alla fine di ciascun periodo di dieta i pazienti sono stati sottoposti alle stesse procedure sperimentali. La mattina, a digiuno almeno da 12 ore, i soggetti hanno assunto un pasto standard, lo stesso alla fine di ciascun periodo di dieta. Prima del pasto e durante le 6 ore successive sono stati prelevati campioni di sangue per il dosaggio di glucosio, insulina, acidi grassi liberi (FFA), colesterolo e trigliceridi nel plasma. Colesterolo, trigliceridi, apo B-48 e apo B-100 sono stati determinati anche nelle frazioni lipoproteiche. Dopo il pasto (6 ore) ed a digiuno, ma in un giorno diverso, è stata effettuata un'ago-biopsia del tessuto adiposo sottocutaneo dell'addome per la misurazione delle attività e dell'espressione genica degli enzimi lipolitici, LPL e HSL.

Il pasto standard consisteva di un gateau di patate fatto di patate, latte intero, uova, formaggio, burro e prosciutto ed è stato consumato in 15-20 minuti. La composizione chimica del pasto era di 944 Kcal, fornite per il 31% dai carboidrati, il 57% dai grassi (34% grassi saturi) e per il 12% dalle proteine.

Analisi statistica I dati sono espressi come Media \pm DS. La risposta postprandiale è stata valutata come area incrementale sotto la curva (*Incremental Area Under Curve*, IAUC) calcolata con il metodo trapezoidale. Le differenze tra le due diete sono state valutate mediante t-test per dati appaiati. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o tramite test non parametrici. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo a metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

Risultati

Sia la dieta ricca in MUFA che quella ricca in SAFA sono state ben accettate dai pazienti, che hanno consumato regolarmente i pasti che sono stati loro somministrati.

Alla fine di entrambi le diete non ci sono state differenze nel peso corporeo (88.5 ± 3.1 kg vs. 88.8 ± 3.3 kg), dei livelli di trigliceridi a digiuno (112 ± 15 vs. 122 ± 21 mg/dl), né di colesterolo HDL (40 ± 3 vs. 40 ± 3 mg/dl). Come ci si poteva aspettare, il colesterolo LDL è diminuito in seguito alla dieta ricca in MUFA (107 ± 7 vs. 111 ± 5 ; $p < 0.05$).

Le risposte postprandiali di glucosio, insulina, acidi grassi liberi e trigliceridi del plasma non si sono mostrati differenti dopo i due approcci dietetici, eccetto per i valori leggermente più alti degli FFA due ore dopo il pasto alla fine della dieta ricca in MUFA (figura 4.3.a).

Per quanto riguarda la risposta postprandiale delle lipoproteine ricche in trigliceridi, il contenuto di trigliceridi dei chilomicroni è risultato significativamente più alto nella prima parte della curva postprandiale (a 2 ore) alla fine della dieta MUFA; tuttavia, esso è diminuito rapidamente portandosi a valori simili a quelli raggiunti in seguito alla dieta ricca in SAFA (figura 4.3.b).

Concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina, FFA e trigliceridi prima e dopo pasto test in pazienti con diabete tipo 2 alla fine dei due periodi dietetici (M±ES)

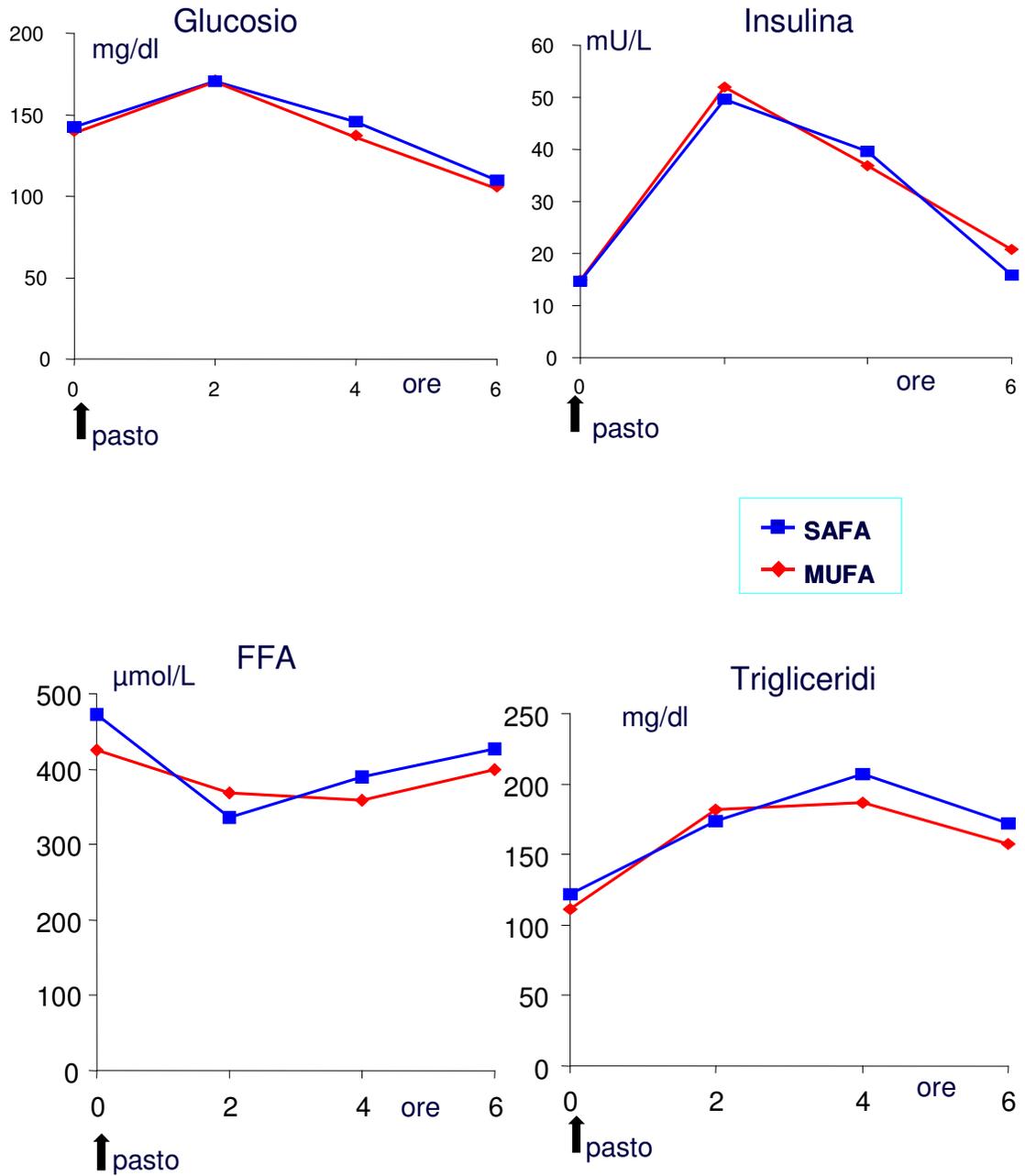


Fig. 4.3.a

L'area incrementale sotto la curva dei trigliceridi, come anche del colesterolo e dell'apo B-100 dei chilomicroni, è risultata molto simile alla fine della due diete (tabella 4.3.a). La risposta dell' apo B-48 dei chilomicroni è stata più bassa, anche se non statisticamente significativa, lungo l'intera curva postprandiale alla fine della dieta MUFA (figura 4.3.b). Questa tendenza è stata osservata anche per l'area incrementale sotto la curva (tabella 4.3.a).

Concentrazioni di colesterolo, trigliceridi, apoB 48 e apoB 100 dei chilomicroni nel plasma prima e dopo pasto test in pazienti con diabete tipo 2 alla fine dei due periodi dietetici (M±ES)

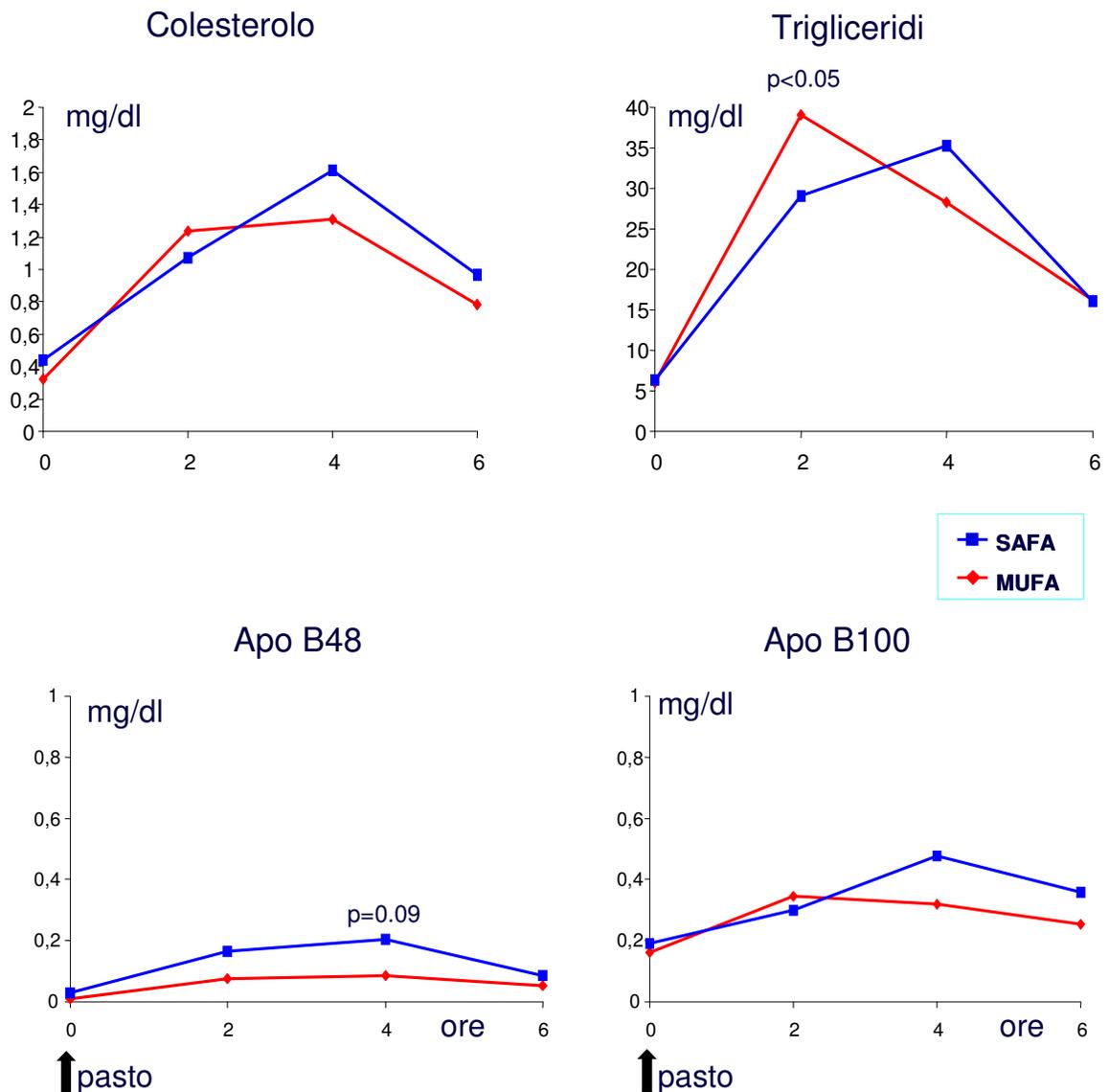


Fig. 4.3.b

Le concentrazioni postprandiali di colesterolo, trigliceridi e di apo B-100 nelle VLDL grandi si sono mostrate simili alla fine delle due diete (figura 4.3.c). Le concentrazioni di apo B-48 sono state simili nella prima parte della curva postprandiale, mentre 6 ore dopo il pasto test esse sono più elevate, anche se non significativamente, dopo la dieta ricca in SAFA (figura 4.3.c). Il contenuto di trigliceridi e colesterolo delle VLDL piccole è diminuito nel periodo postprandiale dopo entrambi le diete, ma la diminuzione postprandiale è stata più evidente dopo la dieta ricca in MUFA rispetto alla dieta ricca in SAFA ($p=0.04$ IAUC dei trigliceridi; $p=0.09$ IAUC del colesterolo) (tabella 4.3.a).

Concentrazioni di colesterolo, trigliceridi, apoB 48 e apoB 100 delle VLDL grandi del plasma prima e dopo pasto test in pazienti con diabete tipo 2 alla fine dei due periodi dietetici (M±ES)

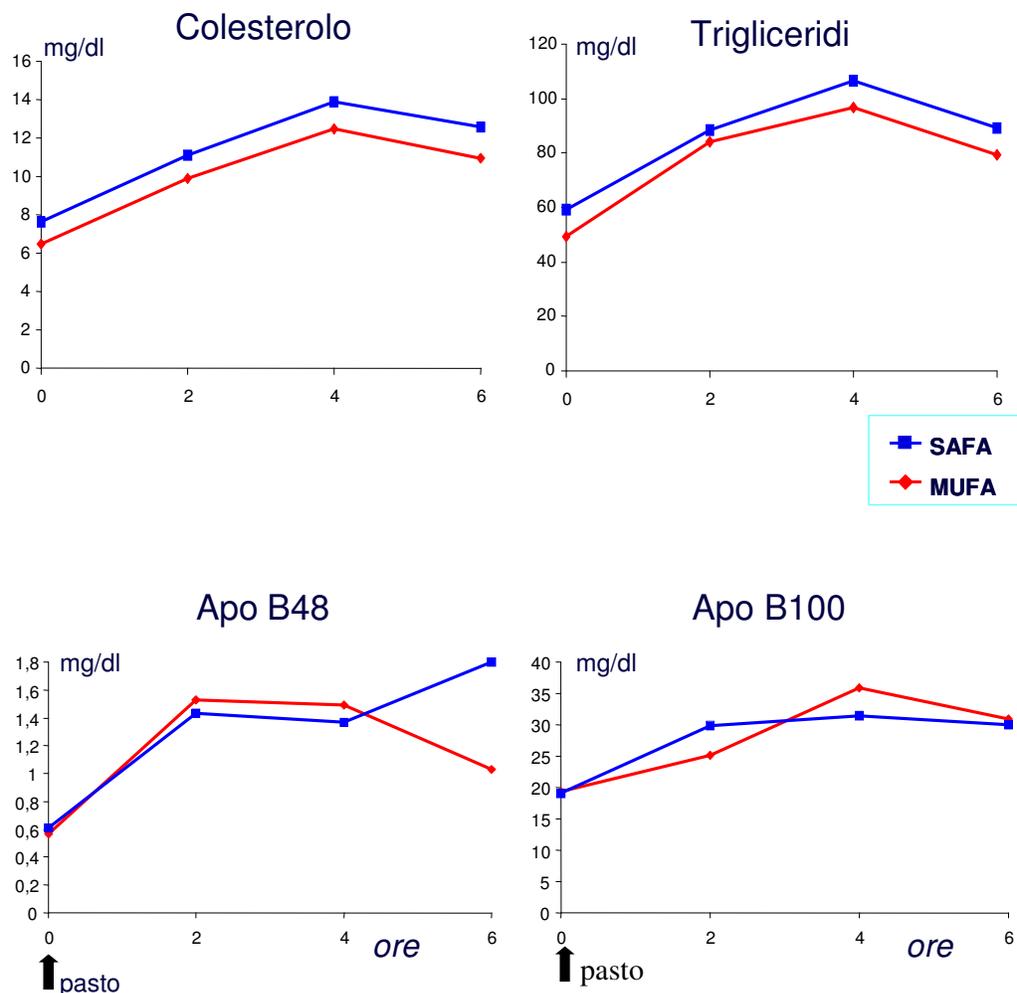


Fig 4.3.c

Aree incrementali sotto la curva dopo pasto test dei lipidi ed apoproteine in chilomicroni, VLDL grandi e piccole alla fine dei due periodi dietetici (M±ES).

	MUFA	SAFA	p
CHILOMICRONI			
Colesterolo (mg/dl*6h)	4.27±0.80	4.14±1.04	0.85
Trigliceridi (mg/dl*6h)	120.6±19.1	113.3±18.6	0.68
Apo B-48 (mg/l*6h)	0.32±0.09	0.68±0.33	0.28
Apo B-100 (mg/l*6h)	0.78±0.31	0.96±0.52	0.67
VLDL GRANDI			
Colesterolo (mg/dl*6h)	24.7±5.2	24.3±4.1	0.90
Trigliceridi (mg/dl*6h)	195.0±30.3	184.0±29.4	0.63
Apo B-48 (mg/l*6h)	4.20±1.03	4.41±2.03	0.94
Apo B-100 (mg/l*6h)	67.4±22.5	57.2±14.88	0.67
VLDL PICCOLE			
Colesterolo (mg/dl*6h)	-8.25±2.17	-5.09±1.87	0.09
Trigliceridi (mg/dl*6h)	-12.70±4.34	-4.11±3.88	0.04
Apo B-48 (mg/l*6h)	1.25±0.69	0.85±0.43	0.93
Apo B-100 (mg/l*6h)	-0.48±13.9	-2.70±14.07	0.53

Tab.4.3.a

Sia l'attività totale della LPL del tessuto adiposo sia quella rilasciata dall'eparina sono aumentate nel periodo postprandiale alla fine della dieta ricca in MUFA, e la differenza tra i due periodi di intervento dietetico è risultata statisticamente significativa per l'attività totale della LPL ($p < 0.05$) (figura 4.3.d).

L'attività dell'HSL del tessuto adiposo si è mostrata significativamente più alta alla fine della dieta MUFA sia a digiuno ($p < 0.02$) che dopo il pasto test ($p < 0.02$) (figura 4.3.d).

Invece non c'è stata nessuna differenza nei livelli di mRNA dell'HSL del tessuto adiposo (per entrambi le forme: HSL616 e HSL388).

Attività ed espressione genica della LPL e della HSL nel tessuto adiposo a digiuno e 6 ore dopo pasto test in pazienti con diabete tipo 2 alla fine dei due periodi dietetici (M±ES)

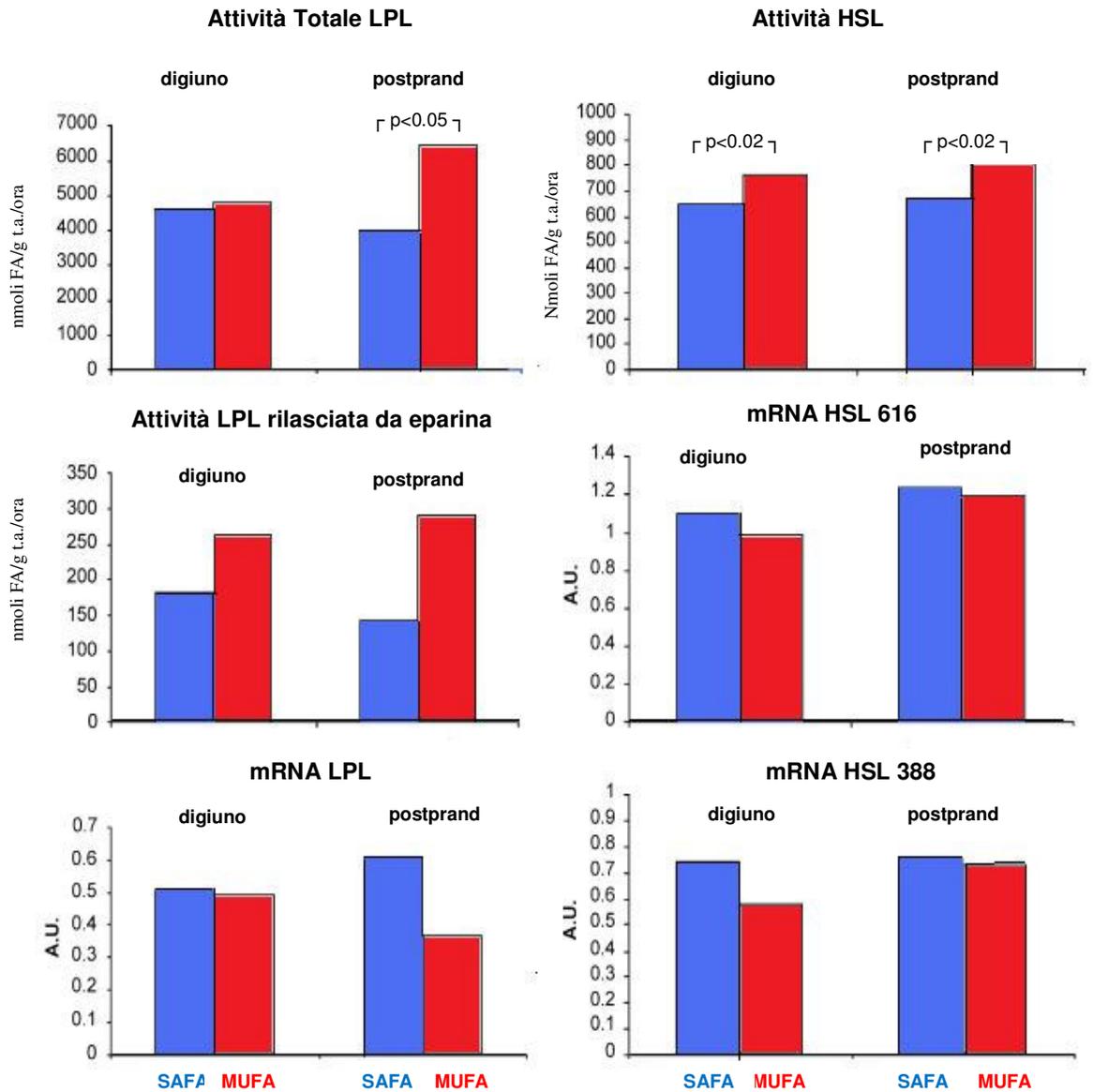


Fig.4.3.d

Discussione

Il principale risultato di questo studio è che un periodo medio (3 settimane) di una dieta ricca in MUFA, paragonata ad una dieta ricca in SAFA, è capace di modificare solo leggermente la tolleranza lipidica postprandiale in pazienti diabetici tipo 2. Le differenze osservate tra gli effetti delle due diete sono state: 1) un più rapido incremento postprandiale nel contenuto di trigliceridi dei chilomicroni dopo la dieta ricca in MUFA, differenza che non è più evidente nell'ultima parte della curva postprandiale; 2) un significativo aumento dell'attività della LPL a livello del tessuto adiposo dopo la dieta ricca in MUFA; 3) un aumento significativo dell'attività della HSL; 4) una significativa diminuzione postprandiale nel contenuto dei trigliceridi delle VLDL piccole.

La possibile influenza della qualità dei grassi della dieta sul metabolismo lipidico postprandiale è ancora oggetto di discussione, specialmente per quanto concerne il confronto tra grassi saturi e monoinsaturi. La maggior parte degli studi hanno valutato gli effetti di un singolo pasto test, generando risultati veramente molto contrastanti. Infatti, in qualche studio c'è stata una diminuzione della risposta dei chilomicroni dopo pasti ricchi in MUFA⁷⁹, in altri, invece, un aumento^{80,157}.

Solo uno studio ha valutato l'effetto di un intervento dietetico con olio d'oliva per 8 settimane rispetto ad una dieta arricchita di acidi grassi saturi sulla risposta lipidica postprandiale in individui sani¹⁵⁸. In questo studio è stato trovato un significativo aumento della risposta dell'apoB-48 dei chilomicroni dopo la dieta ricca in MUFA nella prima fase della curva postprandiale, inducendo gli autori a concludere che gli acidi grassi monoinsaturi avrebbero potuto indurre una più rapida sintesi dei chilomicroni. Anche nel nostro studio c'è un precoce primo aumento del contenuto dei trigliceridi dei chilomicroni, ma no nel loro numero (l'apoB-48 dei chilomicroni era, infatti, diminuito dopo la dieta MUFA).

La differenza tra i due studi potrebbe essere dovuta al fatto che noi abbiamo usato, alla fine dei due periodi dietetici, lo stesso pasto test standard, ricco in grassi saturi, mentre Roche ed al. hanno usato un pasto standard arricchito di olio d'oliva. Il precoce incremento del contenuto dei trigliceridi dei chilomicroni potrebbe essere dovuto ad una più rapida digestione e assorbimento dei grassi probabilmente indotta dagli acidi grassi monoinsaturi, come suggerito da studi in vitro effettuati sull'uomo e sull'animale. L'incremento dei trigliceridi dei chilomicroni dopo la dieta MUFA è limitato solo alla prima parte della curva postprandiale, probabilmente perché il tessuto adiposo è capace di incrementare l'attività della lipasi lipoproteica, come mostrato nel nostro studio. Questo fa sì che i trigliceridi dei chilomicroni possano essere rapidamente idrolizzati, di

conseguenza, già dopo 4 ore essi sono leggermente più bassi che dopo la dieta ricca in SAFA.

L'incremento dell'attività della LPL del tessuto adiposo dopo la dieta ricca in MUFA potrebbe spiegare anche la diminuita concentrazione, specialmente dei trigliceridi, della VLDL piccole nel periodo postprandiale. Oltre all'attività della LPL, noi abbiamo anche misurato l'mRNA della LPL. Sei ore dopo il pasto test i livelli di mRNA erano diminuiti, perciò, l'aumentata attività della LPL 6 ore dopo il pasto test potrebbe essere dovuta ad eventi post-trascrizionali o ad un incremento dell'espressione genica della LPL durante la prime parte della curva postprandiale.

Un altro studio¹⁵⁸ ha valutato l'attività della LPL del plasma dopo diete con differenti composizioni senza trovare alcuna differenza. Il nostro studio, per la prima volta, ha valutato il possibile ruolo della LPL direttamente a livello del tessuto adiposo e chiaramente mostra che c'è un incremento dell'attività della LPL dopo la dieta ricca in MUFA. Questa maggiore attività della LPL, probabilmente secondario al rapido incremento dei trigliceridi dei chilomicroni, è capace, comunque, di neutralizzare completamente questa più alta risposta trigliceridemia iniziale.

La dieta ricca in MUFA induce anche un aumento dell'attività dell'HSL del tessuto adiposo sia a digiuno che nella fase postprandiale. Questo è un risultato molto incoraggiante e nuovo. Ciò potrebbe essere spiegato come un possibile adattamento del tessuto adiposo all'aumentato flusso di acidi grassi derivanti dalla più alta attività della LPL con la dieta ricca in MUFA.

In conclusione, questo studio mostra che una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) non riesce a migliorare la tolleranza lipidica postprandiale in pazienti con diabete tipo 2 rispetto alla dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi (SAFA), ma riduce significativamente la risposta postprandiale delle VLDL piccole, che sono considerate le più aterogeniche tra le VLDL.

4.4 Effetti di una dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico sulle alterazioni lipidiche postprandiali del diabete tipo 2. Studio n. 4 (Pubblicazioni come Abstracts n.3 e n.4)

Introduzione

La terapia dietetica per il trattamento del paziente diabetico tipo 2 può, spesso, da sola raggiungere dei risultati ottimali sia sul compenso glicemico che sul metabolismo lipidico e lipoproteico. Per quanto riguarda quest'ultimo aspetto, numerosi studi hanno valutato l'effetto di diversi tipi di diete sul profilo lipidico a digiuno in diabetici tipo 2¹⁵⁹⁻¹⁶³.

Dall'insieme di questi studi si deduce che una dieta ad alto contenuto in CHO, rispetto ad una dieta ricca in grassi monoinsaturi, è meno efficace sul profilo lipidico a digiuno in quanto determina un aumento dei trigliceridi plasmatici¹⁵⁹. Tuttavia, questi effetti negativi possono essere evitati se si scelgono alimenti ricchi in CHO, ma con basso indice glicemico e/o ricchi in fibre¹⁶⁰. Esistono, invece, pochi dati in letteratura sugli effetti dei vari tipi di diete sulle alterazioni lipidiche e lipoproteiche in fase postprandiale, fase in cui tali alterazioni potrebbero essere quantitativamente più rilevanti, rispetto a quelle presenti solo a digiuno, nell'aumentare il rischio cardiovascolare, in particolare in pazienti diabetici. D'altra parte, del tutto sconosciuto è il ruolo che gli enzimi del tessuto adiposo (LPL e HSL) potrebbero avere nello spiegare gli effetti di questi due differenti approcci dietetici. Per chiarire queste complesse problematiche, si è pensato di confrontare l'effetto di una dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico con una ricca in acidi grassi monoinsaturi sulla lipemia postprandiale in pazienti diabetici tipo 2, analizzando i meccanismi mediante i quali tali diete possono influenzare il metabolismo lipidico in fase postprandiale.

Soggetti.

Fino ad adesso, hanno partecipato allo studio 11 pazienti con diabete mellito tipo 2, dopo aver dato il loro consenso informato.

I criteri di inclusione/esclusione sono stati i seguenti:

Criteri di inclusione:

- Pazienti con diabete mellito tipo 2 in assenza di scompenso glicometabolico (HbA1c <8%) in terapia dietetica o con ipoglicemizzanti orali.
- Età fra 45 e 65 anni e IMC <30 kg/m²
- Valori di lipidi plasmatici a digiuno <250 mg/dl per il colesterolo e < 300 mg/dl per i trigliceridi e in assenza di trattamento ipolipidemizzante.

Criteri di esclusione:

- Insufficienza renale (creatininemia > 1.5 mg/dl) ed epatica (transaminasi più di due volte i valori normali).
- Donne in età fertile
- Anemia (Hb <12 g/dl) e altre patologie (infezioni, tumori, ecc).

Disegno sperimentale

Lo studio è stato eseguito secondo un disegno sperimentale randomizzato di tipo cross-over con somministrazione di due diete isoenergetiche a diverso contenuto in acidi grassi (MUFA), carboidrati (CHO) e fibre. Dopo un periodo di osservazione (run-in) di circa 4 settimane, durante il quale tutti i pazienti hanno seguito la loro dieta abituale, ciascun paziente è stato assegnato ad una delle due diete per quattro settimane. Successivamente, ogni paziente ha seguito, ancora per quattro settimane, l'altro regime dietetico. Tutti i pazienti hanno incontrato settimanalmente una dietista e compilato un diario alimentare di tre giorni per valutare le loro abitudini alimentari e, successivamente, la loro adesione al trattamento dietetico.

Le caratteristiche delle due diete isoenergetiche sono riportate in tabella 4.4.a. La dieta relativamente ricca in carboidrati, dieta C, è rappresentata dal 52% dell'energia totale (ET) da CHO, apporta una quantità di 28 g/1000 kcal di fibre, ed è a basso indice glicemico (58%); la dieta M, a ridotto contenuto in carboidrati, è rappresentata dal 45% dell'energia totale (ET) da CHO, fornisce 8 g/1000 kcal di fibre, ed è ad alto indice glicemico (88%).

Procedure sperimentali

Dopo il periodo di run-in, tutti i pazienti hanno eseguito prelievi ematici per la determinazione di colesterolo, trigliceridi e HDL-colesterolo.

Alla fine di ciascun trattamento dietetico sono stati valutati i livelli di lipemia postprandiale dopo un pasto test (948 kcal) di composizione simile al trattamento dietetico in corso.

Prima del pasto e nelle sei ore successive sono stati effettuati prelievi ematici per la determinazione di glucosio, insulina, colesterolo, trigliceridi del plasma e delle principali frazioni e subfrazioni lipoproteiche (chilomicroni, VLDL grandi e piccole, IDL, LDL, HDL). Alla fine del test, 6 ore dopo il pasto, è stata eseguita un'agobiopsia del tessuto adiposo sottocutaneo addominale per la determinazione dell'attività della lipasi lipoproteica (LPL) e della lipasi ormono-sensibile (HSL). Il giorno successivo al

pasto test, è stato effettuato un prelievo a digiuno per la determinazione dell'attività della lipasi lipoproteica nel plasma dopo stimolo con eparina.

Composizione delle due diete

	Dieta ricca in CHO, fibre e a basso IG (Dieta C)	Dieta ricca in MUFA, povera in CHO e fibre e a alto IG (Dieta M)
Proteine (%ET)	18	18
Grassi (%ET)	30	37
Saturi (%ET)	6	7
Monoinsaturi (%ET)	17	24
Polinsaturi n-6 (%ET)	7	6
Colesterolo (mg/g)	143	158
Carboidrati (%TE)	52	45
Fibre (g/1000 kcal)	28	8
Indice Glicemico (%)	58	88
Carico Glicemico	137	176

Tab 4.4.a

Analisi statistica I dati sono espressi come Media \pm ES. La risposta postprandiale è stata valutata come area incrementale sotto la curva (*Incremental Area Under Curve*, IAUC) calcolata con il metodo trapezoidale. Le differenze tra le due diete sono state valutate mediante t-test per dati appaiati. Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o tramite test non parametrici. Una $p < 0.05$ è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo a metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

Risultati

Le caratteristiche dei soggetti partecipanti allo studio sono mostrate nella tabella 4.4.b. I dati relativi alle concentrazioni di glucosio e insulina nel plasma a digiuno e dopo il pasto sono mostrati in fig. 4.4.a. I livelli di glucosio ed insulina sono più bassi nella prima parte della curva postprandiale (a 2 ore) alla fine della dieta ricca in CHO e fibre e le glicemie tendono ad essere più elevate dopo questa dieta 6 ore dopo il pasto.

Caratteristiche generali dei soggetti	
Sesso (M/F)	8/3
Età (anni)	59±4
IMC (Kg/m ²)	28±1
Colesterolemia (mg/dl)	159±30
Trigliceridemia (mg/dl)	103±35
HDL-colesterolo (mg/dl)	37±12
Terapia (dieta/I.O.)	8/3
HbA1c (%)	6.6±0.6

Tab.4.4.b

Concentrazioni plasmatiche di glucosio e insulina prima e dopo il pasto test alla fine dei due trattamenti dietetici

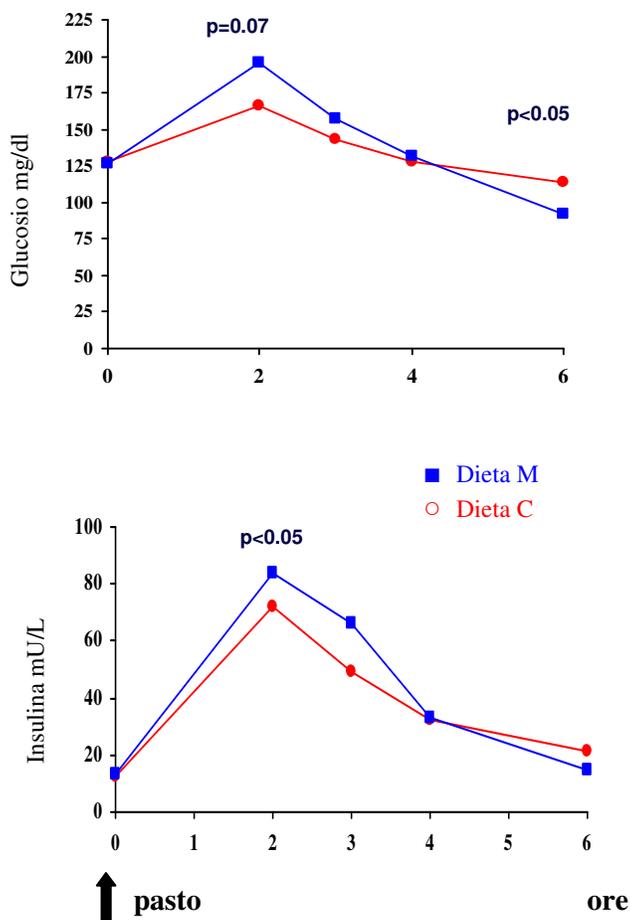


Fig. 4.4.a

Le risposte postprandiali, espresse come aree incrementali (IAUC) di colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle varie frazioni lipoproteiche alla fine dei due trattamenti dietetici sono riportate in tab.4.4.c.

I livelli di colesterolo e trigliceridi plasmatici non mostrano una differenza significativa tra i due approcci dietetici, anche se i livelli di trigliceridi postprandiali valutati alla fine della dieta ricca in carboidrati e fibre risultano più bassi rispetto a quelli ottenuti alla fine della dieta ricca in MUFA (AIC: 164 ± 114 vs 236 ± 148 mg/dl.6 ore, rispettivamente, dieta C vs dieta M, $p=0.09$) (Tab.4.4.c)

Aree incrementali per i trigliceridi (TG) (mg/dl·6ore) e colesterolo (Col) (mg/dl·6ore) nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche dopo un pasto test alla fine dei due interventi dietetici (Dieta M e Dieta C). M±ES *p<0.05 Dieta M vs Dieta C			
		DIETA M	DIETA C
Plasma	Tg	236±44	164±34
	Col	-20±16	-2±6
Chilomicroni	Tg	86±15*	63±10
	Col	3±0.6*	2±0.3
VLDL grandi	Tg	177±34*	127±26
	Col	22±5	12±5
LDL	TG	-7±2.1	-4±1.5
	Col	-20.2±1.4	1.2±6.1
IDL	TG	-4.7±2.6	-3.7±2
	Col	-6.5±2.5	-4.1±1.8
HDL	TG	-10.4±4.5	-10.9±4.4
	Col	-10.4±5.7	-2.2±2.6

Tab.4.4.c

Per quanto riguarda la risposta postprandiale delle lipoproteine ricche in trigliceridi, il contenuto di trigliceridi e di colesterolo dei chilomicroni risulta significativamente più basso alla fine della dieta ricca in CHO, fibre e a basso IG rispetto alla dieta ricca in MUFA (Fig.4.4.c), come risulta in particolare dal calcolo delle aree incrementali sotto le curve (Tab.4.4.c)

L'area incrementale del colesterolo e trigliceridi nelle VLDL grandi risulta più bassa alla fine della dieta ricca in CHO e fibre (Fig.4.4.c) e tale differenza raggiunge la significatività statistica per quanto riguarda i trigliceridi (Tab.4.4.c).

**Concentrazioni di colesterolo e trigliceridi nei chilomicroni e
nelle VLDL grandi dopo pasto test alla fine
dei due periodi dietetici**

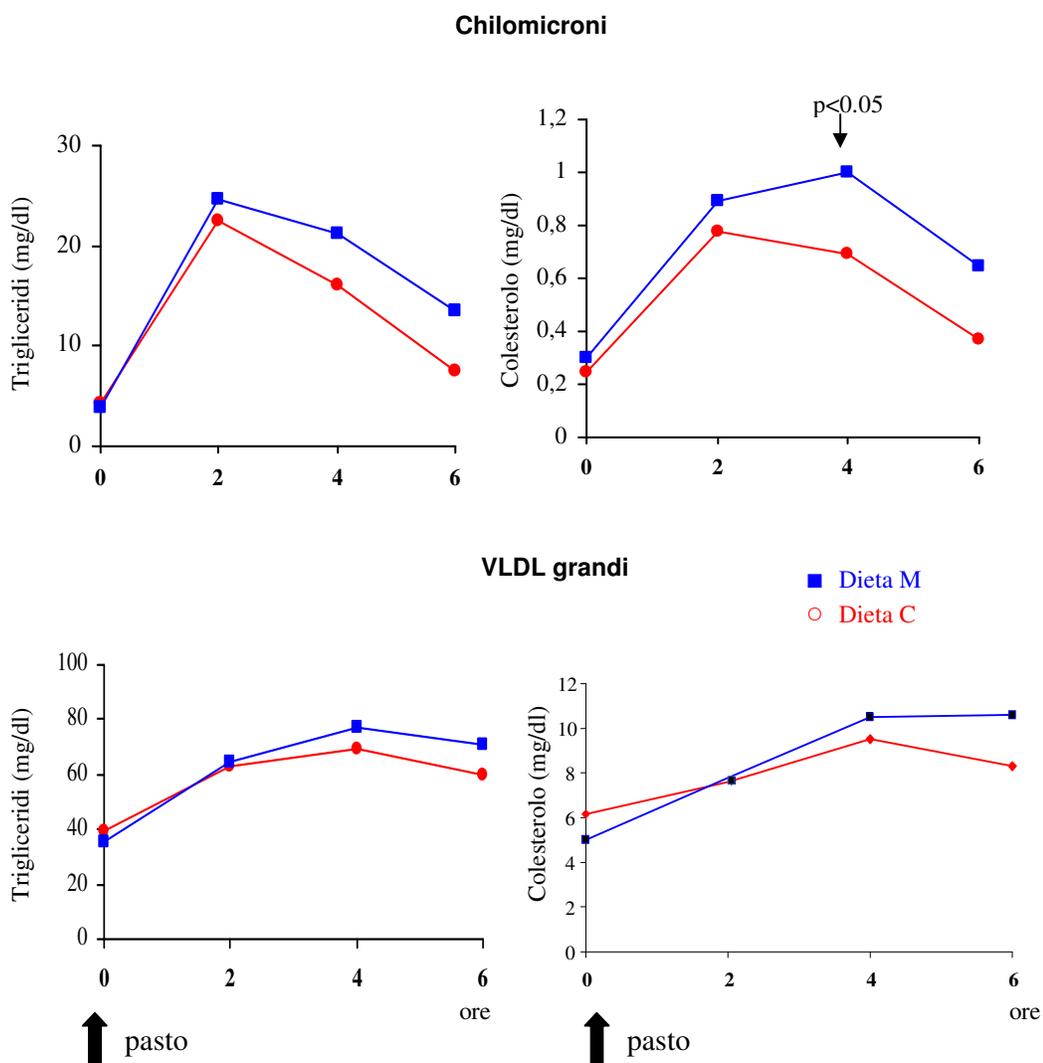


Fig.4.4.c

Le risposte postprandiali di trigliceridi e colesterolo delle LDL e delle HDL non differiscono dopo i due tipi di diete (Tab.4.4.c); invece, le concentrazioni a digiuno del colesterolo in entrambi queste frazioni lipoproteiche diminuiscono significativamente alla fine della dieta ricca in carboidrati e fibre rispetto alla dieta ricca in MUFA (86 ± 6.5 vs 96 ± 7.6 mg/dl, colesterolo LDL; 37.5 ± 3.6 vs 40.6 ± 3.5 mg/dl colesterolo HDL; $p < 0.05$).

L'attività della LPL, totale e rilasciata dall'eparina, e dell'HSL del tessuto adiposo, misurate entrambe in campioni ago biotici di tessuto adiposo prelevati 6 ore dopo il pasto di composizione simile a quella del trattamento dietetico in corso, tendono a ridursi dopo la dieta ricca in CHO e fibre, ma la differenza non è significativa (Fig.4.4.d). Tuttavia sia l'attività totale della LPL che quella rilasciata dall'eparina, risultano leggermente più basse alla fine della dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico rispetto alla dieta ricca in MUFA. Per quanto riguarda l'attività dell'HSL del tessuto adiposo, essa risulta più bassa alla fine della dieta C rispetto alla dieta M, ma anche in questo caso la differenza tra i due approcci dietetici non è statisticamente significativa (Fig.4.4.d).

Attività della LPL e della HSL nel tessuto adiposo 6 ore dopo pasto test alla fine dei due periodo dietetici

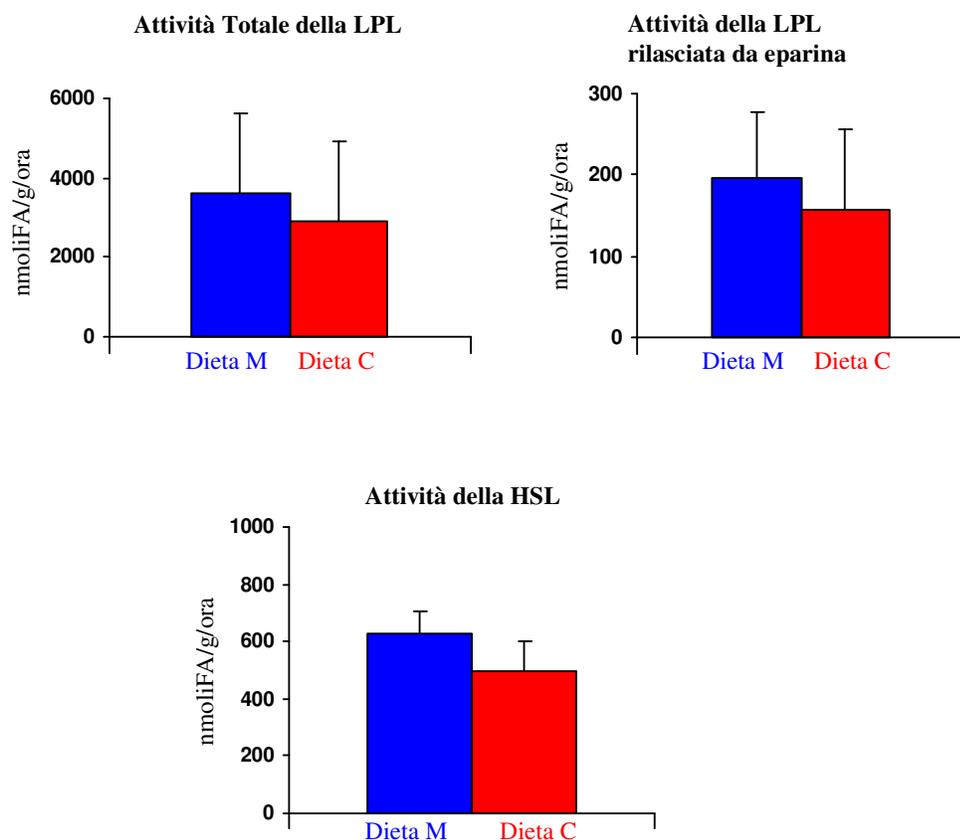


Fig.4.4.d.

Discussione

Questi dati, ancorchè preliminari, indicano che una dieta relativamente ricca in carboidrati (52% dell'energia totale della dieta), ma al tempo stesso ricca in fibre e a basso indice glicemico è in grado di influenzare positivamente la risposta lipidica postprandiale nei pazienti con diabete tipo 2, oltre ai benefici effetti già conosciuti sulla glicemia postprandiale e sul colesterolo LDL. Da questi risultati preliminari non sembra che le attività lipasiche del tessuto adiposo vengano influenzate in maniera importante dai due trattamenti dietetici utilizzati.

5. CONCLUSIONI

Le conclusioni principali che si possono trarre da questo insieme di studi sono:

- 1) L'insulino-resistenza gioca un ruolo fondamentale nel determinismo delle alterazioni lipidiche postprandiali riguardanti le lipoproteine ricche in trigliceridi di origine epatica (VLDL). Invece il diabete di per sé, si associa ad alterazioni lipidiche postprandiali che riguardano anche le lipoproteine ricche in trigliceridi di origine esogena (chilomicroni).
- 2) La ridotta attività della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo sembra essere presente solo nei diabetici e, pertanto, sembra avere un ruolo fondamentale nelle alterazioni delle lipoproteine di origine esogena in fase postprandiale.
- 3) La composizione del pasto sembra poter influire sulla risposta delle attività della LPL e della HSL a livello del tessuto adiposo. In particolare, un pasto molto ricco in grassi, si associa ad un'assenza di variazione di tali attività. Questo potrebbe contribuire a spiegare l'aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi di origine esogena che si ha dopo un pasto particolarmente ricco in grassi.
- 4) Una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi, rispetto ad una ricca in acidi grassi saturi, non determina effetti particolarmente favorevoli in relazione al metabolismo lipidico postprandiale. Anzi sembra determinare una più precoce sintesi dei chilomicroni, che, però, viene rapidamente controbilanciata da un aumento nell'attività della LPL del tessuto adiposo.
- 5) Una dieta relativamente ricca in carboidrati, ricca in fibre e a basso indice glicemico influenza positivamente le alterazioni lipidiche postprandiali dei pazienti con diabete tipo 2. Questi effetti non sembrano associarsi a modifiche sostanziali delle attività lipolitiche del tessuto adiposo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Simpson HS, Williamson CM, Olivecrona T, Pringle S, Maclean J, Lorimer AR, Bonnefous F, Bogaievsky Y, Packard CJ, Shepherd J. Postprandial lipemia, fenofibrate and coronary artery disease. *Atherosclerosis* 85:193-202, 1990
2. Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, Muhlberger V, Knapp E, Dunn JK, Gotto AM, Patsch W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb* 12:1336–1345, 1992.
3. Havel RJ. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 5:102-109, 1994
4. Syvanne M, Taskinen MR. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350 (suppl.1):20-23, 1997
5. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cartin B, Dagenais GR, Lupien PJ, Despres JP. Small dense low density particles as predictors of the risk of ischemic heart disease in men: prospective results of the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 94:69-75, 1997
6. Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low density lipoproteins. *Eur Heart J* 19:24-30, 1998
7. Zilversmith DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 60:473-485, 1979.
8. Goot PHE, Van Stiphout WAHJ, Krauss XH, Jansen H, van Tol A, van Ramshorts E, Chin-On S, Hofman A, Cresswell SR, Havekes L. Postprandial lipoprotein metabolism in normolipidemic men with and without coronary artery disease. *Arterioscl Thromb* 11:653-662, 1991
9. Weintraub MS, Grosskopf I, Rassin T, Miller H, Charach G, Rotmensch HH, Liron M, Rubinstein A, Iaina A. Clearance of chylomicron remnants in normolipidaemic patients with coronary heart disease: case control study over three years. *BMJ* 312:936-939, 1996
10. Mero N, Malmstrom R, Steiner G, Taskinen MR, Syvanne M. Postprandial metabolism of apolipoprotein B 48 and B 100-containing particles in type 2 diabetes mellitus: relation to angiographically verified severity of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 150:167-177, 2000
11. Lupatelli G, Pasqualini L, Siepi D, Marchesi S, Pirro M, Vaudo G, Ciuffetti G, Mannarino E. Increased postprandial lipemia in patient with normolipidemic peripheral arterial disease. *Am Heart J* 143:733-738, 2002

12. Ryu JE, Howard G, Craven TE, Bond MG, Hagan AP, Crouse III JR. Postprandial trygliceridemia and carotid atherosclerosis in middle-aged subjects. *Stroke* 23:823-828, 1992
13. Sharrett AR, Chambless LE, Heiss G, Paton CC, Patsch W. Association of postprandial triglyceride and retinyl palmitate response with asymptomatic carotid artery atherosclerosis in middle-aged men and women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:2122-2129, 1995
14. Teno S, Uto Y, Nagashima H, Endoh Y, Iwamoto Y, Omori Y, Takizawa T. Association of postprandial hypertriglyceridemia and carotid intima-media thickness in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23:1401-1406, 2000
15. Karpe F, De Faire U, Mercuri M, Bond MG, Hellenius ML, Hamsten A. Magnitude of alimentary lipemia is related to intima-media thickness of the common carotid artery in middle-aged men. *Atherosclerosis* 141:307-314, 1998
16. Boquist S, Ruotolo G, Tang R, Bjorkegren J, Bond MG, De Faire U, Karpe F, Hamsten A. Alimentary lipemia, postprandial triglyceride-rich lipoproteins, and common carotid intima-media thickness in healthy, middle-aged men. *Circulation* 1010:723-728,1999
17. Rapp JH, Lespine A, Hamilton RL, Colyvas N, Chaumeton AH, Tweedie-Hardman J, Kotite L, Kunitake ST, Havel RJ, Kane JP. Triglyceride-rich lipoproteins isolated by selective-affinity anti-apolipoprotein B immunosorption from human atherosclerotic plaque. *Arter Thromb* 14:1767-1774, 1994
18. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-S420, 1999
19. Silveira A, Karpe F, Johnsson H, Bauer KA, Hamsten A. In vivo demonstration in humans that large triglyceride-rich lipoproteins activate coagulation factor VII through the intrinsic coagulation pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1333-1339, 1996
20. Miller GJ, Martin JC, Mitropoulos KA, Reeves BEA. Plasma factor VII is activated by postprandial triglycerodemia, irrespective of dietary fat consumption. *Atherosclerosis* 86:163-171, 1991
21. Hyson DA, Paglieroni TG, Wun T, Rutledge JC. Postprandial lipemia is associated with platelet and monocyte activation and increased monocyte cytokine expression in normolipemic men. *Clin Appl Thromb Hemost* 8:147-155, 2002

22. Van Oostrom AJ, Sijmonsma TP, Verseyden C, Jansen EH, De Koning EJ, Rabelink TJ, Castro Cabezas M. Postprandial recruitment of neutrophils may contribute to endothelial dysfunction. *J Lipid Res* 44:576-583, 2003
23. Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilatation. *Am J Cardiol* 88:31E-34E, 2001
24. Ong PJ, Dean TS, Hayward CS, Della Monica PL, Sanders TA, Collins P. Effect of fat and carbohydrate consumption on endothelial function. *Lancet* 354:2134, 1999
25. Gaenger H, Sturm W, Neumayr G, Kirchmair R, Ebenbichler C, Ritsch A, Foger B, Weiss G, Patsch JR. Pronounced postprandial lipemia impairs endothelium-dependent dilation of the brachial artery in men. *Cardiovasc Res* 52:509-516, 2001
26. Evans M, Anderson RA, Graham J, Ellis GR, Morris K, Davies S, Jackson SK, Lewis MJ, Frenneaux MP, Rees A. Ciprofibrates therapy improves endothelial function and reduces postprandial. *Circulation* 101:1773-1779, 2000
27. Hotamisligil G.S. Molecular mechanism of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:S23-S27, 2000
28. Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des* 9:1023-1031, 2003
29. Ronti T, Lupattelli G, Mannarino E. The endocrine function of adipose tissue: an update. Review. *Clin End* 64:355-365, 2006
30. Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. Review. *Trends in Endocr Metab*, 14:137-145, 2003
31. Arner P. Free fatty acids- do they play a central role in type 2 diabetes? *Diabetes Obes Metab* 3:11-19, 2001
32. Lewis G.F. Carpentier A. Adeli K. Giacca A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrine Review* 23:201-229, 2002
33. Iverius PH, Ostlund-Lindqvist AM. Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization, and molecular weight analysis. *J Biol Chem* 251 (24): 7791-7795, 1976
34. Hide WA, Chan L, Wen-Hsiung L. Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 33:167-178, 1992
35. Van Tilbeurgh H, Roussel A, Lalouel JM, Cambillau C. Lipoprotein lipase. Molecular model based on the pancreatic lipase x-ray structure: consequences for heparin binding and catalysis. *J Biol Chem* 269 (6):4626-4633, 1994

36. Vannier C, Ailhaud G. Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. II. Processing, subunit assembly and intracellular transport. *J Biol Chem* 264:3206-3216, 1989
37. Auwerx J, Leroy P, Schoonjans K. Lipoprotein lipase: recent contributions from molecular biology. *Crit Rev Clin Lab Sci* 29:243-68, 1992
38. Santamarina-Fojo S. Genetic dyslipoproteinemias: role of lipoprotein lipase and apolipoprotein C-II. *Curr Opin Lipidol* 3:186-95, 1992
39. Goldberg IJ. Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37:693-707, 1996
40. Eckel RH. Lipoprotein Lipase. A multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320 (16):1060-8, 1989
41. Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ. Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1123:1-17, 1992
42. Braun JEA, Severson DL. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochemical Journal* 287:337-347, 1992
43. Hemila H, Koivula TT, Palva I. Hormone-sensitive lipase is closely related to several bacterial proteins, and distantly related to acetylcholinesterase and lipoprotein lipase: identification of a superfamily of esterases and lipases. *Biochim Biophys Acta* 1210:249-253, 1994
44. Holm C, Osterlund T, Laurell H, Contreras JA. Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Ann Rev Nutr* 20:235-393, 2000
45. Holm C, Kirchgessner TG, Svenson KL, Fredriksson G, Nilsson S, Miller CG, Shively JE, Heinzmann C, Sparkes RS, Mohandas T. Hormone-sensitive lipase: sequences, expression, and chromosomal localization to 19 cent-q13.3. *Science* 241: 1503-1506, 1988
46. Shen WJ, Patel S, Hong R, Kraemer FB. Hormone-sensitive lipase functions as an oligomer. *Biochemistry* 39:2392-2398, 2000
47. Fredrikson G, Belfrage P. Positional specificity of hormone-sensitive lipase from rat adipose tissue. *J Biol Chem* 258:14253-14256, 1983
48. Fredrikson G, Tornqvist H, Belfrage P. Hormone-sensitive lipase and monoacylglycerol lipase are both required for complete degradation of adipocyte triacylglycerol. *Biochim Biophys Acta* 876:288-293, 1986
49. Clifford GM, Londos C, Kraemer FB, Vernon RG, Yeaman SJ. Translocation of hormone-sensitive lipase and perilin upon lipolytic stimulation of rat adipocytes. *J Biol Chem* 275:5011-5015, 2000

50. Cryer A, Riley SE, Williams ER, Robinson DS. Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post- heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat- cells and to plasma insulin concentrations. *Clinical Science and Molecular Medicine* 50:213-221,1976
51. Kaciuba-Uscilko H, Dudley DA, Terjung RL. Influence of thyroid status on skeletal muscle LPL activity and TG uptake. *American Journal of Physiology* 238:E518-E523, 1980
52. Borensztajn J. Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase. In *Lipoprotein Lipase* 133-148, 1987 (Borensztajn J. editor) Chicago, IL: Evener.
53. Frayn KN, Coppak SW, Fielding BA, Humphreys SM. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Advances in Enzyme Regulation* 35:163-78, 1995
54. Lithell H, Boberg J, Hellsing K, Lundqvist G, Vessby B. Lipoprotein lipase activity in human skeletal muscle and adipose tissue in the fasting and the fed states. *Atherosclerosis* 30:89-94, 1978
55. Taskinen MR, Nikkila EA, Kuusi T, Harno K. Lipoprotein lipase activity and serum lipoproteins in untreated type 2 (insulin- independent) diabetes associated with obesity. *Diabetologia* 22:46-50, 1982
56. Syvanne M, Taskinen MR: Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350, S120-123, 1997.
57. Taskinen MR: Pathogenesis of dislipidemia in type 2 diabetes: *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109S, S180-188, 2001.
58. Ginsberg HN, Illingworth R: Postprandial dislipidemia: an atherogenic disorder common in patients with diabetes mellitus: *Am J Cardiol* 88(suppl), H9-H15, 2001.
59. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA: Post-prandial triglyceride profile in a population-based sample of type 2 diabetic patients: *Diabetologia* 47:19-22, 2004.
60. Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Annuzzi G: Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J. Clin Endocrinol Metab* 89:2153-2159, 2004.
61. Jeppesen J, Hollenbeck CB, Zhou MY, Coulston AM, Jones C, Chen YD, Reaven GM: Relation between insulin resistance, hyperinsulinemia, postheparin plasma

- lipoprotein lipase activity, and postprandial lipemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:320-324, 1995.
62. Axelsen M, Smith U, Eriksson JW, Taskinenn MR, Jansson PA. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 131:27-31, 1999.
 63. AnnuzziG., De Natale C, Iovine C, Patti L, Di Marino L, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Rivellese AA. Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2397-402, 2004.
 64. Roust LR, Jensen MD. Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity: *Diabetes* 42:1567-1573, 1993.
 65. Couillard C, Bergeron N, Prud'homme D, Bergeron J, Tremblay A, Bouchard C, Mauriege P, Despres JP. Postprandial triglyceride response in visceral obesity in men. *Diabetes* 47:953-60, 1998.
 66. Keys A. Seven Countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge, Mass: Harvard University Press 1980
 67. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition and heart disease. *Am J Clin Nutrition* 75:191-212, 2002
 68. Rivellese AA. Diet and cardiovascular disease: beyond cholesterol. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular disease. NMCD* 15: 395-398, 2005
 69. Green MH, Massaro ER, Green JB. Multi compartmental analysis of the effects of dietary fat saturation and cholesterol on absorptive lipoprotein metabolism in the rat. *Am J Clin Nutr* 40:82-94, 1984
 70. van Heek M, Zilversmit DB. Postprandial lipemia and lipoprotein lipase in the rabbit are modified by olive and coconut oil. *Arteriosclerosis* 10:421-429, 1990
 71. Groot PHE, de Boer BCJ, Haddeman E, Houtsmuller UMT, Hulsmann WC. Effect of dietary fat composition on the metabolism of triacylglycerol-rich plasma lipoproteins in the postprandial phase in meal-fed rats. *J Lipid Res* 29:541-555, 1988
 72. Levy E, Roy CC, Goldstein R, Bar-On H, Ziv E. Metabolic fate of chylomicrons obtained from rats maintained on diets varying in fatty acid composition. *J Am Coll Nutr* 10:69-78, 1991
 73. Lai HC, Ney DM. Corn oil, palm oil and butter fat fractions affect postprandial lipemia and lipoprotein lipase in meal fed rats. *J Nutr* 125:1536-1545, 1995

74. Murphy MC, Zampelas A, Puddicombe SM, Furloger NP, Morgan LM, Williams CM. Pretranslational regulation of the expression of the lipoprotein lipase gene by dietary fatty acids. *Br J Nutr* 70:727-736, 1993
75. Williams C. Postprandial metabolism: effects of dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc* 56:679-692, 1997
76. De Bruin TWA, Brouwer CB, Van Linde-Sibbenius Trip M, Jansen H, Erkeiens DW. Different postprandial metabolism of olive oil and soybean oil: a possible mechanism of the high-density lipoprotein conserving effect of olive oil. *Am J Clin Nutrition* 58:477-483, 1993
77. Lichtenstein AH, Ausmann LA, Garrasco W, Jenner JL, Gualtieri LJ, Ordovas JM, Schaefer EJ. Effect of canola, corn, and olive oils on fasting and postprandial lipoproteins in humans as part of a national cholesterol education program step 2 diet. *Arterioscler Thromb* 13: 1533-1542, 1993
78. Tholstrup T, Sandstrom B, Bysted A, Holmer G. Effect of 6 dietary fatty acids on the postprandial profile, plasma fatty acids, lipoprotein lipase and cholesterol ester transfer activities in healthy young men. *Am J Clin Nutr* 73: 198-208, 2001
79. Thomsen C, Storm H, Holst JJ, Hermansen K. Differential effects of saturated and monounsaturated fats on postprandial lipemia and glucagon-like peptide 1 response in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 77:605-611, 2003
80. Mekki N, Charbonnier M, Borel P, Leonardi J, Juhel C, Portugal H, Lairon B. Butter differs from olive oil and sunflower oil in its effect on postprandial lipemia and triacylglycerol-rich lipoproteins after single mixed meals in healthy young men. *J Nutr* 132:3642-3649, 2002
81. Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow J. dietary polyunsaturated fats of the ω -6 and ω -3 series reduce postprandial lipoprotein levels. *J Clin Invest* 82:1884-1893, 1988
82. Khan S, Minihane AM, Talmud PJ. Dietary long chain n-3 PUFAs increase gene expression in adipose tissue of subjects with an atherogenic lipoprotein phenotype. *J Lipid Res* 43:979-985, 2002
83. Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res* 44:455-463, 2003
84. Rivellese AA, Maffettone A, Vessby B, Uusitupa M, Hermansen K, Berglund L, Louheranta A, Meyer BJ, Riccardi G. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and postprandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis* 167:149-158, 2003

85. Annuzzi G, De Natale C, Iovine C, Patti L, Di Marino L, Coppola S, Del Prato S, Riccardi G, Rivellese AA. Insuline resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2397-2402, 2004
86. Steiner G. Hypertriglyceridemia and carbohydrate intolerance: interrelations and therapeutic implications. *Am J Cardiol* 57:27G-30G, 1986
87. Nestel J, Carrol KF, Havenstein N. Plasma triglyceride response to carbohydrates, fats and caloric intake. *Metabolism* 19:1-18, 1970
88. Rodriguez-Villar C, Manzanares JM, Casals E. High-monounsaturated fat, olive oil-rich diet has effects similar to a high-carbohydrate diet on fasting and postprandial state and metabolic profiles of patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 49:1511-1517, 2000
89. Campbell LV, Marmot PE, Dyer JA, Borkman M, Storlien LH. The high-monounsaturated fat diets as a practical alternative for NIDDM. *Diabetes Care* 17:177-182, 1994
90. Chen Y-Di, Coulston AM, Zhou MY, Hollenbeck CB, Reaven GM. Why do low-fat high-carbohydrate diets accentuate postprandial lipemia in patients with NIDDM? *Diabetes Care* 18:10-16, 1995
91. Georgopoulus A, Bantle JP, Noutsou M, Swaim WR, Parker SJ. Differences in the metabolism of postprandial lipoproteins after a high-monounsaturated-fat versus a high-carbohydrate diet in patient with type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18:773-782, 1998
92. Ikeda I, Tomari Y, Sugano M. Interrelated effects of dietary fiber and fat on lymphatic cholesterol and triglyceride absorption in rats. *J Nutr* 119:1383-1387, 1989
93. Anderson JW, Tietyen-Clark J. Dietary fiber: hyperlipidemia, hypertension and coronary heart disease. *Am J Gastroenterol* 81:907-919, 1986
94. Ripsin CM, Keenan JM, Jacobs DR. Oat products and lipid lowering. A meta-analysis. *JAMA* 267:3317-3325, 1992
95. Glore SR, Van Treeck D, Knehans AW, Guild M. Soluble fibre and serum lipids: a literature review. *J Am Diet Assoc* 94:425-436, 1994
96. Lairon D. Dietary fibres: effects on lipid metabolism and mechanisms of action. *Eur J CLin Nutr* 50:125-133, 1996

97. Cherbut C, Barry JL, Lairon D, Duran M. Dietary fibre. Mechanism of action in human physiology and metabolism. Proceedings of a European Conference, Nantes, June 20-22, Paris: John Libbey Eurotext, 1995
98. Dubois C, Armand M, Senft M, Portugal H, Pauli AM, Bernard PM, Lafont H, Lairon D. Chronic oat bran intake alters postprandial lipemia and lipoproteins in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 61, 352-333, 1995
99. Anderson JW, O'Neal DS, Riddel-Mason S, Floore TL, Dillon DW, Oeltgen PR. Postprandial serum glucose, insulin, and lipoprotein responses to high- and low-fiber diets. *Metabolism* 44, 848-854, 1995
100. Mekki N, Dubois C, Charbonnier M, Cara L, Senft M, Pauli AM, Portugal H, Gassin AL, Lafont H, Lairon D. Effects of lowering fat and increasing dietary fiber on fasting and postprandial plasma lipids in hypercholesterolemic subjects consuming a mixed Mediterranean-Western diet. *Am J Clin Nutr* 66:1443-1451, 1997
101. Kimura H, Okharu Y, Katoh K, Ishii H, Sunahara N, Takagi A, Ikeda Y. Development and evaluation of a direct sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of lipoprotein lipase mass in human plasma. *Clin Bioch* 32 (1): 15-23,1999
102. Wicher I, Sattler W, Ibovnik A, Kostner GM, Zechner R, Malle E. Quantification of lipoprotein lipase (LPL) by dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay. Comparison of immunoreactivity of LPL mass and enzyme activity of LPL. *J Immunol Meth* 192: 1-11,1996
103. Klose G, De Grella R, Greten H. A comparative study of human tissue and post-heparin plasma triglyceride lipases. *Atherosclerosis* 25 (2-3): 175-82, 1976
104. Olivecrona T, Bengtsson G, Marklund SE, Lindahl U, Hook M. Heparin-lipoprotein lipase interactions. *Fed Proc* 36 (1):60-5, 1977
105. Nilsson- Ehle P, Ekman. Rapid, simple and specific assays for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery* 3 (3): 194-209,1977
106. Nozake S, Masaharu K, Matsuzawa Y, Seiichiro T. Sensitive non-radioisotopic method for measuring lipoprotein lipase and hepatic triglyceride lipase in post-heparin plasma. *Clin Chem* (30/5):748-51, 1984
107. Duque M, Graupner M, Stutz H, Wicher I, Zechner R, Paltauf F, Hermetter A. New fluorogenic triacylglycerol analogs as substrates for the determination and chiral discrimination of lipase activities. *J Lipid Res* 37:868-76,1996

108. Zandonella G, Haalck L, Spener F, Faber K, Paltauf F, Hermetter A. Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacyl glycerols. Effect of substrate solubilisation. *Eur J Biochem* 231(1):50-5, 1995
109. Eguchi Y. Analysis of lipoprotein lipase activity using high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 16:500-3, 2002
110. Taskinen MR, Nikkila EA, Huttunen JK, Hilden H. A micromethod for assay of lipoprotein lipase activity in needle biopsy samples of human adipose tissue and skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 104:107-17, 1980
111. Nilsson-Ehle P, Ekman R. Rapid, simple and specific assay for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery* 3:194-209, 1977
112. Belfrage P, Vaughan M. Simple liquid-liquid partition system for isolation of labelled oleic acid from mixtures with glycerides. *J Lipid Res* 10:341-344, 1969
113. Panarotto D, Remillard P, Bouffard L, Maheux P. Insulin resistance affects the regulation of lipoprotein lipase in the postprandial period and in adipose tissue specific manner. *Eur J Clin Invest* 32:84-92, 2002
114. Watt MJ, Carey AL, Wolsk-Petersen E, Kraemer FB, Pedersen BK, Febbraio MA. Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion. *Diabetologia* 48:105-112, 2005
115. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patané G, Boggi U, Piro S, Anello M, Mosca F, Di Mario U, Marchetti P: Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and caspase-mediated, pro-apoptotic effects on human pancreatic beta-cells. *Diabetes* 1(5):1437-1442, 2002
116. Zicari A, Ticconi C, Realacci M, Cela O, Santangelo C, Pietropolli A, Russo MA, Piccione E: Hormonal regulation of cytokine release by human fetal membranes at term gestation: effects of progesterone on tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta 1 output. *J Reprod Immunol* 56(1-2):123-136, 2002
117. Laurell H, Grober J, Vindis C, Lacombe T, Dazatas M, Holm C, Langin D. Species-specific alternative splicing generates a catalytically inactive form of human hormone-sensitive lipase. *Biochem J* 32: 8137-8143, 1997
118. Patti L, rubba F, Coppola S, Rivellese AA. Lipemia postprandiale: implicazioni cliniche e problemi metodologici. *Giorn Ital Diabetol* 19:169-176, 1999
119. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA. Post-prandial triglyceride profile in a population-based sample of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:19-22, 2004

120. Iovine C, Gentile A, Romano G, Hattemer A, Pacioni D, Riccardi G, Rivellese AA. Self-monitoring of plasma triglyceride levels to evaluate postprandial response to different nutrients. *Metabolism* 53:620-623, 2004
121. Heine RJ, Dekker JM. Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease. *Diabetologia* 45:461-475, 2002
122. Hatch FT, LeesRS. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. In: Paoletti R, Kritchevsky D (Eds): *Advances in lipid research*. Academic Press, London 6:1-68, 1989
123. Smith D, Proctor SD, Mamo JCL. A highly sensitive assay for quantitation of apolipoprotein B48 using an antibody to human apolipoprotein B and enhanced chemiluminescence. *Ann Clin Biochem* 34:185-189, 1997
124. Karpe F, Hamsten A. Determination of apolipoprotein B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res* 35:1311-1317, 1994
125. Redgrave TG, Carlson LA. Changes in plasma very low density and low density lipoprotein content, composition and size after a fatty meal in normo- and hypertriglyceridemic man. *J Lipid Res* 20:217-230, 1979
126. Karpe F, Steiner G, olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A. Metabolism of triglyceride-rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest* 91:748-759, 1993
127. Demacker PNM. Diets and posprandial lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 6:43-47, 1995
128. Karpe F. Effect of diet on postprandial lipemia: a suggestion for methodological standardization. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 7:44-55, 1997
129. Bergeron N, Havel RJ. Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 8:43-52, 1997
130. Murphy MC, Isherwood SG, Sethi S, Gould BJ, Wright JW, Knapper JA, Williams CM. Postprandial lipid and hormone responses to meals of varying fat contents: modulatory role of lipoprotein lipase? *Eur J Clin Nutr* 49:578-588, 1995
131. Cohen JC. Chylomicron triglyceride clearance: comparison of three assessment methods. *Am J Clin Nutr* 49:306-313, 1989
132. Annuzzi G, Holmquist L, Carlson LA. Concentrations of apolipoproteins B, C-I, C-II, C- III, E and lipids in serum and serum lipoproteins in normal subjects during alimentary lipemia. *Scand J Clin Lab Invest* 49:73-81, 1989

133. Annuzzi G, Jansson E, Kaijser L, Holmquist L, Carlson LA. Increased removal rate of exogenous triglycerides after prolonged exercise: time course and effect of exercise duration. *Metabolism* 36:438-443, 1987
134. Berr F, Eckel RH, Kern F. contraceptive steroids increase hepatic uptake of chylomicron remnants in healthy young women. *J Lipid Res* 27:645-651, 1986
135. Redgrave TG, Carlson LA. Changes in plasma very low density and low density lipoprotein content, composition, and size after a fatty meal in normo- and hypertriglyceridaemic man. *J Lipid Res* 20:217-229, 1979
136. Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A. Metabolism of triglyceride rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest.* 91(3):748-58, 1993
137. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA. Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 23:882-884, 1997
138. Karpe F, Hamsten A. Determination of apolipoproteins B-48 and B-100 in triglyceride-rich lipoproteins by analytical SDS-PAGE. *J Lipid Res* 35:1311-1317, 1994
139. Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, Patti L, Iovine C, Coppola S, DelPrato S, Riccardi G, Annuzzi G. Exogenous and endogenous postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients with optimal blood glucose control and optimal fasting triglyceride levels. *J Clin Endocrinol Metab.* 89(5):2153-2159, 2004
140. Syvanne M, Hilden H, Taskinen MR. Abnormal metabolism of postprandial lipoproteins in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus is not related to coronary artery disease. *J Lipid Res* 35:15-26, 1994
141. Chen YD, Swami S, Skowronski R, Coulston A, Reaven GM. Differences in postprandial lipaemia between patients with normal glucose tolerance and noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 76:172-7, 1993
142. Eliasson B, Mero N, Taskinen MR, Smith U. The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis* 129:79-88, 1997
143. Axelsen M, Smith U, Eriksson JW, Taskinen M-R, Jansson P-A. Postprandial hypertriglyceridemia and insulin resistance in normoglycemic first-degree relatives of patients with type 2 diabetes. *Ann Intern Med* 131:27-31, 1999
144. Nilsson-Ehle P, Carlstrom S, Belfrage P. Rapid effect on lipoprotein lipase activity in adipose tissue of humans after carbohydrate and lipid intake. *Scand J Clin Lab Invest* 35:373-8, 1975

145. Sadur CN, Eckel RH. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* 69:1119-25, 1982
146. Kovar J, Fejfarova V, Pelikanova T, Poledne R. Hyperglycemia downregulates total lipoprotein lipase activity in humans. *Physiol Res* 53:61-8, 2004
147. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45(9): 1201-1210, 2002
148. Goldberg IJ, Kako Y, Lutz EP. Responses to eating: lipoproteins, lipolytic products and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11:235-241, 2000
149. Watt M.J, Carey A.L, Wolsk-Petersen E, Kraemer F.B, Klarland Pedersen B, Febbraio MA. Hormone-sensitive lipase is reduced in the adipose tissue of patients with type 2 diabetes mellitus: influence of IL-6 infusion. *Diabetologia* 48:105-112, 2005
150. Okazaki H, Igarashi M, Nishi M, Tajima M, Sekiya M, Okazaki S, Yahagi N, Ohashi, Tsukamoto K, Amemiya-Kudo M, Matsuzaka T, Shimano H, Yamada N, Aoki J, Morikawa R, Takanezawa Y, Arai H, Nagai R, Kadowaki T, Osuga J, Ishibashi S. Identification of a novel member of the carboxylesterase family that hydrolyzes triacylglycerol. A potential role in Adipocyte Lipolysis. *Diabetes* 55:2091-2097, 2006
151. Eriksson JW, Buren J, Svensson M, Olivecrona T, Olivecrona G. Postprandial regulation of blood lipids and adipose tissue lipoprotein lipase in type 2 diabetes patients and healthy control subjects. *Atherosclerosis* 166:359-367, 2003
152. Nilsson-Ehle P, Calstrom S, Belfrage P. Rapid effect on lipoprotein lipase activity in adipose tissue after carbohydrate and lipid intake. Time course and relation to plasma glycerol, triglyceride, and insulin levels. *Scand J Clin Lab Invest* 35:373-378, 1975
153. Frayn KN, Coppak SW, Fielding BA, Humphreys SM. Coordinated regulation of hormone-sensitive lipase and lipoprotein lipase in human adipose tissue in vivo: implications for the control of fat storage and fat mobilization. *Advan Enzyme Regul* 35:163-178, 1995
154. Williams CM. Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. *Atherosclerosis*. 141 Suppl 1:S87-92. Review. 1998
155. Sanders TA. Dietary fat and postprandial lipids. *Curr Atheroscler Rep*. 5(6):445-51. Review. Nov 2003
156. Parks EJ. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr Atheroscler Rep* 3:462-470, 2001

157. Jackson KG, Robertson MD, Fielding BA, Frayn KN, Williams CM. 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.* 76(5):942-9, 2002
158. Roche HM, Zampelas A, Knapper JM, Webb D, Brooks C, Jackson KG, Wright JW, Gould BJ, Kafatos A, Gibney MJ, Williams CM. Effect of long-term olive oil dietary intervention on postprandial triacylglycerol and factor VII metabolism. *Am J Clin Nutr.* 68(3):552-60, 1998
159. Garg A. High monounsaturated fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 67(suppl): 577S-582S, 1998
160. Rivellese AA, Riccardi G, Giacco A, Pacioni D, Genovese S, Mattioli PL, Mancini M. Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet* 2:447-450, 1980
161. Simpson HGR, Simpson RW, Lousley S, Carter RD, Geeki M, Hockaday TD, Mann JI. A high carbohydrate leguminous fibre diet improves all aspect of diabetic control. *Lancet* 1:1-5, 1981
162. Mann J. Dietary fibre and diabetes revisited. *Eur J Clin Nutr* 55:919-921, 2001
163. Chandalia M, Garg A, Lutjohann D, von Bergmann K, Grundy SM, Brinkley LJ. Beneficial effects on high dietary fibre intake in patients with type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 342:1392-1398, 2000

8. APPENDICE: Pubblicazioni

LAVORI IN EXTENSO

1. *“Lipasi Lipoproteica: funzione e significato clinico”*. Review.
G. Costabile, L. Di Marino, G. Annuzzi, P. Massaro, G. Riccardi, AA. Rivellese.
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli.
Giornale Italiano di Diabetologia e Metabolismo 2007; 27:82-92
2. *“Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independent of obesity and whole-body insulin resistance. Diabetes, obesity, and postprandial lipids”*. G. Annuzzi, R. Giacco, L. Patti, L. Di Marino, C. De Natale, M. Marra, C. Santangelo, R. Masella, G. Costabile, A.A. Rivellese. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease: accettato per la pubblicazione.
3. *“Fasting and postprandial adipose tissue lipolytic activities (LPL-HSL) and RNA expression in normal weight, obese and obese diabetic individuals”*. G. Costabile, G. Annuzzi, L. Di Marino, C. De Natale, R. Giacco, P. Cipriano, R. Masella, G. Riccardi, A.A. Rivellese. Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli; CNR Avellino, ISS Roma. Sottomesso a European Journal of Clinical Investigation
4. *“Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes”*. AA Rivellese, R. Giacco, G. Annuzzi, C. De Natale, L. Patti, L. Di Marino, V. Minerva, G. Costabile, C. Santangelo, R. Masella, G. Riccardi. Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli; CNR Avellino, ISS Roma. Clinical Nutrition 2007.

ABSTRACTS

1. *“Adipose tissue lipoprotein lipase and hormone-sensitive lipase activities in relation to insulin resistance, diabetes and obesity”*. G. Costabile, L. Di Marino, *R. Giacco, C. De Natale, G. Riccardi, A.A. Rivellese, G. Annuzzi. Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli; *CNR Avellino. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease
2. *“Diete ricche in acidi grassi saturi o monoinsaturi: possibili effetti sulla resistenza insulinica e sulla lipemia postprandiale nel diabete mellito tipo 2”*. P. Massaro, G. Annuzzi, R. Giacco, L. Di Marino, L. Patti, C. De Natale, G. Costabile, C. Santangelo, R. Masella, A. Giacco, G. Riccardi, AA. Rivellese.

Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli;
CNR Avellino, ISS Roma. *G It Diabetol Metab* 2007; 27:110

3. “An optimal dietary approach for treating postprandial lipid abnormalities in type 2 diabetic patients”. AA Rivellese, C. De Natale, L. Patti, G. Costabile, L. Bozzetto, G. Riccardi, G. Annuzzi. Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli. *Atherosclerosis* 2007; 8:167 P020-614.
4. “High-CHO/high-fibre diet vs. low-CHO/high-MUFA diet: which is the better approach to improve postprandial lipid abnormalities in Type 2 diabetic patients?” G. Annuzzi, C. De Natale, L. Patti, L. Bozzetto, O. Ciano, G. Costabile, P. Massaro, G. Riccardi, AA. Rivellese. Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università Federico II, Napoli. *Diabetologia* 2007; 50: S328 P0794.