

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI  
FEDERICOII**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA IN  
FISIOPATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE**

**XXI CICLO**

**COORDINATORE: Prof. Gianni Marone**



**Alterazioni lipidiche postprandiali nel diabete tipo 2:  
ruolo del diabete di per sé e valutazione di differenti  
approcci nutrizionali**

**Tutor:  
Prof.ssa A.A. Rivellese**

**Dottoranda:  
Claudia De Natale**

## INDICE

<b>RIASSUNTO</b>		<b>4</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b>		<b>8</b>
1.1	Metabolismo postprandiale delle lipoproteine	8
1.2	Alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale	9
1.3	Alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale nel diabete tipo 2 e nell'obesità	10
1.4	Ruolo dell'insulino-resistenza e del tessuto adiposo nel determinare le alterazioni lipidiche in fase posprandiale	17
1.5	Effetti di interventi nutrizionali sulla lipemia postprandiale e sulle attività lipolitiche del tessuto adiposo	19
<b>2. SCOPI</b>		<b>22</b>
<b>3. METODOLOGIE UTILIZZATE</b>		<b>24</b>
3.1	Valutazione della lipemia postprandiale	24
3.1.a	Separazione delle lipoproteine	27
3.1.b	ApoB-48 e ApoB-100	27
3.2	Misurazione della LPL e della HSL	28
3.2.a	Misurazione dell'attività della LPL del tessuto adiposo	29
3.2.b	Misurazione dell'attività della HSL nel tessuto adiposo	
3.2.c	Espressione genica della LPL e della HSL del tessuto adiposo	31
3.2.d	Altre determinazioni	32
<b>4. STUDI</b>		<b>33</b>
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	33
4.2	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. 2	44
4.3	Effetti di una dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico sulle alterazioni lipidiche postprandiali del diabete tipo 2. Studio n. 3	54
4.4	Effetti di alimenti funzionali arricchiti in fibre vegetali, acidi grassi n- 3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con lievi alterazioni del metabolismo lipidico. Studio n. 4	
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>74</b>
<b>7.</b>	<b>APPENDICE: Pubblicazioni</b>	<b>86</b>

## RIASSUNTO

Le alterazioni del metabolismo lipidico postprandiale sono strettamente correlate al rischio di malattie cardiovascolari. Tali alterazioni sono molto frequenti nel diabete tipo 2 e in altre condizioni caratterizzate da insulino-resistenza, come ad esempio nell'obesità. Tuttavia non è chiaro il ruolo del diabete di per sé nel determinismo di tali alterazioni. Considerata l'importanza delle alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale è necessario individuare le strategie terapeutiche più idonee per la loro correzione. Pertanto, 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 (**Studio 1**, pubblicato su *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease* 2008).
2. Valutare gli effetti degli acidi grassi monoinsaturi vs gli acidi grassi saturi della dieta sulla lipemia postprandiale e sulle lipasi del tessuto adiposo nel diabete di tipo 2 (**Studio 2**, pubblicato su *Clinical Nutrition* 2008).
3. 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 (**Studio 3**, inviato a *Diabetologia*).
4. Valutare gli effetti di alimenti funzionali arricchiti in fibre vegetali, acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con lievi alterazioni del metabolismo lipidico (**Studio 4**).

**Studio 1.** Hanno partecipato allo studio 10 soggetti con diabete tipo 2 ed obesità, 11 soggetti solo con obesità e 11 soggetti sani normopeso, tutti con normali livelli plasmatici a digiuno di trigliceridi e di colesterolo. Prima e per le 6 ore successive ad un pasto test ricco in grassi sono stati effettuati prelievi ematici per la determinazione dei livelli di colesterolo, trigliceridi, apoB-48 ed apo B-100 nelle lipoproteine del plasma, separate mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità discontinuo. L'attività della LPL a digiuno e postprandiale (dopo 6 ore) è stata determinata in campioni agobiopici di tessuto adiposo sottocutaneo addominale. La sensibilità insulinica è stata determinata mediante clamp euglicemico iperinsulinemico.

I soggetti obesi-diabetici e i soggetti obesi presentano un simile grado di adiposità (IMC, circonferenza vita, massa grassa) e di insulino-resistenza (M e M/I). Essi similmente

mostrano anche una maggiore concentrazione postprandiale di trigliceridi nelle VLDL grandi (Area incrementale dei trigliceridi:  $188\pm 28$  e  $135\pm 22$  mg/dl·6 ore) rispetto ai controlli ( $87\pm 13$  mg/dl·6ore,  $M\pm ES$ ,  $p<0.05$ ). Gli obesi-diabetici mostrano valori significativamente più alti di trigliceridi nei chilomicroni postprandiali rispetto agli obesi e ai controlli (area incrementale dei trigliceridi:  $132\pm 23$  vs.  $75\pm 14$  e  $107\pm 20$  mg/dl·6 ore). L'attività del LPL risulta significativamente ridotta nei soggetti diabetici rispetto agli obesi e ai controlli.

**Studio 2.** 11 pazienti con diabete tipo 2 hanno seguito, secondo un disegno randomizzato di tipo cross-over, due diete isoenergetiche, una ricca in acidi grassi monoinsaturi (SAFA 8%, MUFA 23%) ed un'altra ricca in acidi grassi saturi (SAFA 17%, MUFA 15%) per un periodo di 3 settimane ciascuna. Alla fine di ciascun periodo di dieta, sono stati effettuati prelievi ematici seriali a digiuno e per 6 ore dopo un pasto test ricco in grassi per la determinazione di colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle diverse lipoproteine. L'attività della LPL e della HSL e la loro espressione genica sono state determinate in campioni agobiottici di tessuto adiposo sottocutaneo addominale a digiuno e 6 ore dopo il pasto. Non si sono riscontrate differenze statisticamente significative nella tolleranza lipidica postprandiale, eccetto che per le aree incrementali dei trigliceridi delle VLDL piccole che risultano significativamente ridotte dopo la dieta ricca in MUFA ( $-13.6\pm 4.7$  vs.  $-2.2\pm 3.8$  mg/dl·6ore,  $p<0.005$ ) e per la risposta dei chilomicroni, che risulta più alta 2 ore dopo il pasto somministrato alla fine della dieta ricca in MUFA rispetto a quella ricca in SAFA. L'attività della LPL e dell'HSL del tessuto adiposo sono più alte dopo la dieta ricca in MUFA.

**Studio 3.** 18 pazienti con diabete tipo 2 hanno seguito, secondo un disegno randomizzato di tipo cross-over, due diete isoenergetiche, una relativamente ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico (Dieta Mediterranea) ed un'altra ricca in MUFA, povera in CHO e fibre e ad alto indice glicemico (Dieta povera in CHO) per un mese ciascuna. Alla fine di ciascun trattamento dietetico sono stati valutati i livelli di lipemia postprandiale dopo un pasto test di composizione simile al trattamento dietetico in corso e le attività della LPL e della HSL in campioni agobiottici di tessuto adiposo addominale. La dieta Mediterranea è capace di ridurre significativamente la risposta postprandiale sia dei trigliceridi che del colesterolo dei chilomicroni (area incrementale postprandiale col:  $2.0\pm 0.3$  vs.  $3.2\pm 0.6$  mg/dl·6h, Tg:  $63\pm 31$  vs.  $91\pm 51$  mg/dl·6h,  $p<0.05$ ), rispetto ad una dieta relativamente povera in CHO e ricca in MUFA. Anche durante la vita reale i livelli di trigliceridi misurati domiciliariamente con reflottometro sono risultati essere più bassi del 30% 3 ore dopo pranzo dopo la dieta Mediterranea rispetto alla dieta ricca in MUFA. Inoltre la dieta Mediterranea

ha determinato rispetto alla dieta ricca in MUFA: 1) una riduzione significativa del picco glicemico nella prima parte del periodo postprandiale, dell'area incrementale postprandiale e della variabilità glicemica; 2) una riduzione significativa dell'insulina postprandiale, suggerendo un miglioramento dell'azione insulinica; 3) una riduzione significativa dei livelli di LDL colesterolo. Dai risultati dello studio sembra che le attività lipasiche del tessuto adiposo non vengano influenzate in maniera importante dai due differenti trattamenti dietetici.

**Studio 4.** 16 soggetti sani con lieve iperlipidemia hanno seguito una dieta contenente prodotti da forno arricchiti in principi attivi da testare (acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli) o una dieta di controllo contenente gli stessi prodotti ma non arricchiti in principi attivi, per un periodo di 4 settimane secondo un disegno di tipo cross-over randomizzato. Alla fine di ciascun trattamento è stato somministrato un pasto test di composizione simile al trattamento dietetico in corso (contenente i prodotti da forno con o senza gli ingredienti attivi) e sono stati eseguiti a digiuno e dopo il pasto test prelievi per la determinazione del colesterolo e dei trigliceridi nel plasma e nelle principali frazioni lipoproteiche, glicemia, insulinemia. Alla fine delle due diverse diete è stato inoltre effettuato un test per la valutazione del senso di sazietà (Visual Analogue Scale). L'inserimento in una dieta equilibrata di alimenti arricchiti con dosi moderate di acidi grassi  $\omega$ -3 a corta e a lunga catena, betaglucani, folati e tocoferoli è in grado di ridurre i livelli plasmatici dei trigliceridi e tale effetto si esplica sia a digiuno con una riduzione dell'11% sia nella fase postprandiale con una riduzione del 6%. Nella fase postprandiale tale riduzione riguarda principalmente la frazione dei chilomicroni (media postprandiale). Gli alimenti da noi utilizzati hanno anche determinato una riduzione significativa dell'omocisteina. La dieta con alimenti funzionali induce inoltre alla fine del pasto una riduzione significativa del senso di fame con conseguente aumento di quello di sazietà. Questo maggiore effetto saziante degli alimenti utilizzati in questo studio è particolarmente evidente nella parte più tardiva della fase postprandiale (5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> ora). Gli alimenti arricchiti nei vari principi attivi sono stati accettati dai volontari senza alcuna difficoltà.

Le conclusioni principali che si possono trarre da questi 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). Il diabete, indipendentemente dalla presenza di obesità, si associa ad alterazioni lipidiche postprandiali che riguardano le lipoproteine ricche in trigliceridi di origine esogena (chilomicroni).

- 2) Una ridotta attività della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo è presente solo nei pazienti con diabete tipo 2 e sembra avere un ruolo fondamentale nel determinismo delle alterazioni delle lipoproteine di origine esogena in fase postprandiale che si osservano in questi pazienti.
- 3) Una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi, rispetto ad una ricca in acidi grassi saturi, non determina effetti particolarmente favorevoli sul metabolismo lipidico postprandiale. Infatti determina un aumento precoce dei chilomicroni che, però, viene rapidamente controbilanciato da un aumento dell'attività della LPL del tessuto adiposo.
- 4) 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 dipendono da modifiche sostanziali delle attività lipolitiche del tessuto adiposo.
- 5) L'utilizzo di alimenti funzionali arricchiti in principi attivi può rappresentare un utile mezzo per facilitare l'implementazione di una dieta sana con effetti vantaggiosi sul metabolismo.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 METABOLISMO POSTPRANDIALE DELLE LIPOPROTEINE

È 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 digiuno<sup>1-2</sup>. 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 permette 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 "remnants", 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.

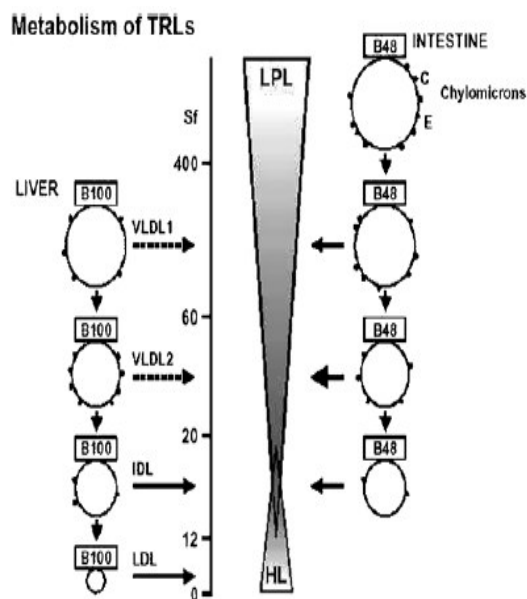
L'aumento delle lipoproteine ricche in trigliceridi nella fase postprandiale e il loro tempo di permanenza in circolo sono regolati, in primis, da un meccanismo di competizione tra chilomicroni e loro remnants, da una parte, e VLDL, di origine endogena, dall'altra. Infatti, tutte queste particelle seguono 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, questo processo.

**Fig.1**

**Rappresentazione schematica del metabolismo di chilomicroni e VLDL<sup>3</sup>**



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. [Sf: coefficiente di flottazione; misura la velocità con cui una particella di un determinata dimensione flotta in un mezzo liquido ed è direttamente proporzionale alle dimensioni della particella e inversamente proporzionale alla sua densità. Si misura in unità Svedberg ( $1S = 1 \times 10^{-13} \text{sec}$ )]. 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 la composizione finale delle particelle a causa dello scambio con altre lipoproteine (LDL e HDL) dei lipidi contenuti nella parte centrale (vengono ceduti trigliceridi in cambio di colesterolo esterificato). 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 con Sf 60-400) e VLDL più piccole (VLDL2 con Sf 20-60). 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 remnants) e particelle di origine epatica (VLDL e loro subfrazioni)<sup>4,5</sup>.

## 1.2 ALTERAZIONI LIPOPROTEICHE IN FASE POSTPRANDIALE

L'elevata persistenza in circolo dei chilomicroni, delle VLDL e dei loro remnants "determina la cosiddetta "dislipidemia 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.

Data la complessità del metabolismo lipoproteico, la lipemia postprandiale potrebbe contribuire al processo aterogeno, oltre che per effetto diretto dei chilomicroni, delle VLDL e dei loro remnants, anche indirettamente, attraverso la formazione di lipoproteine prodotte durante il loro catabolismo nel periodo postprandiale ma che permangono in circolo, anche a digiuno, come, per esempio, le LDL piccole e dense, il cui aumento è indice di aumentato rischio cardiovascolare<sup>6,7</sup>.

L'importanza delle alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale nello sviluppo dell'aterosclerosi è stata suggerita dagli studi di Zilvermith, nei quali si dimostrava in modelli animali come il colesterolo esterificato dei remnants dei chilomicroni si accumulasse nell'intima dell'aorta<sup>8</sup>.

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 coronarica<sup>9-11</sup> e della presenza di arteriopatia periferica<sup>12-14</sup> ma anche di indicatori precoci di coinvolgimento vascolare quali lo spessore medio-intimale carotideo<sup>15-17</sup>. Questi studi indicano abbastanza chiaramente che una lenta rimozione dal circolo dei remnants dei chilomicroni costituisce un fattore di rischio indipendente per lo sviluppo dell'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 remnants delle lipoproteine ricche in trigliceridi potrebbero agire direttamente in senso aterogeno. Essi sono stati rilevati, infatti, in placche aterosclerotiche umane<sup>18</sup> e possono promuovere una risposta infiammatoria nella parete arteriosa<sup>19</sup>. I remnants 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<sup>20,21</sup>. L'attivazione delle piastrine e dei monociti è un processo potenzialmente coinvolto nello sviluppo della malattia cardiovascolare che sembra essere associato alla lipemia postprandiale<sup>22</sup>.

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-mediata<sup>23</sup>. Sembra inoltre che un consistente aumento dell'iperlipidemia postprandiale sia associato con una riduzione della vasodilatazione endotelio-mediata a livello dell'arteria brachiale<sup>24-26</sup>. Questo marker funzionale e strutturale di aterosclerosi precoce si correla proporzionalmente al grado di iperlipidemia postprandiale ed è in relazione con la riduzione delle HDL, dotate di potenziale antiossidante, e con l'aumento di LDL piccole e dense che, al contrario, si ossidano facilmente<sup>26</sup>. Anche Evans e coll.<sup>27</sup> 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 le alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale alterino la funzione dell'endotelio predisponendolo alla vasocostrizione e determinando uno stato proinfiammatorio e procoagulante.

### **1.3 RUOLO DELL'INSULINO-RESISTENZA E DEL TESSUTO ADIPOSO NEL DETERMINARE LE ALTERAZIONI LIPIDICHE IN FASE POSTPRANDIALE.**

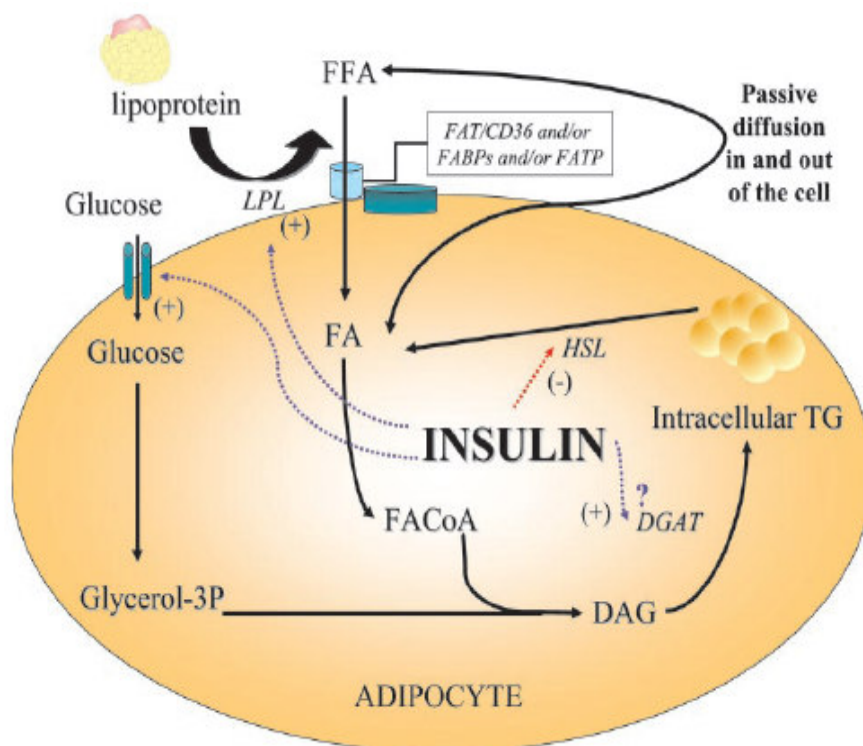
Nella patogenesi delle alterazioni della lipemia postprandiale, l'insulino-resistenza, svolge senza dubbio un ruolo di primo piano. Il tessuto adiposo, tradizionalmente considerato solo come un organo di deposito energetico, è stato riconosciuto negli ultimi dieci anni come un sito principale di insulino-resistenza<sup>28</sup> nonché un vero e proprio organo endocrino, avente la capacità di produrre molteplici peptidi bioattivi, detti adipochine, i quali influenzano numerose vie metaboliche<sup>29</sup>, molte delle quali regolate dall'insulina.

Infatti, l'insulina è il principale ormone regolatore delle funzioni del tessuto adiposo e gli adipociti sono cellule 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.1);
- inibisce l'attività della lipasi ormono-sensibile (HSL), riducendo così la lipolisi intracellulare dei trigliceridi citoplasmatici (Fig.1);
- promuove la captazione degli acidi grassi derivanti dall'idrolisi delle lipoproteine circolanti per azione della lipasi lipoproteica (LPL) (Fig.1).

Fig. 1

**Ruolo dell'insulina nella stimolazione della captazione, esterificazione ed immagazzinamento degli acidi grassi nel tessuto adiposo<sup>30</sup>.**



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.

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 postprandiale<sup>31</sup>, oppure al tessuto muscolare e/o cardiaco, dove gli acidi grassi vengono ossidati a scopo energetico, durante il periodo di digiuno<sup>31-33</sup>.

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'insulina<sup>34</sup>.

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<sup>35,36</sup>. 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.

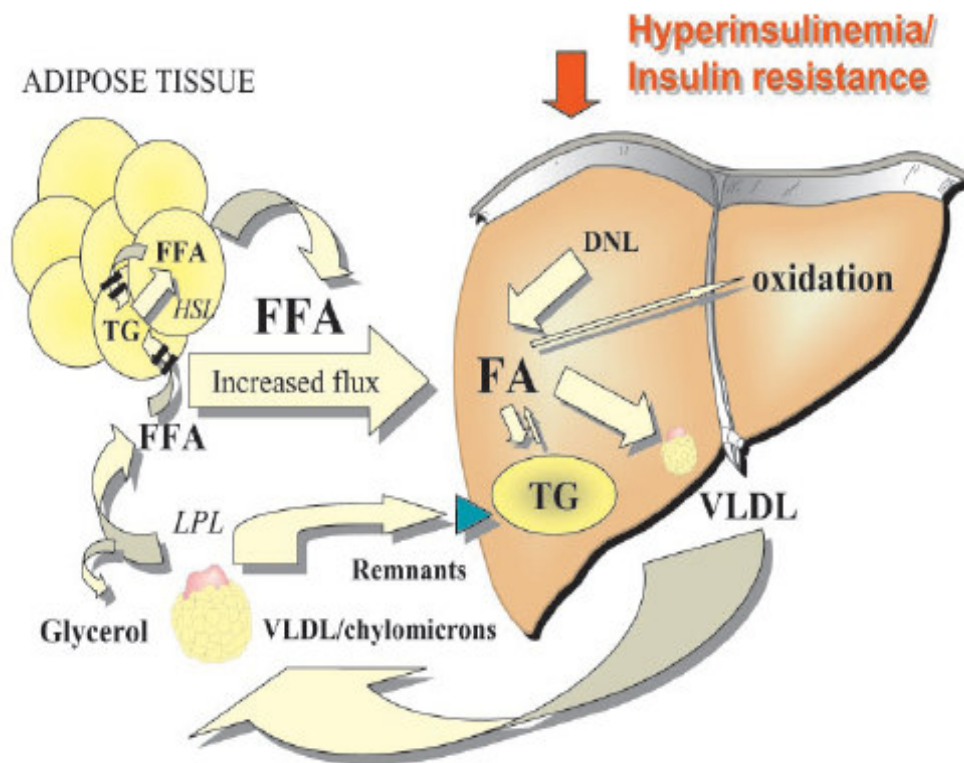
Da quanto detto, è facile dedurre che in tutte le condizioni caratterizzate o da deficit più o meno assoluto dell'insulina o da insulino-resistenza, come diabete tipo 1 all'insorgenza, obesità, diabete tipo 2 e sindrome metabolica, possano essere presenti alterazioni dei processi di esterificazione e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

Fig.2

**Ruolo degli acidi grassi nell' aumentata produzione epatica delle VLDL<sup>30</sup>**



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.

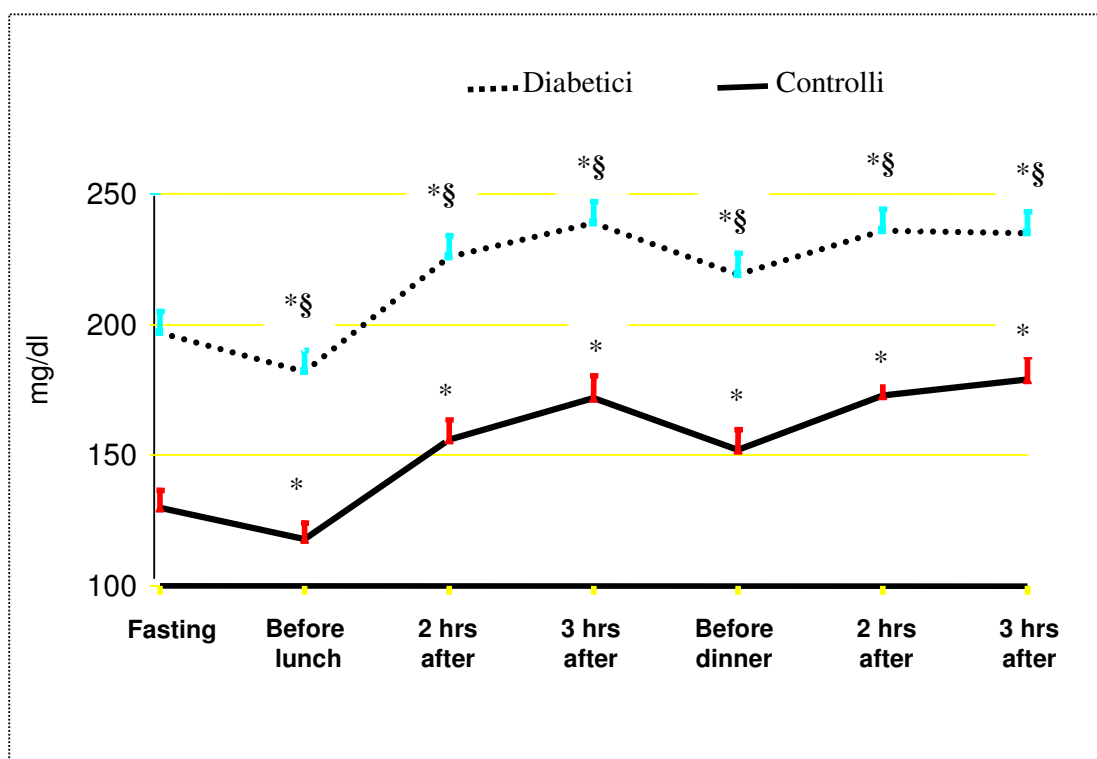


#### 1.4 ALTERAZIONI LIPOPROTEICHE POSTPRANDIALI NEL DIABETE TIPO 2 E NELL'OBESITÀ

L'elevata persistenza in circolo dei chilomicroni, delle VLDL e dei loro remnants, è un elemento caratterizzante la dislipidemia dei pazienti con diabete tipo 2<sup>37-39</sup>. 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 portatile<sup>40</sup>(fig.3).

**Fig. 3**

**Profilo giornaliero dei trigliceridi in pazienti con diabete tipo 2 (n=145) ed 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).**



Recentemente è stato dimostrato che anche i soggetti con diabete tipo 2 normotrigliceridemicici a digiuno e con ottimale compenso glicemico presentano alterazioni delle lipoproteine in fase postprandiale che riguardano le lipoproteine di origine sia esogena sia endogena<sup>41</sup>. 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.<sup>42</sup> 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.<sup>43</sup> 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 normotrigliceridemicici.

Annuzzi e coll.<sup>44</sup> hanno 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 sani<sup>45</sup>. Queste alterazioni potrebbero essere dovute, in particolare, alle modificazioni delle lipoproteine endogene conseguenti alla insulino-resistenza. In particolare, Couillard e coll.<sup>46</sup> 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.

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

È ben noto il ruolo che il tipo di alimentazione può avere nell'influenzare il rischio cardiovascolare<sup>47-49</sup>. Uno dei meccanismi principali mediante i quali la dieta può influenzare tale rischio è la sua azione sui 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. 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-3<sup>50-54</sup>. Levy ed al.<sup>53</sup> 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<sup>52,54</sup>. 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 LPL<sup>55</sup>.

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 ricchi in acidi grassi n-3 rispetto ad altri tipi di acidi grassi<sup>56</sup>. 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-6<sup>57</sup> o, più spesso, un'uguale risposta<sup>58,59</sup>. 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 mostrato 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)<sup>60</sup>. 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 MUFA<sup>61</sup>.

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 gli 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-3<sup>62</sup>. Inoltre, non osservando 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<sup>63,64</sup>. La riduzione dei trigliceridi in fase postprandiale con un supplemento di 2.7 g/die di acidi grassi n-3 è stata confermata anche in uno studio più a lungo termine (3 mesi) effettuato in individui sani<sup>65</sup>.

Se l'effetto ipotrigliceridemizzante 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<sup>66,40</sup>. Un altro aspetto interessante, in particolare 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 ipertrigliceridemia<sup>67</sup>. In queste condizioni potrebbe essere aumentata anche la risposta lipemica postprandiale<sup>68</sup>. 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<sup>69,70</sup>. 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)<sup>71</sup>. Infine Jeppesen et al. hanno mostrato che diete ad alto contenuto in carboidrati, rispetto a diete ricche in grassi, amplificano l'entità della lipemia postprandiale in individui sani<sup>72</sup>.

I possibili effetti negativi dell'alto consumo di CHO sulla trigliceridemia a digiuno e probabilmente su quella postprandiale, osservati in alcuni studi, potrebbero 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 meccanismi<sup>73</sup>. 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 corta<sup>74-78</sup>. Esse, quindi, sono dotate di un ben documentato effetto ipocolesterolemizzante. 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 significativi<sup>79-81</sup>.

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, metabolismo lipidico e attività lipolitiche del tessuto adiposo, sia a digiuno che in fase postprandiale, sia ampiamente riconosciuta, 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 determinare le alterazioni lipidiche postprandiali e nella modulazione delle attività lipolitiche a livello del tessuto adiposo.

Inoltre, nonostante la rilevanza clinica delle anomalie lipoproteiche in fase postprandiale, ancora oggi, non sono stati individuati interventi terapeutici capaci di correggere tali alterazioni. Tali interventi risultano ancora più utili nei pazienti diabetici tipo 2, caratterizzati, come è stato detto, da alterazioni lipidiche in fase postprandiale anche in presenza di una normale concentrazione plasmatica di lipidi a digiuno. Tra gli approcci terapeutici va considerata innanzitutto la terapia nutrizionale che, grazie all'innescò di molteplici meccanismi, è in grado di influenzare contemporaneamente più fattori di rischio cardiovascolare e può avere effetti particolarmente vantaggiosi anche sul metabolismo lipidico in fase postprandiale.

Inoltre ci è sembrato necessario valutare anche i meccanismi ancora sconosciuti con cui diversi approcci dietetici possono influenzare il metabolismo lipidico, focalizzando la nostra ricerca soprattutto sulle attività lipasiche del tessuto adiposo.

Infine, anche se sono ben riconosciuti i benefici della terapia nutrizionale, l'adesione alla dieta è spesso difficile da ottenere soprattutto per lunghi periodi di tempo ed è necessario ricercare nuovi mezzi per superare tale limite.

Pertanto, 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 gli effetti degli acidi grassi monoinsaturi vs gli acidi grassi saturi della dieta sulla lipemia postprandiale e sulle lipasi del tessuto adiposo nel diabete di tipo 2.*

3. *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.*
  
4. *Valutare gli effetti di alimenti funzionali arricchiti in fibre vegetali, acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con lievi alterazioni del metabolismo lipidico.*

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

### 3. METODOLOGIE UTILIZZATE

#### 3.1 VALUTAZIONE DELLA LIPEMIA POSTPRANDIALE

Come illustrato nella tabella 2 esistono diversi metodi per lo studio della lipemia postprandiale<sup>82</sup>. 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 reflattometri portatili, può fornire indicazioni utili per l'individuazione e la correzione della condizione di iperlipidemia postprandiale<sup>83-85</sup>.

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  $S_f$ <sup>86</sup>. 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 è un ottimo marker delle lipoproteine postprandiali di origine intestinale.

Le tecniche di dosaggio utilizzate 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 delle particelle ricche in trigliceridi<sup>87</sup>.



Tab.2

Metodi per la valutazione della lipemia postprandiale<sup>88</sup>

<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 subfrazioni 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 di 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 dai remnants. 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 <sub>3</sub> -e <sup>13</sup> 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.

Le tecniche elettroforetiche permettono, invece, di dosare quantitativamente le due isoforme dell'apoB, 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 sodio dodecilsolfato su gel con gradiente lineare di poliacrilammide 3-20% (SDS-PAGE)<sup>89</sup>. 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 procedura 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<sup>90,91</sup>. 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 apo-48 e di apoB-100.

Attualmente, per lo studio della lipemia alimentare sono utilizzati pasti molto diversi tra loro e ciò rende difficile il confronto tra i risultati di diversi studi e rende impossibile stabilire dei criteri di normalità della risposta lipemica<sup>92,93</sup>. 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<sup>94,93</sup>.

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<sup>95,96</sup>. 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 postprandiale<sup>97</sup>. E' inoltre opportuno evitare 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 circolanti<sup>98</sup>. Nelle donne, poi, bisogna considerare l'eventuale assunzione di contraccettivi a base di estrogeni in quanto questi ultimi sembrano influenzare il metabolismo dei remnants dei chilomicroni<sup>99</sup>.

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

### **3.1.a Separazione delle lipoproteine**

I campioni di sangue 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 Carlson<sup>100</sup>, Karpe e Hamsten<sup>101</sup>. 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 grandi (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 precipitazione<sup>102</sup>. In tutte le subfrazioni lipoproteiche sono state determinate le concentrazioni di colesterolo e di trigliceridi.

### **3.1.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 mediante elettroforesi su gradiente di gel di SDS-poliacrilammide 3-20%<sup>103,104</sup>. In breve, le aliquote delipidizzate dei campioni sono state disciolte in un buffer e fatte correre su di un gel con gradiente da 3 a 20%. Come calibratore è stata utilizzata un'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. Sei 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%, tutta la notte. 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 area 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. 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 le procedure a nostra disposizione e i campioni biologici su cui è utile effettuare le valutazioni.

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-eparinico<sup>105</sup>. La somministrazione endovenosa di eparina promuove il rapido rilascio della LPL in circolo, dopo averla liberata dall'eparan-solfato dei proteoglicani adesi alla superficie endoteliale<sup>106</sup>.

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 dell'enzima 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. A tale proposito, si distingue un'attività tissutale 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 mono-gliceridi 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 ed, 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, e che offrono una maggiore sensibilità, prevedono l'impiego di un substrato radioattivo, rappresentato da 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'enzima<sup>107</sup>.

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 enzimatico<sup>108</sup>. Un'altra possibile alternativa ai metodi radioisotopici è rappresentata dalle tecniche fluorimetriche per il dosaggio dell'attività catalitica della LPL<sup>115</sup>. Il substrato su cui la lipasi lipoproteica va ad agire è di solito un alchildiacyl-glicerolo fluorogenico, contenente un pirene, la cui fluorescenza è intramolecolarmente bloccata da un gruppo trinitrofenilico<sup>109,110</sup>. 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 fluorescente<sup>111</sup>. 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 derivatizzante 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 fluorimetrici, 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 radioisotopici.

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). Il materiale prelevato è 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  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

*L'attività della LPL rilasciata in vitro dall'eparina* è stata determinata secondo la procedura di Taskinen et al.<sup>112</sup>, da noi modificata. Campioni di tessuto adiposo (5-10 mg) sono stati incubati a  $37^{\circ}\text{C}$  in 450  $\mu\text{l}$  di Krebs-Ringer Buffer 0.1 mol/l, pH 8.4 e 50  $\mu\text{l}$  di eparina bovina. Dopo 45 min esatti, i frammenti di tessuto adiposo sono stati allontanati e 100  $\mu\text{l}$  del mezzo di incubazione sono fatti reagire con 100  $\mu\text{l}$  di emulsione di trioleina marcata con trizio per 110 min a  $37^{\circ}\text{C}$ <sup>1139</sup>. 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<sup>114</sup>. Dopo agitazione per 2 min, i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm, per 20 min, a  $20^{\circ}\text{C}$ , e la radioattività degli acidi grassi liberi, contenuti in 1.6 ml di surnatante, è stata letta 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  $37^{\circ}\text{C}$ .

*Attività totale della LPL.* La procedura è stata descritta da Panarotto et al.<sup>115</sup>, ma da noi modificata. Frammenti di 10 mg circa di tessuto adiposo, in duplicato, sono stati omogenati, con un omogenizzatore Heidolph Diaph-900 (26000 rpm), in 80  $\mu\text{l}$  di buffer/mg di tessuto adiposo (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.5 a  $25^{\circ}\text{C}$ , sucrosio 0.02 M, albumina bovina 1%, eparina bovina 1U/300  $\mu\text{l}$  buffer, e come detergenti sodio-deossicolato 0.3% + IGEPAL CA-630 0.012%) e centrifugati per 15 min., 12000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ . Dell'infranatante, diluito 12 volte con Buffer (Tris-HCl 0.2 M, pH 8.5 a  $25^{\circ}\text{C}$ , sucrosio 0.02 M, albumina bovina 1%), 100  $\mu\text{l}$  sono stati fatti reagire con 100  $\mu\text{l}$  dello stesso substrato sopra riportato per 110 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ . Gli acidi grassi sono stati estratti e misurati come descritto per l'attività della LPL rilasciata in vitro dall'eparina.

### **3.2.b Misurazione dell'attività della HSL nel tessuto adiposo.**

Questa procedura è stata descritta da Watt<sup>116</sup> e da noi modificata. Aliquote di tessuto adiposo (15-20 mg), in duplicato, sono state omogenate per 15 sec. in ghiaccio, in 450  $\mu\text{l}$  di Buffer di omogeneizzazione pH 7.4 contenente EDTA- $\text{Na}_2$ , sucrosio, dithioerythritolo e inibitori di proteasi. Dopo 45 min di centrifugazione, 30  $\mu\text{l}$  di infranatante sono stati incubati a  $37^{\circ}\text{C}$ , con 100  $\mu\text{l}$  di substrato composto da una miscela di trioleina e trioleina marcata con trizio. La reazione è stata bloccata, dopo 45 min di incubazione, con l'aggiunta di 3.25 ml di miscela di estrazione e 1.05 ml di buffer pH 10.5. I tubi sono stati agitati vigorosamente su Vortex per 13 sec., e le due fasi sono state separate mediante centrifugazione a 3000rpm,  $20^{\circ}\text{C}$ , 20 min. Su 1 ml della fase superiore, contenente gli acidi grassi rilasciati, diluito in 10 ml di Instagel

Plus, è stata contata 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.

### **3.2.c 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, secondo quanto descritto in passato<sup>117,118</sup>. 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.NM005357). 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 inattiva<sup>124</sup>. 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.d 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 plasmatiche di acidi grassi liberi sono state determinate mediante metodi enzimatici colorimetrici (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany). I livelli plasmatici di insulina sono stati misurati con kits ELISA (Technogenetics, Milan, Italy).

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

Clamp euglicemico iperinsulinemico. Insulina umana è stata somministrata endovena ad una velocità costante di 1.5 mU/kg di peso corporeo/min per 2 ore. La glicemia è stata mantenuta costante intorno a 90 mg/dl modificando la velocità di infusione di glucosio sulla base delle misurazioni della glicemia su un analizzatore Accucheck (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

### **STUDIO n.1. I chilomicroni 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.**

(Pubblicazione in extenso n. 1 su Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease 2008).

#### **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'obesità<sup>104, 119-122</sup>. 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.

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 sé, 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 ipolipemizzanti ed i pazienti 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.

Tab. 4.1.a

<b>Caratteristiche generali, valori metabolici a digiuno, insulino-sensibilità e attività della LPL rilasciata dall'eparina del tessuto adiposo dei soggetti partecipanti allo studio.</b>			
	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>			
IMC (kg/m <sup>2</sup> ) <sup>a</sup>	32.8 [2.0] <sup>b</sup>	34.5 [2.7] <sup>b</sup>	24.0 [1.3]
Circonferenza vita (cm) <sup>a</sup>	112 [8] <sup>b</sup>	113 [7] <sup>b</sup>	85 [4]
Massa grassa (kg) <sup>a</sup>	31.7 [4.4] <sup>b</sup>	32.9 [4.9] <sup>b</sup>	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) <sup>a</sup>	35 [4] <sup>b</sup>	43 [11]	47 [10]
Glucosio (mg/dl) <sup>a</sup>	131 [36] <sup>bc</sup>	90 [9]	86 [9]
<i>Clamp euglicemico iperinsulinemico</i>			
M value (velocità di infusione del glucosio = mg/kg p.c./min) <sup>a</sup>	4.1 [0.9] <sup>b</sup>	4.5 [1.5] <sup>b</sup>	8.2 [2.2]
M/I <sup>a</sup>	2.1 [1.1] <sup>b</sup>	1.7 [0.8] <sup>b</sup>	7.5 [3.2]
<i>Attività della LPL del tessuto adiposo (nmol FA/g/ora)<sup>a</sup></i>			
digiuno	99 [34] <sup>bc</sup>	217 [92]	252 [155]
6 ore dopo il pasto	89 [51] <sup>bc</sup>	231 [99]	278 [130]

Media [DS]; <sup>a</sup>p<0.05 ANOVA; <sup>b</sup>p<0.05 vs. controlli e <sup>c</sup>p<0.05 vs. obesi

### Disegno sperimentale

A digiuno, al mattino, i soggetti hanno consumato un pasto test ricco in grassi, costituito da un gâteau di patate, del contenuto calorico di 944 kcal, rappresentate per il 57 % da grassi (il 34% di acidi grassi saturi), il 31% da carboidrati e il 12% da proteine (Tab.4.1.b). 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).

**Tab.4.1.b**

<b>Composizione del pasto test</b>	
Carboidrati (%)	31
Grassi Totali (%)	57
Grassi Saturi (%)	34
Proteine(%)	12
Calorie (kcal)	944

### **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 il test ANOVA (*ANalysis Of VAriance*) ed il test post hoc tra i gruppi (LSD). Le variabili non normalmente distribuite sono state analizzate dopo trasformazione logaritmica o con 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 ( $p < 0.001$ ) (Tab. 4.1.a). I soggetti diabetici presentavano valori più alti di glicemia sia a digiuno che

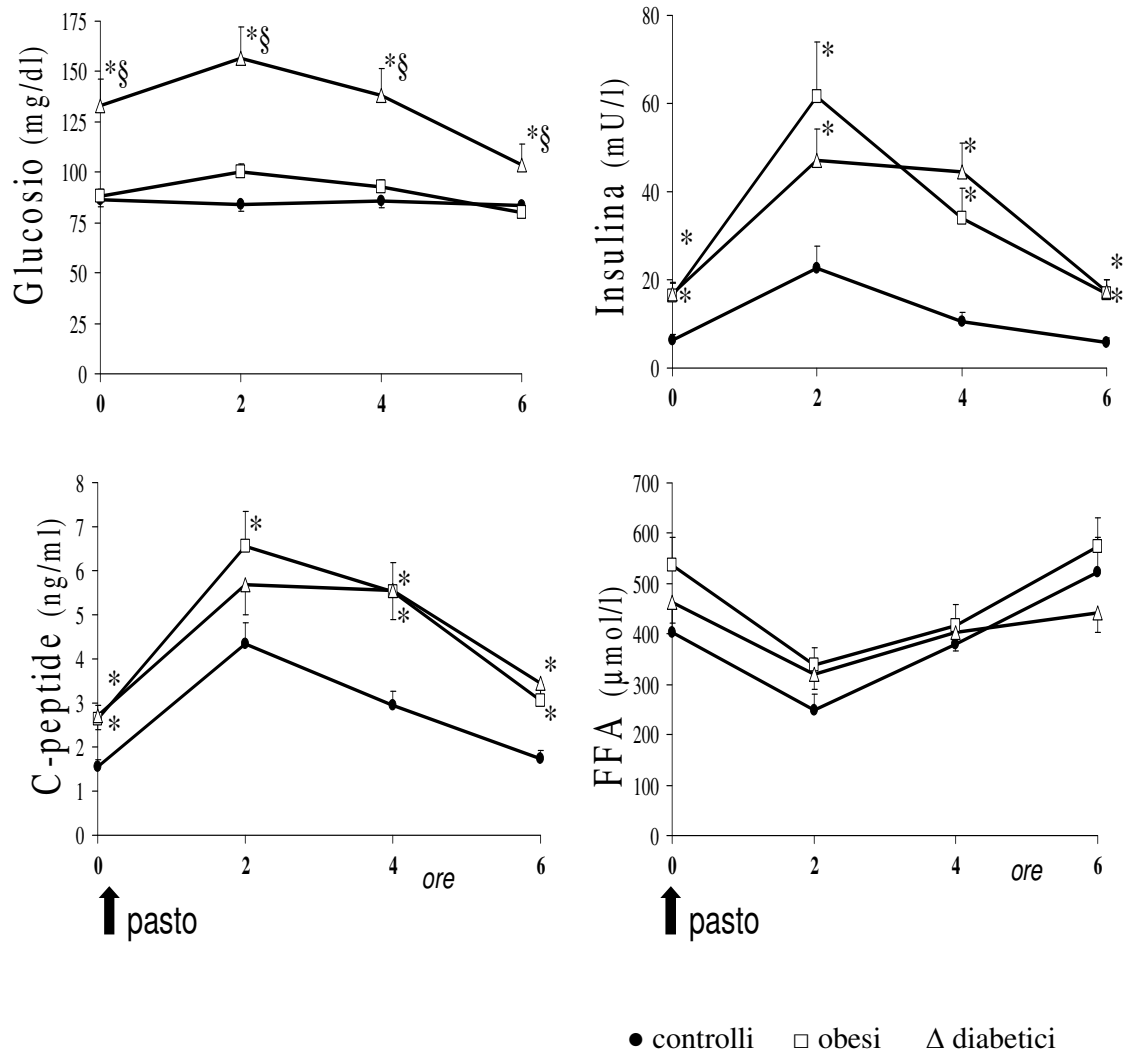
dopo il pasto ( $p < 0.01$  per tutti i punti della curva postprandiale, Fig.4.1.a). I livelli plasmatici di insulina a digiuno e postprandiali sono risultati significativamente più alti nei soggetti obesi con e senza diabete rispetto ai controlli ( $p < 0.01$  per tutti i punti della curva postprandiale, 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 ( $p < 0.05$ ) (Tab. 4.1.c). I livelli di colesterolo sono diminuiti in fase postprandiale, senza nessuna differenza tra i gruppi (Tab. 4.1.c).

Fig. 4.1.a

Concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina, C-peptide, ed FFA  
prima e dopo pasto standard in soggetti obesi, obesi diabetici e controlli normopeso.

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



Tab. 4.1.c

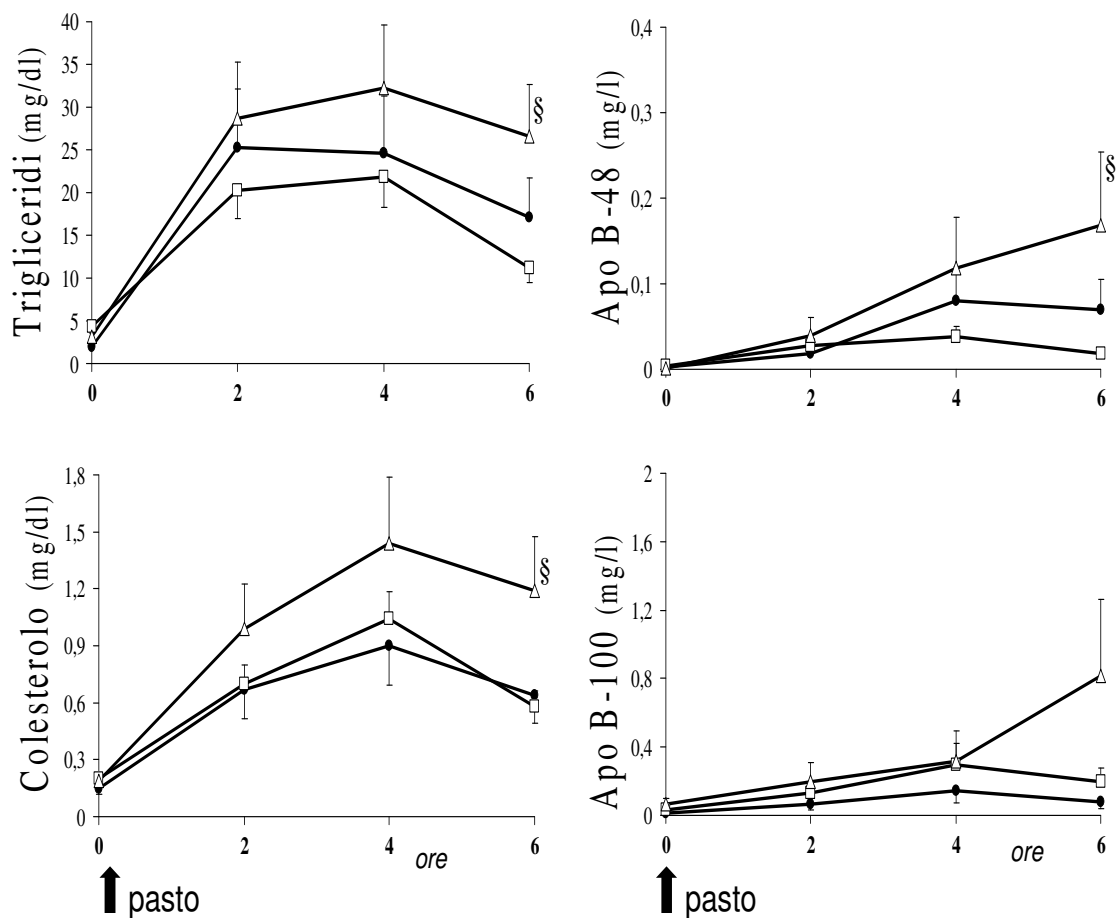
<b>Aree incrementali di trigliceridi (TG) (mg/dl·6ore), colesterolo (Col) (mg/dl·6ore), apo B-48 (mg/l·6ore), and apo B-100 (mg/l·6ore) nel plasma e nelle frazioni lipoproteiche dopo un pasto standard in soggetti obesi diabetici, obesi, e controlli normopeso.</b>				
		<b>Obesi Diabetici</b>	<b>Obesi</b>	<b>Controlli</b>
<b>Plasma</b>	TG	343 [52] <sup>bc</sup>	222 [37]	208 [34]
	Col	-8.7 [9.9]	-16.6 [9.7]	-14.3 [7.3]
<b>Chilomicroni</b>	TG	132 [23] <sup>c</sup>	75 [14]	107 [20]
	Col	5.1 [0.9] <sup>bc</sup>	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]
<b>VLDL grandi</b>	TG <sup>a</sup>	188 [28] <sup>b</sup>	135 [22] <sup>b</sup>	87 [13]
	Col <sup>a</sup>	25.6 [3.9] <sup>b</sup>	19.2 [3.3] <sup>b</sup>	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]
<b>VLDL piccole</b>	TG <sup>a</sup>	-11.9 [5.3] <sup>b</sup>	-2.9 [4.0]	3.5 [3.3]
	Col	-5.2 [2.8] <sup>b</sup>	-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]
<b>IDL</b>	TG	-3.0 [1.2]	-3.3 [1.3]	-0.9 [1.1]
	Col	-1.8 [1.5]	-6.7 [2.3]	-1.8 [1.7]
<b>LDL</b>	TG	-5.7 [2.2]	-6.2 [2.3]	-2.1 [1.0]
	Col	-24.1 [7.1]	-16.0 [12.3]	-16.9 [7.4]
<b>HDL</b>	TG	2.1 [4.9]	-0.2 [2.9]	-6.6 [7.3]
	Col	-10.1 [2.3]	-12.3 [5.9]	-10.4 [3.1]

Media [DS]; <sup>a</sup>p<0.05 ANOVA; <sup>b</sup>p<0.05 vs. controlli e <sup>c</sup>p<0.05 vs. obesi

I pazienti diabetici hanno mostrato più alti livelli di colesterolo e trigliceridi nei chilomicroni postprandiali rispetto agli altri due gruppi, differenza che è risultata significativa 6 ore dopo il pasto test (p<0.05 vs. gli obesi) (Fig.4.1.b)

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.  $M \pm ES$ ; \* $p < 0.05$  vs. controlli, § $p < 0.05$  vs. obesi.



● controlli □ obesi △ diabetici

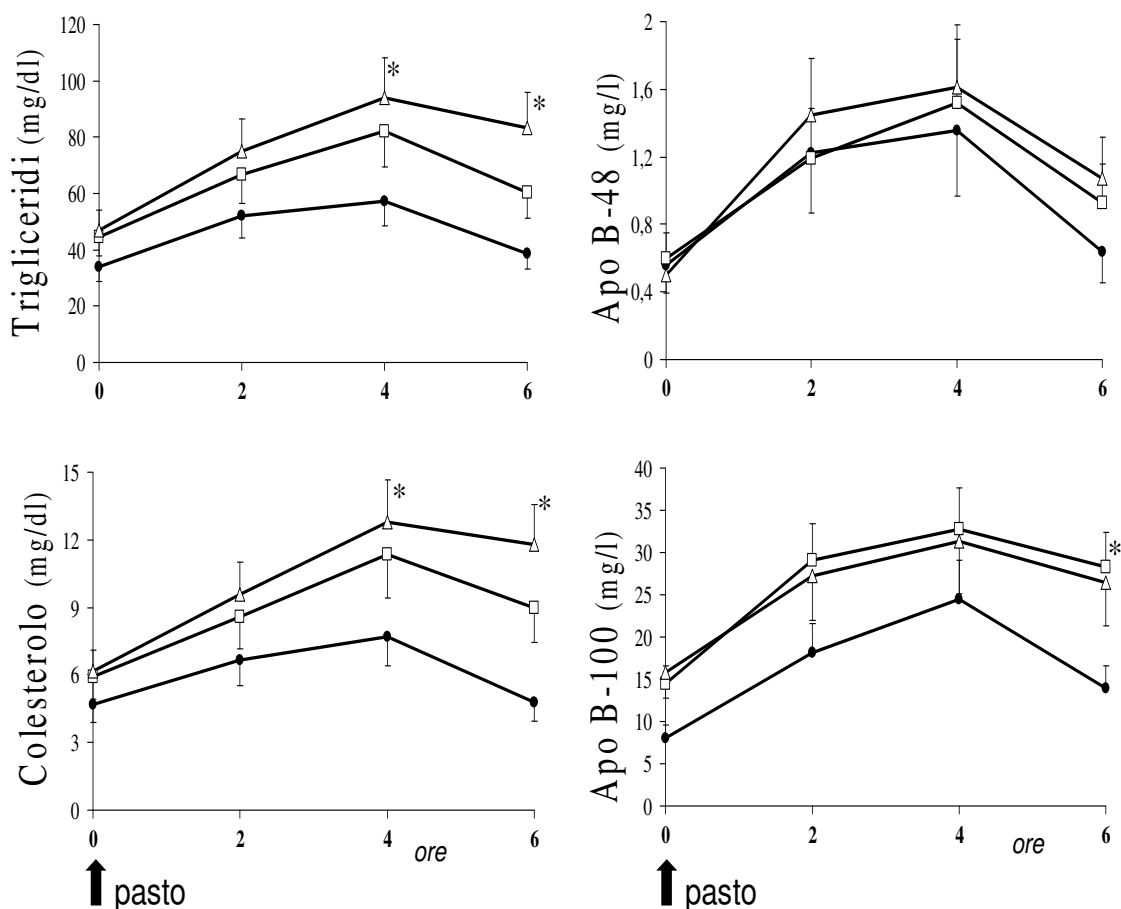
I pazienti diabetici hanno mostrato anche valori significativamente più alti delle aree incrementali sotto la curva dei trigliceridi ( $p < 0.05$  vs obesi) e del colesterolo ( $p < 0.05$  vs obesi e controlli) dei chilomicroni (Tab.4.1.c). Analogamente si è osservato un aumento significativo dei livelli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

**Fig. 4.1.c**

**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.  $M \pm ES$ ; \* $p < 0.05$  vs. controlli**



● controlli □ obesi Δ diabetici



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

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

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 rispetto agli obesi ed ai controlli, sia a digiuno ( $99 \pm 11$  vs.  $217 \pm 35$  e  $252 \pm 51$  nmol FA/g/ora, ANOVA  $p < 0.05$ ) sia 6 ore dopo il pasto ( $89 \pm 16$  vs.  $231 \pm 31$  e  $278 \pm 40$  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 alterazioni lipidiche postprandiali nel diabete tipo 2 sono ampiamente riconosciute, le alterazioni di specifiche classi di lipoproteine ed i meccanismi implicati in tali alterazioni non sono stati 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 insulino-sensibilità è stata raramente valutata. Prestando attenzione a questi fattori, in questo studio abbiamo voluto considerare gli effetti specifici del diabete di per sé, dell'obesità e dell'insulino-resistenza sulle alterazioni delle singole lipoproteine nella fase postprandiale.

L'alterazione postprandiale più rilevante è stata riscontrata a carico delle VLDL grandi nei pazienti obesi e in quelli diabetici. Questa anormalità è da associarsi all'insulino-resistenza, poiché essa è parimenti 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'apoB-100. I più alti livelli postprandiali di apoB-100, riscontrati nei due gruppi di individui obesi, non sono dovuti strettamente a modifiche indotte dal pasto, ma piuttosto al fatto che i livelli di apoB-100 sono già più alti in condizione di digiuno nei soggetti insulino-resistenti rispetto ai controlli. Questo risultato

indica che anche in individui con trigliceridemia a digiuno normale l'aumento delle VLDL grandi in fase postprandiale è correlato ai livelli delle stesse a digiuno, ed 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, l'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 insulino-resistenza. L'aumentata produzione di chilomicroni potrebbe essere in relazione con la più bassa attività della LPL nel tessuto adiposo, come suggerito anche dalla correlazione inversa riscontrata tra queste due variabili ( $r = -0.42$ ,  $p < 0.05$ ). In questo studio i pazienti diabetici presentano una riduzione significativa dell'attività della LPL del tessuto adiposo rilasciata in vitro dall'eparina, rispetto ai soggetti con un simile grado di adiposità, sia quando l'attività è espressa per grammo 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 quella 6 ore dopo il pasto test. Ciò potrebbe essere dovuto, oltre che al tempo di prelievo del campione bioptico di tessuto adiposo, 6 ore vs 3,5-4 ore dopo il pasto, così come viene spesso riportato in letteratura, anche dal 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 un carico di grassi<sup>123</sup>.

I fattori che potrebbero essere responsabili della riduzione dell'attività della LPL nei pazienti 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 produzione di LPL del tessuto adiposo<sup>124</sup>. 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 determinare i valori più bassi di attività della LPL nei pazienti diabetici<sup>125</sup>, essendo essa il principale fattore discriminante tra gli individui diabetici ed obesi.

In conclusione, questo studio dimostra che

1. 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.

2. 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.

## **STUDIO n .2. 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.**

(Pubblicazione in extenso n. 2 su Clinical Nutrition 2008, pubblicazione come abstract n.1 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 postprandiale<sup>126-128</sup>. I dati che confrontano gli effetti dei grassi monoinsaturi (MUFA) con quelli dei grassi saturi (SAFA) sono scarsi. La gran parte di essi riguarda gli effetti acuti di pasti test, non di interventi dietetici, ed i risultati sono abbastanza controversi<sup>126,127</sup>. 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<sup>66,83,104</sup>.

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 postprandiale 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  $53 \pm 9$  anni ( $M \pm DS$ ), in soprappeso o obesi ( $BMI 31 \pm 3 \text{ kg/m}^2$ ), con circonferenza vita  $99 \pm 8$  cm, in buon compenso glicemico ( $HbA1c 6.9 \pm 0.7\%$ ) e con normali livelli di lipidi plasmatici a digiuno (colesterolo  $183 \pm 26$  mg/dl, trigliceridi  $117 \pm 59$  mg/dl, HDL colesterolo  $40 \pm 10$  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 ciascuna. Le caratteristiche delle due diete sono riportate in tabella 4.2.a.

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/die), mentre il contenuto in colesterolo era più basso nella dieta MUFA rispetto alla dieta SAFA (130 vs 248 mg/die).

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 valutata 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 nel plasma di glucosio, insulina, acidi grassi liberi (FFA), colesterolo e trigliceridi. 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 una agobiopsia 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% da carboidrati, il 57% da grassi (34% grassi saturi) e per il 12% da proteine.

Tab.4.3.a

<b>Composizione giornaliera delle due diete</b>		
	<b>MUFA</b>	<b>SAFA</b>
<b>Energia (kcal)</b>	1798	1797
<b>Proteine (%)</b>	17	17
<b>Carboidrati (%)</b>	46	46
<b>Grassi totali (%)</b>	37	37
<b>Saturi (%)</b>	8	<b>17</b>
<b>Monoinsaturi (%)</b>	<b>23</b>	15
<b>Polinsaturi (%)</b>	4	3
<b>Colesterolo (mg)</b>	130	248
<b>Fibre (g)</b>	21.1	20.9

**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 con test non parametrici. Una  $p < 0.05$  è stata considerata statisticamente significativa. L'analisi statistica è stata eseguita in accordo ai 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.

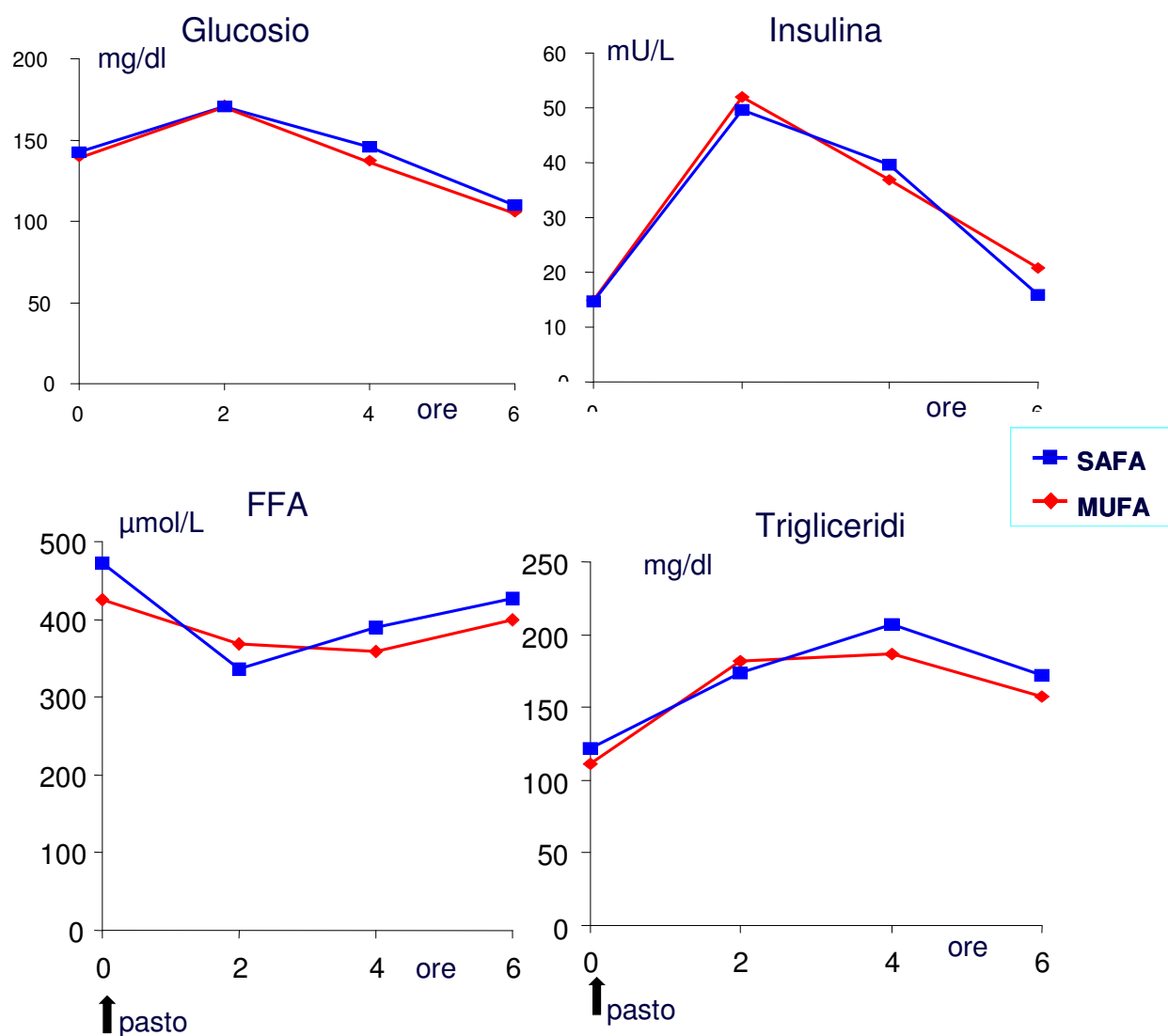
Alla fine di entrambe le diete non ci sono state differenze nel peso corporeo ( $88.5 \pm 3.1$  kg vs.  $88.8 \pm 3.3$  kg) e nei livelli di trigliceridi a digiuno ( $112 \pm 15$  vs.  $122 \pm 21$  mg/dl) e di colesterolo HDL ( $40 \pm 3$  vs.  $40 \pm 3$  mg/dl). Come atteso, il colesterolo LDL è diminuito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

Le risposte postprandiali di glucosio, insulina, acidi grassi liberi e trigliceridi del plasma non si sono mostrate differenti dopo i due trattamenti dietetici, eccetto per i valori leggermente più alti degli FFA due ore dopo il pasto alla fine della dieta ricca in MUFA (figura 4.2.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 4.2.a)

**Fig. 4.2.a**

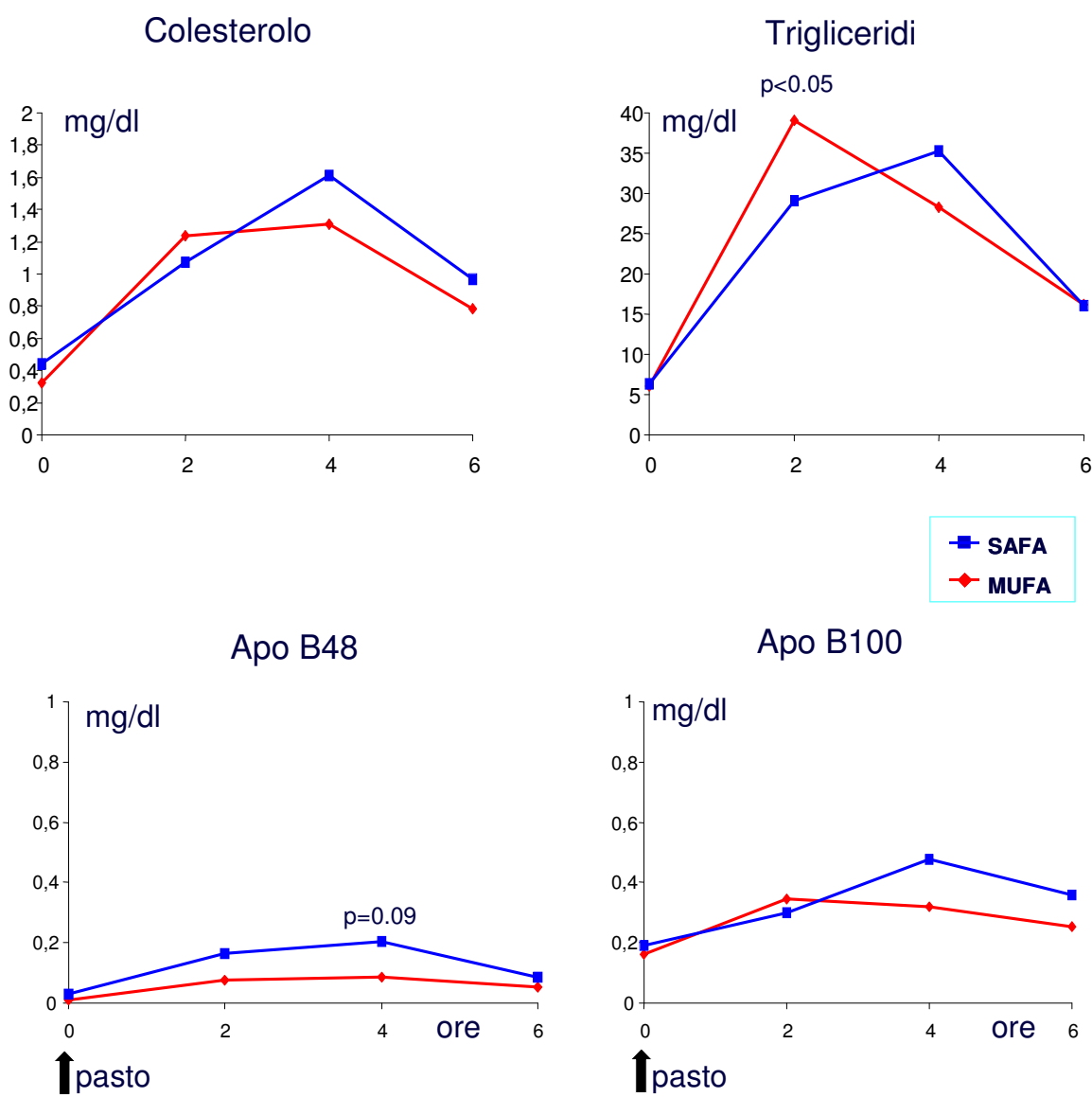
**Concentrazioni plasmatiche di glucosio, insulina, FFA e trigliceridi prima e dopo pasto test in pazienti con diabete tipo 2 alla fine dei due periodi di dieta (M±ES)**



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 delle due diete (tabella 4.3.b). 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.b).

**Fig. 4.2.b**

**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)**

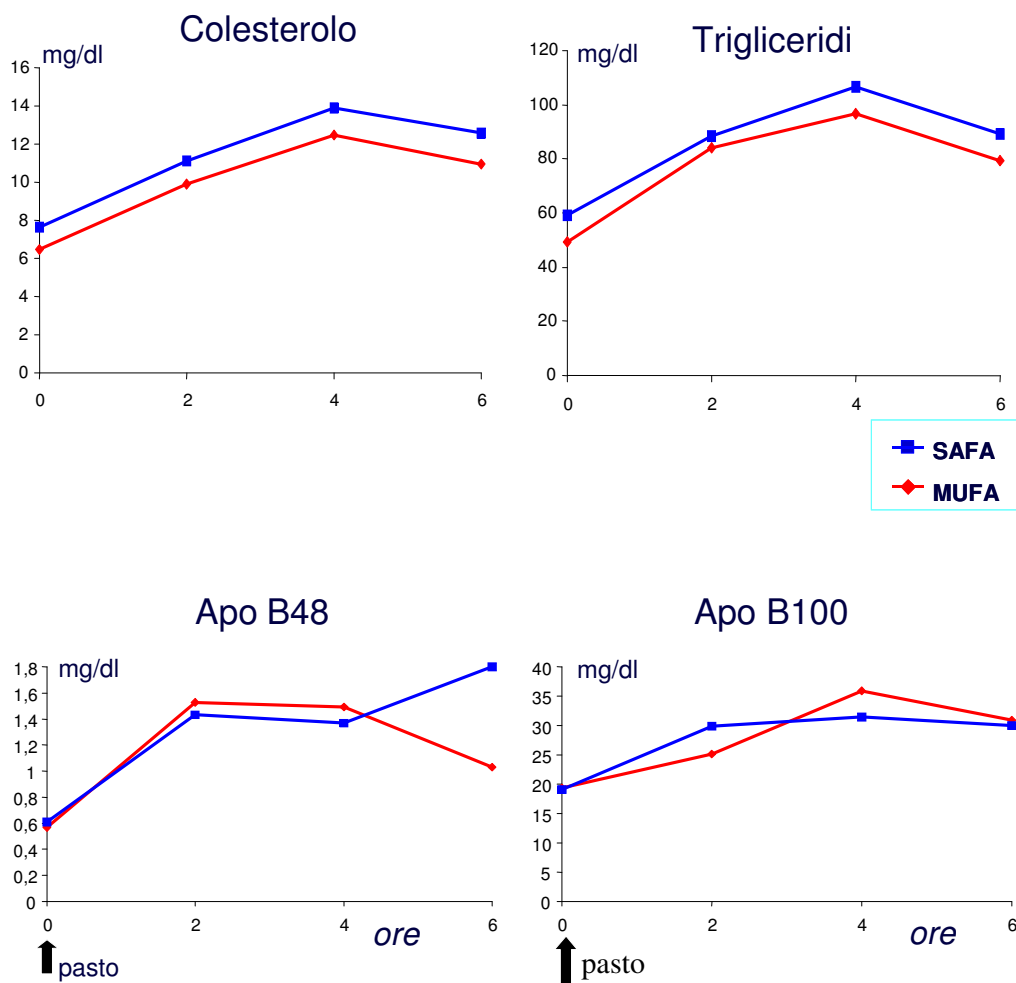




Le concentrazioni postprandiali di colesterolo, trigliceridi e di apo B-100 nelle VLDL grandi si sono mostrate simili alla fine delle due diete (figura 4.2.c). Le concentrazioni di apo B-48 sono state simili nella prima parte della curva postprandiale, mentre 6 ore dopo il pasto test esse erano più elevate, anche se non significativamente, dopo la dieta ricca in SAFA (figura 4.2.c). Il contenuto di trigliceridi e colesterolo delle VLDL piccole è diminuito nel periodo postprandiale dopo entrambe 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 4.2.b).

**Fig. 4.2.c**

**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)**



Tab. 4.2.b

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

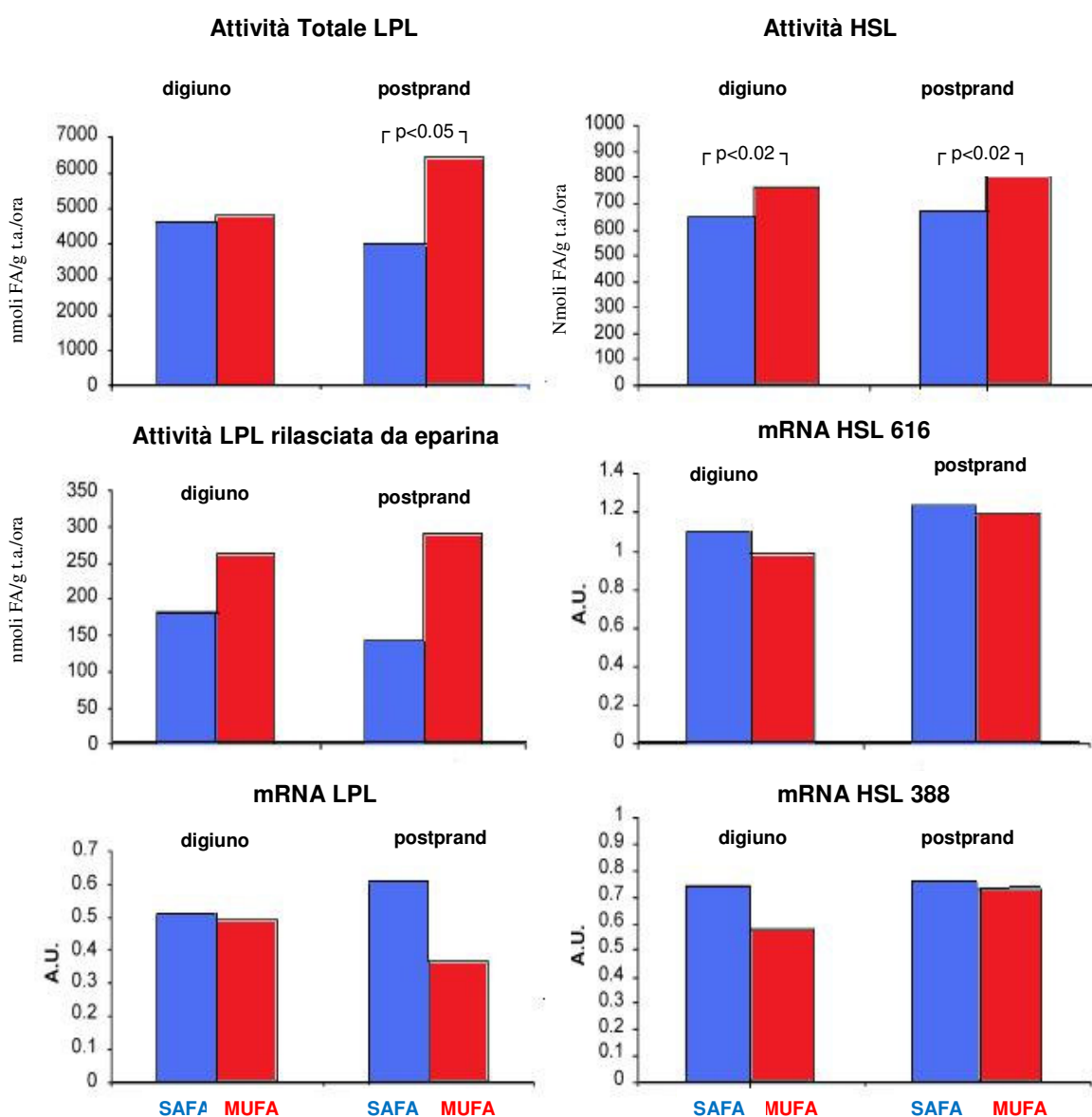
	MUFA	SAFA	p
<b>CHILOMICRONI</b>			
Colesterolo (mg/dl*6h)	4.27±0.80	4.14±1.04	0.85
Trigliceridi (mg/dl*6h)	120.6±19.1	113.3±18.6	0.68
Apo B-48 (mg/l*6h)	0.32±0.09	0.68±0.33	0.28
Apo B-100 (mg/l*6h)	0.78±0.31	0.96±0.52	0.67
<b>VLDL GRANDI</b>			
Colesterolo (mg/dl*6h)	24.7±5.2	24.3±4.1	0.90
Trigliceridi (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
<b>VLDL PICCOLE</b>			
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

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 4.2.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 4.2.d). Invece non c'è stata nessuna differenza nei livelli di mRNA dell'HSL del tessuto adiposo (per entrambe le forme: HSL616 e HSL388).

**Fig. 4.2.d**

**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**



## 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. Dopo la dieta ricca in MUFA si è osservato: 1) un più rapido incremento postprandiale nel contenuto di trigliceridi dei chilomicroni, differenza che non era più evidente nell'ultima parte della curva postprandiale; 2) una significativa diminuzione postprandiale nel contenuto dei trigliceridi delle VLDL piccole; 3) un aumento significativo dell'attività della LPL a livello del tessuto adiposo; 4) un aumento significativo dell'attività della HSL nel tessuto adiposo.

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 ha 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 MUFA<sup>60</sup>, in altri, invece, un aumento<sup>61,129</sup>

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 sani<sup>130</sup>. 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 aumento del contenuto dei trigliceridi dei chilomicroni, ma non del loro numero (l'apoB-48 dei chilomicroni era, infatti, diminuita 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<sup>130</sup> 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, per cui, di conseguenza, già dopo 4 ore essi erano 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 delle VLDL piccole, specialmente dei loro trigliceridi, 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. Pertanto, l'aumentata attività della LPL 6 ore dopo il pasto test sembra essere dovuta ad eventi post-trascrizionali o ad un incremento dell'espressione genica della LPL durante la prima parte della curva postprandiale.

Un altro studio<sup>130</sup> 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 secondaria al rapido incremento dei trigliceridi dei chilomicroni, è capace, comunque, di neutralizzare completamente questa più alta risposta trigliceridica 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 nuovo, che 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 saturi (SAFA), ma riduce significativamente la risposta postprandiale delle VLDL piccole, che sono considerate le più aterogene tra le VLDL.

### **STUDIO n.3. Effetti di una dieta ricca in carboidrati, fibre e a basso indice glicemico sulle alterazioni lipidiche postprandiali del diabete tipo 2.**

(Lavoro inviato a Diabetologia, Appendice n.3, pubblicazione come Abstracts n. 2 e 3)

#### **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 2<sup>131-135</sup>. I due approcci nutrizionali attualmente consigliati per il trattamento del diabete tipo 2 consistono o in una dieta ricca in CHO e fibre o in una dieta ridotta in CHO e ricca in grassi monoinsaturi. Dall'insieme degli studi effettuati 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 plasmatici<sup>132</sup>. Tuttavia, questi effetti negativi possono essere evitati se si scelgono alimenti ricchi in CHO, ma con basso indice glicemico e/o ricchi in fibre<sup>162</sup>. 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 lipolitici 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 voluto confrontare l'effetto di una dieta ricca in CHO, fibre e a basso indice glicemico che, per le sue caratteristiche, abbiamo chiamato dieta Mediterranea, con una relativamente povera in CHO e 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**

Hanno partecipato allo studio 18 pazienti con diabete mellito tipo 2, dopo aver dato il loro consenso informato. I pazienti erano in lieve sovrappeso (IMC:  $27 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup>), in buon compenso glicemico (HbA1c:  $6.9 \pm 0.7\%$ ) in terapia con sola dieta (n=13) o dieta + metformina (n=5) e avevano livelli di lipidi a digiuno (colesterolo:  $159 \pm 30$  mg/dl, trigliceridi:  $103 \pm 35$  mg/dl). Nessun paziente assumeva farmaci ipolipemizzanti. I soggetti non avevano storia o sintomi associati ad altre malattie, eccetto il diabete. Nessuno era vegetariano e/o impegnato in attività fisica intensa.

### **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 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 4.3.a. La dieta Mediterranea è rappresentata dal 52% dell'energia totale da CHO, contiene 28 g di fibre /1000 kcal, ed è a basso indice glicemico (58%); la dieta povera in CHO, ricca in MUFA è rappresentata dal 45% dell'energia totale da CHO, fornisce 8 g di fibre /1000 kcal, ed è ad alto indice glicemico (88%). Le due diete sono uguali per quanto riguarda gli altri componenti (proteine, grassi saturi).

La diversa composizione di nutrienti delle due diete è stata ottenuta grazie ad un'appropriata scelta degli alimenti e del condimento. Per la dieta Mediterranea gli alimenti predominanti sono i legumi (fagioli, ceci, lenticchie etc.), i vegetali (bieta, carciofi, finocchi, spinaci etc.), la frutta (pere, mele, arance etc.) e i cereali ricchi in fibre (bastoncini di crusca di frumento, pane di tipo integrale), mentre per la dieta povera in CHO, ricca in MUFA, l'olio extra vergine di oliva rappresenta il condimento caratterizzante (circa 60-80g al giorno). I due regimi dietetici sono frazionati in tre pasti principali (colazione, pranzo, cena): i pasti principali variano quotidianamente, mentre la colazione rimane invariata. La composizione bromatologica è stata calcolata utilizzando le tabelle di composizione degli alimenti dell'Istituto Nazionale di Nutrizione.

### **Procedure sperimentali**

Al termine di ciascun periodo di trattamento dietetico i pazienti hanno effettuato: 1) a digiuno di 12 ore prelievi per la determinazione di colesterolo e trigliceridi totali, delle HDL e delle LDL; 2) misurazione domiciliare dei livelli plasmatici di trigliceridi e glucosio con prelievi a digiuno, immediatamente prima e dopo 2 e 3 ore dopo il pranzo e prima di cena per due giorni consecutivi ; 3) un pasto test di composizione simile al trattamento dietetico seguito e prelievi prima e dopo 2, 4 e 6 ore dal pasto standard per la determinazione di glucosio, insulina, colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle subfrazioni lipoproteiche (chilomicroni, VLDL grandi e piccole, IDL, LDL, HDL); alla fine del periodo con la dieta Mediterranea il

pasto era consistito in pasta e fagioli e 150 g di mele, con un contenuto calorico pari a 948 kcal. Esso era composto per il 30% da grassi, di cui il 7% da grassi saturi, per il 52% da carboidrati, per il 18% da proteine ed ha un indice glicemico pari al 52% (tabella 4.3.b). Invece, alla fine del periodo con la povera in CHO e ricca in MUFA il pasto test consisteva in un gateau di patate e 250 g di succo d'arancia, con un contenuto calorico uguale a quello del precedente pasto ma con una percentuale di nutrienti differente: 37% di grassi, di cui il 7% di saturi, il 45% di carboidrati, il 18% di proteine e un indice glicemico pari al 96% (tabella 4.3.b).

4) sei ore dopo il pasto è stata eseguita un'agobiopsia del tessuto adiposo sottocutaneo addominale per la determinazione delle attività lipasi lipoproteica (LPL) e della lipasi ormono-sensibile (HSL)

**Tab. 4.3.a**  
**Composizione delle due diete**

	<b>Dieta Mediterranea</b>		<b>Dieta povera in CHO</b>	
	Raccomandata	Seguita (M±DS)	Raccomandata	Seguita (M±DS)
Energia totale (kcal/die)	1918	1874±315	1939	1862±348
Proteine (%)	18	18±1	18	18±1
Grassi totali (%)	30	30±1*	37	37±1
Saturi(%)	3	7±1	7	7±1
Monoinsaturi (%)	<b>17</b>	17±1*	<b>23</b>	23±1
Polinsaturi n-6 fat (%)	3.9	4.2±0.3	4.2	4.3±0.3
Colesterolo (g/die)	143	133±43	158	160 ±32
Carboidrati (%)	<b>52</b>	51±1*	<b>45</b>	44±1
Fibre (g/1000 Kcal)	<b>28</b>	27±2*	<b>8</b>	8±1
Indice glicemico (%)	<b>58</b>	60±4*	<b>88</b>	87±2
Carico glicemico (%)	<b>155</b>	154±24*	<b>205</b>	207±37

\* p<0.05 vs. dieta povera in CHO



**Tab 4.3.b**  
**Caratteristiche bromatologiche dei due pasti test**

	Proteine	Lipidi	Saturi	MUFA	Carboidrati	Fibre	IG	Calorie
<b>Pasto dopo dieta Mediterranea</b>	18%	30%	7%	16%	52%	24g	53%	948 Kcal
<b>Pasto dopo dieta povera in CHO</b>	18%	37%	8%	21%	45%	7.5g	97%	948 Kcal

#### **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 ai metodi standard usando il software SPSS (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL).

#### **Risultati**

Non ci sono state differenze del peso corporeo alla fine dei due differenti approcci dietetici. L'adesione ad entrambe le diete è stata ottima, come mostrato dalla composizione delle diete seguite dai pazienti e valutate mediante il calcolo del diario alimentare somministrato al termine dei due periodi di dieta (tabella 4.3.a). Come atteso, le diete seguite dai pazienti erano significativamente differenti unicamente per quanto riguarda il contenuto in grassi totale, in MUFA, CHO, fibre, indice glicemico e carico glicemico. (tabella 4.3.a). Gli effetti delle due diete sui lipidi plasmatici sono mostrati nella tabella 4.3.b: alla fine della dieta e Mediterranea si è verificata una riduzione significativa del colesterolo totale, del colesterolo LDL e del colesterolo HDL ( $p < 0.05$ ) e un incremento dei trigliceridi delle HDL rispetto alla

dieta povera in CHO, ricca in MUFA. I livelli dei trigliceridi delle LDL sono risultati simili alla fine delle due diete.

**Tab 4.3.c**

**Colesterolo e trigliceridi totali,delle LDL e delle HDL a digiuno alla fine dei due periodi di dieta**

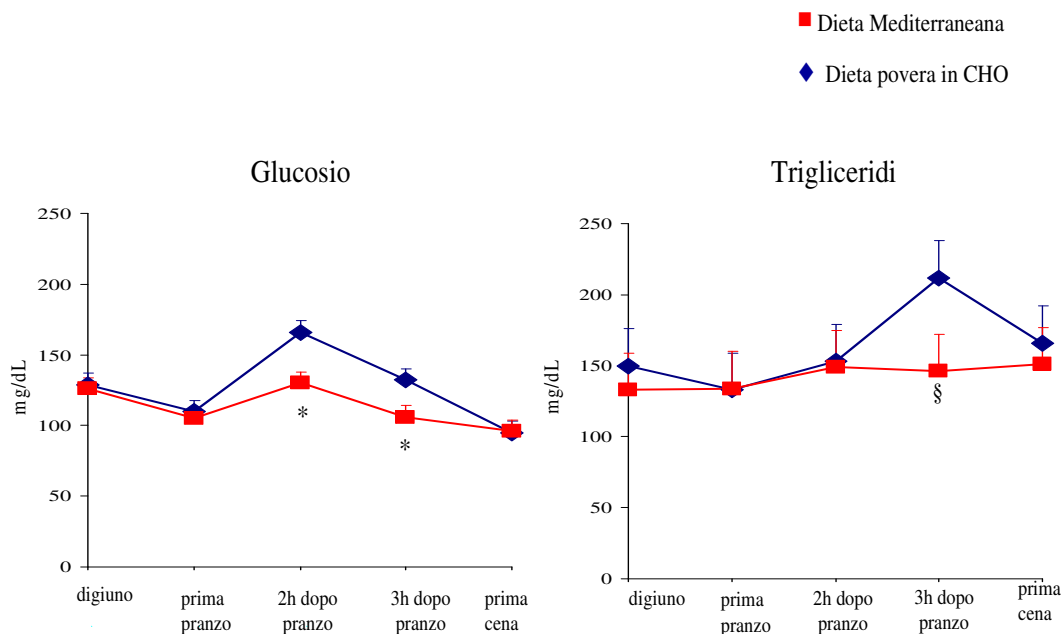
	<b>Dieta Mediterranea</b>	<b>Dieta povera in CHO</b>
Colesterolo totale (mg/dl)	162±27 *	170±30
Trigliceridi totali (mg/dl)	96±29	89±31
LDL Colesterolo (mg/dl)	101±23 *	109±24
LDL Trigliceridi (mg/dl)	15±4.0	16±4.7
HDL Colesterolo (mg/dl)	38±9.6 *	41±10
HDL Trigliceridi (mg/dl)	18±4.8 *	16±4.1

M± DS,\*p<0.05

I dati relativi all'autocontrollo del glucosio e dei trigliceridi (media di due profili misurati dai pazienti al termine delle due diete) sono mostrati nella figura 4.3.a: I livelli di glucosio sono risultati significativamente più bassi 2 e 3 ore dopo il pranzo durante il periodo di dieta Mediterranea rispetto all'altro periodo dietetico. Allo stesso modo anche i trigliceridi sono risultati più bassi del 30% 3 ore dopo il pranzo

Fig. 4.3.a

**Livelli plasmatici di glucosio e trigliceridi (media di due profili giornalieri) misurati alla fine delle due diete**



M±ES, \*p<0.05, §=0.06

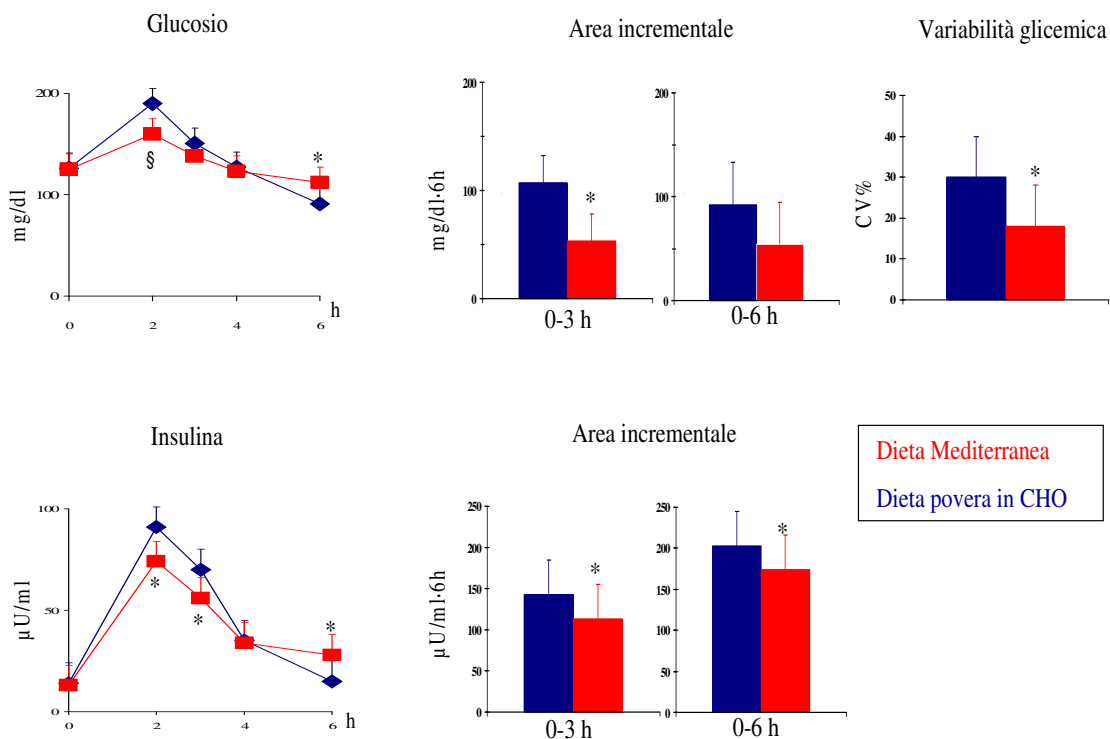
Dopo il pasto ricco in CHO e fibre effettuato al termine della dieta Mediterranea la glicemia è stata più bassa nella prima parte della curva posprandiale, in particolare dopo 2 ore dal pasto ( $160 \pm 46$  vs.  $190 \pm 70$  mg/dl,  $p=0.07$ ) e lo stesso si è verificato per i livelli plasmatici di insulina, che sono risultati significativamente più bassi alla seconda ( $74 \pm 54$  vs.  $91 \pm 61$   $\mu$ U/ml;  $p<0.05$ ) e terza ora ( $56 \pm 43$  vs.  $70 \pm 40$   $\mu$ U/ml;  $p<0.05$ ) rispetto ai risultati ottenuti dopo il pasto povero in CHO, ricco in MUFA effettuato alla fine dell'altra dieta. (figura 4.3.c).

Al contrario, i livelli plasmatici di glucosio ed insulina sono risultati significativamente più alti dopo 6 ore dal pasto ricco in CHO e fibre rispetto all'altro pasto test ( $112 \pm 31$  vs.  $91 \pm 21$  mg/dl;  $p<0.05$  per il glucosio e  $21 \pm 11$  vs.  $15 \pm 5$   $\mu$ U/ml;  $p<0.05$  per l'insulina). Tale andamento della curva postprandiale determina: 1) una riduzione dell'area incrementale postprandiale della glicemia (IAUC), in particolare fino alla terza ora (figure 4.3.b;  $p<0.05$ ); 2) una riduzione significativa dell'IAUC dell'insulina sia a 3 che 6 ore (figure 4.3.b;  $p<0.05$ ); 3) una riduzione significativa della variabilità glicemica postprandiale,

valutata come coefficiente di variazione della glicemia postprandiale ( CV risulta dimezzato dopo la dieta Mediterranea), ( $p < 0.02$ ; figure 4.3.b).

**Fig. 4.3.b**

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



Al termine della dieta Mediterranea l'area incrementale postprandiale dei trigliceridi era ridotta del 31% rispetto alla dieta povera in CHO ( $p = 0.06$ ) mentre non vi erano differenze significative per l'area incrementale del colesterolo.

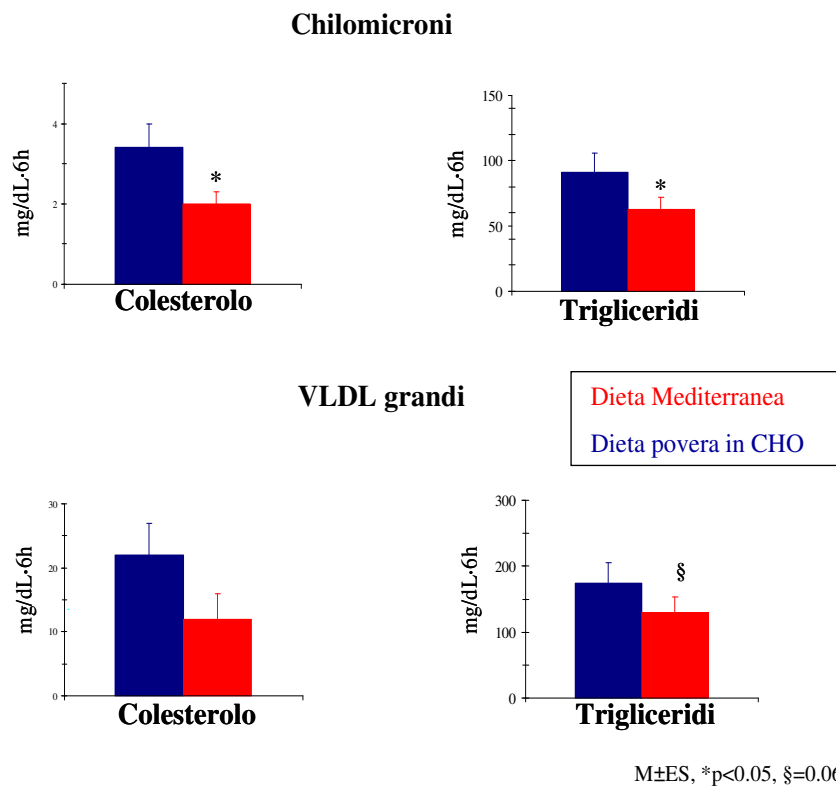
I risultati relativi alla risposta postprandiale delle lipoproteine ricche in trigliceridi sono riportati in figura 4.3.c come IAUC del colesterolo e dei trigliceridi dei chilomicroni e delle VLDL grandi. Sia i trigliceridi che il colesterolo dei chilomicroni erano più bassi dopo il pasto somministrato al termine della dieta Mediterranea, e l'area incrementale era significativamente più bassa ( $p < 0.05$  sia per i trigliceridi che per il colesterolo; figura 4.3.c).

Lo stesso si è osservato per quanto riguarda i trigliceridi delle VLDL grandi (IAUC  $129 \pm 83$  vs.  $174 \pm 108$  mg/dl·6h,  $p < 0.06$ ) (figure 4.3.c), delle VLDL piccole (IAUC  $-19 \pm 21$  vs.  $-13 \pm 19$

mg/dl·6h,  $P=0.07$ ) e delle LDL (IAUC  $-4\pm 5$  vs.  $15\pm 4$  mg/dl·6h,  $p<0.05$ ). Non sono state osservate differenze nella risposta postprandiale per le altre lipoproteine (dati non mostrati)

**Fig. 4.3.c**

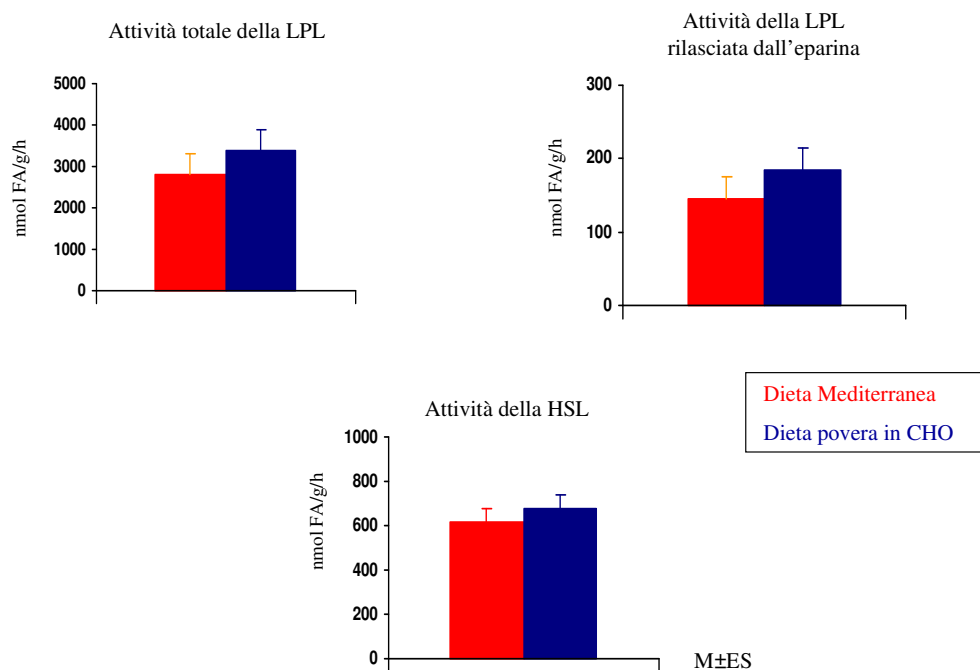
**Aree incrementali postprandiali per colesterolo e trigliceridi nel plasma, nei chilomicroni e nelle VLDL grandi dopo il pasto test alla fine delle due diete**



L'attività della LPL, sia totale che rilasciata dall'eparina, misurate entrambe in campioni agobiopici di tessuto adiposo, prelevati 6 ore dopo il pasto test di composizione simile al trattamento dietetico in corso, non mostrano significative differenze al termine delle due diete (attività totale LPL:  $2792\pm 958$  vs.  $3375\pm 2251$  nmol FA/g /h; attività LPL rilasciata dall'eparina:  $146\pm 70$  vs.  $184\pm 117$  nmol FA/g /h). Anche per quanto riguarda l'attività della HSL del tessuto adiposo, non sono state osservate differenze alla fine dei due differenti approcci dietetici ( $616\pm 237$  vs.  $676\pm 210$  nmol FA/g /h). (Fig.4.3.d).

Fig. 4.3.d.

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



### Discussione

Questo studio mostra chiaramente, per la prima volta, che una dieta moderatamente ricca in CHO, ricca in fibre e, quindi, anche con un basso indice glicemico e carico glicemico, che possiamo considerare la vera dieta Mediterranea, induce una significativa riduzione delle lipoproteine ricche in trigliceridi in fase postprandiale, in particolare dei chilomicroni, in pazienti con diabete tipo 2. Tale effetto si verifica anche durante la vita reale, infatti i livelli di trigliceridi misurati domiciliaramente con reflattometro, sono risultati essere più bassi del 30% 3 ore dopo pranzo. Inoltre, i nostri risultati suggeriscono che questo tipo di dieta è da preferire rispetto alla dieta povera in CHO e ricca in MUFA per i suoi effetti su: 1) controllo glicemico postprandiale, con una riduzione significativa del picco glicemico nella prima parte del periodo postprandiale, dell'area incrementale postprandiale e della variabilità glicemica.

Tale effetto è considerato molto importante per la prevenzione del rischio cardiovascolare nel paziente diabetico<sup>136</sup>, così come per la riduzione del rischio di ipoglicemie postprandiali tardive; 2) una riduzione significativa dell'insulina postprandiale, suggerendo un miglioramento dell'azione insulinica; 3) una riduzione significativa dei livelli di LDL colesterolo. Tale risultato, che potrebbe essere considerato di piccola entità (riduzione del 9%), è, invece molto importante da un punto di vista clinico, in considerazione della necessità di mantenere bassi i livelli di LDL- colesterolo, soprattutto in pazienti con diabete tipo 2<sup>137</sup>. In questo studio le attività della LPL e della HSL del tessuto adiposo non sembrano essere influenzate dai due differenti trattamenti dietetici, suggerendo che le attività del tessuto adiposo non giocano un ruolo importante nel determinare i risultati di questo studio. Le due diete potrebbero agire mediante altri meccanismi, in particolare sull'assorbimento degli acidi grassi della dieta e del colesterolo e sulla produzione di chilomicroni e VLDL. Infatti, da una parte, la dieta povera in CHO e ricca in MUFA essendo più ricca in grassi, maggiori determinanti della risposta lipidica postprandiale, potrebbe indurre un più intenso assorbimento di acidi grassi e quindi determinare una più rivelante produzione di chilomicroni. Dall'altra parte, essendo la dieta Mediterranea allo stesso tempo ricca in CHO e fibre, potrebbe agire attraverso diversi meccanismi, per esempio ritardando lo svuotamento gastrico, riducendo l'assorbimento di glucosio, colesterolo, acidi grassi ed, infine, riducendo la produzione intestinale di chilomicroni, come è descritto in studi in vitro e in vivo<sup>138</sup>. Inoltre, dal momento che la dieta Mediterranea riduce la risposta postprandiale di glicemia e insulina, è probabile che tali effetti determinino una riduzione della lipogenesi de novo, stimolata da i livelli di glicemia e insulinemia e particolarmente rilevante nei pazienti diabetici, nei quali contribuisce al 25% della sintesi delle VLDL<sup>139</sup>. In questo studio non abbiamo determinato le Apo B48 e Apo B100 delle diverse lipoproteine. Per tale motivo non possiamo con precisione differenziare le lipoproteine esogene da quelle endogene ma è probabile che la dieta Mediterranea, possa determinare i suoi effetti limitando la produzione endogena di VLDL oltre che riducendo la secrezione e produzione di chilomicroni. Inoltre, la dieta Mediterranea, sembrerebbe indurre un miglioramento della sensibilità insulinica, come suggerito dall'andamento della glicemia e della insulinemia postprandiale, che è un effetto molto importante se consideriamo che l'insulino-resistenza svolge un ruolo centrale nel determinismo delle alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale. La rilevanza clinica dei risultati di tale studio risiede nel fatto che la lipemia postprandiale è considerata un fattore di rischio cardiovascolare indipendente. Inoltre, abbiamo detto che, i pazienti con diabete tipo 2 sono caratterizzati da frequenti e molteplici anomalie del metabolismo in fase postprandiale

che, potrebbero in parte spiegare il loro elevato rischio cardiovascolare. Quindi, proprio in questi pazienti, risulta particolarmente utile un approccio nutrizionale di questo tipo capace di influenzare anche le anomalie lipidiche postprandiali in aggiunta agli altri fattori di rischio cardiovascolare. A tal riguardo particolarmente interessanti sono gli effetti della dieta sui livelli plasmatici di glicemia e insulinemia. In particolare, è importante sottolineare l'effetto modulante della dieta Mediterranea sulla glicemia postprandiale : riduzione del picco postprandiale nella prima parte della curva e con un lieve incremento dei livelli plasmatici di glucosio nella seconda parte della curva postprandiale( sesta ora). Tale andamento, da una parte, determina una riduzione della variabilità glicemica, considerata un ulteriore possibile fattore di rischio cardiovascolare e, dall'altra parte, determina una riduzione del rischio di eventuali ipoglicemie postprandiali tardive, che spesso si verificano in pazienti con diabete tipo 2 in terapia con sulfaniluree o insulina. In conclusione, questo tipo di dieta, relativamente ricca in CHO, ricca in MUFA e a basso indice glicemico, per i suoi effetti benefici su diversi fattori di rischio cardiovascolare, comprese le alterazioni lipoproteiche in fase postprandiale, potrebbe rappresentare la dieta di scelta nel trattamento dietetico del diabete tipo 2.



**STUDIO n.4. Effetti di alimenti funzionali arricchiti in fibre vegetali, acidi grassi n-3, folati, betaglucani e tocoferoli in soggetti con lievi alterazioni del metabolismo lipidico.**

(Lavoro pubblicato come abstract n. 4 su Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease).

**Introduzione**

La dieta può svolgere un ruolo di primaria importanza nel prevenire le malattie cardiovascolari influenzando più fattori di rischio cardiovascolare attraverso molteplici meccanismi. Gli effetti di una alimentazione corretta non sono mediati solo dalle variazioni dei livelli plasmatici di colesterolo o degli altri fattori di rischio classici, ma anche dai possibili effetti su altri fattori di rischio cardiovascolare, quali l'alterata sensibilità insulinica, alterazioni dei lipidi nella fase postprandiale, anomalie della funzione endoteliale, aumento dello stress ossidativo, dei processi infiammatori e incremento dei livelli di omocisteinemia<sup>140</sup>. Pertanto, è fondamentale definire un modello alimentare capace di agire su multipli fattori di rischio cardiovascolare promuovendo anche il benessere psicofisico degli individui. Tuttavia, l'adesione a tale modello non è sempre facile e risulta piuttosto deludente soprattutto se consideriamo lunghi periodi di tempo. Nel tentativo di migliorare l'adesione alla dieta, prospettive promettenti potrebbero essere legate allo sviluppo di alimenti funzionali, che, pur conservando le caratteristiche organolettiche di alimenti di largo consumo, siano arricchiti di principi nutrizionali in grado di modulare il rischio cardiovascolare. Naturalmente, affinché gli effetti positivi sul miglioramento della salute o sulla diminuzione del rischio di malattia si possano verificare, la assunzione di alimenti funzionali deve avvenire nell'ambito di uno stile di vita sano e di una alimentazione adeguata. Recentemente sono stati prodotti alimenti arricchiti in principi attivi dimostratisi capaci di influenzare positivamente il rischio cardiovascolare, cioè acidi grassi  $\omega$ -3, fibre solubili, in particolare betaglucani, folati e tocoferoli<sup>141-145</sup>.

E' necessario, a questo punto, valutare se effettivamente questi prodotti arricchiti di tali principi attivi, abbiano una reale efficacia nell'influenzare in modo benefico il senso di sazietà, il profilo lipidico, il metabolismo glucidico, i markers dell' infiammazione e della funzione vascolare e, quindi, nel modulare il rischio cardiovascolare. A tal fine abbiamo confrontato gli effetti di una dieta contenente alimenti funzionali arricchiti di acidi grassi  $\omega$ -3 a lunga catena (800 mg/giorno), acidi grassi  $\omega$ -3 a corta catena (400 mg/giorno), betaglucani (3.6 g/giorno), folati (1600  $\mu$ g/giorno) e tocoferoli (120 mg/giorno rispetto ad una dieta uguale, ma senza la presenza di questi, su diversi fattori di rischio cardiovascolare in soggetti con lievi alterazioni del metabolismo lipidico

## **Soggetti**

Hanno partecipato allo studio 16 soggetti, di cui 7 donne e 9 uomini. La popolazione in studio era caratterizzata da un lieve sovrappeso e presentava lievi alterazioni del metabolismo lipidico, avendo livelli plasmatici medi di colesterolo di  $218 \pm 7$  mg/dl, di trigliceridi di  $168 \pm 76$  mg/dl, di HDL-colesterolo di  $41 \pm 14$  mg/dl, di LDL-colesterolo di  $218 \pm 30$  mg/dl ( $M \pm DS$ ). Nessun partecipante assumeva terapia farmacologica ipolipidemizzante. Erano esclusi dalla studio soggetti con diabete, eventi cardiovascolari pregressi, insufficienza renale ed epatica, anemia ed altre patologia invalidanti.

## **Disegno sperimentale**

Lo studio è stato effettuato secondo un disegno di tipo cross-over, randomizzato, in doppio cieco. Dopo il run-in ci circa 2 settimane, i soggetti sono stati assegnati, in modo casuale, ad uno dei due periodi di intervento: dieta Test contenente gli alimenti funzionali arricchiti dei principi attivi da testare o dieta di controllo contenente gli stessi prodotti ma non arricchiti in principi attivi che si presentavano del tutto identici agli alimenti di controllo. Sia i partecipanti che il medico coinvolto nella sperimentazione non erano a conoscenza di quale fosse il periodo in cui venivano consumanti gli alimenti arricchiti in principi attivi. Alla fine del primo periodo, della durata di quattro settimane, ciascun soggetto è passato, per altre quattro settimane, all'altro tipo di dieta.

Le diete consigliate erano isoenergetiche per far sì che il peso corporeo non variesse durante lo studio ed avevano la stessa composizione percentuale di nutrienti, eccetto per il contenuto di principi attivi aggiunti in uno dei due periodi: acidi grassi  $\omega$  3, betaglucani, folati e tocoferoli. In particolare la composizione della dieta consigliata era in linea con le raccomandazioni per la prevenzione delle malattie cardiovascolari: proteine 16%, lipidi 35% di cui saturi <10%, carboidrati 49% di cui solubili 15%, colesterolo <300 mg/giorno. In uno dei due periodi, nell'ambito della dieta abituale dei partecipanti allo studio, sono stati inseriti i prodotti arricchiti dei principi attivi da testare, in particolare sono state inserite due porzioni di pane (160 g), 1 brioche (50 g) e 1 merenda (50 g) al giorno, in modo da raggiungere un apporto giornaliero di n-3 a lunga catena di 800 mg, di n-3 a corta catena di 400 mg, di betaglucani di 3.6 g, di folati di 1600  $\mu$ g, di tocoferoli di 120 mg in aggiunta alla quota di tali principi nutritivi presente nella dieta abituale. Nell'altro periodo, sempre nell'ambito della dieta abituale, sono stati inseriti gli stessi prodotti utilizzati nella dieta test non arricchiti dei principi attivi da testare (dieta controllo). Pertanto, le due diete differivano solo per la presenza di questi principi attivi (tabella 4.4.a)

### **Procedure sperimentali**

Dopo il periodo di run-in e alla fine di ciascun trattamento dietetico sono stati eseguiti a digiuno prelievi per la determinazione di colesterolo e trigliceridi nel plasma, glicemia, insulinemia, acidi grassi liberi (FFA), proteina C reattiva (PCR) e omocisteina.

Alla fine di ciascun trattamento dietetico sono stati eseguiti a digiuno e dopo il pasto test prelievi per la determinazione di colesterolo e trigliceridi nel plasma e nelle principali frazioni lipoproteiche (chilomicroni, VLDL, LDL e HDL), glicemia, insulinemia e PCR. Alla fine delle due diverse diete è stato inoltre effettuato un test per la valutazione del senso di sazietà (Visual Analogue Scale). Il pasto standard, utilizzato alla fine dei due periodi, aveva lo stesso apporto calorico e la stessa composizione: 1029 Kcal, Proteine 12 %, Carboidrati 28 %, Grassi 60 %, Colesterolo 621 mg. Differiva, secondo il trattamento dietetico in corso, soltanto per il contenuto in acidi grassi della serie  $\omega$ -3 (1.2 g), betaglucani (2 g), folati (1074  $\mu$ g) e tocoferoli (74  $\mu$ g) forniti dagli alimenti da testare. Esso era costituito, alla fine della dieta test, da una brioche con principi attivi (50g), un sandwich preparato con pane contenente principi attivi (110g) e una frittata preparata con 2 uova, pecorino romano (18g) e burro (50g); alla fine della dieta di controllo il pasto era uguale, ma preparato con i prodotti senza i principi attivi.

### **Analisi statistiche**

I valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard. Le differenze tra i due trattamenti dietetici sono state valutate mediante “test t di Student” per dati appaiati. Le variabili con distribuzioni non Gaussiane, come i trigliceridi totali del plasma e delle differenti classi di lipoproteine, sono state valutate previa trasformazione logaritmica oppure utilizzando test statistici non parametrici (Wilcoxon signed ranks test). La risposta al pasto è stata valutata come media postprandiale, ovvero come media aritmetica dei valori postprandiali ai tempi 180 min. e 360 min. E' stata considerata statisticamente significativa una  $p < 0.05$  a due vie. Per l'elaborazione statistica è stato utilizzato il software “Statistical Package for Social Sciences” (SPSS).

### **Risultati**

La composizione delle diete seguite, valutata con il 7 days food record, è risultata sovrapponibile a quelle consigliate e, come atteso, la dieta test seguita dal nostro campione era diversa rispetto alla dieta controllo solo per quanto riguarda i principi attivi presenti negli alimenti testati; le differenze sono risultate statisticamente significative ( $p < 0.05$ ) per quanto riguarda appunto gli apporti di: PUFA totali, PUFA  $\omega$ -3, fibra totale, fibra solubile, folati e

tocoferoli (tabella 4.4.a). Come atteso il peso corporeo dei partecipanti si è mantenuto stabile dall'inizio alla fine del periodo di studio.

**Tab. 4.4.a**  
**Composizione delle due diete**

	<b>Dieta Test</b>		<b>Dieta Controllo</b>	
	Raccomandata	Seguita	Raccomandata	Seguita
Energia (kcal)	1986	2003±62	1986	1934±80
Grassi totali (g)	78 (35)	77±2	78 (35)	75±2
Grassi Saturi (g)	23 (10)	23±1	23 (10)	22±1
Grassi Monoinsaturi (g)	33 (15)	33±1	33 (15)	31±2
Grassi Polinsaturi (g)	9 (4)	8±0.4*	7 (3)	7±0,5
Grassi Polinsaturi n-3° (g)	1.3	2±0.01*	0.1	0.5±0.01
Colesterolo (mg)	205	220±14	205	224±12
Carboidrati (g)	258 (49)	269±11	258 (49)	258±13
solubili (g)	80 (15)	78±3	80 (15)	82±7
Fibre (g)	30	28±0.5	27	24±1
insolubili (g)	10	9±0.4	10	9±1
solubili (g)	8	7±0.2*	5	4±0.3
Folati(µg)	1967	1679±52*	367	158±26
Tocoferoli (mg)	128	121±2*	8	8±1

M±ES; \*P<0.05; ° DHA-EPA ALA

La tabella 4.4.b mostra i livelli plasmatici di colesterolo e di trigliceridi alla fine dei due periodi di intervento. Si può osservare che i livelli di trigliceridi si riducono significativamente alla fine della dieta test nei confronti della dieta di controllo ( $p<0.05$ ), con una riduzione percentuale dell'11%. Non ci sono differenze statisticamente significative, invece, per quanto riguarda il colesterolo plasmatico. I due trattamenti dietetici non hanno determinato alcuna variazione significativa neanche per quanto riguarda le frazioni di colesterolo HDL ed LDL, mentre si è osservata una riduzione statisticamente significativa dei trigliceridi delle LDL dopo la dieta test rispetto alla dieta di controllo.

Tab. 4.4.b

**Colesterolo e trigliceridi totali, delle LDL e delle HDL a digiuno alla fine dei due periodi di dieta**

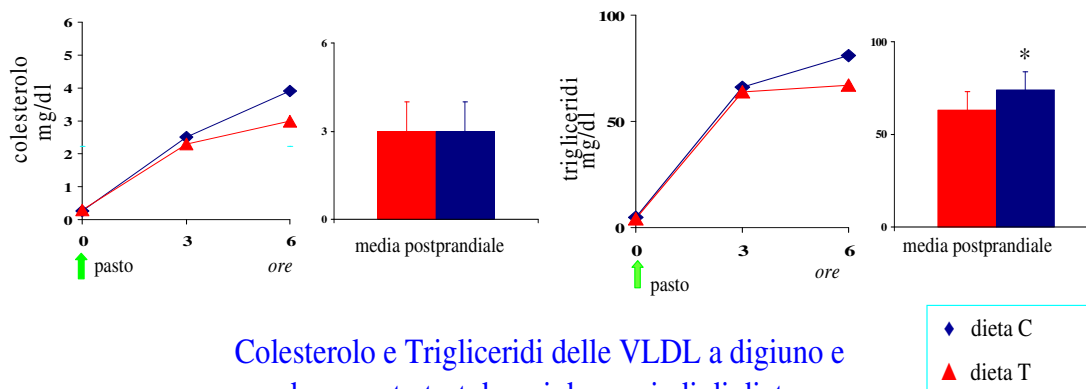
	Colesterolo		Trigliceridi	
	Dieta C	Dieta T	Dieta C	Dieta T
Totali (mg/dl)	208±21	204±26	153 ± 58	138±66*
LDL (mg/dl)	122 ±14	121 ±23	25 ±8	22 ±7*
HDL (mg/dl)	41 ±13	39 ±12	20 ±6	19 ±5

M±DS, \*p<0.05

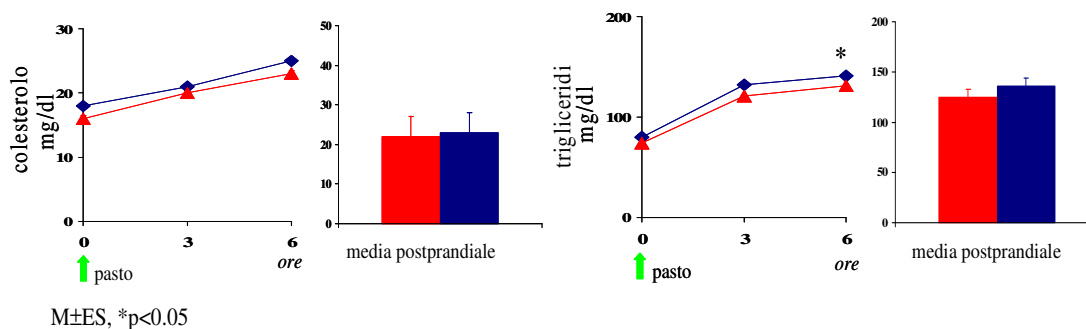
In relazione ai livelli plasmatici delle lipoproteine ricche in trigliceridi, chilomicroni e VLDL, in fase postprandiale la quota di trigliceridi contenuta nei chilomicroni è ridotta alla fine della dieta test con una differenza statisticamente significativa ( $p<0.05$ )(figura 4.4.b). Anche i trigliceridi delle VLDL sono ridotti in fase postprandiale dopo la dieta arricchita di principi attivi e la differenza raggiunge la significatività statistica 6 ore dopo il pasto test (131±85 vs. 141±75 mg/dl,  $p<0.05$ ). Il colesterolo e i trigliceridi delle LDL e delle HDL non mostrano alcuna differenza dopo il pasto test alla fine dei due diversi tipi di trattamento (dati non mostrati).

Fig 4.4.b

### Colesterolo e Trigliceridi dei chilomicroni a digiuno e dopo pasto test dopo i due periodi di dieta



### Colesterolo e Trigliceridi delle VLDL a digiuno e dopo pasto test dopo i due periodi di dieta



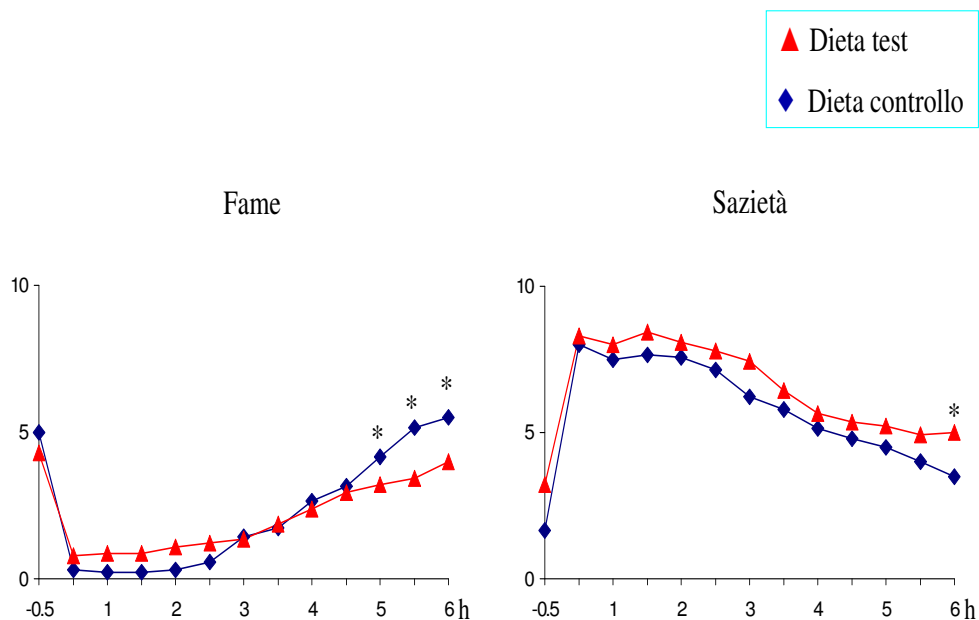
Sia a digiuno che in fase postprandiale non ci sono differenze sostanziali per quanto riguarda la glicemia, invece l'insulinemia è risultata significativamente più bassa nella fase postprandiale precoce (1<sup>a</sup> ora) alla fine della dieta ricca in principi attivi. Gli FFA sono risultati sostanzialmente simili sia a digiuno che in fase postprandiale in seguito ai due trattamenti dietetici (dati non mostrati).

I livelli di omocisteina misurati a digiuno dopo i due differenti approcci dietetici sono risultati significativamente più bassi dopo la dieta test rispetto alla dieta controllo (10 ±3 vs. 8±2 μmol/L, p=0.03, dati non mostrati).

Infine, per quanto riguarda i risultati relativi al senso di fame e sazietà si è osservata, per il senso di sazietà, una significativa riduzione a partire dalla 5<sup>a</sup> ora dopo il pasto ricco in principi attivi. In linea con questo dato si è verificata una maggiore sazietà dopo il pasto arricchito di principi attivi con una differenza statisticamente significativa alla 6<sup>a</sup> ora (p<0.05).(fig)

Fig 4.4.d

## Valutazione del senso di fame e sazietà mediante VAS (Visual Analogue Scale)

\* $p < 0.05$ **Discussione**

I risultati di questo studio dimostrano che l'inserimento in una dieta equilibrata di alimenti arricchiti con dosi moderate di acidi grassi  $\omega$ -3 a corta e a lunga catena, betaglucani, folati e tocoferoli è in grado di ridurre i livelli plasmatici dei trigliceridi e dell'omocisteina così come è in grado di aumentare il senso di sazietà. Per quanto riguarda l'effetto sui trigliceridi, esso si esplica sia a digiuno con una riduzione dell'11% sia nella fase postprandiale con una riduzione del 6%. Nella fase postprandiale tale riduzione riguarda principalmente la frazione dei chilomicroni, cioè delle lipoproteine di origine esogena. L'effetto sui trigliceridi è quasi sicuramente da attribuirsi agli acidi grassi  $\omega$ -3, la cui azione ipotrigliceridemizzante è stata ampiamente dimostrata, anche se in genere con dosi più elevate di 2-3 g al giorno. Inoltre il nostro studio dimostra che con gli alimenti testati è possibile ridurre i trigliceridi postprandiali che, come si è detto, sono spesso elevati anche in individui con valori di trigliceridi a digiuno del tutto normali come si osserva in persone con diabete tipo 2 e/o sindrome metabolica. Nel nostro studio non si sono avute variazioni del colesterolo ed in particolare del colesterolo LDL. Dai dati della letteratura si sa che gli acidi grassi  $\omega$ -3 determinano, insieme alla riduzione dei trigliceridi plasmatici, anche un aumento, certamente non desiderato, del colesterolo LDL di circa il 10%<sup>146</sup>. Il fatto che ciò non si verifichi nel

nostro studio può essere attribuito alle basse dosi utilizzate di acidi grassi  $\omega$ -3 o anche al possibile effetto del betaglucano che, per la sua azione ipocolesterolemizzante, potrebbe aver controbilanciato l'effetto negativo degli acidi grassi  $\omega$ -3 sul colesterolo LDL. Gli alimenti da noi utilizzati hanno anche determinato una riduzione dell'omocisteina, da mettere in relazione con l'arricchimento in folati. Questo effetto sulla omocisteina ha un importante significato clinico giacchè questo parametro potrebbe rappresentare un importante fattore di rischio non solo per eventi coronarici ma anche cerebrali<sup>147</sup>. La dieta con alimenti funzionali induceva inoltre alla fine del pasto una riduzione del senso di fame con conseguente aumento di quello di sazietà da mettere verosimilmente in relazione con l'arricchimento in betaglucani. Questo maggiore effetto saziante degli alimenti utilizzati in questo studio è particolarmente evidente nella parte più tardiva della fase postprandiale (5<sup>a</sup>-6<sup>a</sup> ora) e, pertanto, potrebbe determinare una riduzione nell'introito calorico del pasto successivo. Questo effetto che, d'altra parte, è abbastanza tipico delle fibre solubili come il betaglucano potrebbe essere importante nel condizionare un minore introito calorico e quindi una migliore adesione a diete ipocaloriche. Per quanto riguarda il metabolismo glicidico, nel nostro studio non si sono avuti effetti sulla glicemia postprandiale, nonostante la presenza dei betaglucani. Si è avuta, invece, una riduzione nei livelli di insulinemia in particolare nella prima ora dopo il pasto. La riduzione della insulinemia, a parità di glicemia, suggerisce un miglioramento dell'azione insulinica. Un altro aspetto importante di questo studio è che gli alimenti arricchiti nei vari principi attivi sono stati accettati dai volontari senza alcuna difficoltà, suggerendo che gli alimenti, pur se addizionati in principi attivi, non hanno perso le loro caratteristiche organolettiche. In sintesi, il profilo dei fattori di rischio cardiovascolare risulta complessivamente migliorato dall'intervento con gli alimenti funzionali da noi testati con un ottima compliance da parte dei pazienti e in assenza di effetti collaterali.



## 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). Il diabete, indipendentemente dalla presenza di obesità, si associa ad alterazioni lipidiche postprandiali che riguardano le lipoproteine ricche in trigliceridi di origine esogena (chilomicroni).
- 2) Una ridotta attività della lipasi lipoproteica del tessuto adiposo è presente solo nei pazienti con diabete tipo 2 e sembra avere un ruolo fondamentale nel determinismo delle alterazioni delle lipoproteine di origine esogena in fase postprandiale che si osservano in questi pazienti.
- 3) Una dieta ricca in acidi grassi monoinsaturi, rispetto ad una ricca in acidi grassi saturi, non determina effetti particolarmente favorevoli sul metabolismo lipidico postprandiale. Infatti determina una più precoce sintesi dei chilomicroni che, però, viene rapidamente controbilanciata da un aumento nell'attività della LPL del tessuto adiposo.
- 4) 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 dipendono da modifiche sostanziali delle attività lipolitiche del tessuto adiposo.
- 5) L'utilizzo di alimenti funzionali arricchiti in principi attivi può rappresentare un utile mezzo per facilitare l'implementazione di una dieta sana con effetti vantaggiosi sul metabolismo intermedio e sul senso di sazietà.

## 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. Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A. Metabolism of triglyceride rich lipoproteins during alimentary lipaemia. *J Clin Invest* 91:748-758, 1993
4. Havel RJ. Postprandial hyperlipidemia and remnant lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 5:102-109, 1994
5. Syvanne M, Taskinen MR. Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350 (suppl.1):20-23, 1997
6. 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
7. Chapman MJ, Guerin M, Bruckert E. Atherogenic, dense low density lipoproteins. *Eur Heart J* 19:24-30, 1998
8. Zilver-Smith DB. Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 60:473-485, 1979.
9. 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
10. 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
11. 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

12. 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
13. Ryu JE, Howard G, Craven TE, Bond MG, Hagaman AP, Crouse III JR. Postprandial triglyceridemia and carotid atherosclerosis in middle-aged subjects. *Stroke* 23:823-828, 1992
14. 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
15. 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419-S420, 1999
20. 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
21. Miller GJ, Martin JC, Mitropoulos KA, Reeves BEA. Plasma factor VII is activated by postprandial triglyceridemia, irrespective of dietary fat consumption. *Atherosclerosis* 86:163-171, 1991
22. 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

23. 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
24. Vogel RA. Measurement of endothelial function by brachial artery flow-mediated vasodilatation. *Am J Cardiol* 88:31E-34E, 2001
25. 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
26. Gaenzer 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
27. 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
28. Hotamisligil G.S. Molecular mechanism of insulin resistance and the role of the adipocyte. *Int J Obes Relat Metab Disord* 24:S23-S27, 2000
29. Chaldakov GN, Stankulov IS, Hristova M, Ghenev PI. Adipobiology of disease: adipokines and adipokine-targeted pharmacology. *Curr Pharm Des* 9:1023-1031, 2003
30. 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
31. 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
32. 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
33. Borensztajn J. Heart and skeletal muscle lipoprotein lipase. In *Lipoprotein Lipase* 133-148, 1987 (Borensztajn J. editor) Chicago, IL: Evener.
34. 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

35. 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
36. 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
37. Syvanne M, Taskinen MR: Lipids and lipoproteins as coronary risk factors in non-insulin dependent diabetes mellitus. *Lancet* 350, S120-123, 1997.
38. Taskinen MR: Pathogenesis of dislipidemia in type 2 diabetes: *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109S, S180-188, 2001.
39. Ginsberg HN, Illingworth R: Postprandial dyslipidemia: an atherogenic disorder common in patients with diabetes mellitus: *Am J Cardiol* 88(suppl), H9-H15, 2001.
40. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA: Postprandial triglyceride profile in a population-based sample of type 2 diabetic patients: *Diabetologia* 47:19-22, 2004.
41. 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.
42. 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.
43. Axelsen M, Smith U, Eriksson JW, Taskinen 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.
44. Annuzzi G., 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.
45. Roust LR, Jensen MD. Postprandial free fatty acid kinetics are abnormal in upper body obesity: *Diabetes* 42:1567-1573, 1993.

46. 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.
47. Keys A. Seven Countries. A multivariate analysis of death and coronary heart disease. Cambridge, Mass: Harvard University Press 1980
48. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition and heart disease. *Am J Clin Nutrition* 75:191-212, 2002
49. Rivellese AA. Diet and cardiovascular disease: beyond cholesterol. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular disease. NMCD* 15: 395-398, 2005
50. 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
51. van Heek M, Zilvermit DB. Postprandial lipemia and lipoprotein lipase in the rabbit are modified by olive and coconut oil. *Arteriosclerosis* 10:421-429, 1990
52. 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
53. 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
54. 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
55. 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
56. Williams C. Postprandial metabolism: effects of dietary fatty acids. *Proc Nutr Soc* 56:679-692, 1997
57. 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
58. 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
59. 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
  60. 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
  61. 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
  62. Weintraub MS, Zechner R, Brown A, Eisenberg S, Breslow J. dietary polyunsaturated fats of the  $\omega$ -6 and  $\omega$ -3 series reduce postprandial lipoprotein levels. *J Clin Invest* 82:1884-1893, 1988
  63. 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
  64. Park Y, Harris WS. Omega-3 fatty acid supplementation accelerates chylomicron triglyceride clearance. *J Lipid Res* 44:455-463, 2003
  65. 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
  66. 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
  67. Steiner G. Hypertriglyceridemia and carbohydrate intolerance: interrelations and therapeutic implications. *Am J Cardiol* 57:27G-30G, 1986
  68. Nestel J, Carrol KF, Havenstein N. Plasma triglyceride response to carbohydrates, fats and caloric intake. *Metabolism* 19:1-18, 1970

69. 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
70. 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
71. 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
72. Georgopoulos 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
73. 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
74. Anderson JW, Tietyen-Clark J. Dietary fiber: hyperlipidemia, hypertension and coronary heart disease. *Am J Gastroenterol* 81:907-919, 1986
75. Ripsin CM, Keenan JM, Jacobs DR. Oat products and lipid lowering. A meta-analysis. *JAMA* 267:3317-3325, 1992
76. 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
77. Lairon D. Dietary fibres: effects on lipid metabolism and mechanisms of action. *Eur J Clin Nutr* 50:125-133, 1996
78. 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
79. 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
80. Anderson JW, O'Neal DS, Riddell-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
81. 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
82. Patti L, rubba F, Coppola S, Rivellese AA. Lipemia postprandiale: implicazioni cliniche e problemi metodologici. *Giorn Ital Diabetol* 19:169-176, 1999
  83. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, Romano G, Pisanti F, Riccardi G, Rivellese AA. Postprandial triglyceride profile in a population-based sample of type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:19-22, 2004
  84. 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
  85. Heine RJ, Dekker JM. Beyond postprandial hyperglycaemia: metabolic factors associated with cardiovascular disease. *Diabetologia* 45:461-475, 2002
  86. 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
  87. 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
  88. Annuzzi G, Bozzetto L. Iperlipidemia postprandiale. *GIDM* 25:125-139, 2005
  89. 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
  90. 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
  91. 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
  92. Demacker PNM. Diets and posprandial lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* 6:43-47, 1995
  93. Karpe F. Effect of diet on postprandial lipemia: a suggestion for methodological standardization. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 7:44-55, 1997
  94. Bergeron N, Havel RJ. Assessment of postprandial lipemia: nutritional influences. *Curr Opin Lipidol* 8:43-52, 1997
  95. 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

96. Cohen JC. Chylomicron triglyceride clearance: comparison of three assessment methods. *Am J Clin Nutr* 49:306-313, 1989
97. 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
98. 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
99. 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
100. 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
101. 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
102. 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
103. 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
104. 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
105. 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
106. Olivecrona T, Bengtsson G, Marklund SE, Lindahl U, Hook M. Heparin-lipoprotein lipase interactions. *Fed Proc* 36 (1):60-5, 1977
107. Nilsson- Ehle P, Ekman. Rapid, simple and specific assays for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery* 3 (3): 194-209,1977
108. 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

109. 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
110. Zandonella G, Haalck L, Spener F, Faber K, Paltauf F, Hermetter A. Inversion of lipase stereospecificity for fluorogenic alkyldiacyl glycerols. Effect of substrate solubilization. *Eur J Biochem* 231(1):50-5,1995
111. Eguchi Y. Analysis of lipoprotein lipase activity using high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 16:500-3, 2002
112. 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
113. Nilsson-Ehle P, Ekman R. Rapid, simple and specific assay for lipoprotein lipase and hepatic lipase. *Artery* 3:194-209, 1977
114. 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
115. 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
116. 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
117. Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Masini M, Santangelo C, Patané G, 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 Biochem* 32 (1): 15-23,1999
118. 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
119. 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

120. 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
121. Eliasson B, Mero N, Taskinen MR, Smith U. The insulin resistance syndrome and postprandial lipid intolerance in smokers. *Atherosclerosis* 129:79-88, 1997
122. 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
123. 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
124. Sadur CN, Eckel RH. Insulin stimulation of adipose tissue lipoprotein lipase. Use of the euglycemic clamp technique. *J Clin Invest* 69:1119-25, 1982
125. Kovar J, Fejfarova V, Pelikanova T, Poledne R. Hyperglycemia downregulates total lipoprotein lipase activity in humans. *Physiol Res* 53:61-8, 2004
126. Williams CM. Dietary interventions affecting chylomicron and chylomicron remnant clearance. *Atherosclerosis*. 141 Suppl 1:S87-92. Review. 1998
127. Sanders TA. Dietary fat and postprandial lipids. *Curr Atheroscler Rep*. 5(6):445-51. Review. Nov 2003
128. Parks EJ. Recent findings in the study of postprandial lipemia. *Curr Atheroscler Rep* 3:462-470, 2001
129. 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
130. 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
131. Frayn KN. Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. *Diabetologia* 45(9): 1201-1210, 2002
132. Garg A. High monounsaturated fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 67(suppl): 577S-582S, 1998
133. 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

133. Simpson HGR, Simpson RW, Lousley S, Carter RD, Geeki M, Hockaday TD, Mann JJ. A high carbohydrate leguminous fibre diet improves all aspect of diabetic control. *Lancet* 1:1-5, 1981
134. Mann J. Dietary fibre and diabetes revisited. *Eur J Clin Nutr* 55:919-921, 2001
135. 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
- Goldberg IJ, Kako Y, Lutz EP. Responses to eating: lipoproteins, lipolytic products and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11:235-241, 2000
136. Cavalot F, Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 91:813-9, 2006
137. O'Keefe JH, Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 100:899-904 2007
138. Lairon D, Play B, Jourdeuil-Rahmani D. Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 18:217-27. 2007
139. Roberts R, Bickerton AS, Fielding BA, et al. (Reduced oxidation of dietary fat after a short term high-carbohydrate diet. *Am J Clin Nutr* 87:824-31 2008
140. Rivellese AA. Diet and cardiovascular disease: beyond cholesterol. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2005; 6:395-398.
141. Sirtori CR, Paoletti R, Mancini M, et al. N-3 fatty acids do not lead to an increased diabetic risk in patients with hyperlipidemia and abnormal glucose tolerance. Italian Fish Oil Multicenter Study. *Am J Clin Nutr*. 1997 Jun;65(6):1874-81.
143. Rivellese A A, Riccardi G, Giacco A, et al. Reduction of risk factors for atherosclerosis in diabetic patient treated with a high-fiber diet. *Diabetes Care* 1983; 12:128-132.
144. Naumann E, Van Rees A B, Önning G, et al.  $\beta$ -glucan incorporated into a fruit drink effectively lowers serum LDL-cholesterol concentrations. *Am J Clin Nutr* 2006; 83:601-605.
145. Carr A C, Zhu B Z, Frei B. Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and alpha-tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 2000; 87:349-354.
146. Sirtori CR, Crepaldi G, Manzato E, et al. One-year treatment with ethyl esters of n-3 fatty acids in patients with hypertriglyceridemia and glucose intolerance: reduced triglyceridemia, total cholesterol and increased HDL-C without glycemic alterations. *Atherosclerosis*. 1998; 137:419-427.

147. Boysen G, Brander T, Christensen H, Gideon R, Truelsen T. Homocysteine and risk of recurrent stroke. *Stroke*. 2003 May;34:1258-61. Epub 2003 Apr 17.

## 8. APPENDICE: Pubblicazioni

### LAVORI IN EXTENSO

1. *“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* 2008, PMID: 18321693
2. *“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. *Clinical Nutrition* 2007, PMID: 17765364
3. *“Mediterranean vs. Low-Carbohydrate diet : which the best dietary approach for treating postprandial lipid abnormalities and improving glucose control in type 2 diabetic patients?”* C. De Natale, G. Annuzzi, L. Bozzetto, R. Mazzarella, L.Patti, L.Di Marino, G.Costabile, O.Ciano, A. Giacco, G. Riccardi, A. A. Rivellese. Inviato a *Diabetologia* (allegato 1)

### ABSTRACTS

1. *“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
2. *“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.
3. *“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.
  4. *“Baked products enriched with n-3 fatty acids, folates, beta-glucans and tocoferols: metabolic effects in patients with mild mixed hyperlipidemia”* V. Minerva, C. De Natale, L. Patti, R. Mazzearella, O. Ciano, S. Maione, G. Mmarotta, S. Turco, R. Ciati, C. Melegari, G. Riccardi, AA Rivellese. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Disease*

**Allegato 1****Mediterranean vs. Low-Carbohydrate diet : which the best dietary approach for treating postprandial lipid abnormalities and improving glucose control in type 2 diabetic patients?**

Claudia De Natale, Giovanni Annuzzi, Lutgarda Bozzetto, Raffaella Mazzeola, Lidia Patti, Lucrezia Di Marino, Giuseppina Costabile, Ornella Ciano, Angela Giacco, Gabriele Riccardi and Angela A. Rivellese.

Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University

Author for correspondence: A.A. Rivellese

Department of Clinical and Experimental Medicine, Federico II University Medical School,

Via Sergio Pansini 5, 80131 Napoli, Italy

Tel.: +39 0817462154; fax: +39 0815466152.

E-mail address: rivelles@unina.it

**Word count:** 3953



**Abstract**

*Aim/hypothesis* To evaluate which is the best dietary approach for treating postprandial lipid abnormalities and improving glucose control in type 2 diabetic patients. *Methods* According to a randomized cross-over design, 18 type 2 diabetic patients (age  $59 \pm 5$  years; BMI  $27 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup>) (mean  $\pm$  SD) in satisfactory blood glucose control on diet or diet+hypoglycemic drugs, followed for 4 weeks a Mediterranean diet - relatively rich in CHO (52% total energy), rich in fibre (28g/1000 kcal) and with a low glycemic index (58%) or a diet low in CHO (45% total energy) and rich in monounsaturated fat (23%) (Low-CHO diet). Thereafter, patients crossed over to the alternate diet for another 4 weeks. At the end of each period blood samples for determination of glucose, insulin, lipids in plasma and lipoprotein fractions (separated by discontinuous density gradient ultracentrifugation) were taken at fasting and over 6 hrs after a test meal similar, for composition, to the corresponding diet. *Results* Postprandial blood glucose and plasma insulin responses as well as glycemic variability were significantly lower after the Mediterranean diet compared to the Low-CHO diet. The Mediterranean diet reduced also the postprandial incremental areas (IAUC) of triglyceride-rich lipoproteins, in particular of chylomicrons (Cholesterol IAUC:  $0.05 \pm 0.01$  vs.  $0.08 \pm 0.02$  mmol/l·6h; triglycerides IAUC:  $0.71 \pm 0.35$  vs.  $1.03 \pm 0.58$  mmol/l·6h,  $p < 0.05$ ). *Conclusions/interpretation* A diet rich in CHO, dietary fibre and with a low glycemic index may be considered the diet of choice for treating diabetic patients on the basis of its multiple effects on different cardiovascular risk factors, including postprandial plasma lipids abnormalities.

NCT00789295

**Key words:** Mediterranean diet; Postprandial lipids; Postprandial glucose; High fibre diet; Low- CHO diet; High MUFA diet.

**Abbreviations**

CHO Carbohydrates

HSL Hormone-sensitive lipase

IAUC Incremental area under the curve

LPL Lipoprotein lipase

MUFA Monounsaturated fat

**Introduction**

The clinical and scientific relevance of postprandial lipid abnormalities is based on the evidence of their association with a higher cardiovascular risk [1,2]. Two very recent prospective studies have shown how non fasting plasma triglyceride levels, particularly 2-4 hrs after meal, represent a cardiovascular risk factor, independent of the other known risk factors and to a greater extent than fasting triglyceride levels [3,4]. Patients with type 2 diabetes mellitus have more pronounced postprandial dyslipidemia [5], and this may account, at least in part, for their higher rate of cardiovascular diseases, which is not explained only by hyperglycemia and the classical cardiovascular risk factors [6]. The postprandial abnormalities observed in these patients occur also in the presence of normal fasting triglyceridemia and good blood glucose control [7]; they involve both exogenous intestine derived lipoproteins and endogenous liver derived lipoproteins [7-9]. Particularly increased are remnants particles, i.e. the ones deriving from the delipidization process of the triglyceride-rich lipoproteins, which are considered highly atherogenic [10].

In spite of the clinical relevance of postprandial lipid alterations there is very little scientific evidence of the potential therapeutic interventions able to correct these abnormalities. If we consider that human beings spend most of their time in the postprandial condition and that

all the lipid alterations in this state greatly outnumber those occurring in fasting conditions, diet is the natural approach to correct postprandial abnormalities. However, while it has been repeatedly demonstrated that dietary treatment in type 2 diabetic patients is able to improve glucose control and blood lipid and lipoprotein profile at fasting [11], there are few data on the effects of various diets on postprandial lipemia [12]. The Mediterranean diet is generally recommended as a useful nutritional tool for the prevention of cardiovascular disease [13] because it is able to act positively on the main cardiovascular risk factors including body weight as it has been shown very recently [14]. However, the two main components of the Mediterranean diet, olive oil rich in monounsaturated fat and foods rich in CHO and fibre, which were traditionally found in association in the real Mediterranean diet of some decades ago, are now often considered in opposition, with supporters and detractors of one or the other. In particular, a diet rich in CHO is considered less effective on fasting lipid metabolism, compared to one rich in monounsaturated fat (MUFA), as it induces higher plasma triglycerides concentrations and low levels of HDL cholesterol [15] although these untoward effects can be avoided by selecting CHO rich foods with a high fibre content and a low glycemic index [16]. It can be hypothesized that a diet containing these kinds of foods may be still more beneficial on postprandial lipid metabolism compared to a diet rich in MUFA, which, being richer in fat, could induce, in the postprandial state, an increase in triglyceride -rich lipoproteins, especially of exogenous origin.

On the basis of this working hypothesis, the aim of this intervention study was to evaluate in type 2 diabetic patients the effects on postprandial lipemia and other metabolic parameters (in both everyday life conditions and after a standard test meal) of two diets, one moderately rich in CHO, rich in fibre and with a low glycemic index (Mediterranean diet), and the other low in CHO and rich in MUFA (Low-CHO diet).

Since adipose tissue, mainly through its lipolytic activities, is considered as having a pivotal role in the regulation of postprandial lipid metabolism [17], a further aim of our study was to clarify the role of adipose tissue in modulating the postprandial lipid response induced by the two dietary approaches by evaluating the activities of lipoprotein lipase (LPL) and hormone-sensitive lipase (HSL).

## **Methods**

**Subjects.** Nineteen type 2 diabetic patients were enrolled in the study, after giving their written informed consent. There was only one drop-out due to concomitant family problems. Therefore, 18 patients, 12 males/6 women, aged  $59 \pm 5$  years (mean  $\pm$  SD), concluded the study. The protocol was approved by the Federico II University Ethics Committee. Patients were slightly overweight (Body Mass Index  $27 \pm 3$  kg/m<sup>2</sup>), in satisfactory blood glucose control (HbA1c  $6.9 \pm 0.7\%$ ) on diet alone (n=13) or diet + metformin (n=5) and with normal fasting plasma lipid levels (cholesterol  $4.12 \pm 0.78$  mmol/l, triglycerides  $1.16 \pm 0.40$  mmol/l).

Subjects had no history or symptoms of any known disease, apart from diabetes, nor were they vegetarians or engaged in intensive physical activity. The sample size was calculated on the basis of the results of a previous study [18] in order to be able to detect a 30 % difference in postprandial lipemia, (triglyceride response of chylomicrons and large VLDL being the primary endpoint), with an 80% study power and a two-tailed  $p < 0.05$ .

**Study design.** The study was performed according to a randomized cross-over design. After a run-in period of 4 weeks, during which patients were stabilized on their own diet, they followed, in random order, two isoenergetic diets differing in MUFA, CHO and fibre content. Each diet was followed for 4 weeks. The Mediterranean diet was relatively rich in CHO (52% of the total daily energy intake), rich in dietary fibre (28g/1000 kcal both of soluble and insoluble types) and with a low glycemic index (51%), the other was rich in MUFA (23%), relatively low in CHO (45%), low in dietary fibre (8g/1000 kcal) and with a

relatively high glycemic index (87%) (diet compositions are reported in table 1). The glycemic load of the high CHO/high fibre diet was lower than that of the high MUFA diet (155% vs 205%). The other components of the two diets, in particular the saturated fat content, were similar (table 1). The main components of the Mediterranean diet were: a portion of legumes 4 times a week, one serving of pasta twice a week and one serving of parboiled rice once a week, 2 servings of vegetables and two of fruit per day and wholemeal bread. The main components of the Low-CHO diet were: white bread, serving of potatoes, rice or pasta each twice weekly, a serving of pizza once a week, and use of vegetables and fruit with low fibre content. To improve compliance to the diets patients were seen weekly by an experienced dietician who, in addition, called them up every two-three days to ensure that they followed the diet assigned. The adherence to the two dietary treatments was evaluated by a 3-day food record filled in by the patients at the end of the two periods.

Experimental procedures. At the end of each dietary intervention period, patients underwent the following procedures: 1) 12-hour fasting blood sampling for the determination of total, LDL and HDL cholesterol and triglycerides; 2) home self measurement of triglyceride and glucose levels with samples taken at fasting, immediately before and 2 and 3 hours after lunch and before dinner for two days at the end of each dietary treatment; 3) a test meal with a composition similar to dietary treatment being followed, with blood samples taken at fasting (at least 12 hours) and 2, 4, and 6 hours after the test meal to evaluate glucose, insulin, cholesterol and triglycerides in plasma and lipoprotein subfractions (chylomicrons, large and small VLDL, IDL, LDL, HDL). The test meal was performed in 12 patients. The composition of the test meal performed at the end of the Mediterranean diet was 52% CHO, 30% fat (7% saturated), 18% proteins, and consisted of beans and pasta soup and an apple. The composition of the other test meal, performed at the end of the Low-CHO diet, was 45% CHO, 37% fat (7% saturated fat) and 18% protein, and consisted of a potato gateau (a pie made of mashed potato, whole milk, eggs, cheese, ham and butter) and orange juice. The energy content of the two test meals was 948 kcal; 4) six hours after the test meal a needle biopsy of abdominal subcutaneous adipose tissue was taken for the determination of LPL and HSL activities.

Laboratory procedures. All laboratory measurements were made blind to the dietary treatments.

Lipoprotein separation. Samples were kept at +4° C before, during and after centrifugation and adequately treated to minimize proteolytic degradation of apo B. Fasting and postprandial lipoprotein subfractions were isolated by discontinuous density gradient ultracentrifugation according to Redgrave and Carlson [19] and Karpe and Hamsten [20], as previously described [8]. Ultracentrifugation was carried out in a Beckman SW 40 Ti rotor on a Beckman Optima L-90K ultracentrifuge (Beckman Instruments, Inc., CA, USA). Briefly, three consecutive runs were performed at 15°C and at 40000 rpm to float: chylomicrons (Svedberg flotation unit (Sf) >400), large VLDL (Sf 60-400) and small VLDL (Sf 20-60). IDL (Sf 12-20) and LDL (Sf 0-12) were recovered from the gradient after the Sf 20-60 particles had been collected. HDL were isolated by a precipitation method [21].

Adipose tissue LPL activity. LPL heparin-releasable activity was determined as previously described [22]. Briefly, 5-10 mg frozen adipose tissue were incubated in a buffer containing beef lung heparin. Thereafter, 100 µl eluate were incubated with 100 µl <sup>3</sup>H-trioleoylglycerol substrate emulsion. The <sup>3</sup>H-labelled oleic acid released was extracted and counted in a Wallac 1410 Liquid Scintillation Counter. LPL total activity was determined as modified from Taskinen et al. [23] Less than 10 mg frozen tissue samples were homogenized, in duplicate, by a Heidolph "Diex-900" homogenizer, in 80 µl/mg adipose tissue buffer (0.2 M Tris-HCl, pH 8.5 at 25°C, 0.02 M sucrose, 1% bovine albumin, 1U/300 µl buffer lung beef heparin, 0.3% deoxycolate + IGEPAL CA-630, 25:1, as detergent) and centrifuged for 15 min, 12000 rpm, +4°C. 100 µl of 12 fold diluted infranant, in triplicate from each vial,

were incubated, and oleic acid was extracted and measured as described for heparin-releasable activity.

Adipose tissue HSL activity. HSL activity was measured as previously described [22].

Briefly, an aliquot of adipose tissue (15-20 mg) was homogenized in a homogenizing buffer. After centrifugation (20000 g for 45 min at 4°C), 30 µl of homogenate infranant was incubated with enzyme dilution buffer and <sup>3</sup>H-trioleoylglycerol substrate emulsion. The reaction was stopped after 45 min by addition of methanol/chloroform/heptanes and potassium carbonate/ boric acid buffer, pH 10.5. Two phases were separated by centrifugation and one ml of the upper phase, containing the released fatty acids, was counted in a liquid scintillator. Enzymatic activity is expressed as nmol of fatty acids released per gram of adipose tissue per hour at 37°C.

Other measurements. Cholesterol and triglyceride concentrations were assayed by enzymatic colorimetric methods . Plasma insulin concentrations were measured by ELISA. Self measurements of triglyceride levels were performed by mean of GCT Accutrend (Roche Diagnostics Mannheim, Germany), a method already validated [5,24].

Statistical Analysis. Data are expressed as mean±standard deviation (mean±SD), unless otherwise stated. Postprandial incremental areas were calculated by the trapezoidal method as the area under the curve above the baseline value (IAUC). Coefficients of variations of plasma glucose at different points after test meals were evaluated as an index of postprandial glycemic variability [25]. Differences between the two diets were evaluated by t-test for paired data. Two-tailed tests were used and a  $p<0.05$  was considered statistically significant. Variables not normally distributed were analyzed after logarithmic transformation or by nonparametric tests.

Since there was no carry-over effect, the results of patients starting with one or the other diet were put together. Statistical analysis was performed according to standard methods using the Statistical Package for Social Sciences software (SPSS/PC, SPSS, Inc., Chicago, IL, USA)

## Results

There was no change in body weight throughout the experiment (kg 73.0 after both dietary treatments). The compliance to the two diets was optimal as shown by the average composition of the diet followed by subjects, evaluated on the basis of the 3-day food records filled in at the end of the two dietary periods (table 1). As expected, the two diets followed by patients were significantly different for total fat, MUFA, CHO, fibre, glycemic index and glycemic load (table 1). Both diets were well accepted by patients. No side effects were reported.

The effects of the two diets on fasting plasma lipoproteins are shown in table 2: at the end of the Mediterranean diet there was a significant reduction of total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol ( $p<0.05$ ) and an increase in HDL triglycerides in comparison with the Low-CHO diet, while triglyceride levels in plasma and LDL were similar. Blood glucose levels measured by patients (average of two daily profiles) were significantly lower 2 ( $7.2\pm 1.1$  vs.  $9.2\pm 2.9$  mmol/l;  $p<0.05$ ) and 3 ( $5.9\pm 1.3$  vs.  $7.3\pm 1.5$  mmol/l;  $p<0.05$ ) hours after lunch during the Mediterranean diet in comparison with the other diet. Similarly self monitored triglycerides (average of two daily profiles) levels were 30% lower 3 hours after lunch.

Plasma glucose, insulin and lipids response to the test meal.

After the high CHO/high fibre test meal performed at the end of the Mediterranean diet plasma glucose concentrations were lower in the first part of the curve, especially after two hours ( $8.89\pm 2.56$  vs.  $10.56\pm 3.89$  mmol/l,  $p=0.07$ ) and the same happened for plasma insulin, which was significantly lower at the 2<sup>nd</sup> ( $444\pm 324$  vs.  $546\pm 366$  pmol/l;  $p<0.05$ ) and 3<sup>rd</sup> hour ( $336\pm 258$  vs.  $420\pm 240$  pmol/l;  $p<0.05$ ) compared to the results obtained after the low CHO/high MUFA test meal performed at the end of the Low-CHO diet (figure 1).

These combined effects on plasma glucose and insulin led to a reduction of the insulin/glucose ratio both at the second ( $0.44 \pm 0.30$  vs.  $0.52 \pm 0.46$ ) and third hour ( $0.39 \pm 0.29$  vs.  $0.49 \pm 0.34$ ;  $p < 0.05$ ) after the Mediterranean test meal. On the contrary, plasma glucose and insulin levels were both significantly higher 6 hours after the high CHO/high fibre meal than after the other test meal ( $6.22 \pm 1.72$  vs.  $5.06 \pm 1.17$  mmol/l;  $p < 0.05$  for plasma glucose and  $126 \pm 66$  vs.  $90 \pm 30$  pmol/l;  $p < 0.05$  for plasma insulin). This shape in the postprandial curve resulted in: 1) a decrease in plasma glucose IAUC, in particular until the 3<sup>rd</sup> hours (figure 1;  $p < 0.05$ ); 2) a significant reduction of insulin IAUC both at 3 and 6 hours (figure 1;  $p < 0.05$ ); 3) a significant decrease in postprandial glycemic variability, evaluated as postprandial plasma glucose coefficient of variation ( $p < 0.02$ ; figure 1).

At the end of the Mediterranean diet postprandial IAUC of plasma triglycerides was reduced by 31% compared to the low CHO/high MUFA diet while there was no significant difference for plasma cholesterol IAUC. The results of the postprandial response of triglycerides rich lipoproteins are reported in figure 2. Both triglycerides and cholesterol of chylomicrons were lower after the test meal performed at the end of the Mediterranean diet and the IAUC was significantly lower ( $p < 0.05$  for both triglycerides and cholesterol). The same happened for the triglycerides content of large VLDL (IAUC  $1.46 \pm 0.94$  vs.  $1.97 \pm 1.22$  mmol/l·6h,  $p < 0.06$ ) (figure 2), small VLDL (IAUC  $-0.21 \pm 0.24$  vs.  $-0.15 \pm 0.21$  mmol/l·6h,  $p = 0.07$ ) and LDL (IAUC  $-0.05 \pm 0.06$  vs.  $0.17 \pm 0.05$  mmol/l·6h,  $p < 0.05$ ). No differences were observed in the postprandial response of the other lipoproteins (data not shown).

Lipolytic activities. Both total and heparin releasable LPL activities in adipose tissue were not significantly different at the end of the two diets (total LPL activity:  $2792 \pm 958$  vs.  $3375 \pm 2251$  nmol FA/g/h; heparin releasable LPL activity:  $146 \pm 70$  vs.  $184 \pm 117$  nmol FA/g/h). Also with regard to HSL activity, no difference was observed at the end of the two dietary approaches ( $616 \pm 237$  vs.  $676 \pm 210$  nmol FA/g/h).

## Discussion

This study clearly shows, for the first time, that a diet moderately rich in CHO, rich in dietary fibre and, therefore, also with low glycemic index and glycemic load, what we can consider the real Mediterranean diet, induces a significant reduction of postprandial triglycerides lipoproteins, in particular of chylomicrons, in type 2 diabetic patients. This effect is present in experimental conditions, that is after a standard test meal, but also in everyday life, where there is a 30% reduction of plasma triglycerides 3 hours after lunch. Moreover, our results confirm that this kind of diet is to be preferred to a diet low in CHO and rich in MUFA for its effects on:

- 1) postprandial blood glucose control, with lower peaks in the first part of the postprandial period. This more blunted postprandial profile implies a reduced variability of blood glucose levels (almost halved in our study), considered so important in the prevention of cardiovascular disease in diabetic patients [26,27], as well as a lower risk of late postprandial hypoglycemia [28];
- 2) postprandial insulin levels, which are significantly reduced concomitantly with the presence of lower blood glucose levels, suggesting an improvement in insulin action;
- 3) LDL cholesterol levels, which are significantly reduced also in normocholesterolemic type 2 diabetic patients, reinforcing the data already obtained in patients with higher LDL cholesterol levels [29]. This result, which may be considered of small entity (a reduction of 9%), is, instead, important from a clinical point of view considering the need to constantly induce lower LDL cholesterol values, especially in type 2 diabetic patients [30].

The only drawback of the diet rich in CHO and fibre is the lower levels of fasting HDL cholesterol obtained with this diet compared to the diet low in CHO and rich in MUFA.

However, the decrease is small, albeit statistically significant, and it is important to underline that any pharmacological and non pharmacological intervention able to reduce LDL cholesterol levels generally leads also to a reduction in HDL cholesterol, whose negative influence on cardiovascular risk, in this specific case, is not at all established. Furthermore, a previous study has shown that the decrease in HDL cholesterol after a low fat/high CHO diet is limited to the HDL<sub>3</sub> subfraction [31], that is the HDL subfraction with less antiatherogenic properties.

These results define very clearly the terms of the question between advocates and detractors of high-CHO vs. high-MUFA diets, emphasizing the clear importance of the quality of CHO [32] and of the total glycemic load of the diet. Indeed, the few studies that have so far looked at the effects of these two kinds of diets on postprandial lipid metabolism compared diets rich in MUFA with diets rich only in CHO, but not in dietary fibre and with a low glycemic index [33-35].

How can the two dietary approaches act on the postprandial response of triglyceride-rich lipoproteins? We looked at the possible effects of the two diets on lipolysis in adipose tissue, considering the crucial role of this tissue in the partitioning of postprandial lipids [17]. However, both LPL and HSL activities were not different at the end of the two diets, suggesting that adipose tissue lipolytic activities do not play a major role in determining the results obtained in our study. This means that the two diets might act on other sites, in particular on the absorption of dietary fatty acids and cholesterol and the production of chylomicrons and VLDL. On the one hand, since low-CHO/high-MUFA diets are richer in the amount of fat, which is one of the main determinants of the postprandial lipid response [36], they may induce a higher absorption of dietary fatty acids, which would result in a higher intestinal production of chylomicrons. On the other hand, since the Mediterranean diet is at the same time rich in CHO and dietary fibre, it may act in different ways, i.e., by slowing down gastric emptying, reducing the absorption of glucose, cholesterol and fatty acids and, finally, reducing the intestinal production and secretion of chylomicrons, as supported by studies performed both in vitro and in vivo [37]. Moreover, since the Mediterranean diet also reduces postprandial plasma glucose and insulin, it is likely that both these effects may lead to a reduction of the de novo lipogenesis, which is stimulated by glucose and insulin levels [37] and may be particularly relevant in type 2 diabetic patients, where it accounts for 25% of VLDL synthesis [38]. In our study we did not measure apo B48 and apo B100 in the different lipoproteins. Therefore we cannot completely differentiate between lipoproteins of exogenous and endogenous origin, but it is likely that reducing or, at least, preventing any increase in hepatic VLDL production, beside reducing chylomicrons production, may have contributed to our results. Moreover, our Mediterranean diet, being rich in fibre, induces also an improvement in insulin resistance, as suggested by the lower Insulin/Glucose ratios, which is relevant given the well known key role played by insulin resistance in determining postprandial lipoprotein abnormalities [7,39].

The clinical relevance of our results lies on the fact that postprandial lipemia is considered, on the basis of cross-sectional and prospective studies [3-4,6], an independent cardiovascular risk factor. Moreover, type 2 diabetic patients are characterized by frequent and multiple abnormalities in postprandial lipid levels, which may, at least in part, explain their excess cardiovascular risk [6]. Therefore, it is clinically relevant to find out a type of dietary approach able to reduce these postprandial abnormalities, in addition to its already proven effects on other cardiovascular risk factors [14,16,40]. To this regard, the effects on postprandial plasma glucose and insulin levels are also relevant. In particular, it is important to underline the modulating effect of the Mediterranean diet on postprandial plasma glucose: reduced postprandial plasma glucose peaks in the first part of the response, a slight increase in plasma glucose levels in the second part (at 6 hours), with consequent reduction of glycemic variability – considered a further possible cardiovascular risk [26] – and also a

reduction in the risk of possible late postprandial hypoglycemia, which often occur in type 2 diabetic patients on sulphonylurea or insulin.

**Limitations.** Participants in our study were type 2 diabetic patients in relatively good blood glucose control and quite normal lipid levels. Therefore, we cannot extrapolate our results to all type 2 diabetic patients. However, it has to be considered that the same type of high CHO-high fibre diet induced similar, if not better, results on blood glucose control and fasting lipid metabolism in type 2 diabetic patients not in satisfactory blood glucose control and with hyperlipidemia [29]. Another point to be stressed is the length of the intervention, one month for each diet. However, while not being a long term experiment, one month is certainly long enough to induce changes in glucose and lipid metabolism.

Regarding dietary compliance, both diets were well accepted by patients, who, in any case, found the Mediterranean diet more acceptable and nearer to their habitual eating pattern.

The low CHO/high MUFA diet was found less satiating compared to the other diet, likely due either to the paucity of foods rich in fibre, whose satiating effect is well known [41], or to the fact that the low CHO/high MUFA diet necessarily includes few foods, since a large part of the calories comes from olive oil. To this regard one could argue that the best dietary approach might be a low CHO/high MUFA diet rich in fibre and with a low glycemic index. Unfortunately, this kind of diet is very difficult, if not impossible, to be done since fibre rich foods are rich also in carbohydrates.

In conclusion, we can say that a diet relatively high in carbohydrates, rich in dietary fibre, with a relatively low glycemic index and a low glycemic load, may be considered the diet of choice for the treatment of type 2 diabetic patients on the basis of its multiple effects on different cardiovascular risk factors, including postprandial lipid abnormalities. This kind of diet optimally combines the main characteristics of the Mediterranean diet, at least the one followed some decades ago, i.e. at the same time rich in dietary fibre (legumes, vegetables, fruit, whole cereals) and olive oil (our high CHO- high fibre diet also contains 17% of monounsaturated fat coming mainly from olive oil). This kind of diet is also sound from a gastronomic point of view, as shown by the fact that it has been consumed for centuries in many Mediterranean countries, where, moreover, it has been associated with a low mortality rate [42].

### **Acknowledgment**

This work was supported in part by funds from “Regione Campania” (L.R. n.5/2002)

The excellent technical laboratory assistance of P. Cipriano is gratefully acknowledged. The authors are grateful to R. Scala for expert linguistic revision.

### **References**

1. Tanaka A (2004) Postprandial hyperlipidemia and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 11: 322-9
2. Karpe F (1999) Postprandial lipoprotein metabolism and atherosclerosis. *J Intern Med* 246: 341-55
3. Nordestgaard BG, Benn M, Schnohr P, Tybjaerg-Hansen A (2007) Nonfasting triglycerides and risk of myocardial infarction, ischemic heart disease, and death in men and women. *JAMA* 298:299-308
4. Bansal S, Buring JE, Rifai N, Mora S, Sacks FM, Ridker PM (2007) Fasting compared with nonfasting triglycerides and risk of cardiovascular events in women. *JAMA* 298:309-16
5. Iovine C, Vaccaro O, Gentile A, et al.(2004) Post-prandial triglyceride profile in a population-based sample of Type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 47:19-22
6. Pastromas S, Terzi AB, Tousoulis D, Koulouris S (2008) Postprandial lipemia: an under-recognized atherogenic factor in patients with diabetes mellitus. *Int J Cardiol* 126:3-12

7. Annuzzi G, De Natale C, Iovine C, et al. (2004) Insulin resistance is independently associated with postprandial alterations of triglyceride-rich lipoproteins in type 2 diabetes mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:2397-402
8. Rivellese AA, De Natale C, Di Marino L, et al. (2004) 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* 89:2153-9
9. Taskinen MR (2003) Diabetic dyslipidaemia: from basic research to clinical practice. *Diabetologia* 46:733-49
10. Yu KC, Cooper AD (2001) Postprandial lipoproteins and atherosclerosis. *Front Biosci* 6:D332-54
11. Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes: A position statement of the American Diabetes Association (2008) *Diabetes Care* 31:S61-S78
12. Lopez-Miranda J, Williams C, Lairon D (2007) *Dietary, physiological, genetic and pathological influences on postprandial lipid metabolism. Br J Nutr* 98:458-73
13. Sofi F, Cesari F, Abbate R, Gesini GF, Casini A (2008); Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ* 2008;337:a1334
14. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, et al. (2008) Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med* 359:229-41
15. Garg A (1998) *High-monounsaturated-fat diets for patients with diabetes mellitus: a meta-analysis. Am J Clin Nutr* 67:577S-582S
16. Riccardi G, Rivellese AA (1991) *Effects of dietary fiber and carbohydrate on glucose and lipoprotein metabolism in diabetic patients. Diabetes Care* 14:1115-25
17. Frayn KN (2002) *Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux. Diabetologia* 45:1201-10.
18. Annuzzi G, Giacco R, Patti L, et al. (2008) Postprandial chylomicrons and adipose tissue lipoprotein lipase are altered in type 2 diabetes independently of obesity and whole-body insulin resistance. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 18:531-538
19. Redgrave TG, Carlson LA (1979) 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
20. Karpe F, Steiner G, Olivecrona T, Carlson LA, Hamsten A (1993) Metabolism of triglyceride rich lipoproteins during alimentary lipemia. *J Clin Invest* 91:748-58
21. Lopes-Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA (1997) Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clin Chem* 23:882-884
22. Rivellese AA, Giacco R, Annuzzi G, et al. (2008) Effects of monounsaturated vs. saturated fat on postprandial lipemia and adipose tissue lipases in type 2 diabetes. *Clin Nutr* 27:133-41
23. Taskinen MR, Nikkila EA, Huttunen JK, Hilden H (1980) 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
24. Moses RG, Calvert D, Storlien LH (1996) Evaluation of the Accutrend GCT with respect to triglyceride monitoring. *Diabetes Care* 19:1305-6
25. Muggeo M, Zoppini G, Bonora E, et al. (2000) Fasting plasma glucose variability predicts 10-years survival of type 2 diabetic patients. The Verona Diabetes Study. *Diabetes Care* 23: 45-50
26. Cavalot F, Petrelli A, Traversa M, et al. (2006) Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 91:813-9
27. O'Keefe JH, Bell DS (2007) Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 100:899-904
28. Giacco R, Parillo M, Rivellese AA, et al. (2000) Long-term dietary treatment with increased amounts of fiber-rich low-glycemic index natural foods improves blood glucose



- control and reduces the number of hypoglycemic events in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 23:1461-6
29. Rivellese A, Riccardi G, Giacco A, et al. (1980) Effect of dietary fibre on glucose control and serum lipoproteins in diabetic patients. *Lancet* 2:447-50
30. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes-2008. *Diabetes Care* 31: S12-54S
31. Desroches S, Paradis ME, Pérusse M, et al. (2004) Apolipoprotein A-I, A-II, and VLDL-B-100 metabolism in men: comparison of a low-fat diet and a high-monounsaturated fatty acid diet. *J Lipid Res* 45:2331-8
32. Riccardi G, Rivellese AA, Giacco R (2008) Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes. *Am J Clin Nutr* 87:269S-274S
33. Berglund L, Lefevre M, Ginsberg HN, et al. (2007) Comparison of monounsaturated fat with carbohydrates as a replacement for saturated fat in subjects with a high metabolic risk profile: studies in the fasting and postprandial states. *Am J Clin Nutr* 86:1611-20
34. Paniagua JA, de la Sacristana AG, Sánchez E, et al. (2007) A MUFA-rich diet improves postprandial glucose, lipid and GLP-1 responses in insulin-resistant subjects. *J Am Coll Nutr* 26:434-44
35. McLaughlin T, Abbasi F, Lamendola C, Yeni-Komshian H, Reaven G (2000) Carbohydrate-induced hypertriglyceridemia: an insight into the link between plasma insulin and triglyceride concentrations. *J Clin Endocrinol Metab* 85:3085-8
36. Dubois C, Beaumier G, Juhel C, et al. (1998) Effects of graded amounts (0-50 g) of dietary fat on postprandial lipemia and lipoproteins in normolipidemic adults. *Am J Clin Nutr*. 67:31-8.
37. Lairon D, Play B, Jourdeuil-Rahmani D (2007) Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J Nutr Biochem* 18:217-27
38. Roberts R, Bickerton AS, Fielding BA, et al. (2008) Reduced oxidation of dietary fat after a short term high-carbohydrate diet. *Am J Clin Nutr* 87:824-31
39. Adiels M, Taskinen MR, Borén J (2008) Fatty liver, insulin resistance, and dyslipidemia *Curr Diab Rep* 8:60-4
40. O'Keefe JH, Gheewala NM Dietary, O'Keefe JO (2008) Dietary strategies for improving postprandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health. *J Am Coll Cardiol* 51: 249-255
41. Slavin JL (2005) Dietary fiber and body weight. *Nutrition* 21:411-8
42. Trichopoulou A, Costacou T, Bamia C, Trichopoulos D (2003) Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med* 26:2599-608

Table 1. Composition of the two isoenergetic diets recommended and followed by patients

	Mediterranean Diet		Low-CHO Diet	
	Recommended	Followed	Recommended	Followed
Total energy (kcal/day)	1918	1874±315	1939	1862±348
Proteins (%)	18	18±1	18	18±1
Total fat (%)	30	30±1 *	37	37±1
Saturated fat (%)	7	7±1	7	7±1
Monounsaturated fat (%)	17	17±1 *	23	23±1
Polyunsaturated n-6 fat (%)	3.9	4.2±0.3	4.2	4.3±0.3
Cholesterol (g/day)	143	133±43	158	160±32
Carbohydrates (%)	52	51±1 *	45	44±1
Fibre (g/1000 kcal)	28	27±2 *	8	8±1
Glycemic index (%)	58	60±4 *	88	87±2
Glycemic load (%)	155	154±24 *	205	207±37

mean ± SD, \* $p < 0.05$  vs. Low-CHO Diet

Table 2. Fasting plasma lipid concentrations after the two diets

	Mediterranean Diet	Low-CHO Diet
Total Cholesterol (mmol/l)	4.20±0.70 *	4.40±0.78
Total Triglycerides (mmol/l)	1.08±0.33	1.01±0.35
LDL Cholesterol (mmol/l)	2.62±0.60 *	2.82±0.62
LDL Triglycerides (mmol/l)	0.17±0.05	0.18±0.05
HDL Cholesterol (mmol/l)	0.98±0.25 *	1.06±0.26
HDL Triglycerides (mmol/l)	0.20±0.05 *	0.18±0.05

mean ± SD, \* $p < 0.05$

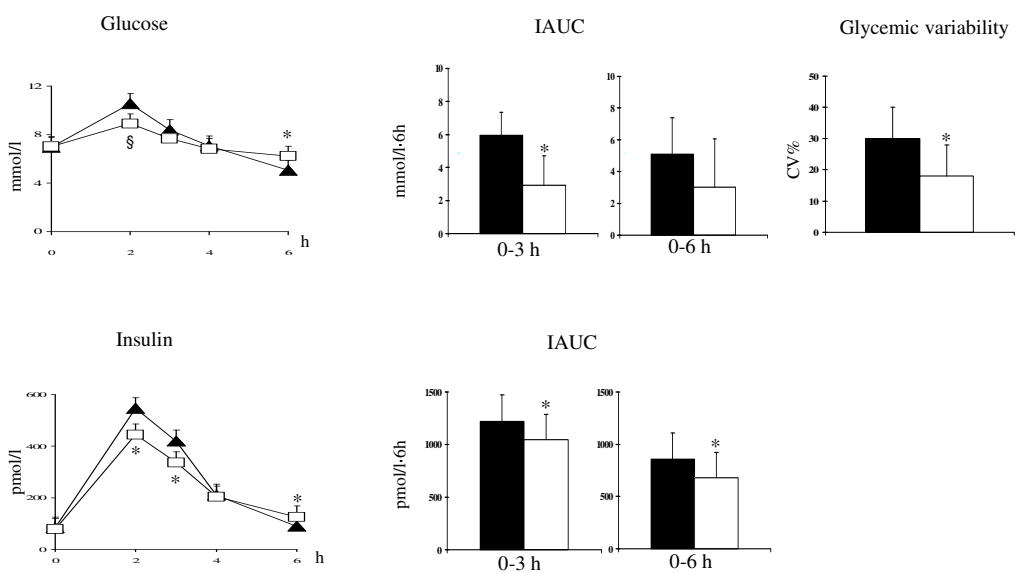


Figure 1

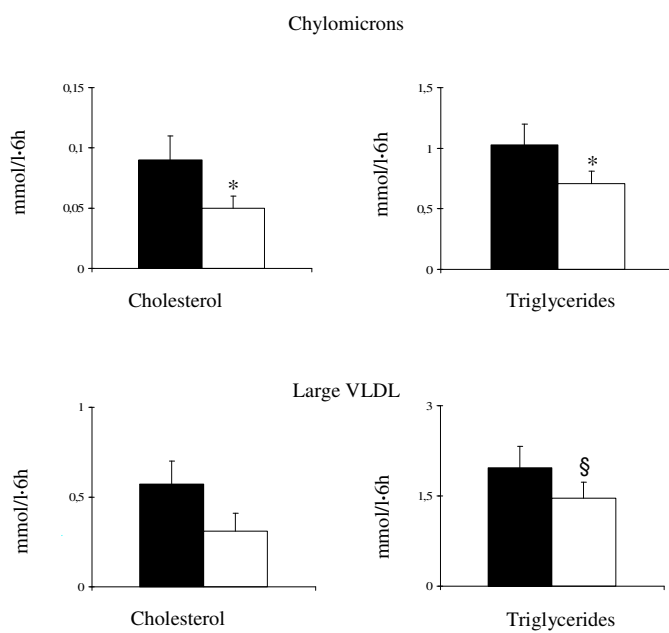


Figure 2

### Figure legends

Figure 1. Plasma glucose and insulin response after a Mediterranean test meal (white squares and white histograms) or a Low-CHO test meal (black triangles and black histograms) performed at the end of the corresponding diet (SEM,  $*p < 0.05$ ,  $\S = 0.06$ ); IAUC: Incremental area under the curve.

Figure 2. Incremental areas under the curve for cholesterol and triglycerides in chylomicrons and large VLDL after a Mediterranean test meal (white histograms) or a Low-CHO test meal (black histograms) performed at the end of the corresponding diet (SEM,  $*p < 0.05$ ,  $\S = 0.06$ ).