

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών στην Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Επίδραση Μεταβολών Ενεργειακού Ισοζυγίου
Στην Κινητική Των Τριγλυκεριδίων**

Έλενα Μποτωνάκη

Επιβλέπων Καθηγητής : Λάμπρος Συντώσης

Τριμελής Επιτροπή :

Λάμπρος Συντώσης, Καθηγητής Διατροφής - Διαιτολογίας

Σμαραγδή Αντωνοπούλου, Καθηγήτρια Βιοχημείας

Σταύρος Κάβουρας, Επίκουρος Καθηγητής Εργοφυσιολογίας &
Διατροφικής Αγωγής Αθλουμένων

Αθήνα 2013

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντμήσεις.....	4
Ευχαριστίες.....	6
Περίληψη.....	7
Abstract	8
1.Εισαγωγή.....	9
2. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας.....	10
2.1. Τριακυλογλυκερόλες και λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας.....	10
2.2. Μεταβολισμός των VLDL-TAG.....	13
2.2.1. Σύνθεση και έκκριση των VLDL-TAG στην κυκλοφορία.....	13
2.2.2. Καταβολισμός των VLDL-TAG.....	14
2.3. Μελέτη της κινητικής των VLDL-TAG.....	16
2.4. Ρύθμιση των επιπέδων των VLDL-TAG.....	18
2.4.1. Κλινική σημασία.....	18
2.5. Η επίδραση του ενεργειακού ισοζυγίου: θετικού έναντι αρνητικού.....	19
2.5.1. Επίδραση του μακροχρόνιου αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου στο μεταπορροφητικό στάδιο (απώλεια βάρους).....	20
2.5.2. Επίδραση του βραχυχρόνιου αρνητικού ισοζυγίου (δίαιτα – άσκηση).....	22
2.5.3. Επίδρασης του θετικού ενεργειακού ισοζυγίου.....	24
3. Σκοπός και υπόθεση μελέτης	26
3.1. Ερευνητικά κενά.....	26
3.2. Σκοπός της μελέτης.....	26
3.3. Ερευνητική υπόθεση.....	26
4. Μεθοδολογία	27
4.1. Κριτήρια επιλογής εθελοντών.....	27
4.2. Ανθρωπομετρία.....	28
4.3. Σύσταση σώματος.....	28
4.4. Μεταβολικός ρυθμός ηρεμίας.....	29
4.5. Υπολογισμός μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου.....	29
4.6. Παρασκευή και έγχυση διαλύματος [1,1,2,3,3- ² H ₅] γλυκερόλης.....	30
4.7. Ερευνητικό πρωτόκολλο.....	31
4.8. Διαιτολογική ανάλυση.....	33
4.9. Επεξεργασία δειγμάτων αίματος.....	33

4.10. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων τριακυλογλυκερολών.....	34
4.11. Απομόνωση VLDL-TAG από το πλάσμα	35
4.12. Απομόνωση γλυκερόλης από τα VLDL-TAG.....	35
4.13. Ανάλυση GC-MS.....	37
4.14. Υπολογισμοί	37
4.15. Στατιστική επεξεργασία	41
5. Αποτελέσματα.....	42
5.1 Χαρακτηριστικά δείγματος	42
5.2. Χαρακτηριστικά ενεργειακής πρόσληψης και περιεκτικότητας θρεπτικών συστατικών των πειραματικών διαιτολογίων.....	42
5.3. Επίδραση στο μεταβολικό προφίλ.....	43
5.4. Κινητική των VLDL-TAG κατά το μεταπορροφητικό στάδιο.....	44
6. Συζήτηση	47
7. Συμπέρασμα.....	49
8. Βιβλιογραφία.....	50

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

ANOVA: ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance)

Apo: απολιποπρωτεΐνη (apolipoprotein)

BMI: δείκτης μάζας σώματος (body mass index)

CETP: μεταφορική πρωτεΐνη εστέρων χοληστερόλης (cholesterol ester transfer protein)

CHD: στεφανιαία νόσος (coronary heart disease)

CM: χυλομικρά (chylomicrons)

DNL: εξ' ηπαρχής λιπογένεση (de novo lipogenesis)

DXA: απορροφησιομετρία ακτινών X διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry)

FFA: ελεύθερα λιπαρά οξέα (free fatty acids)

FCR: ρυθμός κλασματικού καταβολισμού (fractional catabolic rate)

GC: αέρια χρωματογραφία (gas chromatography)

HDL: ορμονοευαίσθητη λιπάση (hormone-sensitive lipase)

HL: ηπατική λιπάση (hepatic lipase)

IDL: λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας (intermediate density lipoproteins)

LCAT: ακυλο-τρανσφεράση της λεκιθίνης-χοληστερόλης (lecithin : cholesterol acyl-transferase)

LDL: λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (low density lipoproteins)

LDLr: υποδοχείς LDL (LDL receptors)

LPL: λιποπρωτεϊνική λιπάση (lipoprotein lipase)

MRT: μέσος χρόνος παραμονής (mean residence time)

MS: φασματογραφία μάζας (mass spectrometry)

m/z: λόγος μάζας –προς– φορτίο (mass-to-charge ratio)

Ra: ρυθμός εμφάνισης (rate of appearance)

RMR: μεταβολικός ρυθμός ηρεμίας (resting metabolic rate)

RQ: αναπνευστικό πηλίκο (respiratory quotient)

SEM: τυπικό σφάλμα του μέσου (standard error of the mean)

TG: τριακυλογλυκερόλη (triglyceride)

TLC: χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (thin-layer chromatography)

TRL: λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε TG (triglyceride rich lipoproteins)

TTR: λόγος ιχνηλάτη προς ιχνηλατούμενη ουσία (tracer to tracee ratio)

VLDL: λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (very low density lipoproteins)

VLDLr: υπολείμματα VLDL (VLDL remnants)

VO₂: ρυθμός πρόσληψης οξυγόνου (oxygen consumption rate)

VO₂ peak: μέγιστη πρόσληψη οξυγόνου (peak oxygen consumption)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης:

Λάμπρο Συντώση, επιβλέποντα καθηγητή μου. Για την καθοδήγηση του, τις σωστές παρατηρήσεις και την κατανόηση που έδειξε όλο αυτό το διάστημα. Επίσης τον ευχαριστώ θερμά γιατί χρόνια πριν, όταν ήμουν προπτυχιακή φοιτήτρια στο Τ.Ε.Φ.Α.Α. Αθηνών, η διδασκαλία του και ο τρόπος προσέγγισης της επιστήμης της διατροφής με ενέπνευσαν να ασχοληθώ με αυτήν την επιστήμη.

Έλενα Μπέλλου, διδακτορική φοιτήτρια. Την ευχαριστώ για τη βοήθεια της καθώς και για την άρτια οργάνωση αυτής της μελέτης.

Δρ. Μαρία Μαράκη, για την βοήθεια που μου προσέφερε όποτε τη χρειάστηκα.

Τις εθελόντριες μας, για την συμμετοχή τους στην μελέτη και την άψογη συνεργασία μας.

Κωνσταντίνο, για τις υπέροχες συζητήσεις που κάναμε καθώς επίσης και για την αισιοδοξία που μου μετέδιδε.

Το πιο μεγάλο ευχαριστώ στον Βαρθολομαίο Τάραντο για την στήριξη του σε όλες τις δύσκολες στιγμές και στην μητέρα μου Ευαγγελία, για όλες τις εικόνες που μετέδωσε καθώς και για την διακριτική της παρουσία και υποστήριξη...

Περίληψη

Εισαγωγή: Το ενεργειακό ισοζύγιο παίζει καθοριστικό ρόλο στον προσδιορισμό της κινητικής των τριακυλογλυκερολών των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL-TG). Οξύ ενεργειακό έλλειμμα προκαλούμενο από δίαιτα μειώνει τις συγκεντρώσεις των VLDL-TG ενώ αντιθέτως η επίδραση της οξείας αυξημένης ενεργειακής πρόσληψης στην κινητική των VLDL-TG δεν είναι πλήρως εξακριβωμένη.

Σκοπός : Να εκτιμηθούν οι επιδράσεις μιας ημέρας οξέος θετικού και αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου στην κινητική των VLDL-TG σε υγιείς γυναίκες.

Μέθοδοι : Στη μελέτη έλαβαν μέρος 10 υγιείς γυναίκες (22.0 ± 2.9 ετών, $\Delta\text{ΜΣ}$ $21.2 \pm 1.3 \text{ kg/m}^2$) όπου πραγματοποίησαν 3 δοκιμασίες, με τυχαία σειρά, την προηγούμενη μέρα: i) τη δοκιμασία ελέγχου - ισοθερμιδική δίαιτα ii) υποθερμιδική δίαιτα με ενεργειακό έλλειμμα 700kcal και iii) υπερθερμιδική δίαιτα με ενεργειακό πλεόνασμα 700kcal.

Αποτελέσματα : Σε σύγκριση με τη δοκιμασία ελέγχου, η υποθερμιδική δίαιτα μείωσε τη συγκέντρωση των VLDL-TG νηστείας κατά ~26% οφειλόμενο σε μείωση της ηπατικής έκκρισης των VLDL-TG κατά 21% και αύξηση της ηπατικής εκκαθάρισης κατά ~12%. Η υπερθερμιδική δίαιτα αύξησε τις συγκεντρώσεις γλυκόζης αλλά δεν είχε καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις και την κινητική των VLDL-TG σε σύγκριση με την δοκιμασία ελέγχου.

Συμπέρασμα : Οξύ ενεργειακό έλλειμμα (700kcal) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υποτριακυλογλυκερολαιμίας λόγω της μειωμένης ηπατικής έκκρισης και αυξημένης εκκαθάρισης των VLDL-TG. Αντιθέτως, οξύ ενεργειακό πλεόνασμα (700kcal) δεν είχε καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις και την κινητική των VLDL-TG.

Abstract

Aim: The aim of the present study was to investigate the effects of acute negative and positive energy balance on VLDL-TG metabolism in women.

Methods: Ten healthy women (age: 22.0 ± 2.9 years, BMI $21.2 \pm 1.3 \text{ kg/m}^2$) underwent a stable isotopically labeled tracer infusion study after performing, in random order, three experimental trials on the previous day: i) a control day of isocaloric feeding (net energy balance), ii) hyper-caloric feeding (overfeeding of 700kcal), and iii) hypocaloric feeding (dietary energy restriction of 700kcal). All diets had the same macronutrient content (%). Subjects were instructed to replicate their diet for two days before each trial and to avoid any kind of physical activity.

Results: Fasting plasma VLDL-TG concentrations were $\sim 26\%$ lower after hypocaloric feeding compared to control ($P=0.037$) due to decreased hepatic VLDL-TG secretion rate (by $\sim 21\%$, $P=0.023$) and increased VLDL-TG plasma clearance rate (by $\sim 12\%$, $P=0.016$). There was no significant change on VLDL-TG concentrations after hypercaloric feeding compared to control.

Conclusion: Acute dietary energy deficit (700kcal) leads to hypotriglyceridemia through a combination of decreased hepatic VLDL-TG secretion and increased VLDL-TG clearance. On the contrary, acute dietary energy surplus (700kcal) does not seem to affect basal VLDL-TG metabolism.

1. Εισαγωγή

Η θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα στην Ελλάδα και ιδιαίτερα στο δυτικό κόσμο, τείνει να έχει μια αυξητική πορεία[1, 2] . Συγκεκριμένα, παρά το γεγονός ότι σε μια έρευνα που διεξήχθη στον ελληνικό πληθυσμό τη δεκαετία του 60 τα ποσοστά θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα ήταν χαμηλά, με την πάροδο των χρόνων τα ποσοστά αυτά άρχισαν να αυξάνονται [2].

Παρά τη γενική αντίληψη ότι η στεφανιαία νόσος προσβάλλει κυρίως τον ανδρικό πληθυσμό, οι καρδιαγγειακές παθήσεις είναι υπεύθυνες για το 23% της γυναικείας θνησιμότητας και αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου σε γυναίκες άνω των 60 ετών[3]. Η συχνότητα εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων είναι σημαντικά χαμηλότερη στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες [4, 5] όμως η διαφορά αυτή των δύο φύλων ελαττώνεται στις μεγαλύτερες ηλικίες λόγω της αύξησης του κινδύνου καρδιαγγειακών νοσημάτων στις γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση[6, 7]. Τις περισσότερες φορές ο κίνδυνος αυτός στο γυναικείο πληθυσμό διπλασιάζεται και σχεδόν τριπλασιάζεται σε σχέση με τον ανδρικό πληθυσμό [6, 7].

Σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων αποτελούν οι αυξημένες συγκεντρώσεις τριακυλογλυκερολών (TAG) στο πλάσμα, τόσο στο μεταγευματικό όσο και στο μεταπορροφητικό στάδιο[8-12], χοληστερόλης στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) καθώς και οι μειωμένες συγκεντρώσεις χοληστερόλης στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL)[6,7,11]. Σύμφωνα με μια μετανάλυση παρατηρείται αύξηση του κινδύνου καρδιαγγειακών ασθενειών κατά 76% στις γυναίκες και 32% στους άνδρες για κάθε αύξηση 1mmol/L στα επίπεδα των τριγλυκεριδίων[13].

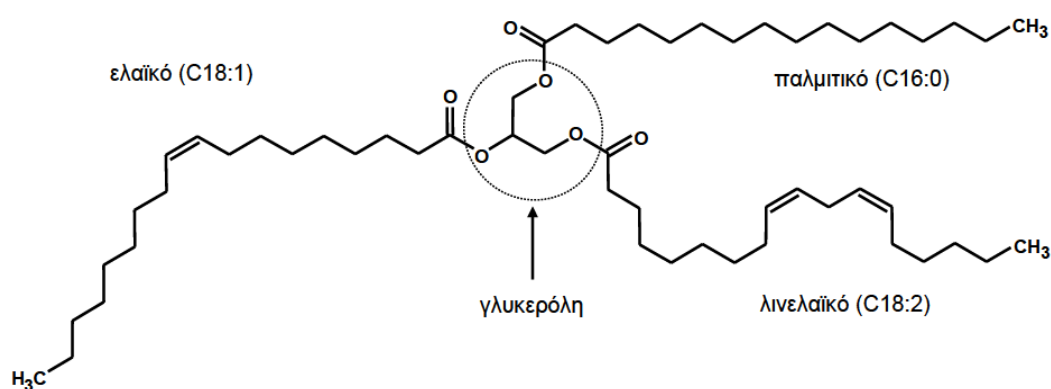
Το ενεργειακό ισοζύγιο φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των TAG καθώς παρεμβάσεις που προκαλούν ενεργειακό έλλειμμα (άσκηση, υποθερμιδική διαίτα) μειώνουν τις συγκεντρώσεις τους στο πλάσμα του αίματος ενώ αντιθέτως, παρεμβάσεις που προκαλούν ενεργειακό πλεόνασμα (υπερθερμιδική διαίτα) ενδέχεται να αυξάνουν ή και να μειώνουν τις συγκεντρώσεις. Όσον αφορά τα αποτελέσματα του ενεργειακού πλεονάσματος στο μεταβολισμό των TAG,

καθοριστικό ρόλο παίζει η σύνθεση της διαίτας. Αυξημένη χορήγηση υδατανθράκων και ιδιαίτερα φρουκτόζης στη διατροφή αυξάνει τις συγκεντρώσεις των TAG στο πλάσμα, ενώ αυξημένη χορήγηση λιπών δείχνει να προκαλεί μείωση. Ο συνδυασμός αυξημένης χορήγησης λιπών και υδατανθράκων επίσης δεν φαίνεται να έχει καμία επίδραση στις συγκεντρώσεις των TAG στο πλάσμα.

2. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας

2.1 Τριακυλογλυκερόλες και λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας

Οι τριακυλογλυκερόλες (TAG) είναι τα απλούστερα λιπίδια που συντίθενται από λιπαρά οξέα και αποτελούν την πιο άφθονη κατηγορία λιπιδίων. Είναι μη πολικά, υδρόφοβα μόρια και γι' αυτό άνυδρα, αδιάλυτα στο νερό και χρησιμεύουν κυρίως ως αποθέματα ενέργειας. Αντιπροσωπεύουν μια πολύ συμπαγόμενη μορφή ενέργειας αποτελώντας περίπου το 95% του διαιτητικού λίπους και καλύπτουν τις μισές και πλέον ενεργειακές ανάγκες ορισμένων οργάνων, ιδίως του ήπατος, της καρδιάς και των γραμμωτών μυών σε ηρεμία. Περιέχουν τρία μόρια λιπαρών οξέων που εστεροποιούνται στις τρεις υδροξυλικές ομάδες της γλυκερόλης sn-1, sn-2, sn-3. Διακρίνονται σε απλές TAG οι οποίες περιέχουν μόνο ένα τύπο λιπαρού οξέος και σε μικτές TAG οι οποίες περιέχουν δύο ή τρεις τύπους.



Εικόνα 2.1. Η χημική δομή των τριακυλογλυκερολών (TG).

Κάθε μόριο TG αποτελείται από τρία μόρια λιπαρών οξέων εστεροποιημένα σε ένα μόριο γλυκερόλης.

Το βασικό τους πλεονέκτημα είναι η βιολογική τους αδράνεια σε σύγκριση με τα FFA, όπου οι σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις τους είναι τοξικές για τον οργανισμό. Έτσι, καθίστανται ιδανική μορφή αποθήκευσης στα ανώτερα ζώα συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου[14].

Το βασικό όμως βιολογικό τους μειονέκτημα είναι ο εξαιρετικά υδρόφοβος χαρακτήρας τους. Λόγω λοιπόν αυτού του χαρακτήρα, οι TAG δεν μπορούν να μετακινηθούν στο υδάτινο περιβάλλον του πλάσματος του αίματος. Για το λόγο αυτό χρειάζονται οι λιποπρωτεΐνες.

Οι λιποπρωτεΐνες σχηματίζονται στα κύτταρα του εντερικού επιθηλίου και του ήπατος. Αποτελούν μια οικογένεια σφαιρικών μακρομοριακών σύμπλοκων λιπιδίων και πρωτεϊνών με κύρια λειτουργία την μεταφορά των ενδογενών και των εξωγενών λιπιδίων από ιστό σε ιστό για να καλύψουν τις ανάγκες των κυττάρων σε λιποειδή[15]. Κατατάσσονται σε πέντε κατηγορίες οι οποίες είναι : (i) τα χυλομικρά (CM), (ii) οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL), (iii) οι λιποπρωτεΐνες διάμεσης πυκνότητας (IDL), (iv) οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL) και (v) οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL).

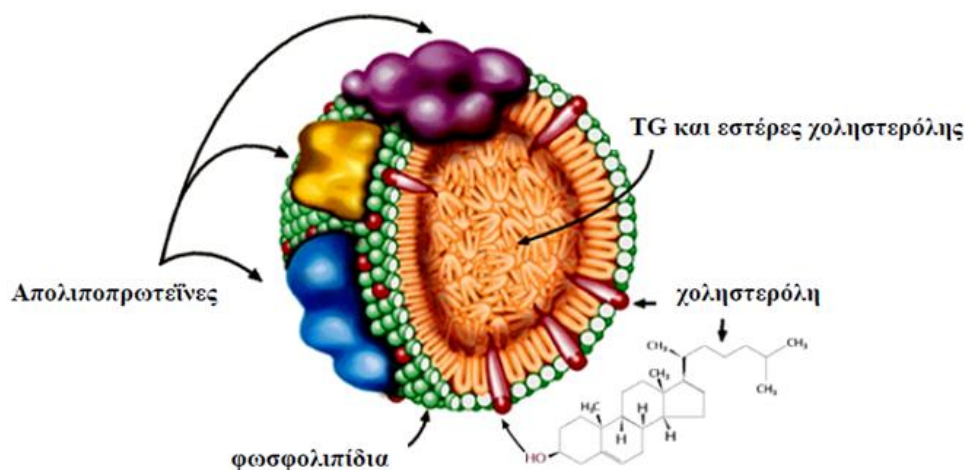
Τα χυλομικρά και οι VLDL αποκαλούνται τριγλυκεριδοφόρες λιποπρωτεΐνες (triglyceride-rich lipoproteins-TRL) καθώς το μεγαλύτερο μέρος του υδρόφοβου πυρήνα τους αποτελείται από TAG. Οι TRLs παίζουν καθοριστικό ρόλο στο να παραδίδουν FFA σε διάφορους ιστούς για παραγωγή ενέργειας (καρδιά και σκελετικοί μύες) ή για αποθήκευση (λιπώδης ιστός)[16].

Τα χυλομικρά που εκκρίνονται από τα εντεροκύτταρα, είναι σωματίδια διαμέτρου 80-1000nm, έχουν ως κύρια λιποειδή τις TAG της τροφής και απολιποπρωτεΐνες τις apoB-48, apoC-I, apoC-II, apoC-III, apoE. Η συγκέντρωσή τους στο αίμα αυξάνεται σημαντικά στο μεταγευματικό στάδιο (έως και 10-12 ώρες μετά την κατανάλωση ενός γεύματος), ενώ κατά το μεταπορροφητικό στάδιο (10-12 ώρες μετά την κατανάλωση ενός γεύματος και ύστερα) τα επίπεδα τους στο αίμα είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμα.(2)

Οι VLDL που εκκρίνονται από το ήπαρ, είναι σωματίδια διαμέτρου 30-80nm και έχουν ως κύρια λιποειδή τις ενδογενώς συντιθέμενες TAG από το ήπαρ και απολιποπρωτεΐνες αποB-100, αποC-I, αποC-II, αποC-III, αποE. Κάθε σωματίδιο VLDL περιέχει μόνο ένα μόριο αποB-100 εν αντιθέσει με την διαθεσιμότητα των TAG του πυρήνα η οποία διαφέρει σημαντικά και καθορίζει τη μεταβολική τύχη των VLDL σωματιδίων[17].

Τα λιπαρά οξέα τα οποία χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση των ηπατικών TAG προέρχονται κυρίως από τα FFA του πλάσματος, από την εξ' ηπαρχής (de novo) λιπογένεση, καθώς επίσης και από ενδοηπατικές και ενδοκοιλιακές τριακυλογλυκερόλες[17, 18]. Σε κατάσταση νηστείας, περίπου το 65-70% των TAG στο αίμα βρίσκονται στις VLDL.

Οι απολιποπρωτεΐνες είναι πρωτεΐνες του πλάσματος που προσδένουν λιπίδια και είναι υπεύθυνες για την μεταφορά των τριακυλογλυκερολών, των φωσφολιπιδίων, της χοληστερόλης και των εστέρων χοληστερόλης από όργανο σε όργανο. Συνδυάζονται με λιπίδια για να σχηματίσουν αρκετές τάξεις λιποπρωτεϊνών.



Εικόνα 2.2. Σχηματική αναπαράσταση μορίου λιποπρωτεΐνης πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL).

2.2 Μεταβολισμός VLDL

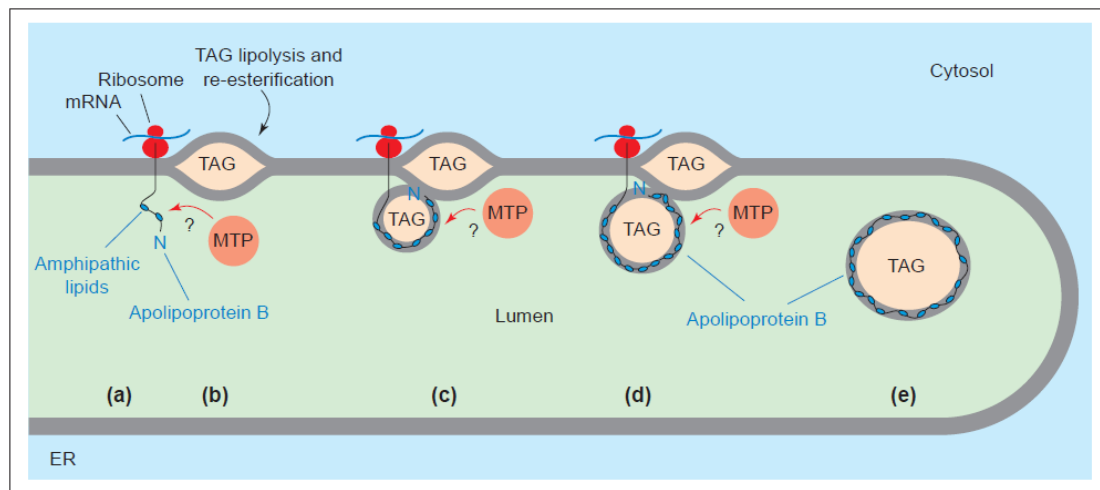
2.2.1 Ηπατική σύνθεση VLDL και έκκριση στην κυκλοφορία

Οι VLDL αποτελούν το κύριο μέσο για τη μεταφορά των ενδογενώς παραγόμενων TAG. Είναι σφαιρικά σωματίδια με διάμετρο 30-80nm και πυκνότητα 0.95-1.006g/ml, έχουν ως κύρια λιποειδή τις ενδογενώς συντιθέμενες TAG από το ήπαρ και απολιποπρωτεΐνες αποB-100, αποC-I, αποC-II, αποC-III, αποE. Η αποB φαίνεται ότι διατηρεί τη δομική σταθερότητα της λιποπρωτεΐνης συνδέοντας το εξωτερικό υδρόφιλο περίβλημα της με τον υδρόφοβο πυρήνα της[19]. Το 40% περίπου της πρωτεϊνικής μάζας των VLDL, αποτελείται από την αποB[15], χωρίς την παρουσία της οποίας, αναστέλλεται η έκκριση λιποειδών από τις VLDL[6]. Σε κατάσταση νηστείας, περίπου το 65-70% των TAG στο αίμα βρίσκονται στις VLDL.

Ο βασικός μηχανισμός σύνθεσης των VLDL προτάθηκε από τον Havel και τους συνεργάτες του το 1976. Ο μηχανισμός αυτός περιλαμβάνει τη σύντηξη ενός νεοσυντιθέμενου μορίου αποB-100, που παράγεται στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, με ένα σταγονίδιο λιποειδών (TAG και φωσφολιποειδή) που παράγεται στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο. Το ώριμο σωματίδιο που σχηματίζεται εκκρίνεται στη συνέχεια στην κυκλοφορία. Το μοντέλο αυτό προτείνει ότι οι TAG ενσωματώνονται στην αποB-100 σε δυο διακριτά στάδια της διαδικασίας ενσωμάτωσης, καθένα από τα οποία πραγματοποιείται σε διαφορετική περιοχή του κυττάρου. Στο πρώτο στάδιο μια μικρή ποσότητα τριακυλογλυκερολών ενσωματώνεται στην αποB-100 κατά τη διαδικασία της σύγχρονης μετάφρασης και μετακίνησης κατά μήκος του αδρού ενδοπλασματικού δικτύου, καταλήγοντας στο σχηματισμό ενός μικρού, πυκνού πρόδρομου σωματιδίου VLDL. Σε αυτή τη διαδικασία σημαντικό ρόλο διαδραματίζει το ένζυμο μικροσωμική πρωτεΐνη μεταφοράς τριακυλογλυκερολών (MTP)[20].

Η MTP καταλύει τη μεταφορά TAG, CE και PL από τη μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου προς τη σημείο σύνθεσης των VLDL[21], και φαίνεται να έχει συγκεκριμένη προτίμηση για τις τριακυλογλυκερόλες που αποτελούνται από λιπαρά οξέα με συγκεκριμένο βαθμό κορεσμού[6]. Σε περιπτώσεις γενετικής έλλειψης αυτού του ενζύμου, η έκκριση της VLDL στην κυκλοφορία παρεμποδίζεται ή αναστέλλεται πλήρως.

Το δεύτερο στάδιο, (στάδιο ωρίμανσης) περιλαμβάνει τη σύντηξη του πρόδρομου σωματιδίου VLDL με ένα μεγάλο σταγονίδιο TAG, το οποίο έχει σχηματιστεί προηγουμένως στο λείο ενδοπλασματικό δίκτυο μέσω της δράσης της MTP. Το ώριμο σωματίδιο VLDL, εκκρίνεται στη συνέχεια στην κυκλοφορία του αίματος.



Εικόνα 2.3. Σύνθεση VLDL.

Τα επίπεδα των ηπατικών λιποειδών όπως η φωσφατιδυλοχολίνη, οι εστέρες χοληστερόλης, τα λιπαρά οξέα και οι τριακυλογλυκερόλες επίσης επηρεάζουν τη σύνθεση των VLDL σωματιδίων [19].

Γενικά, η φωσφατιδυλοχολίνη φαίνεται να ευνοεί τη μετατόπιση της αποB από το κυτοσόλιο στον αυλό του ενδοπλασματικού δικτύου, γεγονός που αποδεικνύεται πολύ σημαντικό για τα πρώτα βήματα της σύνθεσης των VLDL σωματιδίων [19].

2.2.2 Καταβολισμός των VLDL

Η αλληλεπίδραση των VLDL-TAG με την λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) ή «παράγοντας κάθαρσης» του ενδοθηλίου των περιφερικών ιστών που απελευθερώνει τα λιπαρά οξέα και εξαντλεί τις TAG του πυρήνα των VLDL[22], αποτελεί την έναρξη του καταβολισμού των VLDL-TAG.

Η LPL βρίσκεται στην επιφάνεια του ενδοθηλίου των μικρών αιμοφόρων αγγείων και των τριχοειδών μέσα στο λιπώδη και στο μυϊκό ιστό και έχει προταθεί ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στο προσδιορισμό της σύστασης του σώματος[23, 24].

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση, η οποία δρα στο αγγειακό ενδοθήλιο είναι το ένζυμο που υδρολύει τις τριακυλογλυκερόλες που βρίσκονται μέσα στις λιποπρωτεΐνες ώστε να απελευθερωθούν λιπαρά οξέα. Εκκρίνεται από το λιπώδη ιστό και δρα επί των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν τις τριακυλογλυκερόλες, οι οποίες υδρολύονται.

Η λιπολυτική δράση της LPL ρυθμίζεται κυρίως από τις απολιποπρωτεΐνες C και κυρίως από την αναλογία της αποC-II προς την αποC-III [23, 25]. Η αποC-II που βρίσκεται στην επιφάνεια των VLDL ενεργοποιεί την LPL η οποία υδρολύει τις TAG των VLDL[26], ενώ αντίθετα, η αποC-III φαίνεται ότι αναστέλλει τη δράση της LPL[26], πιθανόν γιατί παρεμποδίζει την αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη αποC-II [23].

Η ολοκλήρωση του καταβολισμού επέρχεται με τη συμβολή μιας μεταφορικής πρωτεΐνης που ονομάζεται πρωτεΐνη μεταφοράς εστέρων χοληστερόλης ή CETP (Cholesteryl ester transfer protein, CETP). Η CETP είναι μια υδρόφοβη γλυκοπρωτεΐνη που είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των TAG από τον πυρήνα των VLDL σε ανταλλαγή εστέρων χοληστερόλης από τις HDL και LDL[27]. Η ανταλλαγή αυτή έχει σαν αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό των VLDL σε εστέρες χοληστερόλης με ταυτόχρονη εξάντληση των TAG, και αντίστοιχα τον εμπλουτισμό των HDL σε TAG με ταυτόχρονη εξάντληση των εστέρων χοληστερόλης [27].

Ο καταβολισμός των μεγάλων σωματιδίων VLDL₁ από την LPL έχει ως αποτέλεσμα την δημιουργία υπολειμμάτων VLDL τα οποία απομακρύνονται από την κυκλοφορία μέσω του ήπατος. Ο καταβολισμός των VLDL₂ οδηγεί σε IDL. Οι IDL διατηρούν την αποB-100, την αποE και εμπλουτίζονται με εστέρες χοληστερόλης (CE)[26].

Οι IDL μετατρέπονται σε μικρότερα, πυκνότερα και πλούσια σε εστέρες χοληστερόλης σωματίδια LDL με τη δράση της ορμονοευαίσθητης λιπάσης (HL)[26]. Καθώς οι IDL μετατρέπονται σε LDL, η αποE αποκολλάται και μόνο η αποB-100 παραμένει προσδεσμένη στην επιφάνεια της LDL[26].

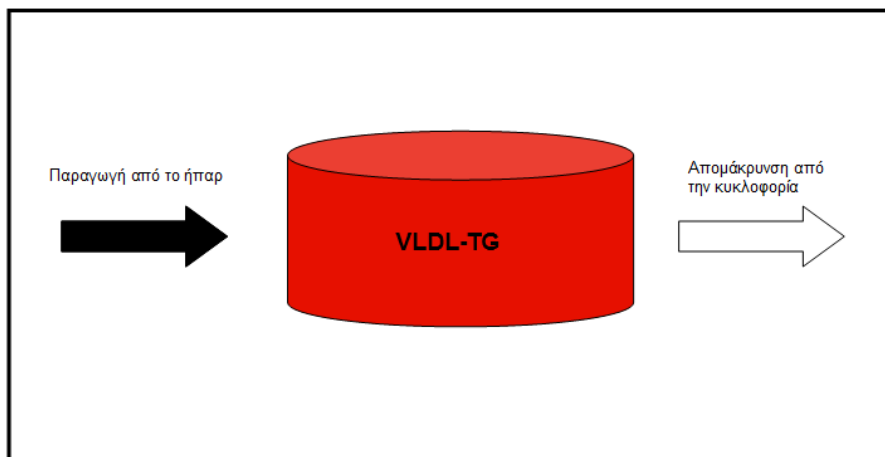
Οι LDL είναι ο κύριος φορέας της χοληστερόλης του πλάσματος και η οξειδωτική τροποποίηση τους αποτελεί τον κύριο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης.

Η έκκριση των VLDL υπόκειται σε ορμονικό έλεγχο από την ινσουλίνη.

Παρά το γεγονός ότι η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση ηπατικών λιπαρών οξέων, φωσφολιποειδών και τριακυλογλυκερολών σε περιόδους αυξημένης ενεργειακής πρόσληψης[27], υψηλές συγκεντρώσεις αυτής της ορμόνης φαίνεται να αναστέλλουν τη παραγωγή VLDL σωματιδίων[28], μειώνοντας την έκκριση της αποB και ενισχύοντας την αποδόμηση της [19]. Αυτό είναι σύμφωνο με την αναβολική δράση της ινσουλίνης καθώς ευνοεί την ηπατική αποθήκευση των λιποειδών και όχι την διανομή των σωματιδίων VLDL προς τους διάφορους ιστούς για ενέργεια.

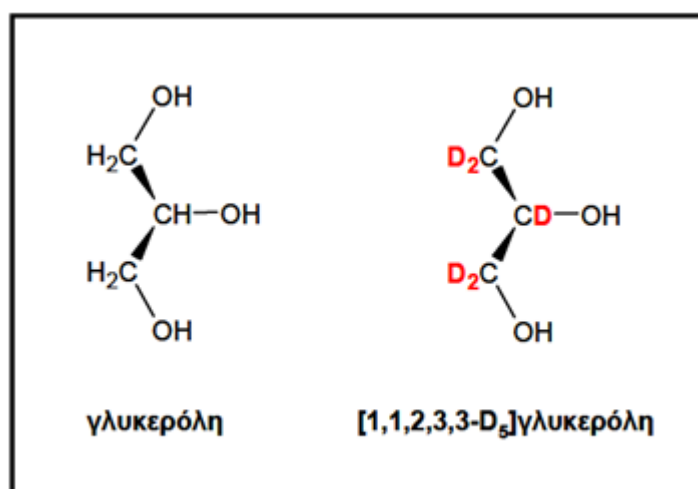
2.2.3 Μελέτη κινητικής των VLDL – τριακυλογλυκερολών.

Αυξημένες συγκεντρώσεις TAG πλάσματος σχετίζονται με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη και παχυσαρκίας και αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου[29]. Ως εκ τούτου, η κατανόηση της κινητικής των VLDL – TAG έχει σημαντικές φυσιολογικές και κλινικές επιπτώσεις[29].



Εικόνα 2.4. Η συγκέντρωση των VLDL-TG στο αίμα προσδιορίζεται κάθε στιγμή από τους ρυθμούς παραγωγής από το ήπαρ και απομάκρυνσης από την κυκλοφορία.

Οι ισοτοπικοί ιχνηλάτες μας δίνουν την δυνατότητα να παρακολουθήσουμε την κινητική των διάφορων βιολογικών υποστρωμάτων και να προσδιορίσουμε τη μεταβολική τους πορεία *in vivo*. Το κύριο χαρακτηριστικό της τεχνικής των ισότοπων είναι η χρήση ενός σεσημασμένου εξωγενούς υποστρώματος (ιχνηλάτης, *tracer*) για τη διερεύνηση της μεταβολικής πορείας ενός ενδογενούς υποστρώματος (ιχνηλατούμενος, *tracee*). Ως εκ τούτου, ο ιχνηλάτης θα πρέπει να είναι χημικά και δομικά όμοιος με το ιχνηλατούμενο υπόστρωμα, θα πρέπει όμως να διαφέρει σε κάποια χαρακτηριστικά έτσι ώστε να καθίσταται δυνατή η ανίχνευση του με μεγάλη ακρίβεια[17].



Εικόνα 2.5. Αριστερά απεικονίζεται το μόριο γλυκερόλης που απαντάται συνηθέστερα στη φύση και στο ανθρώπινο σώμα (ιχνηλατούμενο) και δεξιά απεικονίζεται η γλυκερόλη που θα χρησιμοποιηθεί ως ιχνηλάτης, η οποία είναι σεσημασμένη με δευτέριο (D) στη θέση του πρώτιου.

Τα ισότοπα διακρίνονται σε ραδιενεργά και σε σταθερά. Τα ραδιενεργά ισότοπα διασπώνται με την πάροδο του χρόνου και σχηματίζουν άτομα ενός άλλου στοιχείου. Αντιθέτως, τα σταθερά ισότοπα δεν διασπώνται με την πάροδο του χρόνου και η ποσότητα τους στη φύση παραμένει σχετικά σταθερή[17]. Η χρήση των σταθερών ισωτόπων ιχνηθέτησης έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης των ραδιενεργών ιχνηθετών. Συγκεκριμένα, δεν υπάρχει έκθεση σε δυνητικά βλαβερή ακτινοβολία, είναι δυνατή η άμεση μέτρηση του λόγου του ιχνηλάτη προς την ιχνηλατούμενη ουσία (TTR, tracer to tracee ratio) στα βιολογικά δείγματα και παρέχεται ο ακριβής καθορισμός θέσης του επισημασμένου μορίου [17].

Οι δόσεις που χρησιμοποιούνται ως ιχνηλάτες κατά τη διάρκεια ενός πειραματικού πρωτόκολλου θα πρέπει να είναι τέτοιες έτσι ώστε να αυξάνουν άνω του φυσιολογικού την περιεκτικότητα του σώματος στο συγκεκριμένο ισότοπο αλλά να μην διαταράσσεται η ομοιοστασία του υπό μελέτη συστήματος [17].

Η παρακολούθηση της κινητικής των VLDL-TG με ισότοπα ιχνηθέτησης περιλαμβάνει την ενδοφλέβια έγχυση επισημασμένης ουσίας που ενσωματώνεται στα VLDL-TG άμεσα και δεν εμπλέκεται σε άλλες μεταβολικές πορείες[30]. Η ουσία που χρησιμοποιείται συνήθεστερα είναι κυρίως ένα ιχνηθετημένο πρόδρομο των TAG (γλυκερόλη, λιπαρά οξέα, οξικό οξύ) το οποίο τελικά ενσωματώνεται στη δομή των VLDL-TG [29, 30]. Η σεσημασμένη γλυκερόλη χρησιμοποιείται αρκετά συχνά στην έρευνα λόγω του ότι δεν ανακυκλώνεται μέσα από τα μονοπάτια της γλυκόλυσης και της νεογλυκογένεσης και έτσι μπορεί να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα στην μελέτη της κινητικής των VLDL-TG[31, 32].

2.4. Ρύθμιση των επιπέδων των VLDL-TAG

2.4.1. Κλινική σημασία

Τα αυξημένα επίπεδα τριακυλογλυκερολών στο πλάσμα σχετίζονται άμεσα με τον αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου και αποτελούν ανεξάρτητο παράγοντα κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα [13, 33-37]. Για την αποφυγή εμφάνισης στεφανιαίας νόσου, οι φυσιολογικές τιμές των TAG του πλάσματος δεν θα πρέπει να ξεπερνούν τα 150 mg/dL μετά από 12ώρη νηστεία[38].

Αυξημένα επίπεδα TAG στο αίμα που μπορεί να οφείλονται είτε σε αυξημένη παραγωγή VLDL-TAG από το ήπαρ [39-41], είτε σε μειωμένη απομάκρυνση τους από τους περιφερικούς ιστούς [42-45] ή και στους δύο μηχανισμούς ταυτόχρονα[46-48], και ενδέχεται να συντελούν στην εμφάνιση υπερτριακυλογλυκερολαιμίας. Επιπλέον, ως αποτέλεσμα της υπερτριακυλογλυκερολαιμίας προκαλείται μείωση της HDL-χοληστερόλης η οποία ασκεί καρδιοπροστατευτική δράση και αύξηση των μικρών και πυκνών LDL σωματιδίων .

Ο καθορισμός του λιπιδαιμικού προφίλ του κάθε ατόμου επηρεάζεται από εξωγενείς και ενδογενείς παράγοντες. Πέρα από την ενδογενή επίδραση που ασκεί το γονιδίωμα[49], διάφοροι εξωγενείς παράγοντες επηρεάζουν τη συγκέντρωση TAG νηστείας στο αίμα. Η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, η παχυσαρκία, η αυξημένη κατανάλωση αλκοόλ καθώς επίσης και το κάπνισμα, δίαιτες υψηλές σε υδατάνθρακες (>60% προσλαμβανόμενης ενέργειας), διάφορες ασθένειες (διαβήτης τύπου II, χρόνια νεφρική ανεπάρκεια), καθώς και λήψη συγκεκριμένων φαρμάκων (κορτικοστεροειδή, οιστρογόνα, αναστολείς πρωτεασών για HIV)[22].

Ως εκ τούτου, λήψη απαραίτητων μέτρων για την ρύθμιση των επιπέδων TAG νηστείας όπως αλλαγές στη διατροφική συμπεριφορά και αυξημένα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας, κρίνονται αναγκαία.

2.5. Επίδραση του ενεργειακού ισοζυγίου: θετικού έναντι αρνητικού

Το ενεργειακό ισοζύγιο ενός ατόμου ορίζεται από την διατήρηση της ισορροπίας ανάμεσα στην ενεργειακή πρόσληψη (ΕΠ) και στην ενεργειακή δαπάνη (ΕΔ). Αρνητικό ισοζύγιο ενέργειας έχουμε όταν η ΕΠ είναι μικρότερη από την ΕΔ ($ΕΠ < ΕΔ$) και θετικό ισοζύγιο ενέργειας έχουμε όταν η ΕΠ είναι μεγαλύτερη από την ΕΔ ($ΕΠ > ΕΔ$). Για να παραμείνει το βάρος ενός ατόμου σταθερό θα πρέπει η ΕΠ να ισούται με την ΕΔ ($ΕΠ = ΕΔ$). Αντιθέτως, σε περιπτώσεις που παρατηρείται μακροχρόνιο αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο θα επέλθει μείωση του σωματικού βάρους και ομοίως, σε περιπτώσεις που παρατηρείται μακροχρόνιο θετικό ενεργειακό ισοζύγιο θα επέλθει αύξηση του σωματικού βάρους.

2.5.1. Επίδραση του μακροχρόνιου αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου στο μεταπορροφητικό στάδιο-απώλεια βάρους

Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι η παχυσαρκία σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα, και ότι η απώλεια βάρους η οποία επέρχεται έπειτα από μείωση της ενεργειακής πρόσληψης έχει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την βελτίωση του καρδιαγγειακού κινδύνου[50].

Σε μελέτες που έγιναν σε γυναίκες με κοιλιακού τύπου παχυσαρκία όσον αφορά την κινητική των VLDL-TAG, έδειξε ότι 10% απώλεια σωματικού βάρους είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκκρισης των VLDL-TAG στο μεταπορροφητικό στάδιο κατά 40%, χωρίς καμία μεταβολή στο ρυθμό εκκαθάρισης[51] και χωρίς να παρατηρηθεί μείωση της έκκρισης των μορίων των VLDL-apoB-100[32, 51, 52].

Η απώλεια του σωματικού βάρους που προκαλείται από μακροχρόνια υποθερμιδική δίαιτα έχει δείχθει ότι προκαλεί μείωση των επιπέδων TAG στο μεταπορροφητικό στάδιο[53, 54] και φαίνεται ότι απώλεια βάρους 1kg μειώνει τα επίπεδα TAG νηστείας κατά 0,015mmol/L[55] αλλά τα αποτελέσματα είναι εμφανή μόνο όταν ο προσδιορισμός των TAG γίνεται κατά τη διάρκεια της απώλειας του σωματικού βάρους[56] όταν δηλαδή συνυπάρχει η επίδραση του οξέος ενεργειακού ελλείμματος.

Αντιθέτως, σε πολλές μελέτες βρέθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα[57] ή σε ορισμένες άλλες δεν βρέθηκε κανένα αποτέλεσμα[58, 59] πιθανών λόγω των διαφορετικών μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Επιπλέον, μέτρια απώλεια σωματικού βάρους (5%) έχειδειχθεί ότι μειώνει ή εξαλείφει τις διαταραχές που σχετίζονται με την παχυσαρκία, μειώνει την υπεργλυκαιμία και την ινσουλινοαντίσταση και αυξάνει την HDL χοληστερόλη. Επίσης συνδέεται με την βελτίωση του λόγου της ολικής χοληστερόλης προς την HDL χοληστερόλη κάτι το οποίο συμβαίνει ανεξάρτητα από το αν η απώλεια βάρους προήλθε από την δίαιτα ή από την άσκηση [60].

Ο βασικός παράγοντας που επηρεάζει τη συγκέντρωση των TAG νηστείας αποτελεί ο ρυθμός λιπόλυσης ο οποίος και καθορίζει την διαθεσιμότητα των FFA στο αίμα[18, 61] Έτσι λοιπόν η μειωμένη έκκριση που παρατηρείται είναι αποτέλεσμα της μειωμένης παροχής των λιπαρών οξέων τόσο της συστηματικής κυκλοφορίας (TAG λιπώδους ιστού) όσο και της μη συστηματικής κυκλοφορίας (ενδοπεριτονιακά, ενδοηπατικά TAG) λόγω της μειωμένης λιπόλυσης έπειτα από μείωση του σωματικού βάρους[22].

Ο μειωμένος ρυθμός λιπόλυσης έπειτα από μείωση του σωματικού βάρους, είναι πιθανό να προέρχεται είτε από αύξηση του βαθμού ινσουλινοευαισθησίας[62] είτε από μειωμένη δραστηριότητα της HSL του λιπώδους ιστού[63, 64], είτε από μείωση του μεγέθους των λιποκυττάρων[65] ή από μείωση των επιπέδων λίπους στον υποδόριο και ενδοσπλάχνικό ιστό[66].

2.5.2. Επίδραση του βραχυχρόνιου αρνητικού ισοζυγίου (δίαιτα-άσκηση).

Βραχυχρόνιο αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο ενδέχεται να προέλθει είτε από την επίδραση της άσκησης, είτε από την επίδραση της μειωμένης ενεργειακής πρόσληψης είτε από το συνδυασμό των παραπάνω.

Η υποτρίακυλογλυκερολαιμική δράση της άσκησης εμφανίζεται 12-18 ώρες μετά το τέλος μιας συνεδρίας άσκησης, διαρκεί 2-3 ημέρες και δεν είναι αποτέλεσμα επαναλαμβανόμενων συνεδριών (προπόνησης)[22]. Το μέγεθος της μείωσης των TAG πλάσματος είτε αυτό προέρχεται από μια συνεδρία άσκησης είτε είναι

αποτέλεσμα προπόνησης είναι το ίδιο και κυμαίνεται περίπου στο 15-50%[22]. Τα μειωμένα επίπεδα TAG πλάσματος που παρατηρούνται 15 ώρες μετά το πέρας της άσκησης διαρκούν 48-60 ώρες και δεν παρατηρούνται περαιτέρω αλλαγές με το πέρας μίας εβδομάδας αποχής από την προπόνηση[22].

Έχει φανεί ότι μία συνεδρία αερόβιας άσκησης μέτριας έντασης διάρκειας 90 λεπτών στο 60% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_{2max}) ή μια συνεδρία αερόβιας άσκησης χαμηλής έντασης που διαρκεί 3 ώρες στο 30% της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου (VO_{2max}), οι οποίες προκαλούν ενεργειακό έλλειμμα 600-700kcal, μειώνουν τα επίπεδα των TAG νηστείας την επόμενη μέρα μετά το τέλος της άσκησης κατά 15-30%[67-75]. Επίσης, άσκηση επαρκούς ενεργειακής δαπάνης (~900 kcal) μειώνει τις συγκεντρώσεις TAG πλάσματος στο μεταπορροφητικό στάδιο την επόμενη μέρα ανεξάρτητα από το εάν η ενεργειακή δαπάνη έχει προέλθει από αερόβια άσκηση ή από άσκηση με αντιστάσεις[22].

Η υποτρίακυλογλυκερολαιμία η οποία εμφανίζεται 1 ημέρα μετά τον τερματισμό οξείας άσκησης εξαρτάται από τη συνολική ενεργειακή δαπάνη της άσκησης, η οποία πρέπει να ξεπερνά τις 500kcal[67, 69, 70, 76-81]. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι μια μέρα ενεργειακού ελλείμματος της τάξης των 500kcal, είτε αυτό προέρχεται από περιορισμό ενεργειακής πρόσληψης μέσω της δίαιτας, είτε από αύξηση της ενεργειακής δαπάνης μέσω της άσκησης ή από το συνδυασμό και των δύο, μειώνει τη συγκέντρωση των TAG στο μεταγευματικό και μεταπορροφητικό στάδιο κατά 12-15%[82].

Σε μια άλλη μελέτη, 5 ημέρες αυξημένης ενεργειακής δαπάνης κατά 900 kcal/ημέρα ή μειωμένης ενεργειακής πρόσληψης σε 1800 kcal/ημέρα σε υγιείς άνδρες, έδειξε σημαντική μείωση των επιπέδων TAG στο μεταπορροφητικό στάδιο[83]. Ωστόσο, η μείωση του σωματικού βάρους που προήλθε ως αποτέλεσμα της άσκησης έδειξε μεγαλύτερη ευεργετική επίδραση στο μεταβολισμό των λιπιδίων σε σχέση με την διαιτητική παρέμβαση. Αντιθέτως, μια ημέρα μειωμένης ενεργειακής πρόσληψης κατά 340 kcal σε μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, δεν επέφερε μείωση των επιπέδων TAG[3].

Σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση της υπερτριακυλογλυκερολαιμίας κατέχει και η άσκηση με αντιστάσεις αλλά και πάλι οι ευεργετικές της ιδιότητες εξαρτώνται από το ενεργειακό έλλειμμα που έχει δημιουργηθεί και όχι από τον τύπο της άσκησης που προηγήθηκε.

Άσκηση επαρκούς ενεργειακού ελλείμματος (~900 kcal) μειώνει, την επόμενη μέρα, την συγκέντρωση TAG στο μεταπορροφητικό στάδιο ανεξάρτητα εάν η μείωση προήλθε από άσκηση με αντιστάσεις ή από αερόβια[22]. Φαίνεται όμως ότι παρά τις σχετικά παρόμοιες επιδράσεις της άσκησης με αντιστάσεις με αυτές της αερόβιας στην κινητική των VLDL-TAG, η άσκηση με αντιστάσεις εμφανίζει την υποτριακυλογλυκερολαιμική της δράση με μικρότερο ενεργειακό έλλειμμα (300-650 kcal) [84] σε σχέση με την αερόβια άσκηση (700-1200 kcal)[85, 86].

Όμως, σε μελέτες που εξετάστηκε η επίδραση μίας συνεδρίας άσκησης με αντιστάσεις, στις συγκεντρώσεις TAG στο μεταπορροφητικό στάδιο, μικρότερης ενεργειακής δαπάνης (200-550 kcal), τα αποτελέσματα είναι διφορούμενα με κάποιες μελέτες[87, 88] να αναφέρουν σημαντικές μειώσεις και κάποιες άλλες όχι[89, 90].

2.5.3. Η επίδραση του θετικού ενεργειακού ισοζυγίου

Λίγες μελέτες έχουν μελετήσει την κινητική των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο μετά την κατανάλωση υπερθερμιδικού διατροφολογίου. Οι περισσότερες μελέτες που έχουν διενεργηθεί αφορούν είτε την κατανάλωση αυξημένων υδατανθράκων[61, 91-94], είτε αυξημένου λίπους[95, 96], είτε ο σχεδιασμός της μελέτης περιελάμβανε την μελέτη κινητικής των VLDL-TG για σύντομο χρονικό διάστημα (4-6 ημέρες)[33, 95, 97].

Παρά το γεγονός ότι δίαιτες υψηλής περιεκτικότητας υδατανθράκων συνιστώνται για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (CHD), λόγω της μειωμένης συγκέντρωσης LDL χοληστερόλης που παρατηρείται, εντούτοις η χορήγηση δίαιτας αυξημένων υδατανθράκων και ιδιαίτερα απλών σακχάρων[97], για σύντομο χρονικό

διάστημα, αυξάνει τη συγκέντρωση των TG λόγω της αυξημένης de novo λιπογένεσης στο ήπαρ [33, 61, 91], αυξάνει την παραγωγή γλυκόζης [33] και αναστέλλει την οξείδωση των λιπών[98, 99].

Αντιθέτως, η χορήγηση αυξημένου λίπους στη δίαιτα φαίνεται ότι προκαλεί μείωση των συγκεντρώσεων των FFA (λόγω της μειωμένης λιπόλυσης) και των VLDL-TG (λόγω μειωμένης DNL στο ήπαρ και ως εκ τούτου λόγω μειωμένης έκκρισης των VLDL-TG στην κυκλοφορία) στο μεταπορροφητικό στάδιο και αύξηση της HDL χοληστερόλης ενώ αντίθετα προκαλεί αύξηση των επιπέδων γλυκόζης στο πλάσμα λόγω της αυξημένης παραγωγής γλυκόζης ως αποτέλεσμα της αυξημένης ενεργειακής πρόσληψης[95, 96].

Επιπλέον, πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν τονίσει ότι ο εμπλουτισμός της διατροφής με πολυακόρεστα ω-3 και ω-6 λιπαρά οξέα (Polyunsaturated Fatty Acids, PUFA) έχει ευεργετικά αποτελέσματα όσον αφορά τη βελτίωση του καρδιαγγειακού κινδύνου και την εμφάνιση καρδιοπαθειών[100, 101]. Η δράση αυτή φαίνεται πως οφείλεται στη μειωμένη σύνθεση VLDL σωματιδίων από το ήπαρ[1, 102, 103] και στην αυξημένη λιπόλυση που επιτελείται κατά την κυκλοφορία τους στο αίμα[103, 104].

Ο συνδυασμός αυξημένης κατανάλωσης υδατανθράκων και λιπών δεν παρουσίασε καμία μεταβολή στο μεταβολισμό των VLDL-TG[94, 97] ενώ παρουσίασε αύξηση των συγκεντρώσεων γλυκόζης κατά το μεταπορροφητικό στάδιο[95, 105].

Ο μηχανισμός με τον οποίο το πλεόνασμα ενέργειας επιδρά στην κινητική των VLDL-TG παραμένει υπό διερεύνηση με μελέτες να δείχνουν ότι αυξημένη χορήγηση υδατανθράκων αυξάνει τη συγκέντρωση των VLDL-TG νηστείας λόγω αυξημένης έκκρισης τους και όχι λόγω μειωμένης εκκαθάρισης[92] και άλλες μελέτες να δείχνουν ότι μειώνει το ρυθμό εκκαθάρισης των VLDL-TG από την κυκλοφορία ενώ δεν παρατηρείται αύξηση του ρυθμού έκκρισης. Ομοίως, σε ορισμένες μελέτες η αυξημένη κατανάλωση υδατανθράκων οδηγεί σε αύξηση του ρυθμού της de novo λιπογένεσης (DNL) στο ήπαρ[33], ενώ σε άλλες δεν παρατηρήθηκε αύξηση της ηπατικής DNL μετά την κατανάλωση αυξημένων υδατανθράκων[61].

Ως εκ τούτου, ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η επίδραση της οξείας (μίας ημέρας) του θετικού και αρνητικού ενεργειακού ισοζυγίου στο μεταβολισμό των VLDL-TG ανεξάρτητα από απώλεια βάρους.

3. Σκοπός και υπόθεση της μελέτης

3.1 Ερευνητικά κενά

Έχει βρεθεί ότι σε νέες υγιείς γυναίκες, βραχυχρόνιο ενεργειακό έλλειμμα (μίας ημέρας) της τάξης των 500kcal, προκαλούμενο από άσκηση, μειώνει την συγκέντρωση των VLDL-TG νηστείας, αυξάνει το ρυθμό κάθαρσης των VLDL-TG από το πλάσμα και μειώνει το μέσο χρόνο παραμονής των VLDL-TG στο πλάσμα[106]. Αντιθέτως, ισόποσο ενεργειακό έλλειμμα προκαλούμενο από δίαιτα δεν επιδρά σημαντικά στη συγκέντρωση των VLDL-TG νηστείας[106]. Όμως, οι επιδράσεις της βραχυχρόνιας αυξημένης ενεργειακής πρόσληψης στις συγκεντρώσεις των VLDL-TG σε γυναίκες, δεν έχει πλήρως διερευνηθεί.

3.2 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση των επιδράσεων του βραχυχρόνιου (μίας ημέρας) αρνητικού και του βραχυχρόνιου θετικού ενεργειακού ισοζυγίου (700kcal), που προκαλείται από μείωση της ενεργειακής πρόσληψης (υποθερμιδική δίαιτα) ή αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης (υπερθερμιδική δίαιτα), στην κινητική των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο, σε νέες υγιείς μη φυσικά δραστήριες γυναίκες.

3.3 Ερευνητική Υπόθεση

Σε νέες υγιείς γυναίκες, μια ημέρα ενεργειακού ελλείμματος (700kcal), προκαλούμενο από μείωση της ενεργειακής πρόσληψης (δίαιτα), μειώνει τη συγκέντρωση των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο, καθώς επίσης και ότι μια ημέρα αυξημένης ενεργειακής πρόσληψης (+700 kcal) αυξάνει τη συγκέντρωση VLDL-TG.

4. Ερευνητική Μεθοδολογία

4.1. Κριτήρια Επιλογής Εθελοντών

Στη μελέτη έλαβαν μέρος δέκα εθελόντριες ηλικίας 22-26 ετών, μη αθλήτριες, φυσιολογικού βάρους [δείκτης μάζας σώματος (ΔΜΣ) $<30\text{kg/m}^2$ και $>18.5\text{kg/m}^2$] οι οποίες απείχαν από κάθε είδους σωματικής δραστηριότητας για τουλάχιστον 1 εβδομάδα. Πριν τη συμμετοχή τους στη μελέτη πραγματοποιήθηκαν εργαστηριακές εξετάσεις που περιελάμβαναν α) ανάλυση σύστασης σώματος, β) αξιολόγηση φυσικής κατάστασης, γ) βιοχημικές εξετάσεις αίματος (συγκεντρώσεις γλυκόζης, ολικών τριακυλογλυκερολών και χοληστερόλης στο μεταπορροφητικό στάδιο) και δ) εξέταση των επιπέδων θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH).

Για την προσέλκυση εθελοντριών με σκοπό τη συμμετοχή τους στη μελέτη, αναρτήθηκε ενημερωτικό φυλλάδιο στο Χαροκόπειο πανεπιστήμιο καθώς επίσης εστάλη ενημερωτικό φυλλάδιο μέσω ηλεκτρονικού ταχυδρομείου στους φοιτητές του Χαροκόπειου πανεπιστημίου όπως και σε άλλα πανεπιστημιακά ιδρύματα της Αθήνας.

Τα κριτήρια αποκλεισμού των εθελοντριών από την μελέτη ήταν τα εξής: αυξημένα επίπεδα γλυκόζης (επίπεδα νηστείας $>1100\text{mg/dL}$), υπερχοληστερολαιμία (επίπεδα

νηστείας >200mg/dL) ή υπερτριακυλογλυκερολαιμία (επίπεδα νηστείας >150mg/dL) και μη φυσιολογικά επίπεδα TSH. Επίσης από τη μελέτη αποκλείστηκαν άτομα τα οποία έκαναν λήψη φαρμακευτικής αγωγής για οποιαδήποτε λόγο, λάμβαναν αντισυλληπτικά σκευάσματα το τελευταίο έτος, υπήρξαν καπνίστριες τα τελευταία δύο έτη, ακολουθούσαν διαιτολογική αγωγή ή είχαν διακυμάνσεις σωματικού βάρους > 2kg τους τελευταίους έξι μήνες, συμμετείχαν σε συστηματική άσκηση ή ήταν αθλήτριες, είχαν σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, είχαν προβλήματα στη λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος (υπερθυρεοειδισμός ή υποθυρεοειδισμός) ή άλλες χρόνιες παθήσεις και είχαν διαπιστωμένες αλλεργίες στη λήψη ενδοφλεβίων σκευασμάτων.

Για τη συμμετοχή τους στη μελέτη, όλες οι εθελόντριες συμπλήρωσαν έντυπο ιατρικό ιστορικό και υπέγραψαν το συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής, με το οποίο ενημερώθηκαν για τον σκοπό της μελέτης, τις πειραματικής διαδικασίας και τους πιθανούς κινδύνους. Η μελέτη εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

4.2. Ανθρωπομετρία

Για τον υπολογισμό του σωματικού βάρους των εθελοντριών χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας (SECA scale, Αμβούργο, Γερμανία) με ακρίβεια καταγραφής 0.1cm. Η μέτρηση των εθελοντριών έγινε χωρίς υποδήματα και με ελαφρύ ρουχισμό. Οι μετρήσεις έγιναν εις διπλούν και υπολογίστηκε ο μέσος όρος του βάρους και του ύψους της κάθε εθελόντριας και εν συνεχεία υπολογίστηκε ο ΔΜΣ ως το πηλίκο του βάρους (σε kg) προς το τετράγωνο του ύψους (σε m).

4.3. Σύσταση σώματος

Ο προσδιορισμός της σύστασης σώματος έγινε περίπου μία εβδομάδα πριν από την έναρξη της μελέτης. Ο προσδιορισμός της άλιπης και λιπώδους μάζας έγινε με τη μέθοδο της απορροφησιομετρίας ακτινών X διπλής ενέργειας (dual-energy X-ray absorptiometry, DXA) χρησιμοποιώντας σαρωτή σώματος (model DPX-MD, Lunar, Madison, WI, USA, software version 4.6). Οι εθελόντριες προσήλθαν στο εργαστήριο νωρίς το πρωί σε κατάσταση νηστείας (αποχή από φαγητό ή αλκοολούχο ποτό για 12 τουλάχιστον ώρες) και ο χρόνος σάρωσης διήρκεσε 15 λεπτά.

4.4. Μεταβολικός Ρυθμός Ηρεμίας

Ο προσδιορισμός του μεταβολικού ρυθμού ηρεμίας (resting metabolic rate, RMR) έγινε με τη μέθοδο της έμμεσης θερμιδομετρίας. Πραγματοποιήθηκε μέτρηση της πρόσληψης οξυγόνου (VO_2) των εξεταζόμενων και έκλυση του διοξειδίου του άνθρακα (VCO_2) για 30 λεπτά χρησιμοποιώντας τη συσκευή dilution canopy (Sensormedics, Vmax229, Yorba Linda, CA) υπό τις κατάλληλες συνθήκες (12ωρη νηστεία, κατάσταση ηρεμίας, θερμοκρασιακά ουδέτερο περιβάλλον) και αφού είχε προηγηθεί ανάπαυση της εθελόντριας για περίπου ~30 λεπτά. Ο προσδιορισμός του RMR έγινε με βάση την εξίσωση Weir[107] και τον πίνακα για το μη-πρωτεϊνικό αναπνευστικό πηλίκο[108].

4.5. Υπολογισμός Μέγιστης Πρόσληψης Οξυγόνου

Ο προσδιορισμός της μέγιστης πρόσληψης οξυγόνου peak oxygen consumption, $\text{VO}_{2\text{peak}}$) των εθελοντριών έγινε έπειτα από υπομέγιστο τεστ σε δαπεδοργόμετρο [109]. Αφού προηγήθηκε ολιγόλεπτη προθέρμανση, η κάθε εθελόντρια ακολούθησε πρωτόκολλο αυξανόμενης κλίσης παράλληλα με την μέτρηση της πρόσληψης

οξυγόνου (Sensomedics, V_{max}229, Yorba Linda CA) καθώς και της καρδιακής της συχνότητας σε κάθε στάδιο (καρδιοσυχνόμετρο Suunto, t3c, Finland). Η ρύθμιση της ταχύτητας του δαπεδοεργόμετρου (Technogym Runcare, Gambettola, Italy) έγινε σύμφωνα με το βηματισμό της κάθε εθελόντριας και παρέμεινε σταθερή (5.0-6.5 km/h) για όλη τη διάρκεια της μέτρησης, ενώ υπήρξε αύξηση της κλίσης κατά 2% κάθε 3 λεπτά. Η δοκιμασία τερματίστηκε όταν η καρδιακή συχνότητα της εθελόντριας έφτασε το 80% της θεωρητικής μέγιστης συχνότητας (maximum heart rate, HR_{max}), όπου ο υπολογισμός της μέγιστης καρδιακής συχνότητας έγινε με βάση τον τύπο $HR_{max} = (220 - \text{ηλικία})$ [110].

4.6. Παρασκευή, έγχυση διαλύματος [1,1,2,3,3-²H₅] γλυκερόλης και αιμοληψίες.

Χρησιμοποιήθηκε ολόκληρο το ειδικά αποστειρωμένο και σφραγισμένο φιαλίδιο που περιείχε το σταθερό ισότοπο ιχνηθέτησης [1,1,2,3,3-²H₅] γλυκερόλη (γλυκερόλη 1,1,2,3,3-D₅, 99%) για την παρασκευή του διαλύματος επισημασμένης γλυκερόλης. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένη σύριγγα των 10ml για να προσληφθεί μικρή ποσότητα φυσιολογικού ορού και να προστεθεί στο φιαλίδιο με τη γλυκερόλη έτσι ώστε να αυξηθεί η ρευστότητα της. Στη συνέχεια έγινε αναρρόφηση του διαλύματος της γλυκερόλης και έγχυση του μέσω αποστειρωμένου φίλτρου (με διάμετρο πόρων 0,22μm, Millex-GV, Millipore, Ireland) σε αποστειρωμένη και σφραγισμένη φιάλη που περιείχε 500ml φυσιολογικού ορού (0.9% χλωριούχο νάτριο, NaCl). Για να αποφευχθεί ο κίνδυνος επαφής του τελικού διαλύματος με το περιβάλλον, η φιάλη που περιείχε το τελικό διάλυμα σφραγίστηκε με parafilm και το διάλυμα αποθηκεύτηκε στο ψυγείο.

Η κάθε εθελόντρια προσήλθε στο εργαστήριο νωρίς το πρωί 08:00πμ για την πραγματοποίηση της δοκιμασίας αφού είχε προηγηθεί ολονύκτια νηστεία (12 ώρες). Έγινε εισαγωγή ενός καθετήρα σε φλέβα του ενός χεριού (στο ύψος του πήχης) για τη χορήγηση σταθερών ισοτόπων ιχνηθέτησης και ενός δευτέρου καθετήρα σε φλέβα του άλλου χεριού για τη συλλογή δειγμάτων αίματος. Για τη διατήρηση του καθετήρα

ανοιχτού, χορηγήθηκε μικρή ποσότητα (~2-3ml) φυσιολογικού ορού (0,9% χλωριούχο νάτριο, NaCl) έπειτα από κάθε αιμοληψία και κάθε μισή ώρα μετά. Για να εξοικειωθούν οι εθελόντριες με την ύπαρξη του φλεβοκαθετήρα, τους παραχωρήθηκε μία ώρα σε κατάσταση ηρεμίας ($t=0$) πριν από την πρώτη αιμοληψία. Αμέσως μετά την πρώτη αιμοληψία στις 09:00πμ. χορηγήθηκε με ενδοφλέβια ένεση η $[1,1,2,3,3\text{-}^2\text{H}_5]$ γλυκερόλη (75 $\mu\text{mol/kg}$ σωματικού βάρους, σε φυσιολογικό ορό). Η χορήγηση πραγματοποιήθηκε μέσω αποστειρωμένου φίλτρου (διάμετρος πόρων 0,22 μm), το οποίο παρεμβάλλονταν μεταξύ της αποστειρωμένης σύριγγας και της βελόνας. Στη συνέχεια, δείγματα αίματος (~10 ml) συλλέγονταν στα 15 λεπτά, κι έπειτα κάθε μία ώρα μέχρι την ολοκλήρωση της μελέτης δηλαδή για 6 ώρες συνολικά. Οι εθελόντριες παρέμειναν σε κατάσταση νηστείας (εκτός από νερό) σε όλη τη διάρκεια της μελέτης.

4.7. Ερευνητικό πρωτόκολλο

Οι εθελόντριες που έλαβαν μέρος στην παρούσα μελέτη υποβλήθηκαν στη διαδικασία μελέτης της κινητικής των VLDL – TAG τρεις φορές συνολικά (ισοθερμιδική δίαιτα, υποθερμιδική δίαιτα, υπερθερμιδική δίαιτα) με διαφορά μίας τουλάχιστον εβδομάδας ενδιάμεσα. Η φάση του έμμηνου κύκλου στην οποία βρίσκονταν οι εθελόντριες την ημέρα της δοκιμασίας δεν λήφθηκε υπόψη καθώς έχειδειχθεί ότι δεν επηρεάζει την συγκέντρωση ή την κινητική των VLDL-TG[111]. Οι δοκιμασίες έλαβαν χώρα με τυχαιοποιημένη σειρά και πριν την έναρξη της πρώτης δοκιμασίας ζητήθηκε από τις εθελόντριες να καταγράψουν τη διαιτητική τους πρόσληψη για δύο ημέρες. Επιπλέον, ζητήθηκε από τις εθελόντριες να επαναλάβουν την ίδια διατροφή που έκαναν γι' αυτές τις δύο ημέρες καθώς επίσης και να απέχουν από οποιαδήποτε έντονη φυσική δραστηριότητα για δύο ημέρες πριν από κάθε δοκιμασία. Η κάθε δοκιμασία διέφερε μόνο στο ενεργειακό ισοζύγιο σε σχέση με τις άλλες δύο. Σε σύγκριση με τη δοκιμασία ελέγχου, στη μια παρέμβαση οι εθελόντριες βρίσκονταν σε αρνητικό ισοζύγιο ενέργειας (700kcal) και στην άλλη παρέμβαση οι εθελόντριες βρίσκονταν σε θετικό ισοζύγιο ενέργεια (700kcal).

Παρέμβαση ελέγχου

Ισοθερμιδική διαίτα

(50% CHO, 30% Fat, 20% Proteins)

Παρέμβαση υποθερμιδικής διαίτας

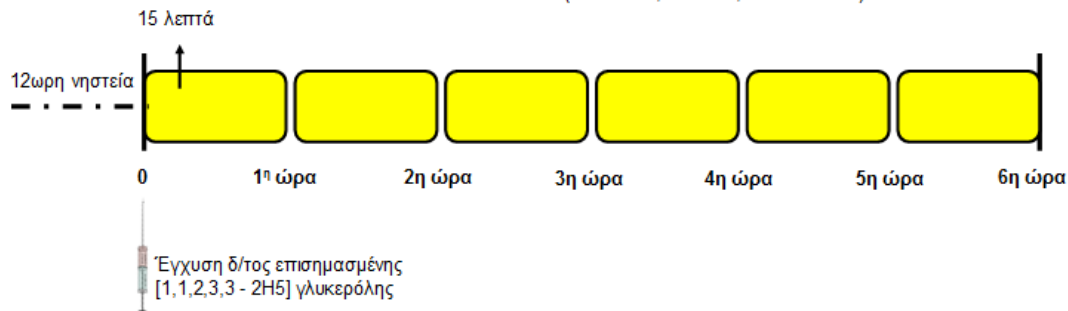
Μείωση ενεργειακής πρόσληψης κατά 700kcal

(50% CHO, 30% Fat, 20% Proteins)

Παρέμβαση υπερθερμιδικής διαίτας

Αύξηση ενεργειακής πρόσληψης κατά 700kcal

(50% CHO, 30% Fat, 20% Proteins)



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση του ερευνητικού πρωτόκολλου.

Παρέμβαση Ελέγχου -Ισοθερμιδική Δίαιτα (Isocaloric Diet)

Από τις εθελόντριες ζητήθηκε να ακολουθήσαν ένα συνταγογραφημένο ισοθερμιδικό διαιτολόγιο το οποίο παρείχε ενέργεια ίση με τις εκτιμώμενες ημερήσιες ενεργειακές τους ανάγκες για σταθερό σωματικό βάρος. Ο υπολογισμός αυτός έγινε πολλαπλασιάζοντας το μετρούμενο RMR με παράγοντα φυσικής δραστηριότητας 1.4 που αντιπροσωπεύει την πολύ χαμηλή έως χαμηλή φυσική δραστηριότητα των εθελοντριών της συγκεκριμένης μελέτης[112]. Ως εκ τούτου, η κάθε εθελόντρια κατά την ημέρα της δοκιμασίας ελέγχου βρισκόταν σε ισοζύγιο ενέργειας.

Παρέμβαση Υποθερμιδικής Δίαιτας (Hypocaloric Feeding)

Από τις εθελόντριες ζητήθηκε να ακολουθήσαν ένα συνταγογραφημένο υποθερμιδικό διαιτολόγιο το οποίο παρείχε ενέργεια ίση με τις εκτιμώμενες ημερήσιες ενεργειακές τους ανάγκες για σταθερό σωματικό βάρος, μείον 700kcal. Η μείωση της ενεργειακής πρόσληψης έγινε και από τα τρία γεύματα της ημέρας,

δηλαδή από το μεσημεριανό, το απογευματινό και το βραδινό γεύμα. Έτσι, η κάθε εθελόντρια, κατά την ημέρα της παρέμβασης με δίαιτα βρισκόταν σε αρνητικό ισοζύγιο ενέργειας, λόγω της μείωσης της ενεργειακής πρόσληψης.

Παρέμβαση Υπερθερμιδικής Δίαιτας (Overfeeding)

Από τις εθελόντριες ζητήθηκε να ακολουθήσαν ένα συνταγογραφημένο υπερθερμιδικό διαιτολόγιο το οποίο παρείχε ενέργεια ίση με τις εκτιμώμενες ημερήσιες ενεργειακές τους ανάγκες για σταθερό σωματικό βάρος, με επιπλέον 700kcal.

Προκειμένου να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή τήρηση του συνταγογραφημένου διαιτολογίου, το πλεόνασμα ενέργειας δόθηκε μέσω δύο ενεργειακών ποτών (200ml/ποτό) υψηλής θερμιδικής αξίας (1400kcal/ml). Το κάθε ποτό περιείχε 50% υδατάνθρακες, 15% πρωτεΐνες και 35% λίπος (Fresubin, Fresenius Kabi).

4.8. Διαιτολογική ανάλυση

Το κάθε συνταγογραφημένο διαιτολόγιο, το οποίο ζητήθηκε να ακολουθηθεί από τις εθελόντριες, παρείχε 50% της συνολικής προσλαμβανόμενης ενέργειας από υδατάνθρακες, 30% από λίπη και 20% από πρωτεΐνες. Για τη βεβαιότητα τήρησης των συνταγογραφημένων διαιτολογίων, ζητήθηκε από τις εθελόντριες να καταγράψουν τη διατροφική τους πρόσληψη σε ειδικά ημερολόγια καταγραφής διατητικής πρόσληψης καθώς επίσης την ημέρα των αιμοληψιών, πριν την έναρξη των μετρήσεων λαμβάνονταν από διαιτολόγο διατροφική ανάκληση 24ώρου για την ημέρα της δοκιμασίας. Η ανάλυση των διαιτολογικών ημερολογίων για την ημέρα της δοκιμασίας έγινε με το λογισμικό πρόγραμμα Diet Analysis Plus 8.0. Τα μακροθρεπτικά συστατικά των δοκιμασιών απεικονίζονται στον πίνακα 1.

	Ισοθερμιδική Δίαιτα	Υποθερμιδική Δίαιτα	Υπερθερμιδική Δίαιτα
Ενεργειακή Πρόσληψη (kcal)	1600±310	900±260*†	2300±300*
Ενεργειακό Ισοζύγιο (MJ)	0	-2.89±0.42*†	2.91±0.32*
Υδατάνθρακες (g)	216±34	127±34*†	307±33*
Πρωτεΐνες (g)	80±18	47±15*†	100±35*
Λίπος (g)	52±18	31±15*†	73±18*

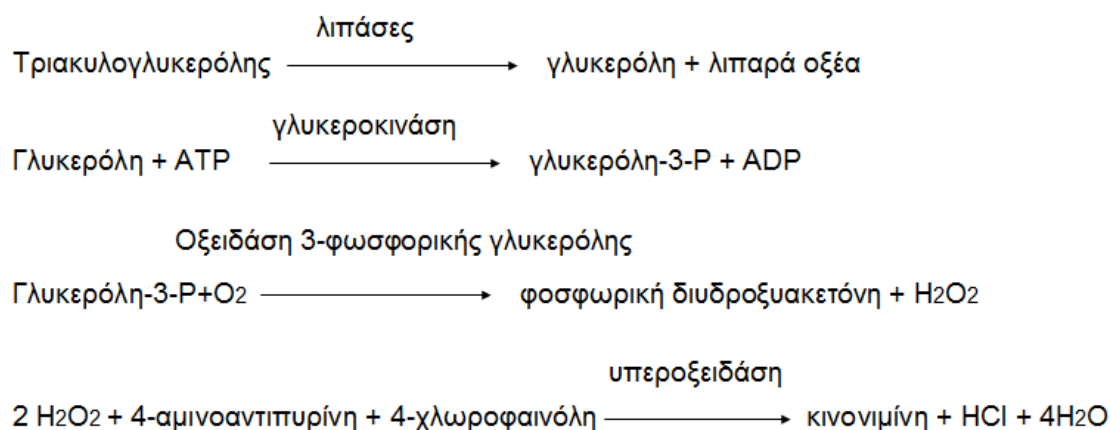
Πίνακας 1. Ενεργειακή πρόσληψη και περιεχόμενο μακροθρεπτικών συστατικών.

4.9. Επεξεργασία δειγμάτων αίματος

Η συλλογή των δειγμάτων αίματος έγινε σε φιαλίδια υπό κενό τα οποία περιείχαν αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό (athylenediamineretraacetic, EDTA) άλας με κάλιο ως αντιπηκτικό (BD Vacutainer), για να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των μεταβολικών παραμέτρων. Αμέσως μετά τη συλλογή, τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε πάγο και, εντός μισής ώρας, ακολούθησε φυγοκέντριση (φυγόκεντρος Hettick Zentrifugen, 2001, Germany) στις 3000 rpm για 15 λεπτά στους 4 °C για διαχωρισμό για διαχωρισμό του πλάσματος. Ένα μέρος του πλάσματος (~3 mL) διατηρήθηκε στην ψύξη για άμεση απομόνωση των VLDL. Τα υπόλοιπα δείγματα αποθηκεύτηκαν σε μικρά σωληνάκια (eppendorfs) στους -80°C για τον προσδιορισμό συγκέντρωσης ολικών TAG, και γλυκόζης. Ο προσδιορισμός των παραπάνω έγινε με ενζυμική, χρωματομετρική μέθοδο, χρησιμοποιώντας εμπορικά διαθέσιμα διαγνωστικά αντιδραστήρια (Alfa Wassermann Diagnostics, West Caldwell, NJ, USA) σε αυτόματο αναλυτή βιοχημικό αναλυτή (ACE Schiapparelli Biosystems, Fairfield, NJ, USA). Τα επίπεδα ινσουλίνης μετρήθηκαν με τη μέθοδο της ανοσοενζυματικής φθορισμομετρίας (immunofluorescence enzymatic assay), χρησιμοποιώντας τον κατάλληλο αναλυτή (ST AIA pack IRI, TOSOH AIA System Analyzers, San Francisco , CA) και τα εμπορικά διαθέσιμα διαγνωστικά αντιδραστήρια (Alfa Wassermann Diagnostics, West Caldwell, NJ, USA).

4.10. Προσδιορισμός συγκεντρώσεων TAG

Η συγκέντρωση των TAG στο πλάσμα και τις VLDL προσδιορίστηκε με ενζυμική δοκιμασία χρωματομετρίας[113]. Με τη μέθοδο αυτή, οι TAG αρχικά υδρολύονται σε γλυκερόλη και FFA με τη βοήθεια της LPL. Στη συνέχεια ακολουθούν οι παρακάτω αντιδράσεις:



Η κινονιμίνη παρουσιάζει μέγιστη απορρόφηση στα 540 nm (μωβ-κόκκινο χρώμα), μετρίεται με φασματοφωτόμετρο και είναι ευθέως ανάλογη με τη συγκέντρωση της γλυκερόλης και αρα των TG (εφόσον ένα μόριο TG περιέχει ένα μόριο γλυκερόλης) στο αρχικό δείγμα (20 μ l). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης (σε mmol/l) χρησιμοποιήθηκε μια σειρά εξωτερικών προτύπων. Το κάθε δείγμα μετρήθηκε δύο φορές και υπολογίστηκε ο μέσος όρος των τιμών.

4.11. Απομόνωση VLDL-TAG από το πλάσμα

Για την απομόνωση των VLDL λιποπρωτεϊνών, περίπου 2,2 ml πλάσματος από τα 3 ml που είχαν παραμείνει σε θερμοκρασία 4°C για μία ώρα διαλύθηκαν σε ειδικά πλαστικά φυαλίδια όγκου 4,7 ml (16x38 mm, Quick seal-Beckman centrifuge tubes) με 2,5 ml διαλύματος NaCl-EDTA (1.006kg/L). Στη συνέχεια τα φυαλίδια αυτά τοποθετήθηκαν σε ρότορα (Beckman TLN 100) και υπερφυγοκεντρήθηκαν (Beckman Optima LE-80K, Palo Alto, CA, USA) σε θερμοκρασία 4°C, στις 74.000 στροφές για 90 λεπτά. Το κλάσμα των VLDL λιποπρωτεϊνών συλλέχθηκε (με αποστειρωμένη

σύριγγα των 3 ml, LuerLok Tip, BD, Ireland, βελόνα 22G2'', BD Microlance, Ireland), έπειτα από την ποσοτική απομόνωση του υπερκείμενου τμήματος, που ακολούθησε τη διχοτόμηση του φιαλιδίου υπερφυγοκέντρωσης με ειδικό κοπτικό εξάρτημα (Beckman CentriTube slicer). Το υπερκείμενο (1,2-1,5 ml) αποθηκεύτηκε σε σωληνάκια (eppendorfs, Starstedt, Germany) στους -80°C για μετέπειτα ανάλυση. Η συγκέντρωση των VLDL-TAG μετρήθηκε μέσω της προαναφερθείσας μεθόδου χρησιμοποιώντας τα ακόλουθα αντιδραστήρια : Alfa Wassermann Diagnostics, West Caldwell, NJ και τον αυτόματο αναλυτή Schiapparelli Biosystems, Fairfield, NJ. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, προσδιορίζονται οι TAG του κλάσματος που απομονώθηκε. Από τη συγκέντρωση TAG στο κλάσμα (C_f), τη μάζα του πλάσματος (m_p=m₂-m₁) και τη μάζα του κλάσματος (m_f=m₄-m₃), θεωρώντας την πυκνότητα του πλάσματος και του κλάσματος ίση με 1g/ml για να απλοποιηθούν οι υπολογισμοί, προσδιορίζεται η συγκέντρωση των VLDL-TAG στο πλάσμα (C_p): $C_p \text{ (mg/dl)} = C_f \text{ (mg/dl)} m_f / m_p$.

4.12 Απομόνωση γλυκερόλης από τα VLDL-TAG

Από τις VLDL λιποπρωτεΐνες που απομονώσαμε, πήραμε 750μl το οποίο το διαλύσαμε σε 3ml ακετόνης (η οποία διατηρείται στην κατάψυξη στους -20°C) για την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Τοποθετήσαμε το διάλυμα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, το αναδεύσαμε σε ειδικό μηχάνημα Vortex και το τοποθετήσαμε για 10 λεπτά στους -20°C. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000 στροφές/λεπτό για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 5 °C ,λήφθηκε με γυάλινη πιπέτα και τοποθετήθηκε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου προστέθηκε 3ml εξάνιο και 3ml νερό (Water for Injection). Στη συνέχεια, τοποθετήσαμε τους σωλήνες σε ειδικό μηχάνημα ανάδευσης (platform shaker), στις 460 στροφές/λεπτό στους 5 °C για 15 λεπτά και έπειτα, φυγοκεντρήσαμε το διάλυμα για 10 λεπτά, στις 3000 στροφές/λεπτό, στους 5°C. Ακολούθως, έγινε λήψη του υπερκείμενου με γυάλινη πιπέτα και το τοποθετήσαμε σε νέους γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου αυτοί με τη σειρά τους τοποθετήθηκαν σε αφυγραντήρα υπό συνθήκες κενού (AES1010 Speedvac, Thermosavant, Holbrook, NY), σε αντιδιαμετρική διάταξη, για 45 λεπτά,

χωρίς θερμότητα. Τα δείγματα που υπέστησαν ξήρανση, επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα χλωροφόρμιο:μεθανόλης (3:1) και εφαρμόστηκαν με λεπτή σύριγγα (50μL) σε πλάκες πυριτικής πηκτής (LK6D silica gel plate, 60Å και πάχους 250μm, Whatman, Maidstone, UK). Για το διαχωρισμό των λιπιδίων, πραγματοποιήθηκε χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC) , μέσα σε γυάλινο θάλαμο ανάπτυξης και ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε επτάνιο:διεθυλ-εθέρας:φορμικό οξύ σε αναλογία 80:20:2. Στη συνέχεια ψεκάσαμε σε γυάλινη πλάκα με διάλυμα ροδαμίνης 6G 0.01% για τον εντοπισμό των κηλίδων που αντιστοιχούν στα TAG και πραγματοποιήσαμε απόξεση της ζώνης των TAG και τα ξύσματα τα μεταφέραμε σε γυάλινους σωλήνες 13x159 όπου επανεκχυλίζονται σε διάλυμα (1ml) χλωροφόρμιου: μεθανόλης (3:1), ανακινούνται για 10 min σε Vortex, κι έπειτα φυγοκεντρούνται για 5λεπτά, στις 3000 στροφές/λεπτό και στους 5 °C. Αναρροφήσαμε το υπερκείμενο με γυάλινη πιπέτα και το τοποθετήσαμε σε νέα γυάλινα φιαλίδια. Αυτά εισέρχονται στον αφυγραντήρα, για 45 λεπτά. Υδρολύσαμε τα αποξηραμένα δείγματα με απαναιώρηση σε διάλυμα (500μl) ακετυλοχλωριδίου:μεθανόλης 10%(1:9 κατ'όγκο, εξώθερμη αντίδραση) και κατόπιν τα φιαλίδια βιδώνονται καλά, ανακινούνται ελαφρά και στη συνέχεια επωάζονται για 30 λεπτά στους 70°C και ανατοποθετούνται σε αφυγραντήρα υπό συνθήκες κενού, για 90 λεπτά. Έπειτα, σχηματίζεται το παράγωγο της γλυκερόλης με τον επταφθοροβουτυρικό ανυδριτή (HFBa, 100μl σε κάθε φιαλίδιο), τα φιαλίδια αναδύονται για 1 λεπτό σε Vortex και επωάζονται στους 70 °C για 30 λεπτά. Στη συνέχεια τα αποξηράνανε τα διαλύματα υπό συνθήκες κενού για 3 ώρες. Τέλος, η αποξηραμένη γλυκερόλη διαλύθηκε σε 200μl επτανίου και το διάλυμα τοποθετήθηκε σε ειδικά για το GC-MS γυάλινα φιαλίδια, τα οποία σφραγίστηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -40°C.

4.13 Ανάλυση GC-MS

Ο λόγος του ιχνηλάτη προς την ιχνηλατούμενη ουσία (TTR) προσδιορίστηκε μέσα από τη διαδικασία συζευγμένης τεχνικής αέριας χρωματογραφίας-φασματογραφίας μαζών (gas chromatography – mass spectrometry, GC-MS). Για τη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιήθηκε το σύστημα GC-MSD 5973 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA). Για την ακριβή λειτουργία του οργάνου έγινε χρήση καμπύλης βαθμονόμησης

πρότυπων ουσιών με γνωστό ισοτοπικό εμπλουτισμό. Τα χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι τα εξής:

- Στήλη DB-17, μήκους 30cm και πάχους 0,25mm.
- Ιοντισμός με βομβαρδισμό ηλεκτρονίων (EI ενέργειας 70 eV).
- Θερμοκρασία πηγής = 100°C, θερμοκρασία εισαγωγής = 250 °C, θερμοκρασία γραμμών μεταφοράς = 250°C.
- Ροή ηλίου στο σύστημα ~ ml/min
- Ένεση με split ratio 100:1
- Επιλεκτική παρακολούθηση (SIM) των ιόντων με λόγους μάζας προς φορτίο m/z 467 (ιχνηλατούμενο) και 472 (ιχνηλάτης με 5 άτομα δευτέρου).

4.14 Υπολογισμοί

Η ινσουλινοαντίσταση σε επίπεδο ολόκληρου του σώματος υπολογίστηκε από τις συγκεντρώσεις της γλυκόζης και της ινσουλίνης στο πλάσμα, χρησιμοποιώντας τον τύπο του ομοιοστατικού μοντέλου (Homeostasis Model Assessment, HOMA)[114]:

$$\text{HOMA} = \text{Συγκέντρωση Ινσουλίνης (}\mu\text{U/ml)} \cdot \text{Γλυκόζη (mmol/L)}/22.5$$

Τα πρωτογενή πειραματικά δεδομένα τα οποία προέκυψαν από την ανάλυση GC-MS είναι η επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής για τον ιχνηλάτη και τον ιχνηλατούμενο, η οποία υπολογίστηκε αυτόματα από το λογισμικό του συστήματος (με χρήση μαθηματικού ολοκληρώματος). Η επιφάνεια αυτή αντιπροσωπεύει τον αριθμό των ιοντικών θραυσμάτων που μετρήθηκαν, που με τη σειρά του ισοδυναμεί με τον αριθμό των μορίων του ιχνηλάτη και του ιχνηλατούμενου πριν τον ιοντισμό. Το δείγμα στο χρόνο $t=0$ μετρήθηκε αρκετές φορές για να προσδιοριστεί με ακρίβεια ο εμπλουτισμός της VLDL-TAG-γλυκερόλης πριν τη χορήγηση του ιχνηλάτη. Τα

υπόλοιπα δείγματα μετρήθηκαν εις διπλούν. Επίσης, μετρήθηκε ένα κενό δείγμα (το οποίο δεν περιέχει βιολογικό υλικό αλλά αντίστοιχη ποσότητα αποσταγμένου νερού και υφίσταται όλη την επεξεργασία που προαναφέρθηκε) για να διαπιστωθεί η απουσία ισοτοπικής μόλυνσης κατά την ανάλυση των δειγμάτων. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο λόγος της επιφάνειας για τον ιχνηλάτη προς την επιφάνεια για τον ιχνηλατούμενο, ο οποίος αντιστοιχεί στον πρωτογενή λόγο ιχνηλάτη, ιχνηλατούμενο ($m+5 / m+0$). Από το λόγο αυτό σε κάθε χρονική στιγμή αφαιρείται ο μέσος όρος του λόγου για το δείγμα στο χρόνο $t = 0$ και προκύπτει έτσι ο TTR (tracer to tracee ratio).

Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο φυσικός λογάριθμος ($\ln$) σε κάθε χρονική στιγμή και προσδιορίστηκε με παλινδρόμηση η ευθεία εκείνη που προσομοιάζει καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα. Για την ανάλυση αυτή επιλέχθηκε ως αρχικό σημείο αυτό με την μεγαλύτερη τιμή $\ln$ (συνήθως το δείγμα μεταξύ 30min και 2 ωρών, ανάλογα με το πόσο γρήγορα γίνεται η ανακύκλωση των VLDL-TAG) και περιλαμβάνονται όλα τα υπόλοιπα σημεία που φαίνεται ότι ορίζουν μια ευθεία. Η απόλυτη τιμή της κλίσης της ευθείας αυτής αντιστοιχεί Κλασματικό Καταβολικό Ρυθμό (Fractional Catabolic Rate, FCR) των VLDL-TAG, που υποδηλώνει το μέρος εκείνο της δεξαμενής των VLDL-TAG που ανακυκλώνεται στη μονάδα του χρόνου.

Ο FCR των VLDL-TAG προσδιορίστηκε παρακολουθώντας την 6-ωρη τροχιά του TTR, της γλυκερόλης των VLDL-TAG, κάνοντας χρήση του μονοεκθετικού μοντέλου καταβολισμού των VLDL-TAG[29, 115]. Με τον τρόπο αυτό υπολογίστηκε ο FCR των VLDL-TAG κατά τις 6 ώρες μελέτης κινητικής των VLDL-TAG, που υποδηλώνει το κλάσμα της δεξαμενής των VLDL-TAG που ανακυκλώνεται στη μονάδα του χρόνου. Η εγκυρότητα της μεθόδου αυτής προϋποθέτει ότι η δεξαμενή των VLDL-TAG στο πλάσμα παραμένει σχετικά σταθερή κατά τη διάρκεια της μελέτης, κάτι που έχει διερευνηθεί από προηγούμενες μελέτες και φαίνεται πως ισχύει[32].

Ο σχετικός ρυθμός έκκρισης των VLDL-TAG από το ήπαρ (σε μmol ανά λίτρο πλάσματος ανά λεπτό, $\mu\text{mol/L} \cdot \text{min}$), που υποδηλώνει την ποσότητα των VLDL-TAG που παράγονται από το ήπαρ και εκκρίνονται στη μονάδα του πλάσματος ανά μονάδα χρόνου, υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας τον FCR των VLDL-TAG με τη συγκέντρωση των VLDL-TAG στο πλάσμα (σε $\mu\text{mol/L}$) [29, 32, 51, 92, 115]. Ο

απόλυτος ρυθμός έκκρισης των VLDL-TAG από το ήπαρ σε μmol ανά λεπτό, $\mu\text{mol}/\text{min}$), που υποδηλώνει τη συνολική ποσότητα VLDL-TAG που παράγονται από το ήπαρ και εκκρίνονται στην κυκλοφορία ανά μονάδα χρόνου, υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας τον FCR των VLDL-TAG με την δεξαμενή των VLDL-TAG στο πλάσμα (σε μmol). Η δεξαμενή των VLDL-TAG υπολογίστηκε πολλαπλασιάζοντας τη συγκέντρωση των VLDL-TAG στο πλάσμα(σε $\mu\text{mol}/\text{L}$) με τον όγκο κατανομής (volume of distribution) των VLDL-TAG (σε λίτρα, L). Ο όγκος κατανομής θεωρήθηκε ότι ισούται με τον όγκο του πλάσματος, καθώς οι VLDL περιορίζονται στο πλάσμα αφού, λόγω μεγέθους, δεν περνούν στον διάμεσο χώρο ή στο λεμφικό σύστημα[116]. Ο όγκος του πλάσματος (σε λίτρα, L) υπολογίστηκε ως 0,055 λίτρα ανά κιλό άλιπης μάζας. Οι υπολογισμοί κινητικής των VLDL-TAG έχουν ως εξής:

Σχετικός ρυθμός έκκρισης VLDL-TAG ($\mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{min}$) =

$$\text{FCR}_{\text{VLDL-TAG}} (\text{l}/\text{min}) \cdot \text{Συγκέντρωση VLDL-TAG} (\mu\text{mol}/\text{L})$$

Απόλυτος ρυθμός έκκρισης VLDL-TAG ($\mu\text{mol}/\text{L} \cdot \text{min}$) =

$$\text{FCR}_{\text{VLDL-TAG}} (\text{l}/\text{min}) \cdot \text{Δεξαμενή VLDL-TAG} (\mu\text{mol})$$

Δεξαμενή VLDL-TAG (μmol) =

$$\text{Συγκέντρωση VLDL-TAG} (\mu\text{mol}/\text{L}) \cdot \text{Όγκος κατανομής (L)}$$

Όγκος κατανομής = όγκος πλάσματος = 0,055L ανά kg άλιπης μάζας

Ο ρυθμός κάθαρσης των VLDL-TAG από την κυκλοφορία (σε ml/min) υποδηλώνει τον όγκο πλάσματος που καθαρίζεται από τις VLDL-TAG στη μονάδα του χρόνου και υπολογίστηκε διαιρώντας τον απόλυτο αριθμό απομάκρυνσης των VLDL-TAG (σε $\mu\text{mol}/\text{ml}$). Ο απόλυτος ρυθμός απομάκρυνσης των VLDL-TAG από το πλάσμα ισούται με τον απόλυτο ρυθμό έκκρισης των VLDL-TAG από το ήπαρ, καθώς η συγκέντρωση των VLDL-TAG στο πλάσμα παραμένει σταθερή[117]:

Ρυθμός κάθαρσης VLDL-TAG(ml/min)=

$$\text{Απόλυτος ρυθμός έκκρισης VLDL-TAG} (\mu\text{mol}/\text{min}) /$$

$$\text{Συγκέντρωση VLDL-TAG} (\mu\text{mol}/\text{ml})$$

Ο μέσος χρόνος παραμονής των VLDL-TAG στην κυκλοφορία του αίματος (mean residence time, MRT, σε λεπτά) υπολογίστηκε ως $1/FCR$ και υποδηλώνει τη μέση χρονική διάρκεια κατά την οποία τα VLDL-TAG κυκλοφορούν στο αίμα, από τη στιγμή που θα εκκριθούν από το ήπαρ έως ότου απομακρυνθούν από τους περιφερικούς ιστούς. Ένας σύντομος MRT υποδεικνύει τη γρήγορη απομάκρυνση των TAG από τα κυκλοφορούντα σωματίδια VLDL, ενώ ένας παρατεταμένος MRT υποδεικνύει ότι τα TAG παραμένουν στον πυρήνα των VLDL χωρίς να απομακρυνθούν για αρκετό χρονικό διάστημα μετά την έκκριση τους από το ήπαρ:

$$\text{Μέσος χρόνος παραμονής VLDL-TAG (min)} = 1/FCR \text{ VLDL-TAG (l/min)}$$

Ο ρυθμός κάθαρσης και ο MRT των VLDL-TAG αντιπροσωπεύουν την απομάκρυνση των VLDL-TAG από την κυκλοφορία του αίματος με οποιοδήποτε τρόπο, π.χ. λόγω υδρόλυσης από την LPL (ή την HL), λόγω μεταφοράς σε άλλες λιποπρωτεΐνες (HDL, LDL) μέσω της CETP, ή ακόμα και λόγω μετάπτωσης ολόκληρου του σωματίδιου VLDL σε άλλο λιποπρωτεϊνικό σωματίδιο (π.χ. IDL και LDL).

Εν κατακλείδι, στην παρούσα μελέτη θα υπολογιστούν οι ακόλουθες παράμετροι:

- Ο ρυθμός έκκρισης των VLDL-TAG από το ήπαρ
- Ο ρυθμός εκκαθάρισης των VLDL-TAG, που αντιπροσωπεύει τον ρυθμό με τον οποίο τα VLDL-TAG εκκαθαρίζονται από την κυκλοφορία
- Ο μέσος χρόνος παραμονής των VLDL-TAG στην κυκλοφορία του αίματος

4.15 Στατιστική επεξεργασία

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λογισμικού SPSS 19 (IBM SPSS, Chicago, IL). Αρχικά πραγματοποιήθηκε δοκιμασία κανονικότητας με τη δοκιμασία Kolmogorov-Smirnov για όλες τις μεταβλητές. Στη συνέχεια, ακολούθησε λογαρίθμηση για όσες μεταβλητές δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή. Τα αποτελέσματα για τις μεταβλητές που ακολουθούσαν την κανονική

κατανομή παρουσιάζονται ως μέσοι όροι $\pm$ τυπική απόκλιση ενώ για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν την κανονική κατανομή ως απολογαριθμησμένοι μέσοι με 95% διάστημα εμπιστοσύνης.

Για την αξιολόγηση των διαφορών μεταξύ των 3 παρεμβάσεων της ερευνητικής μελέτης, εκτιμήθηκαν γενικευμένα γραμμικά μοντέλα (Generalized estimating equations). Για όλες τις εξαρτημένες μεταβλητές, χρησιμοποιήθηκε η κανονική κατανομή για την εκτίμηση των γενικευμένων γραμμικών μοντέλων, με την ταυτοτική συνάρτηση ως συνάρτηση δεσμός. Για τον πίνακα συσχετίσεων δεν θεωρήθηκε καμία εκ των προτέρων δομή αφού ελέγχθηκαν διάφορες δομές με τη χρήση του QIC (Quasi likelihood under the Independence Criterion). Εφαρμόστηκε εκ των προτέρων ανάλυση (post-hoc analysis) για την σύγκριση των μέσω τιμών μεταξύ των παρεμβάσεων με χρήση του κριτηρίου Bonferroni για να ληφθεί υπόψη η αύξηση του σφάλματος τύπου Ι λόγω πολλαπλών συγκρίσεων.

5. Αποτελέσματα

5.1. Χαρακτηριστικά δείγματος

Το δείγμα της μελέτης αποτέλεσαν 10 υγιείς, νορμοβαρείς γυναίκες. Τα χαρακτηριστικά των εθελοντριών παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

	Μέσος Όρος	Τυπική απόκλιση
Ηλικία (έτη)	22.0	± 2.9
Σωματικό βάρος (kg)	58.9	± 6.9
Ύψος (m)	1.67	± 0.07
Δ.Μ.Σ. (kg/m ²)	21.2	± 1.3
Λιπώδης μάζα (%)	18.5	± 4.4
Άλιπη μάζα (kg)	38.0	± 3.7
Ποσοστό λίπους (%)	31.2	± 4.5
RMR (Kcal/24h)	1200	± 152

Πίνακας 2. Βασικά χαρακτηριστικά εθελοντριών (n=10).

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι $\pm$ SD.

Δ.Μ.Σ.: Δείκτης Μάζας Σώματος, RMR:μεταβολικός ρυθμός ηρεμίας (resting metabolic rate).

5.2 Χαρακτηριστικά ενεργειακής διαιτητικής πρόσληψης και περιεκτικότητας θρεπτικών συστατικών των πειραματικών διαιτολογίων.

Σε σχέση με τη δοκιμασία ελέγχου (ισοθερμιδική δίαιτα, μηδενικό ενεργειακό ισοζύγιο), οι εθελόντριες βρίσκονταν σε αρνητικό ενεργειακό ισοζύγιο (700kcal) κατά τη διάρκεια της υποθερμιδικής διαίτας και σε θετικό ενεργειακό ισοζύγιο (700kcal) κατά τη διάρκεια της υπερθερμιδικής διαίτας (πίνακας 3).

	Ισοθερμιδική Δίαιτα	Υποθερμιδική Δίαιτα	Υπερθερμιδική Δίαιτα
Ενεργειακή Πρόσληψη (kcal)	1600±300	900±250*†	2300±300*
Ενεργειακό Ισοζύγιο (MJ)	0	-2.89±0.42*†	2.91±0.32*
Υδατάνθρακες (g)	216±34	127±34*†	307±33*
Πρωτεΐνες (g)	80±18	47±15*†	100±35*
Λίπος (g)	52±18	31±15*†	73±18*

Πίνακας 3. Ενεργειακή πρόσληψη και περιεχόμενο μακροθρεπτικών συστατικών.

5.3 Επίδραση στο μεταβολικό προφίλ.

Οι συγκέντρωση γλυκόζης πλάσματος ήταν σημαντικά αυξημένη μετά από την υπερθερμιδική δίαιτα σε σχέση με την δοκιμασία ελέγχου ($P = 0.042$) ή σε σχέση με την υποθερμιδική δίαιτα ($P = 0.001$). Η ινσουλίνη ορού ήταν παρομοίως αυξημένη μετά την υπερθερμιδική δίαιτα σε σχέση με την υποθερμιδική ($P < 0.001$). Τα ολικά τριγλυκερίδια καθώς επίσης και η συγκέντρωση των VLDL-TG ήταν στατιστικά σημαντικά χαμηλότερη μετά την υποθερμιδική σε σχέση με την δοκιμασία ελέγχου και την υπερθερμιδική, αλλά δεν βρέθηκε καμία διαφορά ανάμεσα στην υποθερμιδική και υπερθερμιδική δοκιμασία ($P = 0.001$)(πίνακας 4).

	Ισοθερμιδική Δίαιτα	Υποθερμιδική Δίαιτα	Υπερθερμιδική Δίαιτα
Γλυκόζη ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.32±0.16	5.29±0.32†	5.50±0.28*
Ινσουλίνη ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	5.40 (4.19, 6.95)	4.41 (3.03, 6.42) †	6.27 (4.67, 8.40)
Δείκτης HOMA- IR	1.28 (0.98, 1.67)	1.03 (0.69, 1.54) †	1.53 (1.11, 2.10)
Ολικά TG($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.73±0.18	0.63±0.19*†	0.73±0.27
VLDL-TG($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.35±0.13	0.26±0.14*†	0.39±0.22

Πίνακας 4. Επίδραση των παρεμβάσεων δίαιτας στο βασικό μεταβολικό προφίλ.

Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι ±SD. *Στατιστικά σημαντικά διαφορετική από την ισοθερμιδική δίαιτα, $P<0.05$. † Στατιστικά σημαντικά διαφορετική από την υπερθερμιδική δίαιτα, $P<0.05$.

5.4 Κινητική των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο.

Ο ρυθμός καταβολισμού των VLDL-TG αυξήθηκε μετά την υποθερμιδική δίαιτα σε σχέση με την δοκιμασία ελέγχου ($0.69 \pm 0.14 \text{ pools} \cdot \text{h}^{-1}$, $P=0.014$) αλλά δεν παρουσίασε καμία αλλαγή μετά την υπερθερμιδική δίαιτα ($0.58 \pm 0.17 \text{ pools} \cdot \text{h}^{-1}$, $P=1.000$).

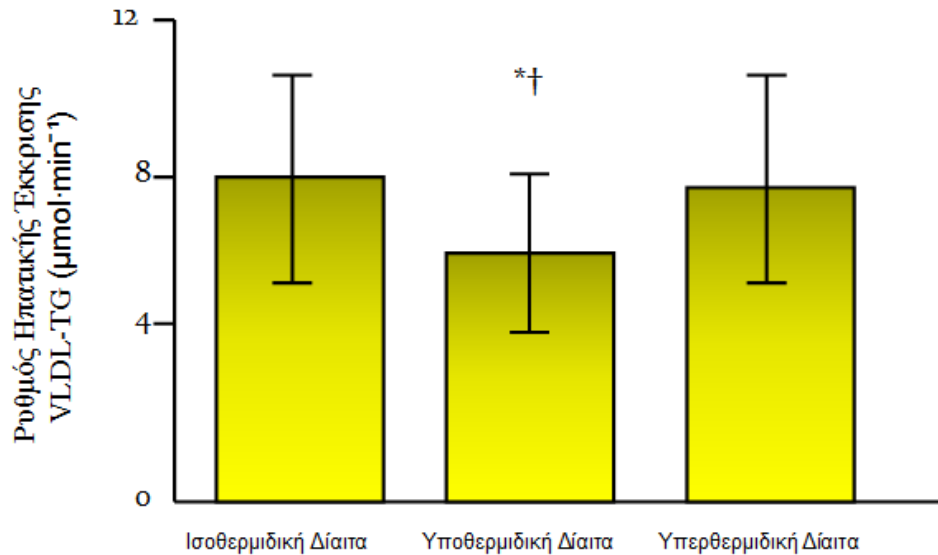
	Ισοθερμιδική Δίαιτα	Υποθερμιδική Δίαιτα	Υπερθερμιδική Δίαιτα
VLDL-TG FCR (pools/h)	0.61±0.08	0.69±0.14	0.58±0.17
Έκκριση VLDL-TG ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	7.7±2.4	6±2.1*†	7.4±3.2
Εκκαθάριση VLDL-TG (ml/min)	22.6±4.1	25.4±5.7*†	21.6±7.5
VLDL-TG MRT (min)	99.8±13.2	90.7±20.6*†	112±34.2

Πίνακας 5. Επίδραση των παρεμβάσεων στην κινητική των VLDL-TG.

FCR: κλασματικός καταβολικός ρυθμός (fractional catabolic rate), MRT: μέσος χρόνος παραμονής στο κλάσμα (mean residence time). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι ± SEM.

* Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την ισοθερμιδική δίαιτα. †Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την υπερθερμιδική δίαιτα.

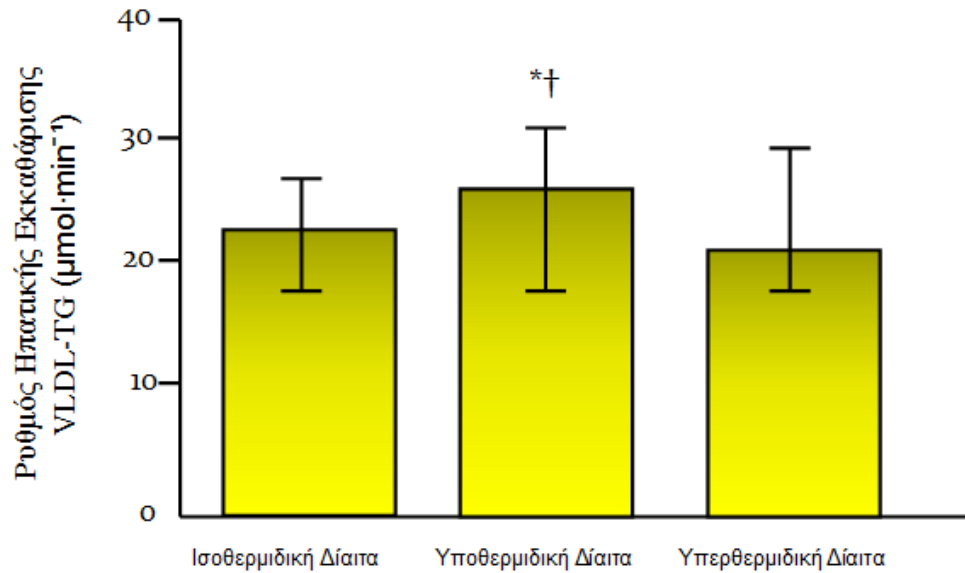
Σε σχέση με τη δοκιμασία ελέγχου ο ρυθμός έκκρισης των ηπατικών VLDL-TG ήταν μειωμένος κατά ~21% μετά την υποθερμιδική διαίτα ($P=0.023$) αλλά δεν σημείωσε καμία αξιόλογη μεταβολή μετά την υπερθερμιδική διαίτα ($P=1.000$)(εικόνα2).



Εικόνα 2. Ο ρυθμός ηπατικής έκκρισης των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο μετά από κατανάλωση ισοθερμιδικής διαίτας, υποθερμιδικής διαίτας (~3MJ) και υπερθερμιδικής διαίτας(~3MJ). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι ± SEM.

- Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την ισοθερμιδική διαίτα, $P=0.023$.
†Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την υπερθερμιδική διαίτα, $P=0.036$.

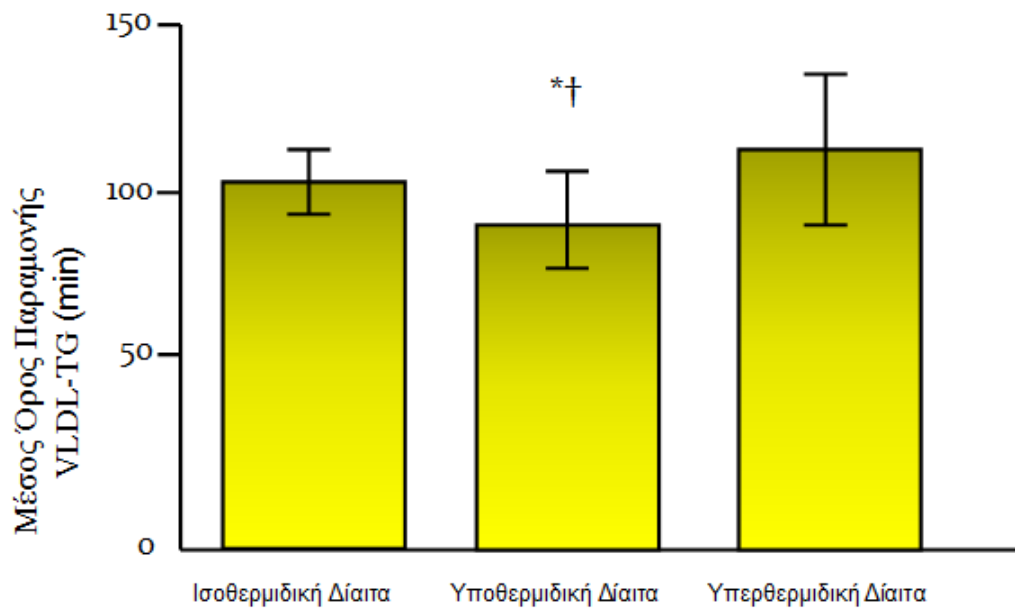
Αντιθέτως, ο ρυθμός εκκαθάρισης των VLDL-TG πλάσματος ήταν αυξημένος κατά ~12% μετά την κατανάλωση υποθερμιδικής διαίτας ($P=0.016$) αλλά δεν άλλαξε μετά την κατανάλωση υπερθερμιδικής διαίτας ($P=1.000$)(εικόνα 3).



Εικόνα 3. Ο ρυθμός ηπατικής εκκαθάρισης των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο μετά από κατανάλωση ισοθερμιδικής διαίτας, υποθερμιδικής διαίτας (~3MJ) και υπερθερμιδικής διαίτας(~3MJ). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι ± SEM.

* Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την ισοθερμιδική διαίτα, $P=0.016$. †Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την υπερθερμιδική διαίτα, $P<0.001$.

Παρομοίως, ο μέσος χρόνος παραμονής (MRT) των VLDL-TG στην κυκλοφορία μειώθηκε μετά την κατανάλωση υποθερμιδικής διαίτας ($P=0.044$) αλλά δεν άλλαξε μετά την κατανάλωση υπερθερμιδικής διαίτας ($P=0.850$)(εικόνα 4) σε σχέση με τη δοκιμασία ελέγχου.



Εικόνα 4. Ο μέσος χρόνος παραμονής των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο μετά από κατανάλωση ισοθερμιδικής διαίτας, υποθερμιδικής διαίτας (~3MJ) και υπερθερμιδικής διαίτας(~3MJ). Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι $\pm$ SEM.

* Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την ισοθερμιδική διαίτα, $P=0.044$. †Στατιστικά σημαντικά διαφορετικό σε σχέση με την υπερθερμιδική διαίτα, $P<0.001$.

6. Συζήτηση

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η επίδραση του βραχυχρόνιου (μιας ημέρας) ενεργειακού ελλείμματος (700kcal) μετά την κατανάλωση υποθερμιδικής διαίτας και η επίδραση του βραχυχρόνιου ενεργειακού πλεονάσματος μετά την κατανάλωση υπερθερμιδικής διαίτας (700kcal) στην κινητική των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο, σε νέες, υγιείς μη φυσικά δραστήριες γυναίκες.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι μία ημέρα ενεργειακού ελλείμματος (700kcal) μειώνει τη συγκέντρωση των VLDL-TG κατά ~26%, που οφείλεται σε 21% μείωση του ρυθμού έκκρισης των VLDL-TG και κατά 12% αύξηση του ρυθμού εκκαθάρισης. Αντιθέτως, μια ημέρα ενεργειακού πλεονάσματος δεν επέφερε καμία αλλαγή στη συγκέντρωση καθώς επίσης και στην κινητική των VLDL-TG αλλά αύξησε τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο μεταπορροφητικό στάδιο. Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης υποδεικνύουν ότι η υποτριγλυκεριδαιμία στις γυναίκες, η οποία είναι αποτέλεσμα μιας ημέρας ενεργειακού ελλείμματος, εκδηλώνεται μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού (μειωμένη έκκριση & αυξημένη εκκαθάριση των VLDL-TG) από εκείνου που έχει βρεθεί ότι εκδηλώνεται μετά από μακροχρόνιο ενεργειακό έλλειμμα που οδηγεί σε απώλεια βάρους (μειωμένη έκκριση των VLDL-TG χωρίς καμία αλλαγή στον ρυθμό εκκαθάρισης των VLDL-TG)[51, 118]. Ως εκ τούτου, ο μηχανισμός ο οποίος ευθύνεται για τη μειωμένη συγκέντρωση VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο, μετά από ενεργειακό έλλειμμα προκαλούμενο από δίαιτα, είναι ο ίδιος με τον μηχανισμό που ευθύνεται για τη μειωμένη συγκέντρωση VLDL-TG στις γυναίκες μετά από άσκηση[106], με τη μόνη διαφορά ότι απαιτείται μεγαλύτερο ενεργειακό έλλειμμα προκαλούμενο από δίαιτα για να εκδηλωθεί το ίδιο αποτέλεσμα.

Σε αντίθεση με το ενεργειακό έλλειμμα, τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης έδειξαν ότι μίας ημέρας ενεργειακό πλεόνασμα που προκλήθηκε από αυξημένη θερμιδική πρόσληψη κατά 700kcal δεν επιδρά στο μεταβολισμό και την κινητική των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο. Είναι η πρώτη φορά που μελετάται η κινητική των VLDL-TG μετά την κατανάλωση μίας ημέρας μικτής υπερθερμιδικής διαίτας. Οι περισσότερες μελέτες που εξέτασαν την κινητική των VLDL-TG στο

μεταπορροφητικό στάδιο αφορούσαν είτε κατανάλωση υπερθερμιδικού διαιτολογίου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (4-6 ημέρες, με ήπια αύξηση βάρους) σε σχέση με την παρούσα μελέτη (1 ημέρα), είτε αφορούσαν την κατανάλωση ενός συγκεκριμένου μακροθρεπτικού συστατικού (υδατάνθρακες ή λίπος)[91, 93, 95-97, 105, 119].

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτών των μελετών, η υπέρμετρη αύξηση της πρόσληψης λίπους στη διατροφή οδηγεί σε μειωμένη συγκέντρωση των VLDL-TG[95, 97, 119] ενώ αντιθέτως, η αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων οδηγεί σε αυξημένη συγκέντρωση των VLDL-TG[91, 97, 105]. Ωστόσο, η αυξημένη πρόσληψη υδατανθράκων και λιπών στα πλαίσια μικτής δίαιτας δεν φαίνεται να έχει επίδραση στην κινητική των VLDL-TG[94, 97]. Αυτά τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης η οποία έδειξε ότι η αυξημένη θερμιδική πρόσληψη μικτής δίαιτας, για μια ημέρα, δεν επιφέρει κανένα αποτέλεσμα στην κινητική των VLDL-TG στο μεταπορροφητικό στάδιο.

Επιπλέον, ένα από τα ευρήματα της παρούσας μελέτης, που έρχεται σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα άλλων μελετών[95, 105], ήταν ότι αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη σχετίζεται με αλλαγές στο μεταβολισμό της γλυκόζης που είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης στο μεταπορροφητικό στάδιο.

7. Συμπέρασμα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί το βραχυχρόνιο (μιας ημέρας) ενεργειακό έλλειμμα (700kcal) το οποίο προκλήθηκε από μείωση της ενεργειακής πρόσληψης (δίαιτα) καθώς επίσης και το βραχυχρόνιο (μιας ημέρας) ενεργειακό πλεόνασμα (700kcal) το οποίο προκλήθηκε από αυξημένη ενεργειακή κατανάλωση.

Βρέθηκε ότι βραχυχρόνιο ενεργειακό έλλειμμα προκαλούμενο από μειωμένη ενεργειακή πρόσληψη και των τριών μακροθρεπτικών συστατικών (υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες) μειώνει τις συγκεντρώσεις VLDL-TG στις γυναίκες μέσω της αυξημένης εκκαθάρισης των VLDL-TG από την κυκλοφορία και της μειωμένης έκκρισης από το ήπαρ. Αντιθέτως, το βραχυχρόνιο ενεργειακό πλεόνασμα που προκλήθηκε από αυξημένη ενεργειακή κατανάλωση δεν παρουσίασε αλλαγές στην κινητική και συγκέντρωση των VLDL-TG.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Massaro, M., et al., *Basic mechanisms behind the effects of n-3 fatty acids on cardiovascular disease*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2008. **79**(3-5): p. 109-15.
2. Chimonas, E.T., *The treatment of coronary heart disease: an update. Part 2: Mortality trends and main causes of death in the Greek population*. Curr Med Res Opin, 2001. **17**(1): p. 27-33.
3. Gill, J.M. and A.E. Hardman, *Postprandial lipemia: effects of exercise and restriction of energy intake compared*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(2): p. 465-71.
4. Kalin, M.F. and B. Zumoff, *Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies*. Steroids, 1990. **55**(8): p. 330-52.
5. Pilote, L., et al., *A comprehensive view of sex-specific issues related to cardiovascular disease*. CMAJ, 2007. **176**(6): p. S1-44.
6. Kannel, W.B., *The Framingham Study: historical insight on the impact of cardiovascular risk factors in men versus women*. J Gend Specif Med, 2002. **5**(2): p. 27-37.
7. Kannel, W.B., et al., *Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study*. Ann Intern Med, 1976. **85**(4): p. 447-52.
8. Tziomalos, K., et al., *Triglycerides and vascular risk: insights from epidemiological data and interventional studies*. Curr Drug Targets, 2009. **10**(4): p. 320-7.
9. Alipour, A., et al., *Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis*. Atheroscler Suppl, 2008. **9**(2): p. 39-44.
10. Gofman, J.W., et al., *Lipoproteins, coronary heart disease, and atherosclerosis*. Physiol Rev, 1954. **34**(3): p. 589-607.
11. Castelli, W.P., *The new pathophysiology of coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1998. **82**(10B): p. 60T-65T.
12. Assmann, G., H. Schulte, and A. von Eckardstein, *Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men*. Am J Cardiol, 1996. **77**(14): p. 1179-84.
13. Austin, M.A., *Epidemiology of hypertriglyceridemia and cardiovascular disease*. Am J Cardiol, 1999. **83**(9B): p. 13F-16F.
14. Gibbons, G.F., K. Islam, and R.J. Pease, *Mobilisation of triacylglycerol stores*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1483**(1): p. 37-57.
15. Ginsberg, H.N., et al., *Effect of a high carbohydrate diet on apoprotein-B catabolism in man*. Metabolism, 1981. **30**(4): p. 347-53.
16. Hassing, H.C., et al., *Pathophysiology of hypertriglyceridemia*. Biochim Biophys Acta. **1821**(5): p. 826-32.
17. Magkos, F. and B. Mittendorfer, *Stable isotope-labeled tracers for the investigation of fatty acid and triglyceride metabolism in humans in vivo*. Clin Lipidol, 2009. **4**(2): p. 215-230.
18. Lewis, G.F., *Fatty acid regulation of very low density lipoprotein production*. Curr Opin Lipidol, 1997. **8**(3): p. 146-53.
19. Mason, T.M., *The role of factors that regulate the synthesis and secretion of very-low-density lipoprotein by hepatocytes*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1998. **35**(6): p. 461-87.

20. Lavoie, J.M. and M.S. Gauthier, *Regulation of fat metabolism in the liver: link to non-alcoholic hepatic steatosis and impact of physical exercise*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(12): p. 1393-409.
21. Gruffat, D., et al., *Regulation of VLDL synthesis and secretion in the liver*. Reprod Nutr Dev, 1996. **36**(4): p. 375-89.
22. Magkos, F., *Basal very low-density lipoprotein metabolism in response to exercise: mechanisms of hypotriacylglycerolemia*. Prog Lipid Res, 2009. **48**(3-4): p. 171-90.
23. Taskinen, M.R. and E.A. Nikkila, *Effects of caloric restriction on lipid metabolism in man: changes of tissue lipoprotein lipase activities and of serum lipoproteins*. Atherosclerosis, 1979. **32**(3): p. 289-99.
24. Quig, D.W., et al., *The influence of starvation and refeeding on the lipoprotein lipase activity of skeletal muscle and adipose tissue of lean and obese Zucker rats*. J Nutr, 1983. **113**(6): p. 1150-6.
25. Ginsberg, H.N., Y.L. Zhang, and A. Hernandez-Ono, *Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes*. Arch Med Res, 2005. **36**(3): p. 232-40.
26. Ferguson, E.E., Jr., *Preventing, stopping, or reversing coronary artery disease--triglyceride-rich lipoproteins and associated lipoprotein and metabolic abnormalities: the need for recognition and treatment*. Dis Mon, 2000. **46**(7): p. 421-503.
27. Gibbons, G.F., et al., *Synthesis and function of hepatic very-low-density lipoprotein*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 1): p. 59-64.
28. Mittendorfer, B., et al., *VLDL-triglyceride kinetics during hyperglycemia-hyperinsulinemia: effects of sex and obesity*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2003. **284**(4): p. E708-15.
29. Patterson, B.W., et al., *Use of stable isotopically labeled tracers to measure very low density lipoprotein-triglyceride turnover*. J Lipid Res, 2002. **43**(2): p. 223-33.
30. Magkos, F. and L.S. Sidossis, *Measuring very low density lipoprotein-triglyceride kinetics in man in vivo: how different the various methods really are*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2004. **7**(5): p. 547-55.
31. Mittendorfer, B., J.F. Horowitz, and S. Klein, *Gender differences in lipid and glucose kinetics during short-term fasting*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(6): p. E1333-9.
32. Mittendorfer, B., B.W. Patterson, and S. Klein, *Effect of sex and obesity on basal VLDL-triacylglycerol kinetics*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(3): p. 573-9.
33. Schwarz, J.M., et al., *Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(1): p. 43-50.
34. Assmann, G., et al., *The emergence of triglycerides as a significant independent risk factor in coronary artery disease*. Eur Heart J, 1998. **19 Suppl M**: p. M8-14.
35. Gotto, A.M., Jr., *Triglyceride as a risk factor for coronary artery disease*. Am J Cardiol, 1998. **82**(9A): p. 22Q-25Q.
36. Patel, A., et al., *Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region*. Circulation, 2004. **110**(17): p. 2678-86.
37. Austin, M.A., J.E. Hokanson, and K.L. Edwards, *Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor*. Am J Cardiol, 1998. **81**(4A): p. 7B-12B.

38. Miller, M., et al., *Triglycerides and cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association*. *Circulation*. **123**(20): p. 2292-333.
39. Farquhar, J.W., et al., *Glucose, insulin, and triglyceride responses to high and low carbohydrate diets in man*. *J Clin Invest*, 1966. **45**(10): p. 1648-56.
40. Reaven, G.M., et al., *Kinetics of triglyceride turnover of very low density lipoproteins of human plasma*. *J Clin Invest*, 1965. **44**(11): p. 1826-33.
41. Reaven, G.M., et al., *Role of insulin in endogenous hypertriglyceridemia*. *J Clin Invest*, 1967. **46**(11): p. 1756-67.
42. Boberg, J., *Quantitative determination of heparin released lipoprotein lipase activity in human plasma*. *Lipids*, 1970. **5**(5): p. 452-6.
43. Boberg, J., L.A. Carlson, and U. Freyschuss, *Determination of splanchnic secretion rate of plasma triglycerides and of total and splanchnic turnover of plasma free fatty acids in man*. *Eur J Clin Invest*, 1972. **2**(3): p. 123-32.
44. Boberg, J., et al., *Splanchnic secretion rates of plasma triglycerides and total and splanchnic turnover of plasma free fatty acids in men with normo- and hypertriglyceridaemia*. *Eur J Clin Invest*, 1972. **2**(6): p. 454-66.
45. Havel, R.J., et al., *Splanchnic metabolism of free fatty acids and production of triglycerides of very low density lipoproteins in normotriglyceridemic and hypertriglyceridemic humans*. *J Clin Invest*, 1970. **49**(11): p. 2017-35.
46. Nikkila, E.A., *Control of plasma and liver triglyceride kinetics by carbohydrate metabolism and insulin*. *Adv Lipid Res*, 1969. **7**: p. 63-134.
47. Nikkila, E.A. and M. Kekki, *Measurement of plasma triglyceride turnover in the study of hyperglyceridemia*. *Scand J Clin Lab Invest*, 1971. **27**(2): p. 97-104.
48. Nikkila, E.A. and M. Kekki, *Plasma endogenous triglyceride transport in hypertriglyceridaemia and effect of a hypolipidaemic drug (SU-13437)*. *Eur J Clin Invest*, 1972. **2**(4): p. 231-8.
49. Alawadhi, M., et al., *Genetic lipoprotein disorders and coronary atherosclerosis*. *Curr Atheroscler Rep*, 2005. **7**(3): p. 196-203.
50. Lefevre, M., et al., *Caloric restriction alone and with exercise improves CVD risk in healthy non-obese individuals*. *Atherosclerosis*, 2009. **203**(1): p. 206-13.
51. Mittendorfer, B., B.W. Patterson, and S. Klein, *Effect of weight loss on VLDL-triglyceride and apoB-100 kinetics in women with abdominal obesity*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003. **284**(3): p. E549-56.
52. Wadden, T.A., D.A. Anderson, and G.D. Foster, *Two-year changes in lipids and lipoproteins associated with the maintenance of a 5% to 10% reduction in initial weight: some findings and some questions*. *Obes Res*, 1999. **7**(2): p. 170-8.
53. Anderson, J.W., C.W. Kendall, and D.J. Jenkins, *Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies*. *J Am Coll Nutr*, 2003. **22**(5): p. 331-9.
54. Poobalan, A., et al., *Effects of weight loss in overweight/obese individuals and long-term lipid outcomes--a systematic review*. *Obes Rev*, 2004. **5**(1): p. 43-50.
55. Dattilo, A.M. and P.M. Kris-Etherton, *Effects of weight reduction on blood lipids and lipoproteins: a meta-analysis*. *Am J Clin Nutr*, 1992. **56**(2): p. 320-8.

56. Kelley, D.E., et al., *Relative effects of calorie restriction and weight loss in noninsulin-dependent diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(5): p. 1287-93.
57. Retzlaff, B.M., et al., *Changes in plasma triacylglycerol concentrations among free-living hyperlipidemic men adopting different carbohydrate intakes over 2 y: the Dietary Alternatives Study*. Am J Clin Nutr, 1995. **62**(5): p. 988-95.
58. Sharman, M.J., et al., *Very low-carbohydrate and low-fat diets affect fasting lipids and postprandial lipemia differently in overweight men*. J Nutr, 2004. **134**(4): p. 880-5.
59. Volek, J., et al., *Comparison of energy-restricted very low-carbohydrate and low-fat diets on weight loss and body composition in overweight men and women*. Nutr Metab (Lond), 2004. **1**(1): p. 13.
60. Blackburn, G., *Effect of degree of weight loss on health benefits*. Obes Res, 1995. **3 Suppl 2**: p. 211s-216s.
61. Parks, E.J., et al., *Effects of a low-fat, high-carbohydrate diet on VLDL-triglyceride assembly, production, and clearance*. J Clin Invest, 1999. **104**(8): p. 1087-96.
62. Goodpaster, B.H., et al., *Effects of weight loss on regional fat distribution and insulin sensitivity in obesity*. Diabetes, 1999. **48**(4): p. 839-47.
63. Klein, S., et al., *Effect of weight loss on whole body and cellular lipid metabolism in severely obese humans*. Am J Physiol, 1996. **270**(5 Pt 1): p. E739-45.
64. Reynisdottir, S., et al., *Effects of weight reduction on the regulation of lipolysis in adipocytes of women with upper-body obesity*. Clin Sci (Lond), 1995. **89**(4): p. 421-9.
65. Mauriege, P., et al., *Regional and gender variations in adipose tissue lipolysis in response to weight loss*. J Lipid Res, 1999. **40**(9): p. 1559-71.
66. Ross, R., et al., *Reduction in obesity and related comorbid conditions after diet-induced weight loss or exercise-induced weight loss in men. A randomized, controlled trial*. Ann Intern Med, 2000. **133**(2): p. 92-103.
67. Annuzzi, G., et al., *Increased removal rate of exogenous triglycerides after prolonged exercise in man: time course and effect of exercise duration*. Metabolism, 1987. **36**(5): p. 438-43.
68. Tsetsonis, N.V., A.E. Hardman, and S.S. Mastana, *Acute effects of exercise on postprandial lipemia: a comparative study in trained and untrained middle-aged women*. Am J Clin Nutr, 1997. **65**(2): p. 525-33.
69. Cullinane, E., et al., *Acute decrease in serum triglycerides with exercise: is there a threshold for an exercise effect?* Metabolism, 1982. **31**(8): p. 844-7.
70. Tsetsonis, N.V. and A.E. Hardman, *Effects of low and moderate intensity treadmill walking on postprandial lipaemia in healthy young adults*. Eur J Appl Physiol Occup Physiol, 1996. **73**(5): p. 419-26.
71. Tsetsonis, N.V. and A.E. Hardman, *Reduction in postprandial lipemia after walking: influence of exercise intensity*. Med Sci Sports Exerc, 1996. **28**(10): p. 1235-42.
72. Gill, J.M., et al., *Effects of a brisk walk on lipoprotein lipase activity and plasma triglyceride concentrations in the fasted and postprandial states*. Eur J Appl Physiol, 2003. **89**(2): p. 184-90.

73. James, A.P., K. Slivkoff-Clark, and J.C. Mamo, *Prior exercise does not affect chylomicron particle number following a mixed meal of moderate fat content*. *Lipids Health Dis*, 2007. **6**: p. 8.
74. Gill, J.M., et al., *Effects of prior moderate exercise on exogenous and endogenous lipid metabolism and plasma factor VII activity*. *Clin Sci (Lond)*, 2001. **100**(5): p. 517-27.
75. Malkova, D., et al., *Prior exercise and postprandial substrate extraction across the human leg*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2000. **279**(5): p. E1020-8.
76. Gill, J.M., S.L. Herd, and A.E. Hardman, *Moderate exercise and post-prandial metabolism: issues of dose-response*. *J Sports Sci*, 2002. **20**(12): p. 961-7.
77. Barrett, L.A., et al., *Effects of intermittent games activity on postprandial lipemia in young adults*. *Med Sci Sports Exerc*, 2006. **38**(7): p. 1282-7.
78. Petitt, D.S. and K.J. Cureton, *Effects of prior exercise on postprandial lipemia: a quantitative review*. *Metabolism*, 2003. **52**(4): p. 418-24.
79. Altena, T.S., et al., *Single sessions of intermittent and continuous exercise and postprandial lipemia*. *Med Sci Sports Exerc*, 2004. **36**(8): p. 1364-71.
80. Pronk, N.P., et al., *Acute effects of walking on serum lipids and lipoproteins in women*. *J Sports Med Phys Fitness*, 1995. **35**(1): p. 50-8.
81. Angelopoulos, T.J. and R.J. Robertson, *Effect of a single exercise bout on serum triglycerides in untrained men*. *J Sports Med Phys Fitness*, 1993. **33**(3): p. 264-7.
82. Maraki, M., et al., *One day of moderate energy deficit reduces fasting and postprandial triacylglycerolemia in women: the role of calorie restriction and exercise*. *Clin Nutr*. **29**(4): p. 459-63.
83. Yamada, T., et al., *Remnant lipoprotein metabolism is improved more when body weight is reduced by exercise than by dietary restriction*. *Clin Chim Acta*, 2008. **388**(1-2): p. 28-32.
84. Tsekouras, Y.E., et al., *A single bout of whole-body resistance exercise augments basal VLDL-triacylglycerol removal from plasma in healthy untrained men*. *Clin Sci (Lond)*, 2009. **116**(2): p. 147-56.
85. Magkos, F., et al., *Lipid metabolism response to a single, prolonged bout of endurance exercise in healthy young men*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006. **290**(2): p. E355-62.
86. Tsekouras, Y.E., et al., *A single bout of brisk walking increases basal very low-density lipoprotein triacylglycerol clearance in young men*. *Metabolism*, 2007. **56**(8): p. 1037-43.
87. Petitt, D.S., S.A. Arngrimsson, and K.J. Cureton, *Effect of resistance exercise on postprandial lipemia*. *J Appl Physiol*, 2003. **94**(2): p. 694-700.
88. Singhal, A., et al., *Effect of intensity of resistance exercise on postprandial lipemia*. *J Appl Physiol*, 2009. **106**(3): p. 823-9.
89. Burns, S.F., et al., *A single session of resistance exercise does not reduce postprandial lipaemia*. *J Sports Sci*, 2005. **23**(3): p. 251-60.
90. Zafeiridis, A., et al., *Effects of low- and high-volume resistance exercise on postprandial lipaemia*. *Br J Nutr*, 2007. **97**(3): p. 471-7.
91. Minehira, K., et al., *Effect of carbohydrate overfeeding on whole body and adipose tissue metabolism in humans*. *Obes Res*, 2003. **11**(9): p. 1096-103.
92. Mittendorfer, B. and L.S. Sidossis, *Mechanism for the increase in plasma triacylglycerol concentrations after consumption of short-term, high-carbohydrate diets*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **73**(5): p. 892-9.

93. Ngo Sock, E.T., et al., *Effects of a short-term overfeeding with fructose or glucose in healthy young males*. Br J Nutr. **103**(7): p. 939-43.
94. McDevitt, R.M., et al., *De novo lipogenesis during controlled overfeeding with sucrose or glucose in lean and obese women*. Am J Clin Nutr, 2001. **74**(6): p. 737-46.
95. Brons, C., et al., *Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men*. J Physiol, 2009. **587**(Pt 10): p. 2387-97.
96. Hill, J.O., et al., *Changes in blood lipids during six days of overfeeding with medium or long chain triglycerides*. J Lipid Res, 1990. **31**(3): p. 407-16.
97. Sobrecases, H., et al., *Effects of short-term overfeeding with fructose, fat and fructose plus fat on plasma and hepatic lipids in healthy men*. Diabetes Metab. **36**(3): p. 244-6.
98. Abdel-Sayed, A., et al., *A high-fructose diet impairs basal and stress-mediated lipid metabolism in healthy male subjects*. Br J Nutr, 2008. **100**(2): p. 393-9.
99. Roglans, N., et al., *Impairment of hepatic Stat-3 activation and reduction of PPARalpha activity in fructose-fed rats*. Hepatology, 2007. **45**(3): p. 778-88.
100. Erkkila, A., et al., *Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach*. Prog Lipid Res, 2008. **47**(3): p. 172-87.
101. Katan, M.B., *Fish and heart disease*. N Engl J Med, 1995. **332**(15): p. 1024-5.
102. Harris, W.S. and W.E. Connor, *The effects of salmon oil upon plasma lipids, lipoproteins, and triglyceride clearance*. Trans Assoc Am Physicians, 1980. **93**: p. 148-55.
103. Harris, W.S., et al., *Effects of fish oil on VLDL triglyceride kinetics in humans*. J Lipid Res, 1990. **31**(9): p. 1549-58.
104. von Schacky, C., et al., *The effect of dietary omega-3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ann Intern Med, 1999. **130**(7): p. 554-62.
105. Faeh, D., et al., *Effect of fructose overfeeding and fish oil administration on hepatic de novo lipogenesis and insulin sensitivity in healthy men*. Diabetes, 2005. **54**(7): p. 1907-13.
106. Bellou, E., et al., *Acute Effects of Exercise and Calorie Restriction on Triglyceride Metabolism in Women*. Med Sci Sports Exerc.
107. Peronnet, F. and D. Massicotte, *Table of nonprotein respiratory quotient: an update*. Can J Sport Sci, 1991. **16**(1): p. 23-9.
108. Weir, J.B., *New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism*. 1949. Nutrition, 1990. **6**(3): p. 213-21.
109. Taylor, H.L., E. Buskirk, and A. Henschel, *Maximal oxygen intake as an objective measure of cardio-respiratory performance*. J Appl Physiol, 1955. **8**(1): p. 73-80.
110. Kohl, H.W., et al., *An empirical evaluation of the ACSM guidelines for exercise testing*. Med Sci Sports Exerc, 1990. **22**(4): p. 533-9.
111. Magkos, F., B.W. Patterson, and B. Mittendorfer, *No effect of menstrual cycle phase on basal very-low-density lipoprotein triglyceride and apolipoprotein B-100 kinetics*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. **291**(6): p. E1243-9.
112. Lin, P.H., et al., *Estimation of energy requirements in a controlled feeding trial*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(3): p. 639-45.
113. Klotzsch, S.G. and J.R. McNamara, *Triglyceride measurements: a review of methods and interferences*. Clin Chem, 1990. **36**(9): p. 1605-13.

114. Matthews, D.R., et al., *Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man*. Diabetologia, 1985. **28**(7): p. 412-9.
115. Lemieux, S., et al., *A stable isotope method using a [(2)H(5)]glycerol bolus to measure very low density lipoprotein triglyceride kinetics in humans*. J Lipid Res, 1999. **40**(11): p. 2111-7.
116. Reichl, D., *Lipoproteins of human peripheral lymph*. Eur Heart J, 1990. **11 Suppl E**: p. 230-6.
117. Havel, R.J., *Role of triglyceride-rich lipoproteins in progression of atherosclerosis*. Circulation, 1990. **81**(2): p. 694-6.
118. Ginsberg, H.N., N.A. Le, and J.C. Gibson, *Regulation of the production and catabolism of plasma low density lipoproteins in hypertriglyceridemic subjects. Effect of weight loss*. J Clin Invest, 1985. **75**(2): p. 614-23.
119. Bortolotti, M., et al., *High protein intake reduces intrahepatocellular lipid deposition in humans*. Am J Clin Nutr, 2009. **90**(4): p. 1002-10.