

Il modello del siero postprandiale, un “tool” trascurato per le sperimentazioni in vitro di nutrienti

Francesco Piacenza, Marco Malavolta, Laura Costarelli, Robertina Giacconi, Andrea Basso, Eugenio Mocchegiani

Polo Scientifico e Tecnologico INRCA, Centro Traslazionale Nutrizione e Invecchiamento, Ancona

«THE POSTPRANDIAL SERUM: A NEGLECTED “TOOL” FOR NUTRITIONAL STUDIES»

Summary. Studies “in vitro” designed to highlight the properties and mechanisms of action of macro- and micronutrients in cellular models are particularly important to achieve knowledge in relatively short time and with reduced costs compared to studies “in vivo”. However, the real exposure of our cells during supplementation with micronutrients may be far beyond the doses and the forms of the micronutrients used in the experiments “in vitro”. To overcome this problem, “in vitro” treatments of cell lines using serum obtained from subjects under particular dietary interventions (i.e. caloric restriction) was attempted with success. However, large part of our life occur in the post-prandial status and the postprandial serum is enriched of the various components of the diet transformed by multitude physiological processes. Hence, in this brief review we will examine the potential and will propose as tool for nutritional studies a cellular models based on treatments with the post prandial serum in order to study the effects of particular dietary intervention or supplementation with micronutrients.

Key words: Postprandial serum, micronutrient, translational

Riassunto. Gli studi “in vitro” finalizzati a evidenziare le proprietà benefiche e i meccanismi di azione di macro- e micronutrienti essenziali su modelli cellulari sono particolarmente importanti per avere indicazioni rapide e con costi contenuti. Tuttavia, gli studi “in vitro” sono limitati dal fatto che non possono tenere conto di eventuali effetti sistemici che possono influenzare l’effetto finale sull’organismo. Per ovviare a questo problema è stato talvolta utilizzato il siero di soggetti sottoposti a particolari regimi dietetici (i.e. restrizione calorica) per trattare linee cellulari in coltura e studiarne la risposta allo stress o altri effetti di interesse per la salute. Gran parte della nostra vita avviene però nello stato postprandiale, il cui siero risulta altresì arricchito dei vari componenti provenienti dalla dieta dopo le trasformazioni cui li sottopone il nostro organismo. In questa breve review si vogliono esaminare le potenzialità e proporre quale strumento di studio un modello cellulare basato sul trattamento con siero postprandiale per studiare meccanismi ed effetti di particolari regimi dietetici o di supplementazioni con micronutrienti.

Parole chiave: Siero postprandiale, micronutriente, traslazionale

Introduzione

Uno dei principali obiettivi della ricerca biomedica è quello di ovviare alle più gravi ed incombenti patologie che affliggono l’intera popolazione mondiale. Generalmente, due generi di approcci possono essere presi in

considerazione per raggiungere questo obiettivo: uno è focalizzato alla realizzazione di terapie sempre più efficaci; l’altro invece, ha come finalità la tutela della salute.

Una consistente quantità di studi multidisciplinari ha messo in luce come sia possibile prevenire l’insorgenza

di varie patologie agendo su fattori ambientali come la nutrizione, l'alimentazione e lo stile di vita (1). Per ciò che riguarda la nutrizione, numerosi studi hanno focalizzato la loro attenzione sulla capacità di particolari regimi dietetici (i.e. dieta mediterranea e restrizione calorica), di supplementazioni con micronutrienti (i.e. vitamine, oligoelementi) e di alimenti funzionali (i.e. probiotici) di prevenire l'insorgenza di varie patologie associate all'invecchiamento incluse le malattie cardiovascolari, il cancro e il diabete di tipo II (2-4). Tuttavia, quando l'incidenza delle patologie età-associate viene utilizzata come end-point, le tempistiche e i costi richiesti per eseguire lunghi studi di follow-up sull'uomo pongono un serio limite a tali studi (5). Per questo motivo, oltre all'utilizzo dei modelli animali, spesso si preferisce ricorrere all'utilizzo di biomarcatori surrogati quali end-point sull'uomo (i.e. livelli di colesterolo o colesterolo LDL in studi mirati ad abbassare il rischio di patologie cardiovascolari) (6) e parallelamente si ricorre a studi "in vitro" per chiarire i meccanismi d'azione alla base dei potenziali effetti sulla salute.

Il problema della sperimentazione "in vitro"

Dato il crescente impatto, mediatico e commerciale, di regimi dietetici in grado di ridurre l'incidenza di diverse malattie associate all'età (quali la restrizione calorica o la dieta mediterranea) e di integratori a base di micronutrienti, che attraverso il loro putativo effetto antiossidante o mimetico della restrizione calorica, potrebbero consentire benefici analoghi, l'interesse nello sviluppo di biomarcatori di salute surrogati e di studi mirati a chiarire i meccanismi d'azione che collegano tali nutrienti ai rispettivi biomarcatori e al loro effetto sulla salute, stanno ricevendo sempre più attenzione. Tale interesse è chiaramente giustificato alla luce della "quasi-impossibilità" (sia economica che tecnica) di condurre lunghissimi studi longitudinali su campioni di popolazione umana (5). Una parte di tali informazioni può comunque essere ottenuta attraverso la sperimentazione su modelli animali. Anche in questo caso, tuttavia, oltre alla ben nota difficoltà di traslare i risultati dal modello animale all'uomo, va tenuto conto del fatto che la maggior parte degli animali di laboratorio (topi e scimmie) ha una lunghezza della vita

media che varia da 1 fino a 35 anni. Da qui l'esigenza di disporre di metodi più pratici e rapidi.

Gli studi "in vitro" mirati a chiarire i meccanismi d'azione di particolari micronutrienti e a riprodurre eventuali effetti che si avrebbero "in vivo", in seguito all'assunzione di determinati nutrienti, sono particolarmente interessanti perché consentono di ottenere le informazioni richieste in tempi relativamente rapidi e con costi contenuti. Tuttavia, gli studi "in vitro" non possono tenere conto di eventuali effetti sistemici che possono influenzare l'effetto finale sull'organismo (7). La risposta "in vivo", infatti, è la conseguenza di una moltitudine di processi che non possono essere riprodotti "in vitro" tra i quali possiamo includere: l'assorbimento intestinale, le trasformazioni e la risposta da parte della microflora intestinale, la quantità e la durata in circolazione del micronutriente, l'effetto dei suoi metaboliti e dei suoi complessi con eventuali proteine di trasporto e l'effettiva biodisponibilità intracellulare che si raggiunge nei diversi tessuti (8).

Il discorso è ancora più complesso se si cerca di valutare l'impatto sull'organismo di un regime dietetico o di nutrienti complessi, o addirittura di una dieta a base di alimenti derivati da animali in produzione zootecnica, alimentati con alimenti funzionali.

La biodisponibilità dei diversi nutrienti, che già giocava da sola un ruolo molto importante, in tal caso, diventa fondamentale. Essa dipende sia da fattori endogeni che esogeni: i primi sembrerebbero essere correlati alla matrice alimentare, alle dimensioni, alla struttura chimica ed alle quantità di alimento ingerite; i secondi, invece, sembrerebbero dipendere dall'attività degli enzimi digestivi, dall'escrezione biliare, dalle biotrasformazioni legate al fegato, ai reni, all'epitelio gastrointestinale ed alla microflora intestinale.

Risulta ovvio come tali fattori possano variare da un alimento a un altro e come quindi uno stesso nutriente, sia più o meno biodisponibile in base all'alimento che lo incorpora e alla variabilità individuale.

Una valida alternativa per ottenere in tempi relativamente rapidi alcune informazioni sui meccanismi d'azione di tali regimi dietetici è stata fornita dopo i primi studi di restrizione calorica condotti su modelli animali e sull'uomo. Il modello proposto consiste nello studiare gli effetti "in vitro" su particolari linee cellulari del siero ottenuto da animali (9) o da soggetti umani (10) sotto-

posti al regime di restrizione calorica. In questa tipologia di studi, le cellule (linee originate da carcinoma epatico) venivano poste in coltura con il siero proveniente dai soggetti sperimentali al termine della sperimentazione o con il siero prelevato alla “baseline” dagli stessi soggetti sperimentali. Questi studi hanno evidenziato per la prima volta la possibilità di utilizzare il siero umano per esaminare gli effetti di un regime dietetico su biomarcatori di salute e longevità in linee cellulari. Infatti, le linee esposte al siero proveniente dai soggetti alla fine del periodo di sperimentazione, mostravano un’aumentata resistenza allo stress ossidativo e un up-regolazione di geni associati alla longevità. In particolare, le cellule messe in coltura con il siero proveniente dai soggetti in restrizione calorica mostravano un aumento di Sirt1, una riduzione della proliferazione e un aumento della resistenza allo shock termico. Se da una parte, tali studi hanno evidenziato come l’utilizzo di queste tecniche “in vitro” può essere utilizzato per predire la capacità di alcune manipolazioni dietetiche di modulare marcatori di salute e longevità nell’uomo, restano comunque alcune perplessità riguardo l’impiego di linee cellulari che notoriamente hanno caratteristiche ben diverse dalle linee primarie. Quest’ultime infatti, oltre a non presentare mutazioni carcinogeniche nel loro genoma, sono suscettibili a fenomeni di senescenza replicativa che non possono essere considerati quando si impiegano linee cellulari immortali. In aggiunta, va tenuto conto che l’utilizzo del siero a digiuno non tiene in considerazione l’influenza del siero postprandiale (PP), nel quale troviamo i picchi di concentrazione degli alimenti che abbiamo assunto con la dieta. Tale influenza non può essere trascurata, in quanto l’essere umano può passare anche metà del tempo della sua vita nello stato PP (11, 12) e, soprattutto nel caso di alimentazione con cibi funzionali o supplementazioni, è importante verificare l’effetto della dieta quando i micronutrienti, oggetto di studio, raggiungono il picco massimo di concentrazione (13).

Il siero PP e le patologie metaboliche

Il siero PP umano è il siero ottenuto dal sangue intero dopo poche ore (4h. max) aver ingerito un alimento. Il periodo che intercorre tra l’ingestione dell’alimento fino al suo metabolismo viene denominato “stato PP”.

Il siero PP racchiude in sé tutte le molecole derivanti dal metabolismo degli alimenti ingeriti.

Tale siero è costantemente oggetto di studio in vari settori:

- vi è un’importante quantità di studi che ha messo in luce come la glicemia, l’indice glicemico, i trigliceridi e altri metaboliti, nel siero PP, possano essere di enorme utilità nel monitoraggio e nella prevenzione di patologie metaboliche (14-18);
- un altro filone di ricerca, ha focalizzato l’attenzione sulla relazione tra lo stato PP e l’integrità del tessuto endoteliale (19-25);
- un recente campo di ricerca ha studiato, mediante il siero PP, la modulazione dei geni in colture cellulari esposte al siero PP, ottenuto da pazienti alimentati con particolari alimenti funzionali (26-32).

Evidenze sempre più crescenti suggeriscono che lo stato PP, caratterizzato da un elevato valore di glucosio e di trigliceridi, sia un fattore rilevante per lo sviluppo del diabete di tipo 2, uno dei principali fattori di rischio per l’arteriosclerosi (14).

Con 246 milioni di persone nel mondo affette da diabete (33), questa epidemia rappresenta globalmente un motivo di preoccupazione significativo e crescente. Il diabete mal controllato è una delle principali cause di morte nella maggior parte dei paesi sviluppati e si associa allo sviluppo di complicanze quali la neuropatia, l’insufficienza renale, la cecità e le malattie cardiovascolari (34, 35). Proprio queste ultime, sono la principale causa di morte nei pazienti diabetici (14).

Esiste una forte correlazione fra la glicemia PP e il rischio cardiovascolare, oltre a un’associazione fra l’iper-glicemia PP e lo stress ossidativo, l’infiammazione, l’IMT carotideo e la disfunzione endoteliale, tutti noti markers di malattia cardiovascolare (14-18). Inoltre, un numero sempre maggiore di studi, dimostra che l’iper-glicemia PP può essere collegata anche alla retinopatia (37), a disfunzioni cognitive negli anziani affetti da diabete di tipo 2 (37) e a certi tipi di cancro (38-42).

L’incidenza del siero PP sul tessuto endoteliale

Il siero PP è caratterizzato da parecchi cambiamenti dinamici relativi all’alterazione transitoria della vasodilatazione endotelio-dipendente (19). Vari studi hanno

mostrato come questo transitorio squilibrio PP, relativo alla vasodilatazione, sia rilevante nello sviluppo iniziale dell'arteriosclerosi, inducendo l'apoptosi delle cellule endoteliali (20). La veloce perdita di tale popolazione cellulare, concomitante alla degradazione delle proteine di adesione cellulare, impedisce all'endotelio di espletare la sua funzione di barriera, aumentando la permeabilità cellulare alle lipoproteine ad altri costituenti del plasma ed esponendo la matrice alla trombosi sub-endoteliale (21). Inoltre, prima di essere eliminate, le cellule endoteliali in fase di apoptosi diventano pro-coagulanti e pro-adesive per leucociti e piastrine (22, 23).

In questo contesto, alcuni studi hanno dimostrato che l'ipertrigliceridemia prandiale indotta, a) altera profondamente la funzione endoteliale attraverso un maggiore stress ossidativo (24), b) induce il reclutamento dei leucociti e c) aumenta l'espressione dei marcatori di attivazione dei leucociti che sono direttamente coinvolti nell'interazione con l'endotelio (25). L'attivazione di tali leucociti da parte delle cellule polimorfonucleate (PMN), non solo implica cambiamenti nella proprietà adesiva dei leucociti, ma induce anche il rilascio di particolari enzimi (43). Due di questi, come la mieloperoxidasi (MPO) e metalloproteinasi-9 (MMP-9), hanno un particolare ruolo nelle patologie derivanti dal deterioramento endoteliale (44, 45).

Per quanto riguarda l'apoptosi delle cellule endoteliali, un interessante studio ha visto che dopo un pasto grasso, l'effetto pro-apoptotico che il siero esercita nei confronti del tessuto endoteliale, può essere dovuto alla diminuzione del potenziale mitocondriale, evento fondamentale nel processo di morte cellulare programmata. In tale lavoro è stato anche visto che lo stesso siero stimola la produzione di ROS nelle cellule endoteliali (46). Questo risultato è ancor più interessante se si considera che molti step della cascata apoptotica, compresi la depolarizzazione mitocondriale, sono redox dipendenti (47). La presenza di un danno endoteliale, indotto dallo stato PP, è stata confermata "in vivo" dopo aver visto un sensibile aumento dei livelli di CD146 nel plasma PP. L'aumento di tale molecola di adesione cellulare, che è costitutivamente espressa nell'endotelio, riflette una perdita dell'integrità endoteliale (48).

Tali risultati sono in accordo con quelli di Ferreira et al., i quali hanno trovato una correlazione tra gli elevati livelli circolanti di trigliceridi nel siero PP e quelli

altrettanto elevati nel sangue di microparticelle endoteliali e vescicole submicroscopiche membranose, entrambe riversate da parte delle cellule endoteliali mature durante l'apoptosi o in seguito a stimolazione da parte di agenti attivanti come il TNF- α (49).

La coerenza fra i risultati di studi metodologicamente diversi, rafforza il concetto che un pasto ricco di grassi accelera il tasso di apoptosi dell'endotelio.

I meccanismi attraverso i quali il siero, raccolto dopo il challenge lipidico, possa danneggiare le cellule endoteliali, sembrano essere complessi. Crescente evidenza suggerisce che la fase PP, soprattutto dopo un pasto ricco di grassi, è una situazione pro-infiammatoria caratterizzata da attivazione leucocitaria e da stress ossidativo (24, 25). Anche Nicholls et al. hanno recentemente dimostrato che il consumo di un carico di grassi saturi riduce il potenziale anti-infiammatorio delle HDL e altera la funzione endoteliale arteriosa (50). Wang et al. hanno valutato l'effetto di lipoproteine ricche in trigliceridi isolate da siero PP su cellule endoteliali aortiche, evidenziando come l'upregolazione di molecole di adesione (ICAM-1, E-selectina, VCAM-1) vari proporzionalmente ai livelli individuali di trigliceridi postprandiali (TG-PP) e alla circonferenza addominale. Inoltre, i TG-PP da soli non inducono una risposta infiammatoria se non in combinazione con basse dosi di TNF- α (0,3 ng/ml) (51). Questi risultati suggeriscono come l'entità del danno proaterogeno indotto da una dieta ricca in grassi a livello endoteliale, possa variare individualmente e in relazione all'età.

Un soggetto anziano caratterizzato da uno stato infiammatorio cronico può maggiormente risentire di un regime dietetico ricco in grassi rispetto ad un soggetto giovane.

Per ciò che riguarda l'impatto dello stress ossidativo sul danno endoteliale, è stato visto che oltre a produrre i ROS, il carico di grasso, stimola i leucociti ad aumentare i livelli sierici della "proteina prodotta dopo un'avanzata ossidazione" (AOPP), un marker di stress ossidativo (52). È interessante notare che l'incremento della produzione di ROS sia correlato a) con l'aumentato tasso di apoptosi delle cellule endoteliali esposte al siero PP e b) con l'aumento dei CD146 nel plasma PP. Tali evidenze suggeriscono che i ROS rilasciati dai "leucociti stimolati" possono giocare un ruolo fondamentale nell'indurre il danno endoteliale.

L'incidenza del siero PP sulla modulazione genica

Tra i vari studi di genomica, la progressione arteriosclerotica è stata associata a una differente espressione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'adesione, nella chemiotassi e nell'organizzazione del citoscheletro (26-29). Questi risultati sono molto importanti poiché possono identificare nuovi biomarcatori e nuovi "signalling pathways" nello sviluppo delle malattie cardiovascolari.

Recentemente, Volger et al. (30) hanno mostrato in uno studio di trascrittomico sull'endotelio delle arterie in stato di arteriosclerosi iniziale e avanzata, una upregolazione, nello stadio avanzato, di geni relativi a) a particolari classi di chemochine, b) al fattore nucleare kB (NFkB) e c) al p53. Questo studio, in accordo con altri (27), ha anche rivelato un'ampia distinzione tra i profili genomici delle fasi iniziali e quelle avanzate, di tutti i generi di placche arteriosclerotiche. I risultati suggeriscono che le diverse fasi di progressione dell'ateroma hanno specifici profili di trascrittomico. In un altro studio, in cui sono state messe in coltura delle cellule endoteliali ottenute da cordone ombelicale (HUVEC) con il siero PP prelevato da alcuni volontari che avevano assunto una dieta ricca di grassi, Dejeans et al (31) hanno mostrato una modulazione di geni legati al controllo del ciclo cellulare e alla promozione dell'apoptosi. E' stato inoltre mostrato che rispetto alla condizione preprandiale, nelle HUVECs esposte al siero PP, i geni che codificano per proteine pro-apoptotiche (Chk2, BBC3, rassf5, CREBBP, cdkn2c e bcl3) erano upregolati e i geni che codificano per le proteine anti-apoptotiche erano inibiti (Cdc6, cdc34, cdc26, bcl2l1, GSTP1). Tra questi geni, Chk2 codifica una proteina che ha la capacità di fosforilare e, quindi, attivare il p53 (32).

Il modello del siero PP "in vitro"

Considerando che:

- 1) nel siero PP sono racchiuse tutte le sostanze provenienti dal metabolismo dell'alimento;
- 2) il siero PP induce la degenerazione del tessuto endoteliale alterandone la funzionalità e diminuendone la vitalità;

3) il danno al tessuto endoteliale rappresenta uno dei primi passi verso l'arteriosclerosi.

L'impatto del regime dietetico sulla salute, con particolare riferimento alla prevenzione di malattie cardiovascolari, può essere valutato esponendo colture di cellule endoteliali primarie (disponibili commercialmente) al siero PP, quest'ultimo ottenuto dopo i diversi regimi dietetici cui sono stati sottoposti alcuni volontari sani. Tale modello, può quindi essere preso in considerazione come modello di sperimentazione "in vitro" che possa mimare nel miglior modo le condizioni di una sperimentazione "in vivo". I risultati offerti da questa tipologia di studio possono complementare quelli ottenuti "in vitro" con singoli micronutrienti e consentono il vantaggio di una tempistica ridotta e costi più contenuti rispetto a quella di una normale sperimentazione "in vivo".

In aggiunta ai vantaggi sopra esposti, questo modello consente il vantaggio di ridurre l'esposizione dei soggetti sperimentali ad una sola somministrazione, riducendo quindi le possibilità di "drop-out" e riducendo eventuali rischi dovuti ad effetti collaterali indesiderati a seguito di una supplementazione o di un regime dietetico sostenuto per lunghi periodi di tempo.

Nel caso infatti si debbano confrontare gli effetti di diete o supplementi o regimi dietetici differenti, lo studio può essere effettuato esponendo colture di cellule endoteliali primarie al siero PP, ottenuto da donatori, alimentati una sola volta con gli "alimenti funzionali" o con regimi dietetici differenti, oggetto di studio, attraverso un design a "cross-over". Le cellule endoteliali potranno

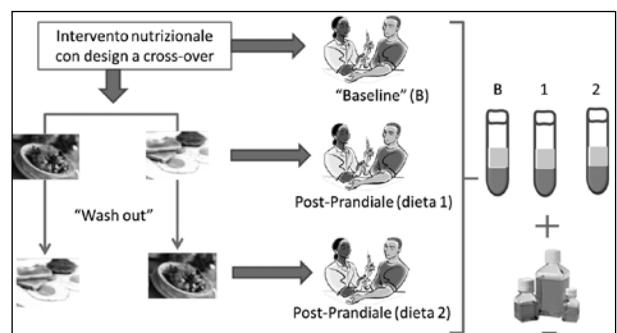


Figura 1. Il modello del siero PP "in vitro". Il modello consiste nell'esporre una linea cellulare primaria (i.e. endoteliali, epatociti, cellule del sangue) con il siero PP ottenuto da 3-4 ore dopo aver alimentato alcuni volontari sani con il nutriente o l'alimento di cui si vogliono evidenziare possibili effetti sulla salute e misurare su tale linea cellulare primaria i biomarcatori che si intende studiare (stress ossidativo, DNA damage, etc.).

quindi essere esposte al siero PP sia per brevi (4 ore) che per lunghi periodi di tempo (8 ore al giorno), cercando di mimare la situazione PP che avverrebbe “in vivo”. La misura di specifici biomarcatori quali la produzione di ROS intracellulari, la stabilità genomica (“DNA damage/repair”), la resistenza allo stress, i profili di espressione genica e la velocità di invecchiamento “in vitro” (senescenza cellulare) sulle cellule esposte per tempi ridotti e prolungati al siero PP a confronto con il siero a digiuno (baseline) potrebbe aiutare ad identificare il regime dietetico con il migliore impatto potenziale sulla salute. Allo stesso tempo, verrebbero messi alla luce eventuali meccanismi d’azione implicati nella prevenzione delle patologie cardiovascolari attraverso le diete sperimentali. Un possibile schema del modello del siero PP “in vitro” è rappresentato in Figura 1. Alcune limitazioni del presente modello consistono nella limitata disponibilità di siero PP di cui è possibile disporre da un singolo donatore e l’eventuale effetto confondente dovuto al medium di coltura che è necessario per assicurare le condizioni ottimali “in vitro” ma che non è ovviamente presente nella condizione “in vivo”.

Considerazioni conclusive

L’approccio metodologico presentato può essere impiegato per chiarire i meccanismi di azione di particolari micronutrienti o regimi dietetici con potenziale impatto sulla prevenzione cardiovascolare. Tale modello potrebbe offrire risultati che possono complementare quelli eseguiti “in vitro” con singoli nutrienti, ma può anche offrire un’interessante alternativa pratica e a basso costo rispetto a lunghi studi longitudinali sull’uomo o su modelli animali.

Ringraziamenti

Il presente lavoro è stato sostenuto dal Ministero dell’Economia e delle Finanze attraverso il Progetto Industria 2015 Bando PII, Programma n. MI01_00148, Progetto: “Alimentazione funzionale nella filiera agro-alimentare (suino, pollo e coniglio), per il miglioramento del benessere animale e per il trasferimento di componenti nutrizionali funzionali al miglioramento della salute dell’uomo”.

Bibliografia

1. World Health Organization. Keeping fit for life: meeting the nutritional needs of older persons. Geneva, Switzerland: WHO, 2002. ISBN 2-930229-45-4
2. Fontana L, Meyer E, Klein S and Holloszy JO. Long-term calorie restriction is highly effective in reducing the risk for atherosclerosis in humans. *PNAS*. 2004; 101: 6659-6663
3. Lappe JM, Gustafson DT, Davies KM et al. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: results of a randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2007;85:1586-91
4. Zhu Y, Michelle Luo T, Jobin C, Young HA. Gut microbiota and probiotics in colon tumorigenesis. *Cancer Lett*. 2011;309:119-27.
5. Fernando Rajulton. The Fundamentals of Longitudinal Research: An Overview Special Issue on Longitudinal Methodology, Canadian Studies in Population. 2001;28:169-185
6. Stocker R, Keaney JF Jr Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev*. 2004;84:1381-478.
7. Rothman SS. Lessons from the Living Cell The Culture of Science and the Limits of Reductionism. ISBN10:0071378200/ISBN13: 9780071378208
8. Borchardt RT, Smith PL, Wilson G. Models for Assessing Drug Absorption and Metabolism. New York: Plenum Press, 1996. Pharmaceutical biotechnology, v. 8.
9. De Cabo R, Fürer-Galbán S, Anson RM et al. An in vitro model of caloric restriction. *Exp Gerontol*. 2003;38:631-9.
10. Allard JS, Heilbronn LK, Smith C et al. In vitro cellular adaptations of indicators of longevity in response to treatment with serum collected from humans on calorie restricted diets. *PLoS One*. 2008;3(9):e3211.
11. Dinneen S, Gerich JE, Rizza R. Carbohydrate metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 1992;327:707-713.
12. Monnier L. Is postprandial glucose a neglected cardiovascular risk factor in type 2 diabetes? *Eur J Clin Invest*. 2000;30:3-11.
13. American Diabetes Association. Postprandial Blood Glucose. *Diabetes Care*. 2001;24:775-778.
14. DECODE Study Group. Glucose tolerance and cardiovascular mortality: comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. *Arch Intern Med* 2001;161:397-405.
15. Nakagami T, Qiao Q, Tuomilehto J et al. Screen-detected diabetes, hypertension and hypercholesterolemia as predictors of cardiovascular mortality in five populations of Asian origin: the DECODA study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*. 2006;13:555-561.
16. Sorkin JD, Muller DC, Fleg JL, Andres R. The relation of fasting and 2-h postchallenge plasma glucose concentrations to mortality: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging with a critical review of the literature. *Diabetes Care*. 2005;28:2626-2632.
17. Levitan EB, Song Y, Ford ES, Liu S. Is nondiabetic hyperglycemia a risk factor for cardiovascular disease? A meta-analysis of prospective studies. *Arch Intern Med*. 2004;164:2147-2155.

18. Cavalot F, Petrelli A, Traversa M et al. Postprandial blood glucose is a stronger predictor of cardiovascular events than fasting blood glucose in type 2 diabetes mellitus, particularly in women: lessons from the San Luigi Gonzaga Diabetes Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91:813-819.
19. Vogel RA, Corretti MC, Plotnick GD. Effect of a single high-fat meal on endothelial function in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 1997;79:350-354.
20. Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol.* 2000;130:947-962.
21. Winn RK, Harlan JM. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1815-1824.
22. Bombeli T, Schwartz BR, Harlan JM. Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood.* 1999;3:3831-3838.
23. Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM. Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood.* 1997;89:2429-2442.
24. Bae JH, Bassenge E, Kim KB et al. Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis.* 2001;155:517-523.
25. Van Oostrom AJ, Rabelink TJ, Verseyden C et al. Activation of leukocytes by postprandial lipemia in healthy volunteers. *Atherosclerosis.* 2004;177:175-182.
26. Faber BC, Cleutjens KB, Niessen RL et al. Identification of genes potentially involved in rupture of human atherosclerotic plaques. *Circ Res.* 2001;89:547-554.
27. King JY, Ferrara R, Tabibiazar R et al. Pathway analysis of coronary atherosclerosis. *Physiol Genomics.* 2005;23:103-118.
28. Randi AM, Biguzzi E, Falciani F et al. Identification of differentially expressed genes in coronary atherosclerotic plaques from patients with stable or unstable angina by cDNA array analysis. *J Thromb Haemost.* 2003;1:829-835.
29. Seo D, Wang T, Dressman H et al. Gene expression phenotypes of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1922-1927.
30. Volger OL, Fledderus JO, Kisters N et al. Distinctive expression of chemokines and transforming growth factor-beta signaling in human arterial endothelium during atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2007;171:326-337.
31. Dejeans N, Maier J, Tauveron I et al. Modulation of gene expression in endothelial cells by hyperlipaemic postprandial serum from healthy volunteers. *Genes Nutr.* 2010;5:263-274.
32. Coutts AS, La Thangue NB. The p53 response: emerging levels of co-factor complexity. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;331:778-785.
33. Diabetes Atlas, 3rd edition. International Diabetes Federation, 2006.
34. Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women: meta-analysis of 37 prospective cohort studies. *BMJ.* 2006;332:73-78.
35. Haffner SM, Lehto S, Ronnema T et al. Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1998;339:229-234.
36. Shiraiwa T, Kaneto H, Miyatsuka T et al. Post-prandial hyperglycemia is an important predictor of the incidence of diabetic microangiopathy in Japanese type 2 diabetic patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;336:339-345.
37. Abbatecola AM, Rizzo MR, Barbieri M et al. Postprandial plasma glucose excursions and cognitive functioning in aged type 2 diabetics. *Neurology.* 2006;67:235-240.
38. Gapstur SM, Gann PH, Lowe W et al. Abnormal glucose metabolism and pancreatic cancer mortality. *JAMA.* 2000;283:2552-2558.
39. Larsson SC, Bergkvist L, Wolk A. Consumption of sugar and sugar-sweetened foods and the risk of pancreatic cancer in a prospective study. *Am J Clin Nutr.* 2006;84:1171-1176.
40. Michaud DS, Liu S, Giovannucci E et al. Dietary sugar, glycemic load, and pancreatic cancer risk in a prospective study. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:1293-1300.
41. Michaud DS, Fuchs CS, Liu S et al. Dietary glycemic load, carbohydrate, sugar, and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:138-147.
42. Lajous M, Willett W, Lazcano-Ponce E et al. Glycemic load, glycemic index, and the risk of breast cancer among Mexican women. *Cancer Causes Control.* 2005;16:1165-1169.
43. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med.* 2000;109:33-44.
44. Sugiyama S, Kugiyama K, Aikawa M et al. Hypochlorous acid, a macrophage product, induces endothelial apoptosis and tissue factor expression: involvement of myeloperoxidase-mediated oxidant in plaque erosion and thrombogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1309-1314.
45. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1994;94:2493-2503.
46. Spallarossa P, Garibaldi S, Barisione C et al. Postprandial serum induces apoptosis in endothelial cells: Role of polymorphonuclear-derived myeloperoxidase and metalloproteinase-9 activity. *Atherosclerosis.* 2008;198:458-67.
47. Le Bras M, Clement MV, Pervaiz S, Brenner C. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol Histopathol.* 2005;20:205-219.
48. Bardin N, Moal V, Anfosso F et al. Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb Haemost.* 2003;90:915-920.
49. Ferreira CC, Peter AA, Mendez AJ et al. Postprandial hypertriglyceridemia increases circulating levels of endothelial cell microparticles. *Circulation.* 2004;110:3599-3603.
50. Nicholls SJ, Lundman P, Harmer JA et al. Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *J Am*

Coll Cardiol. 2006;48:715-720

51. Wang YI, Schulze J, Raymond N et al. Endothelial inflammation correlates with subject triglycerides and waist size after a high-fat meal. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300:H784-91.
52. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia *Kidney Int.* 1996;49:1304-1313.

Correspondence:

Dr. Francesco Piacenza

Polo Scientifico e Tecnologico INRCA, Centro Traslazionale
Nutrizione e Invecchiamento

Via Birarelli 8, 60100, Ancona, Italy.

Tel: +39-0718004106; Fax: +39-071206791

E-mail: fradiancona@yahoo.it