

ΧΡΙΣΤΙΝΑ ΞΕΝΑΚΗ, 21031

Επιβλέπων καθηγητής: Τζ. Νομικός

**Επίδραση της
υπεργλυκαιμίας μετά
από φόρτιση γλυκόζης
σε δείκτες οξειδωτικού
στρες στην κυκλοφορία
του αίματος υγιών
εθελοντών. Συσχέτιση
με τη δραστικότητα των
αιμοπεταλίων.**

Πίνακας περιεχομένων

Πίνακας περιεχομένων	1
1. Θεωρητικό Μέρος	3
1.1. Μεταγευματική Υπεργλυκαιμία (ΜΥ)	3
1.2. ΜΥ και Οξειδωτικό Στρες	12
1.3. Οξειδωτικό Στρες & Αιμοπετάλια.....	23
1.4. Υπεργλυκαιμία, Οξειδωτικό Στρες & Αιμοπετάλια	28
2. Σκοπός	30
3. Μεθοδολογία	31
3.1. Επιλογή εθελοντών	31
3.2. Σχεδιασμός της μελέτης για το πρωτόκολλο της υπεργλυκαιμίας.....	31
3.3. Σωματομετρία	32
3.4. Απομόνωση και επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων	32
3.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε δείγματα ορού	33
3.6. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	35
3.7. Στατιστική Ανάλυση.....	36
4. Αποτελέσματα	38
4.1. Εισαγωγή	38
4.2. Οι εθελοντές της μελέτης.....	38
4.3. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης [50].....	39
4.4. Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων –Έλεγχος μεθοδολογίας.....	41
4.5. Συσχέτιση των επιπέδων σε πρωτεϊνικά καρβονύλια με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την παρέμβαση (χρόνος 0 - baseline).....	42
4.6. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων	43
4.7. Συσχέτιση των επιπέδων βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών πριν την παρέμβαση (χρόνος 0 - baseline) με τις μεταβολές των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις φορτίσεις.....	50
4.8. Συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων με τις μεταβολές των επιπέδων γλυκόζης, ινσουλίνης, ιντερλευκίνης-6 και δραστικότητα αιμοπεταλίων (EC50 ADP και EC50 TRAP)	52
5. Συζήτηση	53
5.1. Εισαγωγή	53

5.2.	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης	53
5.3.	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων	53
5.4.	Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και επίπεδα ινσουλίνης	57
5.5.	Δεδομένα άλλων μελετών.....	57
5.6.	Προβληματισμοί.....	60
5.7.	Συμπεράσματα	61
6.	Βιβλιογραφία.....	63

1. Θεωρητικό Μέρος

1.1. Μεταγευματική Υπεργλυκαιμία (ΜΥ)

1.1.1. Ορισμός

Η γλυκόζη αίματος αναφέρεται ως η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος. Ως «γλυκόζη νηστείας» περιγράφεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος μετά από 8 ώρες νηστείας, ενώ τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης αναφέρονται στη συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση ενός γεύματος (ή υποκατάστατου γεύματος για κλινικές δοκιμασίες, π.χ. διάλυμα δεξτρόξης).

Ο γενικός όρος «υπεργλυκαιμία» χρησιμοποιείται για να εκφράσει υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η υπεργλυκαιμία λαμβάνει κλινική υπόσταση στη διάγνωση μεταβολικών νοσημάτων όπως είναι ο διαβήτης ή η διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας ορίζει τον διαβήτη ως επίπεδα γλυκόζης νηστείας $\geq 7.0 \text{ mmol/l}$ (126 mg/dl) ή μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης (2 ώρες μετά από κατανάλωση 75 g γλυκόζης *per os*) $\geq 11.1 \text{ mmol/l}$ (200 mg/dl) [1]. Τα αντίστοιχα όρια για τη διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη (Impaired Glucose Tolerance – IGT) όπως και για τη διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας (Impaired Fasting Glucose – IFG) φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 - Όρια γλυκόζης για IGT και IFG [1]

IGT	γλυκόζη νηστείας $< 7.0 \text{ mmol/l}$ (126 mg/dl) και μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης $\geq 7.8 \text{ mmol/l}$ (140 mg/dl) και $< 11.1 \text{ mmol/l}$ (200 mg/dl)
IFG	γλυκόζη νηστείας μεταξύ 6.1 και 6.9 mmol/l (110 mg/dl με 125 mg/dl) και μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης $< 7.8 \text{ mmol/l}$ (140 mg/dl)

Πέρα από την παραπάνω κλινική σημασία του όρου, όπως αναφέρθηκε, οι επιστήμονες χρησιμοποιούν την υπεργλυκαιμία για να περιγράψουν τα γενικότερα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα, ανεξάρτητα από κλινικά και άλλα χαρακτηριστικά. Κατ' αντιστοιχία, ο όρος «υπογλυκαιμία» περιγράφει τα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Οι μεταβολές μεταξύ χαμηλών και υψηλών συγκεντρώσεων γλυκόζης αίματος προκύπτουν φυσιολογικά καθόλη τη διάρκεια της ημέρας, ως μέρος του φυσιολογικού μεταβολισμού των υδατανθράκων της τροφής.

Σε μη διαβητικούς ανθρώπους, όπου τα επίπεδα γλυκόζης αίματος νηστείας, βάσει του Αμερικανικού Διαβητολογικής Ένωσης, κυμαίνονται μεταξύ 70 και 100 mg/dl [2], η γλυκόζη στο πλάσμα αρχίζει να αυξάνεται περίπου 10 λεπτά μετά την κατανάλωση γεύματος ως αποτέλεσμα της απορρόφησης των διαιτητικών υδατανθράκων από τον οργανισμό. Συνήθως η υψηλότερη τιμή μεταγευματικής

γλυκόζης δεν ξεπερνά τα 140 mg/dl, ενώ αυτή παρατηρείται περίπου 1-2 ώρες μετά το γεύμα, με τα επίπεδα γλυκόζης να επιστρέφουν στο φυσιολογικό 1 με 2 ώρες μετά την κορυφή [2]. Ο βαθμός και ο χρόνος αύξησης των επιπέδων γλυκόζης επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες όπως τη διάρκεια, την ποσότητα και την ποιότητα του καταναλισκόμενου γεύματος [4]. Αξίζει να σημειωθεί πως ακόμα και αν οι τιμές γλυκόζης επανέρχονται στα φυσιολογικά επίπεδα το πολύ 3 ώρες μετά το γεύμα, η απορρόφηση των υδατανθράκων συνεχίζει μέχρι περίπου τις 5 με 6 ώρες.

Αντίθετα, διαβητικοί ασθενείς (τύπου I και τύπου II) λόγω των ανωμαλιών που υπόκεινται οι μηχανισμοί μεταβολισμού της γλυκόζης (π.χ. η έκκριση ινσουλίνης ή η απορρόφηση γλυκόζης από το ήπαρ), συχνά παρουσιάζουν υψηλότερα και μεγαλύτερης διάρκειας μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης. Η απορρόφηση των υδατανθράκων διαρκεί περίπου 5 με 6 ώρες και σε διαβητικούς ασθενείς. Πιο συγκεκριμένα, σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I, τα επίπεδα και οι μεταβολές της μεταγευματικής γλυκόζης εξαρτώνται από την οδό χορήγησης, τη δόση και τον τύπο της χορηγούμενης ινσουλίνης (εφόσον οι τύπου I ασθενείς δεν μπορούν να την παράξουν ενδογενώς). Αντίστοιχα, η μεταγευματική γλυκόζη σε διαβητικούς τύπου II ασθενείς θεωρείται πως αποτελεί έναν σχετικά πρώιμο δείκτη ανωμαλίας στην ομοιοστάση της γλυκόζης [3].

Συμπερασματικά, το προφίλ των μεταγευματικών επιπέδων γλυκόζης εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, ανάμεσα στους οποίους βρίσκονται η απορρόφηση των υδατανθράκων, η έκκριση ινσουλίνης και γλυκαγόνης και η συνεργατική τους δράση στο μεταβολισμό της γλυκόζης στο ήπαρ και τους περιφερικούς ιστούς.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτός ο λόγος για τον οποίο η μέτρηση της μεταγευματικής γλυκόζης αποτελεί δείκτη γλυκαιμικού ελέγχου τόσο σε μη διαβητικούς όσο και σε διαβητικούς ασθενείς.

Ο καλύτερος δείκτης γλυκαιμικού ελέγχου σε διαβητικούς και μη διαβητικούς ασθενείς θεωρείται η Γλυκοζυλιωμένη Αιμοσφαιρίνη (HbA_{1c}) [5]. Η HbA_{1c} , όπως υποδεικνύει το όνομα της, αποτελεί δείκτη του βαθμού γλυκοζυλίωσης της αιμοσφαιρίνης των ερυθροκυττάρων, ενώ εκφράζεται ως ποσοστό επί της συνολικής συγκέντρωσης αιμοσφαιρίνης. Αντανακλά την έκθεση των ερυθροκυττάρων στη γλυκόζη και αποτελεί έναν αρκετά ακριβή δείκτη της μέσης συγκέντρωσης της γλυκόζης στο πλάσμα, προ- και μετα-γευματικά, των τελευταίων τριών μηνών. Γενικότερα, η γλυκόζη νηστείας, η μεταγευματική γλυκόζη όπως και η μέση γλυκόζη πλάσματος (δηλαδή ο μέσος όρος των μετρήσεων ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέσα στη διάρκεια της ημέρας) έχουν συσχετιστεί με τα επίπεδα HbA_{1c} . Παρά αυτές τις υψηλές συσχετίσεις όμως, δεν έχει βρεθεί σημαντική συσχέτιση μεταξύ της HbA_{1c} και της διαφοράς των επιπέδων προ- και μετα-γευματικής γλυκόζης.

Έτσι λοιπόν, είναι απαραίτητη η διεξαγωγή μελετών και κλινικών δοκιμασιών ώστε να διερευνηθούν περαιτέρω οι παραπάνω σχέσεις [3]. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να βοηθήσει την επιστημονική κοινότητα στο να ορίσει επακριβώς τον όρο «μεταγευματική υπεργλυκαιμία» (ΜΥ), κάτι που μέχρι στιγμής αποτελεί μια πιο γενική έννοια λόγω της απουσίας μιας περισσότερο τυποποιημένης εκτίμησης της.

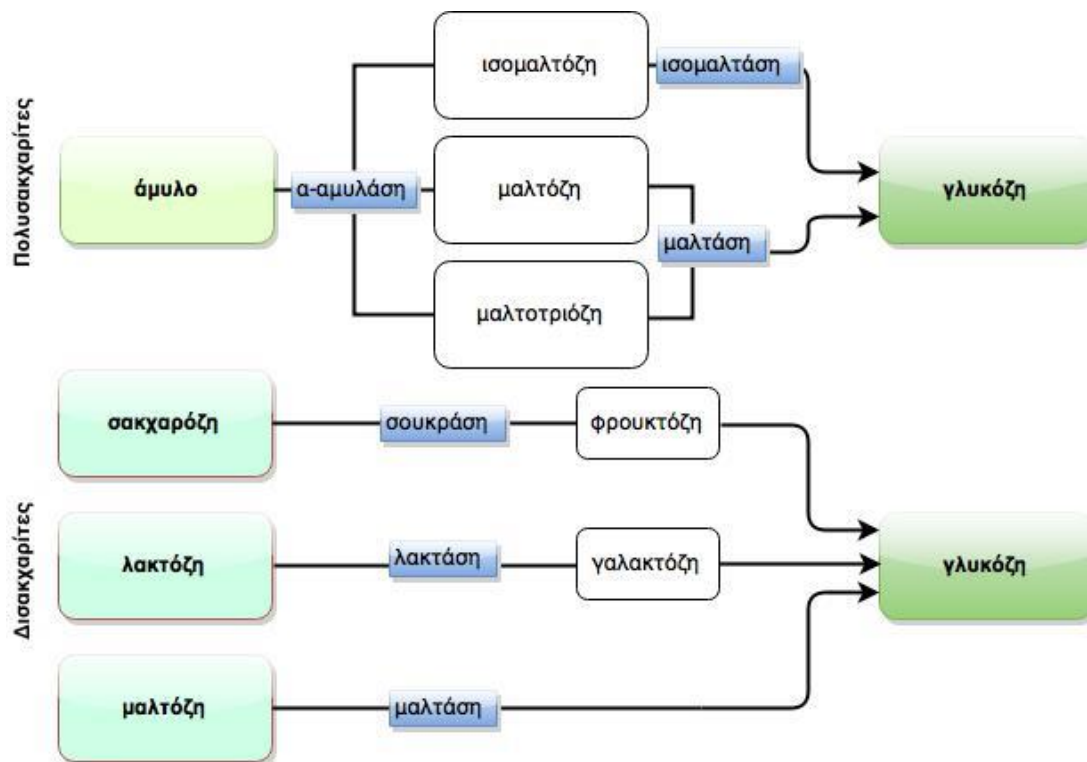
Σήμερα, με τον όρο ΜΥ οι επιστήμονες αναφέρονται στα γενικότερα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος μετά την κατανάλωση γεύματος. Με αυτή την έννοια του όρου θα προχωρήσει και η διατριβή στη συνέχεια.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως επιδημιολογικά δεδομένα συχνά συσχετίζουν την μεταγευματική υπεργλυκαιμία με την μεταγευματική υπερλιπιδαιμία σε μια ενιαία παθοφυσιολογική οντότητα η οποία αναφέρεται ως «μεταγευματικός δυσμεταβολισμός», με χαρακτηριστική εφαρμογή της ως παράγοντας πρόβλεψης μελλοντικών καρδιαγγειακών επεισοδίων ακόμα και σε μη διαβητικούς ασθενείς [6].

1.1.2. Παθογένεση

Η διάσπαση των πολυ- και δι-σακχαριτών της τροφής σε μονοσακχαρίτες, οι οποίοι αποτελούν την απορροφήσιμη μορφή των υδατανθράκων από τα κύτταρα των ιστών, πραγματοποιείται από υδρολυτικά ένζυμα με τη γενική ονομασία «γλυκοζιδάσες».

Οι πολυσακχαρίτες, όπως είναι το άμυλο, υπόκεινται μια πρώτη διάσπαση στη στοματική κοιλότητα από την α-αμυλάση η οποία υδρολύει α(1→4) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Η δράση του ενζύμου αυτού συνεχίζεται και στο στόμαχο, όπου τελικά αδρανοποιείται από το όξινο pH, με τελικά παράγωγα της μερικής αυτής υδρόλυσης τις δεξτρίνες (αλυσίδες πολυσακχαριτών και μαλτόζη). Η περαιτέρω πέψη των δεξτρινών πραγματοποιείται στο λεπτό έντερο, με την παρουσία της χολής και του παγκρεατικού υγρού να αυξάνει το pH ώστε η παραγόμενη από το πάγκρεας α-αμυλάση να μπορέσει να φθάσει την υψηλότερη δραστηριότητα της ώστε να προχωρήσει στην υδρόλυση των δεξτρινών. Ανάλογα την αρχική μορφή του αμύλου στην τροφή (δηλαδή αν πρόκειται για διακλαδισμένο ή μη πολυσακχαρίτη) προκύπτουν αντίστοιχα τελικά παράγωγα που ανήκουν στις μαλτόζη, ισομαλτόζη και γλυκόζη. Όπως παρατηρείται και στο Σχήμα 1, τελικό προϊόν της υδρόλυσης των πολυσακχαριτών αποτελεί πάντα η γλυκόζη, με τη δράση ενός συνόλου εξειδικευμένων ενζύμων (π.χ. μαλτάση).



Σχήμα 1 - Ενζυμική υδρόλυση υδατανθράκων προς γλυκόζη [4]

Αντίθετα με τους πολυσακχαρίτες, οι δισακχαρίτες δεν υπόκεινται διάσπαση στο στόμα ή το στομάχο, αλλά ολοκληρωτικά στο λεπτό έντερο από εξειδικευμένα ένζυμα για το κάθε μόριο (Σχήμα 1). Τελικά, οι μονοσακχαρίτες μαζί με μερικούς δισακχαρίτες απορροφώνται από τις λάχνες του εντερικού επιθήλιου, με διαφορετικό μηχανισμό για κάθε ένωση (π.χ. η γλυκόζη και η γαλακτόζη με ενεργητική μεταφορά, ενώ η φρουκτόζη με υποβοηθούμενη διάχυση).

Τελικά, η μεταβολική πορεία της γλυκόζης έχει ως εξής [4]:

- 15% της απορροφούμενης από το βλεννογόνο γλυκόζης διαρρέει μέσω της ψηκτροειδούς παρυφής πίσω στον εντερικό αυλό
- 25% της γλυκόζης μέσω διάχυσης από τη βασικοπλευρική μεμβράνη μεταφέρεται απ' ευθείας στη κυκλοφορία
- 60% της γλυκόζης μεταφέρεται στην κυκλοφορία μέσω ενός μεταφορέα στον ορογόνο υμένα

Η υπόλοιπη ποσότητα της γλυκόζης χρησιμοποιείται στον βλεννογόνο του εντέρου για τις ενεργειακές ανάγκες των κυττάρων.

Ο μηχανισμός απορρόφησης της φρουκτόζης δεν είναι πλήρως γνωστός, αν και εικάζεται ότι γίνεται μέσω μηχανισμού ενεργητικής μεταφοράς ο οποίος επηρεάζεται και από την παρουσία γλυκόζης. Είναι χαρακτηριστικό πάντως ότι η απορρόφηση της φρουκτόζης γίνεται με αργότερο ρυθμό από αυτόν της γαλακτόζης και της γλυκόζης.

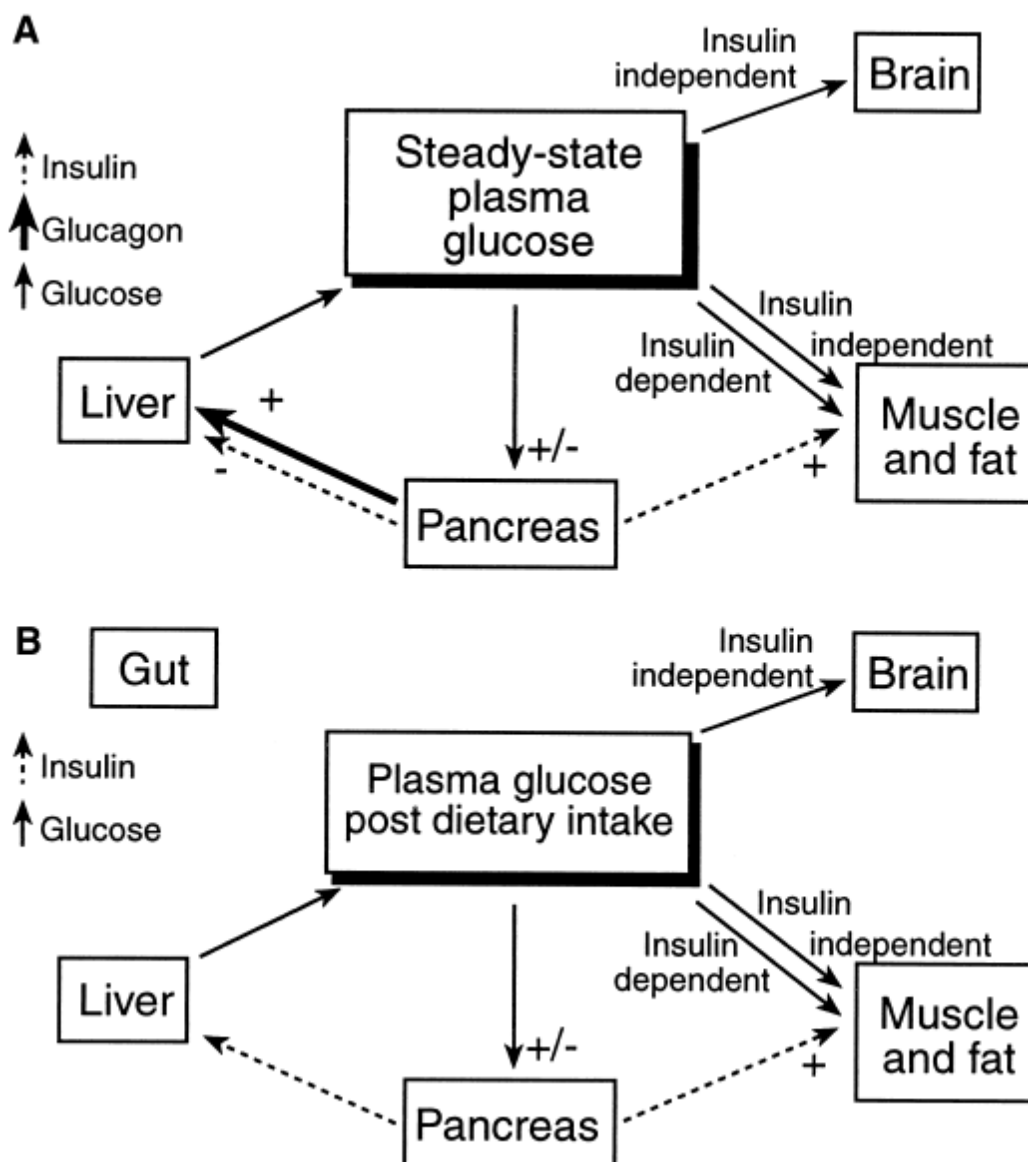
Μετά την απορρόφηση των μονοσακχαριτών από τα κύτταρα του βλεννογόνου, τα μόρια εισέρχονται στην πυλαία κυκλοφορία μέσω της οποίας μεταφέρονται στο ήπαρ. **Σε αυτό το στάδιο είναι που παρατηρείται η ΜΥ**, καθώς με την απελευθέρωση των μορίων γλυκόζης στην κυκλοφορία προς το ήπαρ αυξάνεται η συγκέντρωσή της.

Η γαλακτόζη και η φρουκτόζη μεταβολίζονται από τα ηπατικά κύτταρα σε γλυκόζη και είτε προχωρούν στην αποθήκευση ως γλυκογόνο είτε στην καταβολική αξιοποίηση τους. Η γλυκόζη μεταβολίζεται και αυτή στο ήπαρ, και μέσω της συστηματικής κυκλοφορίας διανέμεται σε άλλους ιστούς (π.χ. μύες), όπου προσλαμβάνεται μέσω υποβοηθούμενης μεταφοράς (ειδικοί πρωτεϊνικοί μεταφορείς της οικογένειας GLUT). Στη διαδικασία αυτή παίζει ρόλο και η ινσουλίνη (για τους μύες και το λιπώδη ιστό), όπως θα αναφερθεί παρακάτω.

Όπως γίνεται αντιληπτό, επειδή η γλυκόζη αξιοποιείται ως ενεργειακό υπόστρωμα από πληθώρα κυττάρων και ιστών, η συγκέντρωσή της στο αίμα πρέπει να διατηρείται σχετικά σταθερή. Γι' αυτόν τον λόγο η γλυκόζη πλάσματος υπόκειται σε ομοιοστατικό έλεγχο μέσω του ενδοκρινικού συστήματος. Πιο συγκεκριμένα, εξειδικευμένα ενδοκρινή κύτταρα που εντοπίζονται καθόλο το μήκος του αυλού του ανώτερου γαστρεντερικού λαμβάνουν χημικό μήνυμα από τη γλυκόζη και ενεργοποιούνται εκκρίνοντας στην κυκλοφορία ορμόνες σε κοκκία (π.χ. τις ινγκρετίνες GLP-1 – προσομοιάζουν με τη γλυκαγόνη πεπτίδιο 1, και GIP – γλυκοζοεξαρτώμενο ινσουλινοτροπικό πεπτίδιο). Αυτές οι ορμόνες με τη σειρά τους έχουν το ρόλο της ευαισθητοποίησης των β-κυττάρων της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, τα οποία εκκρίνουν ινσουλίνη ως απόκριση στη γλυκόζη του καταναλισκόμενου γεύματος. Έτσι λοιπόν, η ινσουλίνη αποκτά το ρόλο της βασικής ορμόνης για το μεταβολισμό των υδατανθράκων κατά το μεταγευματικό στάδιο. Για παράδειγμα, μια άμεση δράση της ινσουλίνης στο μεταβολισμό της γλυκόζης, εντοπίζεται ενεργοποίηση της έκφρασης των GLUT-4 πρωτεϊνικών μεταφορέων της γλυκόζης στη μεμβράνη των λιποκυττάρων, των κυττάρων των σκελετικών μυών καθώς και εκείνων της καρδιάς. Πιο βραδείες επιδράσεις της ορμόνης περιλαμβάνουν την επαγωγή ή καταστολή της σύνθεσης ενζύμων.

Άλλες ορμόνες που συμμετέχουν στον ομοιοστατικό μηχανισμό της γλυκόζης αποτελούν η παγκρεατική γλυκαγόνη και μερικές γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες του φλοιού των επινεφριδίων (π.χ. κορτιζόλη, κορτιζόνη, κορτικοστερόνη). Πρακτικά, η έκκριση ινσουλίνης διεγείρεται από την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα μεταγευματικά, ενώ η απελευθέρωση της γλυκαγόνης μειώνεται [7]. Σε αντίθετη περίπτωση όπου παρατηρείται υπογλυκαιμία, διεγείρεται η έκκριση γλυκαγόνης και μειώνεται εκείνη της ινσουλίνης. Με αυτόν τον τρόπο οι ορμόνες ρυθμίζουν την απορρόφηση και την απελευθέρωση της γλυκόζης από και προς τους ιστούς, επαναφέροντας την σε ομοιοστατικά επίπεδα στο αίμα. Μία σχηματική

απεικόνιση των μηχανισμών με τους οποίους ελέγχεται η ομοιάσταση της γλυκόζης τόσο σε στάδιο νηστείας όσο και μεταγευματικά βρίσκεται στο Σχήμα 2.



Σχήμα 2 - Μηχανισμοί ομοιάστασης της γλυκόζης σε στάδιο νηστείας και μεταγευματικά [8]

Έτσι λοιπόν, στους διαβητικούς ασθενείς και τους ασθενείς με ινσουλινοαντίσταση όπου η έκκριση ινσουλίνης παρουσιάζει επιπλοκές, η ΜΥ που προκύπτει μετά την κατανάλωση γεύματος δεν είναι διαχειρίσιμη προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο ανωμαλίες στα επίπεδα και το μεταβολισμό της γλυκόζης.

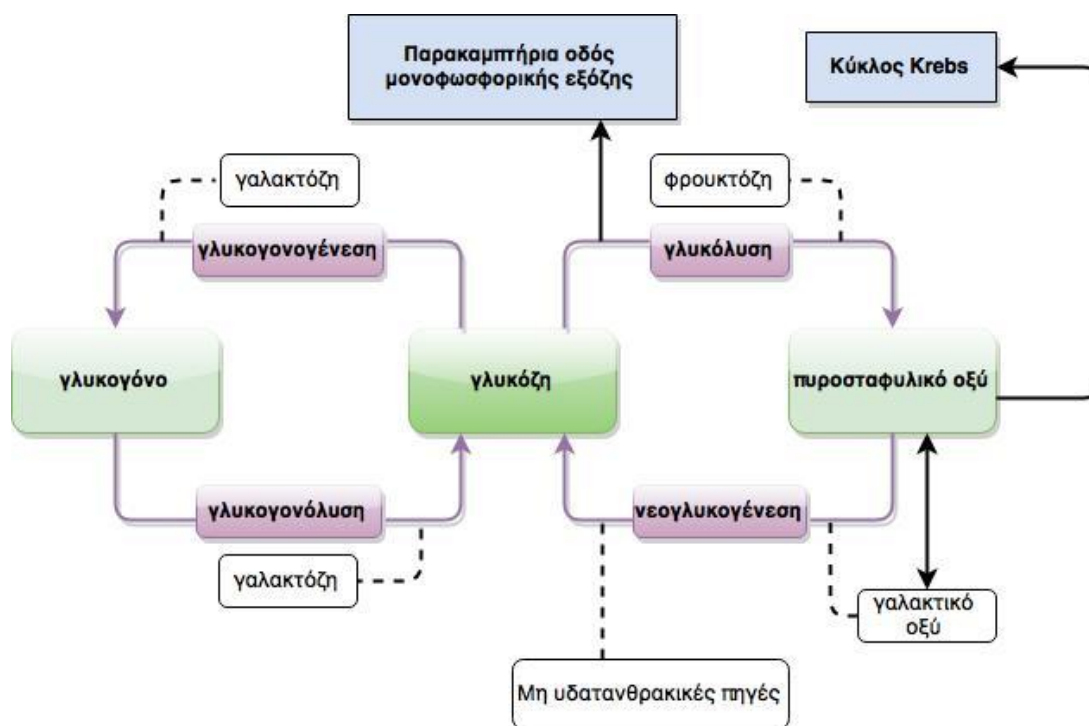
Πέρα από τον προαναφερέντα μεταφορέα, υπάρχουν και 5 ακόμη πρωτεϊνικοί GLUT μεταφορείς της γλυκόζης που είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση του μονοσακχαρίτη από την κυκλοφορία του αίματος, οι οποίοι εντοπίζονται σε διάφορους ιστούς. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί πως οι GLUT-1 και GLUT-3

θεωρούνται οι βασικοί μεταφορείς της γλυκόζης στα κύτταρα, με τη συγκέντρωσή τους να παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από ορμονικά ερεθίσματα (π.χ. ινσουλίνη).

Έχοντας αναφέρει τα παραπάνω, είναι κατανοητό πως το βασικό όργανο ελέγχου της φυσιολογικής συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα μέσω του μηχανισμού αυτού αποτελεί το ήπαρ. Μέσω των μεταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα στο ήπαρ ο μονοσακχαρίτης α) απομακρύνεται από το αίμα ή β) ελευθερώνεται προς το αίμα. Η πρώτη περίπτωση σχετίζεται με τη σύνθεση γλυκογόνου και την παραγωγή ενέργειας, ενώ η δεύτερη με τη γλυκογονόλυση και τη νεογλυκογένεση.

Πέρα όμως από το ποσοστό της απορροφούμενης από το βλεννογόνο γλυκόζης που κατευθύνεται προς το ήπαρ, μέρος αυτής της εξωγενούς αυτής γλυκόζης διαφεύγει από το ήπαρ και κυκλοφορεί προς τους ιστούς του σώματος. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο εγκέφαλος, ο οποίος τη χρησιμοποιεί ως αποκλειστικό ενεργειακό υπόστρωμα για τη λειτουργία του. Άλλοι ιστοί που αξιοποιούν αυτή τη γλυκόζη αποτελούν τα ερυθρά αιμοσφαίρια, ο λιπώδης και ο μυϊκός ιστός.

Τελικά, η μεταβολική πορεία των μονοσακχαριτών εξαρτάται από τις ενεργειακές απαιτήσεις του οργανισμού. Πέρα όμως από τη ρύθμιση της πορείας αυτής μέσω του παραπάνω ορμονικού συστήματος λαμβάνει μέρος και αλλοστερική ενεργοποίηση ή καταστολή ενζύμων. Η μεταβολική αυτή τύχη των μονοσακχαριτών απεικονίζεται συνοπτικά στο Σχήμα 3.



Σχήμα 3 - Κυριότερες οδοί του μεταβολισμού των υδατανθράκων [4]

1.1.3. Κλινικές Επιπτώσεις

Γνωρίζοντας τη βιολογική σημασία της γλυκόζης και της ομοιόστασης της στον οργανισμό, είναι λογικά τα ευρήματα επιστημόνων παγκοσμίως σχετικά με την υπεργλυκαιμία γενικά, αλλά και την ΜΥ ειδικότερα, και τη συσχέτιση τους με πληθώρα παθήσεων και κλινικών επιπτώσεων, είτε με αιτιολογική σχέση είτε ως παράγοντας επιδείνωσης. Παρακάτω, παρατίθενται μερικές κλινικές επιπτώσεις της υπεργλυκαιμίας, με έμφαση σε ήδη εγκατεστημένες παθήσεις, κυρίως λόγω της συχνά συνοδής αδυναμίας για επαρκή διαχείριση της αύξησης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Σχετικά πάντως με την ΜΥ συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί πως οι αρνητικές επιπτώσεις της επαναλαμβανόμενης ΜΥ αρχίζουν να παρατηρούνται μέσα σε μόλις λίγους μήνες [6].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα των επιπλοκών που προκαλεί η υπεργλυκαιμία αποτελεί η συμβολή της στο ρυθμό εξέλιξης της IGT προς **διαβήτη** τύπου II, μέσω της δυσλειτουργίας που προκαλεί στα β-κύτταρα του παγκρέατος [9]. Πιο ειδικά, η σημασία της ΜΥ για το διαβήτη γίνεται εμφανής από το ότι η μείωση των υψηλών κορυφών στη συγκέντρωση της γλυκόζης μεταγευματικά αποτελεί ίσως τον πιο απλό τρόπο μείωσης της πιθανότητας ανάπτυξης αυτής της μεταβολικής νόσου [10]. Επίσης, πιθανολογείται πως στα αρχικά στάδια του διαβήτη πριν τις δομικές αλλαγές στους νεφρούς και ειδικά σε ασθενείς με κακό γλυκαιμικό έλεγχο, επεισόδια υπεργλυκαιμίας μπορεί να συμβάλλουν στην μικροαλβουμινουρία [11].

Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει πως η έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο πλάσμα του αίματος αποτελεί ανεξάρτητο και κλινικά σημαντικό παράγοντα κινδύνου **καρδιαγγειακής νόσου**, τόσο σε μη διαβητικούς όσο και σε διαβητικούς ασθενείς [12]. Κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται πιο συγκεκριμένα και για τον μεταγευματικό δυσμεταβολισμό στο σύνολο του [13].

Έχει επίσης βρεθεί ότι η διατήρηση της HbA_{1c} σε επίπεδα μικρότερα από 7.0% μπορεί να προλάβει ή ακόμη και να μειώσει την εξέλιξη νόσων όπως η νευροπάθεια, οι νεφροπάθειες και η ρετινοπάθεια σε ασθενείς με διαβήτη τύπου I και II [14]. Λαμβάνοντας υπόψιν πως η HbA_{1c} αντανακλά τα επίπεδα γλυκόζης των τελευταίων τριών μηνών, συμπεριλαμβανομένων των προ- και μετα-γευματικών επιπέδων, γίνεται εμφανής η σχέση μεταξύ της ΜΥ και των **μικρο-αγγειακών** αυτών παθήσεων. Οι ερευνητές, παρόλα αυτά, δεν επιθυμούν μια εστίαση μόνο σε τέτοιες μικρο-αγγειακές επιπλοκές, καθώς φαίνεται πως οι μακρο-αγγειακές επιπλοκές (π.χ. αθηροσκλήρωση) αποτελούν έναν από τους βασικούς παράγοντες θνησιμότητας σε διαβητικούς τύπου II. Για παράδειγμα, ακόμα και σε διαβητικούς ασθενείς αρχικού σταδίου, όπου η γλυκόζη νηστείας και η HbA_{1c} κυμαίνονται σε φυσιολογικά επίπεδα, φαίνεται πως η ΜΥ μπορεί να ευθύνεται για εγκεφαλικά επεισόδια ή έμφραγμα του μυοκαρδίου [15].

Πέρα από τις προαναφερθείσες αγγειακές επιπλοκές, επεισόδια υπεργλυκαιμίας, σε συνδυασμό με τη χρόνια φλεγμονή και την υπερινσουλιναίμία, φαίνεται πως παίζουν ρόλο στην εξέλιξη και την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων και τελικά **καρκινικών όγκων** [16]. Είναι άλλωστε γνωστό ότι η γλυκόζη πλάσματος συχνά χρησιμοποιείται σαν δείκτης επιβίωσης σε καρκινικούς ασθενείς, κυρίως επειδή τα καρκινικά κύτταρα *in vitro* φαίνεται να αξιοποιούν υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης στο περιβάλλον τους, αυξάνοντας την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εξάπλωση και τη μετάσταση τους [17].

Γενικότερα, η δυσγλυκαιμία, η οποία περιλαμβάνει την υπεργλυκαιμία ($>126\text{mg/dl}$), την υπογλυκαιμία ($<70\text{mg/dl}$) αλλά και την αυξημένη γλυκαιμική μεταβλητότητα (με τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων $\geq 29\text{mg/dl}$), έχει βρεθεί πως αποτελεί παράγοντα κινδύνου για λοίμωξη και θνησιμότητα σε ασθενείς με αιματολογικές κακοήθειες που υπόκεινται **μεταμόσχευση αιμοποιητικών κυττάρων** [18]. Αυτά τα αποτελέσματα συγκεκριμενοποιούνται για την υπεργλυκαιμία και από άλλες μελέτες, οι οποίες υποδεικνύουν σχέση μεταξύ αυξημένης γλυκόζης αίματος και λοιμώξεων, απόρριψη μοσχεύματος, χρόνου παραμονής σε κλινικό περιβάλλον, αλλά και γενικότερης επιβίωσης σε τέτοιους ασθενείς [19].

Όσον αφορά τους **νοσηλευόμενους ασθενείς** με χρόνιες παθήσεις ή και σε κρίσιμο στάδιο (π.χ. ασθενείς στη Μονάδα Εντατικής Θεραπείας – ΜΕΘ), φαίνεται πως οι πιο συχνές επιπλοκές που σχετίζονται με το μεταβολισμό της γλυκόζης είναι η υπεργλυκαιμία και η ινσουλινοαντίσταση [20]. Αυτές οι δυο διαταραχές οφείλονται συνήθως στις καταβολικές ορμόνες (γλυκαγόνη, επινεφρίνη, κορτιζόλη) οι οποίες αυξάνουν την ηπατική γλυκογονόλυση και γλυκονεογένεση [20], αλλά συναντώνται και ως αποτέλεσμα διαταραχής στο αμυντικό σύστημα του ασθενούς (π.χ. λόγω χαμηλής κινητικότητας πολυμορφοπύρηνων λευκοκυττάρων) [21]. Έτσι, μια αρρύθμιστη και εκτός ελέγχου υπεργλυκαιμία συσχετίζεται με διαταραχές σε υγρά και ηλεκτρολύτες αλλά και με αυξημένο κίνδυνο για λοιμώξεις σε τέτοιους ασθενείς [21]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η οξεία νεφρική ανεπάρκεια που σε νοσηλευόμενους ασθενείς συχνά συνοδεύεται από υπερμεταβολικές καταστάσεις που εκφράζονται ανάμεσα στα άλλα και με υπεργλυκαιμία (άλλες εκφράσεις αυτού του υπερμεταβολισμού αποτελούν ο αυξημένος πρωτεϊνικός καταβολισμός και η υπερτριγλυκεριδαίμία) [20].

Έχει επίσης βρεθεί πως ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη **κυστικής ίνωσης** έχουν προοδευτικά χειρότερη λειτουργία των πνευμόνων αλλά και αυξημένες πιθανότητες για βακτηριακές λοιμώξεις του θώρακα σε σχέση με εκείνους που δεν παρουσιάζουν διαβήτη, εν μέρει λόγω της υπεργλυκαιμίας στους αεραγωγούς [22]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως ασθενείς κυστικής ίνωσης με διαταραχή ανοχής στη γλυκόζη παρουσιάζουν υψηλότερο πρωτεϊνικό καταβολισμό, οδηγώντας σε επιδείνωση της πνευμονοπάθειας [23].

Πέρα από τις παραπάνω παθολογικές επιπτώσεις, η υπεργλυκαιμία φαίνεται πως παίζει ρόλο και στη **γνωσιακή λειτουργία** του οργανισμού, τόσο σε ασθενείς με διαβήτη ή προ-διαβήτη όσο και σε μη διαβητικά άτομα [24]. Οι μηχανισμοί που πιθανολογείται πως επηρεάζουν την εγκεφαλική λειτουργία μέσω της υπεργλυκαιμίας ενοχοποιούν την έκθεση του εγκεφάλου σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Σχετικά με αυτό, είναι χαρακτηριστικό πως βιοχημικές αναλύσεις μετά θάνατο στον εγκέφαλο ασθενών με Νόσο Αλτσχάιμερ έδειξαν αυξημένη συγκέντρωση σε εκείνους τους δείκτες οξειδωτικού στρες που έχουν συσχετιστεί με την υπεργλυκεριδαμία [25], οι οποίοι θα αναφερθούν παρακάτω.

1.2. ΜΥ και Οξειδωτικό Στρες

1.2.1. Παθοφυσιολογία

Η παθοφυσιολογία της υπεργλυκαιμίας είναι γνωστό από πληθώρα μελετών ότι προκαλεί:

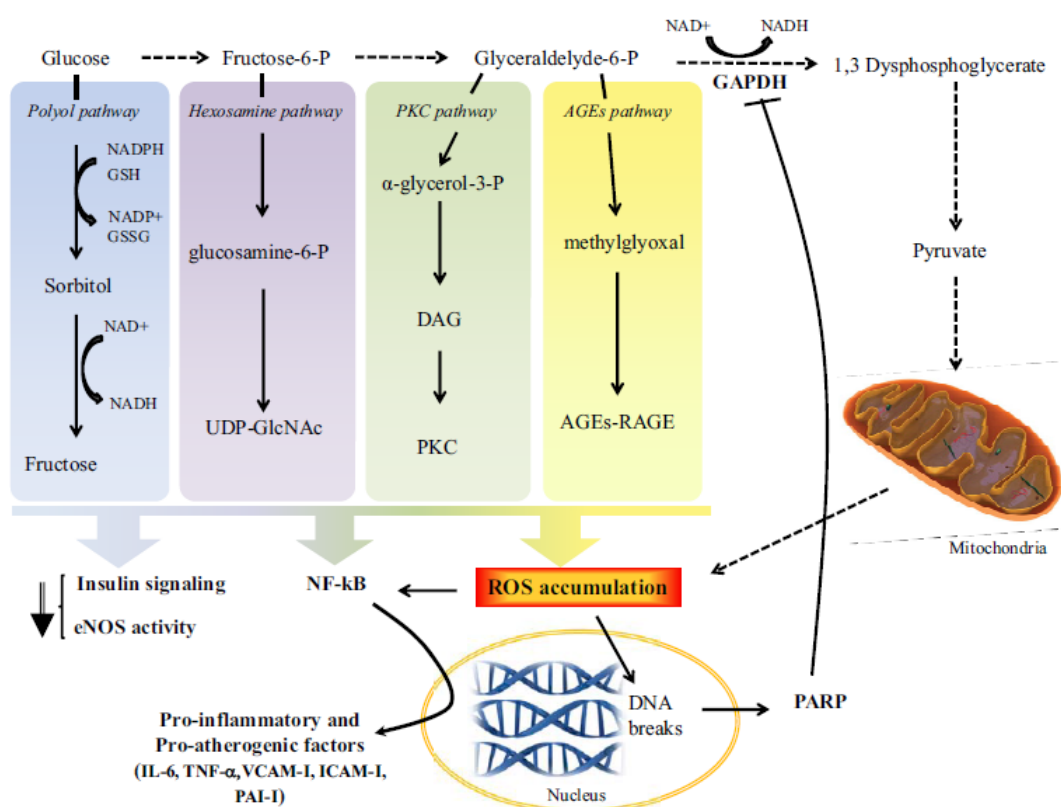
1. Ενισχυμένη δραστηριότητα πολυολών
2. Αυξημένη δημιουργία τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (advanced glycation end products – AGEs) και ενεργοποίηση των υποδοχέων τους
3. Ενεργοποίηση των ισομορφών β,δ και α της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)
4. Ενεργοποίηση της πορείας εξοζαμίνης
5. Μείωση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών άμυνας

Αυτές οι βιοχημικές πορείες που ενεργοποιούνται από την υπεργλυκαιμία σχετίζονται, ανάμεσα στα άλλα, και με **αύξηση στο οξειδωτικό στρες στα κύτταρα του οργανισμού** [26]. Πρακτικά, το οξειδωτικό στρες προκύπτει όταν η παραγωγή των προ-οξειδωτικών μορφών επικαλύψει τη δράση των αντιοξειδωτικών παραγόντων [27]. Κάτι τέτοιο προωθεί την οξείδωση βιομορίων με περαιτέρω απώλεια της βιολογικής τους λειτουργίας, προκαλώντας τελικά βλάβες τόσο σε κυτταρικό όσο και σε ιστικό επίπεδο.

Ο τρόπος με τον οποίο η υπεργλυκαιμία προκαλεί αύξηση οξειδωτικού στρες έχει μελετηθεί από επιστήμονες διεξοδικά. Η γενική ιδέα είναι ότι η υπεργλυκαιμία επάγει την παραγωγή **ενεργών μορφών οξυγόνου** και αζώτου (reactive oxygen species – **ROS**, nitrogen reactive oxygen species – **NOS**) [28], οι οποίες με τη σειρά τους πλήττουν το κύτταρο προκαλώντας βλάβες σε πολλές από τις μεταβολικές του διεργασίες και λειτουργίες. Σε αυτό το σημείο είναι σημαντικό να αναφερθεί πως τα μόρια ROS/NOS δεν διαθέτουν μόνο επιβλαβή ρόλο, καθώς παράγονται φυσιολογικά στον οργανισμό και αποτελούν ρυθμιστικά μόρια στις μεταβολικές διεργασίες του κυττάρου διαμέσω ενεργοποίησης αλληλουχιών ενζύμων και μεταγραφικών παραγόντων [29].

Οι ROS αποτελούνται από ελεύθερες ρίζες με ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική τους στοιβάδα (π.χ. ανιόν υπεροξειδίου, ρίζα υδροξυλίου, υδροπεροξύλιο, περοξύλιο, αλκοξύ, ελεύθερη ρίζα μονοξειδίου του αζώτου, ελεύθερη ρίζα διοξειδίου του αζώτου) και από μη ριζικές δραστικές μορφές (π.χ. υπεροξειδίο του υδρογόνου, υπεροξεινιτρώδες ανιόν, υποξειδίο του αζώτου) [27] [30].

Οι βιοχημικές πορείες μέσω των οποίων προκαλείται αύξηση του οξειδωτικού στρες στα κύτταρα του οργανισμού σε υπεργλυκαιμικό στάδιο, περιγράφονται συνοπτικά στο Σχήμα 4, το οποίο αναλύεται παρακάτω.



Σχήμα 4 - Βιοχημικές πορείες οξειδωτικού στρες σε υπεργλυκαιμικό στάδιο [23]

Υπό ενδοκυτταρικές υπεργλυκαιμικές καταστάσεις η γλυκόζη μέσω της πορείας των πολυολών μετατρέπεται στη πολυαλκοόλη σφοριτόλη η οποία με τη σειρά της μειώνει τις ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις των αντιοξειδωτικών παραγόντων NADPH και GSH και συνεπώς επάγει την υπερπαραγωγή O_2^- . Η συσσώρευση τέτοιας ROS αναστέλλει την αφυδρογονάση της 6-φωσφο-γλυκόζης, ενός ενζύμου απαραίτητου για την παραγωγή των αναγωγικών ισοδυνάμων NADPH, τα οποία σε συνεργασία με την GSH συμβάλλουν στην αποικοδόμηση των οργανικών υδροπεροξειδίων, ενισχύοντας με αυτόν τον τρόπο το οξειδωτικό στρες. Επιπλέον η σφοριτόλη μεταβολίζεται σε φρουκτόζη από την αφυδρογονάση της σφοριτόλης αυξάνοντας την ενδοκυτταρική αναλογία NADH/NAD⁺, η οποία οδηγεί σε αναστολή της αφυδρογονάσης της 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδης (GAPDH). Αυτό με τη σειρά

του αυξάνει τη συγκέντρωση της φωσφο-τριόζης. Υψηλότερα επίπεδα φωσφο-τριοζών προωθούν τη δημιουργία μεθυλογλυοξάλης (μιας πρόδρομης ένωσης των AGEs) και της διακυλογλυκερόλης (μέσα από την 3-φωσφο-α-γλυκερόλη), ενεργοποιώντας έτσι την PKC.

Η χρόνια υπεργλυκαιμία επίσης αυξάνει στη κυκλοφορία τη συγκέντρωση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων, ενδοθηλίνης-I και αγγειοτενσίνης II, τα οποία **ενεργοποιούν ισομορφές της PKC** δεσμευόμενα σε υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης. Οι ισομορφές της PKC επίσης ενεργοποιούνται, έμμεσα και άμεσα, μέσα από την αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων λιπαρών οξέων στον ορό. Η ενεργοποίηση αυτή συμβάλλει στην αγγειακή καταστροφή που προκαλεί η υπεργλυκαιμία, αναστέλλοντας την ισουλινο-διεγερόμενη έκφραση της ενδοθηλιακής συνθάσης του οξειδίου του αζώτου (eNOS) στα ενδοθηλιακά κύτταρα και την παραγωγή μονοοξειδίου του αζώτου στα λεία μυϊκά κύτταρα, αυξάνοντας την έκφραση του αναστολέα I του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-I) και του πυρηνικού παράγοντα κ-B (NF-κB), και τέλος, προωθώντας τη δραστηριότητα της οξειδάσης του NADPH, ενός προ-οξειδωτικού ενζύμου.

Η υπερπαραγωγή ROS που οφείλεται στην υπεργλυκαιμία επίσης διαμεσολαβεί στη **δέσμευση των AGEs στους υποδοχείς τους (RAGE)**. Οι υψηλότερες ενδοκυτταρικές συγκεντρώσεις γλυκόζης οδηγούν στην αυτό-οξείδωση της γλυκόζης σε γλυοξάλες, τη μετατροπή του προϊόντος Amadori (ενδιάμεσο της παραγωγής AGEs κατά τη γλυκοζυλίωση) σε 3-δεοξυ-γλυκοσόνη και την αποικοδόμηση της 3-φωσφο-γλυκεριναλδεϋδης και της φωσφο-δι-υδρο-ακετόνης σε μεθυλο-γλυοξάλη. Αυτές οι ουσίες αντιδρούν με ελεύθερες αμινομάδες των ενδο- και των εξωκυτταρικών πρωτεϊνών, συνθέτοντας AGEs. Η σύνδεση των AGEs στους υποδοχείς τους επάγει την παραγωγή ενδοκυτταρικών ROS και την μετέπειτα ενεργοποίηση του οξειδοαναγωγικά ευαίσθητου μεταγραφικού παράγοντα NF-κB, ο οποίος ελέγχει την έκφραση μίας ποικιλίας γονιδίων που σχετίζονται με την φλεγμονή και την αθηροσκλήρωση (π.χ. ιντερλευκίνη-6, PAI-I). Επιπλέον, τα AGEs που είναι παρόντα στο εξωκυτταρικό πλέγμα μειώνουν την ελαστικότητα και την διαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου μειώνοντας την ενδοθηλιο-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή.

Τέλος, η **ενεργοποίηση της πορείας της εξοζαμίνης** συμβάλλει στην αγγειακή καταστροφή που προκαλεί η υπεργλυκαιμία λόγω της ικανότητας της να εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως είναι η μεταγωγή σημάτων, η μεταγραφική δραστηριότητα ή η απόπτωση. Σε αυτή την πορεία η γλυκόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφο-γλυκοζαμίνη από μια αμιδοτρανσφεράση (την αμιδοτρανσφεράση της L-γλουταμίνης:6-φωσφο-D-φρουκτόζη - GFAT). Η 6-φωσφο-γλυκοζαμίνη μεταβολίζεται περαιτέρω σε ουριδιλο-διφωσφο-N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη (UDP-GlcNAc) που χρησιμοποιείται από την UDP-GlcNAc τρανσφεράση (OGT) για την ενζυμική γλυκοζυλίωση πολλών πρωτεϊνών, όπως είναι οι μεταγραφικοί

παράγοντες, οι οποίοι με τη σειρά τους ελέγχουν την έκφραση γονιδίων προ-φλεγμονωδών και προ-θρομβωτικών παραγόντων όπως του PAI-I. Η ενεργοποίηση της πορείας εξοζαμίνης μπορεί επίσης να αναστέλλει την δραστηριότητα της eNOS, προσβάλλοντας την ινσουλινο-διεγερόμενη πορεία του υποστρώματος (IRS)/κινάσης της 3-φωσφατίδυλο-λινωσιτόλης (PI3-K)/πρωτεϊνικής κινάσης B στον ινσουλινο-διεγερόμενο υποδοχέα, και προωθώντας το οξειδωτικό στρες αυξάνοντας την παραγωγή ROS.

Η υπερπαραγωγή ROS από την μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων θεωρείται εκείνος ο μηχανισμός που προκαλεί η υπεργλυκαιμία ο οποίος βρίσκεται πίσω από τους παθογενικούς μηχανισμούς που περιγράφηκαν παραπάνω.

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα NADH και FADH₂ που παράγονται από τον κύκλο του Krebs μεταφέρονται στα μιτοχόνδρια, όπου λειτουργούν ως δότες ηλεκτρονίων στα μιτοχονδριακά μεμβρανικά οξειδοαναγωγικά σύμπλοκα ενζύμων. Τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται διαμέσω των οξειδοαναγωγικών συμπλόκων I, II, III και IV (κυτόχρωμα c) μέχρι να φθάσουν στο μοριακό οξυγόνο, συνθέτοντας τελικά νερό. Η μεταφορά ηλεκτρονίων στα σύμπλοκα αυτά παράγει μια βαθμίδωση πρωτονίων στην εξωμιτοχονδριακή μεμβράνη, δημιουργώντας μια διαφορά δυναμικού μεταξύ της ενδο- και της εξωμιτοχονδριακής μεμβράνης που τελικά είναι υπεύθυνη για τη σύνθεση ATP. Η μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλοκο II στο III παράγει και ROS ως υποπροϊόντα, των οποίων τα επίπεδα στην φυσιολογική οξειδωτική φωσφορυλίωση είναι χαμηλά ενώ εξουδετερώνονται από ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά όπως είναι η γλουταθειόνη (GSH) και η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD). Σε υπεργλυκαιμική κατάσταση, τα υψηλότερα επίπεδα πυροσταφυλικού αυξάνουν τη συγκέντρωση ακετυλο-CoA μέσα από τον κύκλο του Krebs οδηγώντας σε υψηλότερη παραγωγή NADH και FADH₂. Με αυτόν τον τρόπο αυξάνεται τελικά η ροή των NADH και FADH₂ στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων και συνεπώς αυξάνεται και η ηλεκτροχημική κλίση στη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Σε αυτό το σημείο, η μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλοκο III έχει αποκλειστεί προκαλώντας την επιστροφή των ηλεκτρονίων πίσω στο συνένζυμο Q₁₀ (ουβικινόνη), το οποίο **τα δίνει στο μοριακό οξυγόνο δημιουργώντας έτσι υπερυπεροξειδίο (O₂^{·-})**. Η επαναφορά της μιτοχονδριακής παραγωγής ROS στα φυσιολογικά επίπεδα μέσα από την πρωτεΐνη αποσύζευξης 1 (UCP-1) και τη SOD αποτρέπει τη συσσώρευση ROS που προκαλείται από την υπεργλυκαιμία και αποκλείει τη συγκεκριμένη πορεία.

Αυτή η υπερ-παραγωγή υπεροξειδίου, ειδικά στο ενδοθήλιο και ιδιαίτερα σε στάδιο MY [26], συνοδεύεται από αυξημένη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου (NO): η αυξημένη συγκέντρωση του ανιόντος του υπεροξειδίου μειώνει τη δραστηριότητα της ενδοθηλιακής συνθάσης NO (eNOS) και, διαμέσω του NF-κB και της PKC, ενεργοποιεί το NAD(P)H και αυξάνει την έκφραση της επαγωγίσιμης συνθάσης NO

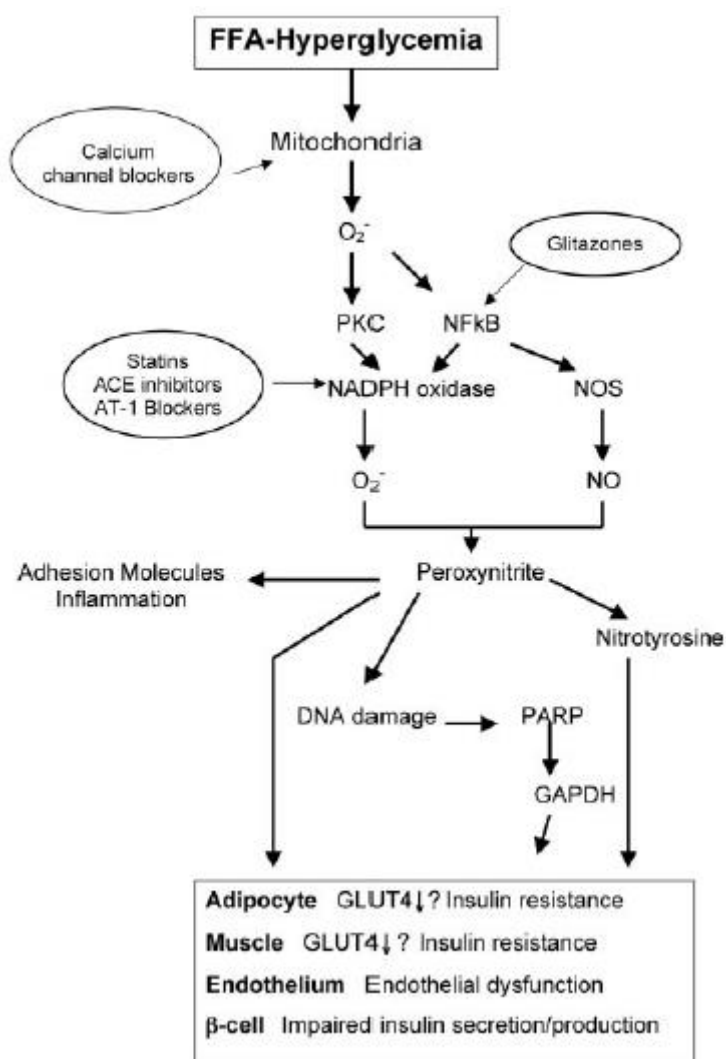
(iNOS), οδηγώντας τελικά σε αυξημένη παραγωγή NO. Με αυτή τη διαδικασία ευνοείται η δημιουργία του ισχυρού οξειδωτικού **ανιόντος υπεροξεινιτρώδους** (ONOO⁻) το οποίο καταστρέφει το DNA, προάγοντας την ενεργοποίηση του πυρηνικού ενζύμου PARP, το οποίο όπως αναφέρθηκε παραπάνω αναστάλλει τη δραστηριότητα της GAPDH, μέσα από μια ADP ριβοζιλίωση της. Ο τρόπος με τον οποίο η PARP επηρεάζει την GAPDH περιλαμβάνει τη μείωση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης NAD⁺ (και έτσι μειώνονεται ο ρυθμός της γλυκόλυσης, της μεταφοράς ηλεκτρονίων και της δημιουργίας ATP).

Επιπλέον, η υπεργλυκαιμία δεν επάγει τη δημιουργία ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα όπου η μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων έχει ανασταλεί. Η αναστολή της δραστηριότητας της GAPDH που προκαλεί η υπεργλυκαιμία δεν συμβαίνει όταν η μιτοχονδριακή υπερπαραγωγή του υπεροξειδίου αποτρέπεται από την UCP-1 και την SOD. Η αναστολή της GAPDH από την πολυμεράση της πολυ-ADP-ριβοζης (PARP) αποτρέπεται από την παρουσία UCP-1 ή SOD. Η αναστολή της δραστηριότητας του GAPDH οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα όλων των γλυκολυτικών ενδιάμεσων πάνω από την GAPDH και συνεπώς προωθεί την ροή στις τέσσερις πορείες που περιγράφηκαν παραπάνω. Αυξημένα επίπεδα των γλυκολυτικών μεταβολιτών πάνω από την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη ενεργοποιούν την πορεία των AGEs προωθώντας τη σύνθεση μεθυλο-γλυοξάλης. Στην ουσία, η 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη μετατρέπεται μη ενζυμικά σε μεθυλο-γλυοξάλη, που αποτελεί την κύρια ενδοκυτταρική πρόδρομη ένωση των AGEs και επίσης μπορεί να επάγει την έκφραση των RAGE. Η αυξημένη 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη επίσης ενεργοποιεί την πορεία της PKC επειδή ο φυσιολογικός ενεργοποιητής της είναι η DAG, η οποία επίσης προκύπτει από την 3-φωσφο-γλυκεριναλδεΐδη. Προχωρώντας πιο πάνω στην κύρια γλυκολυτική πορεία, τα αυξημένα επίπεδα της 6-φωσφο-φρουκτόζης ενεργοποιούν την πορεία της εξοζαμίνης, όπου ο μεταβολίτης μετατρέπεται από το ένζυμο GFAT σε UDP-GlcNAc, ενώ τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης διαμέσω της πορείας των πολυολών μετατρέπεται σε σορβιτόλη.

Αξίζει να αναφερθεί πως στο μυϊκό και το λιπώδη ιστό, ως προσπάθεια του κυττάρου να μην αυξήσει την παραγωγή ROS από την υπερβολική συγκέντρωση NADH, αδρανοποιεί την ινσουλινο-εξαρτώμενη διέγερση των υποδοχέων οι οποίοι εισάγουν τη γλυκόζη στο κύτταρο (π.χ. GLUT-4), οδηγώντας τελικά σε ινσουλινοαντίσταση [7]. Τέτοιος μηχανισμός δεν υπάρχει στα β-κύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εισάγουν τη γλυκόζη στο εσωτερικό τους με διευκολυνόμενη διάχυση, γεγονός που οδηγεί αυτόματα στις διαδικασίες που περιγράφονται παραπάνω.

Προχωρώντας, το ανιόν του υπεροξεινιτρώδους που προκύπτει από την ταυτόχρονη υπερ-παραγωγή του υπεροξειδίου και του NO, θεωρείται κυτταροτοξικό λόγω της ικανότητας του να οξειδώνει σουλφυδρυλομάδες σε πρωτεΐνες, να προκαλεί έναρξη

της λιπιδικής υπεροξείδωσης και να συμμετέχει σε αντιδράσεις νίτρωσης αρωματικών δακτυλίων σε αμινοξέα όπως η τυροσίνη, επηρεάζοντας πολλά μονοπάτια μεταγωγής σήματος [30] [31]. Έτσι, η παραγωγή υπεροξεινιτρώδους μπορεί να συναχθεί με την παρουσία **νιτροτυροσίνης**, η συγκέντρωση της οποία ούτως ή άλλως φαίνεται να αυξάνεται στο αίμα και τους ιστούς σε υπεργλυκαιμικό στάδιο [32]. Στο παρακάτω συγκεντρωτικό σχήμα 5 βρίσκεται μια περιληπτική απεικόνιση όλων των παραπάνω διαδικασιών.



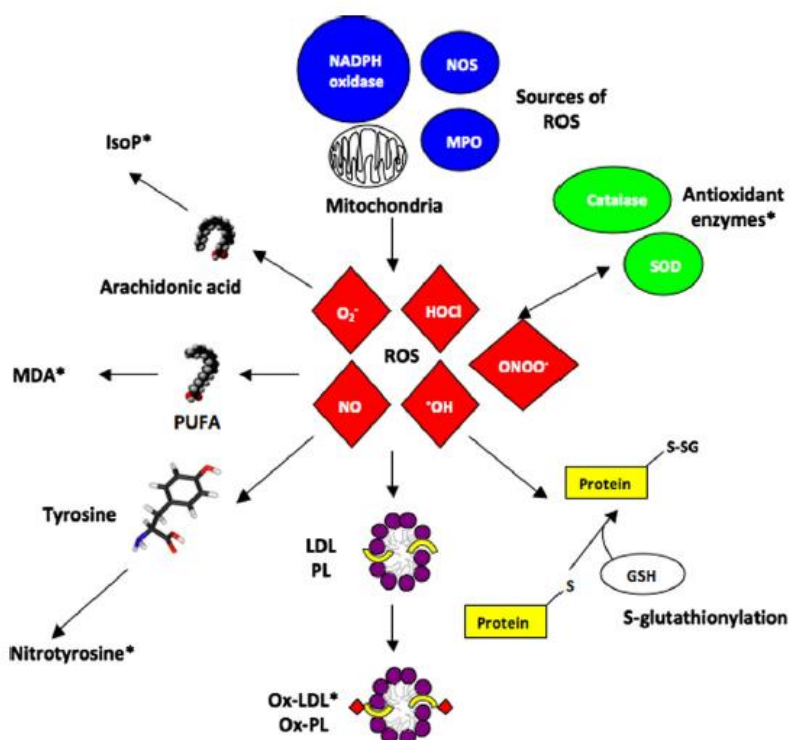
Σχήμα 5- Μηχανισμός επίδρασης της υπεργλυκαιμίας σε κύτταρα και ιστούς [10]

1.2.2. Δείκτες οξειδωτικού στρες στην ΜΥ

Η παρουσία του οξειδωτικού στρες στο μεταγευματικό υπεργλυκαιμικό στάδιο αποδεικνύεται με έμμεσο και άμεσο τρόπο [32]. Ο έμμεσος τρόπος περιλαμβάνει την μελέτη της δράσης ή τον προσδιορισμό των **αντιοξειδωτικών ενώσεων και ενζύμων** στο μεταγευματικό στάδιο, τα οποία φαίνεται πως μειώνουν την έκφραση και την ένταση μερικών φαινομένων που παρατηρούνται στην ΜΥ, όπως π.χ. την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε πως μετά τη χορήγηση ασκορβικού οξέος (βιταμίνης C) ύστερα από οξεία επαγωγή

υπεργλυκαιμίας από δεξτρόζη 50%, επανακτήθηκε η αγγειοδιαστολή μέσω του ενδοθηλίου σε υγιείς εθελοντές [33]. Από την άλλη πλευρά, ο άμεσος τρόπος περιγράφεται μέσα από τον προσδιορισμό **δεικτών οξειδωτικού στρες** σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας. Κάτι τέτοιο αποκτά ιδιαίτερη σημασία για τον έγκαιρο εντοπισμό των μεταβολικών διαδικασιών που προκαλούν χρόνιες μεταβολικές παθήσεις, όπως ο διαβήτης [27].

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες μπορούν να θεωρηθούν τα μόρια ROS ή να αποτελούν προϊόντα των μεταβολικών διεργασιών που ενεργοποιούνται από την παρουσία ROS όπως είναι η **λιπιδική υπεροξειδωση**, η **οξείδωση πρωτεϊνών** και η **οξείδωση νουκλεϊκών οξέων** [30]. Η λιπιδική υπεροξειδωση αποτελείται από σειρά αλυσιδωτών αντιδράσεων με στόχο κυρίως τα λιπαρά οξέα των φωσφολιποειδών των κυτταρικών μεμβρανών, επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο τη λειτουργία τους (π.χ. αλλάζοντας τη ρευστότητα). Η οξείδωση των πρωτεϊνών εξαρτάται από τα αμινοξέα που αυτές περιέχουν (π.χ. η μεθειονίνη και η τυροσίνη αποτελούν από τα πιο «ευάλωτα» αμινοξέα) καθώς και από τη θέση των οξειδούμενων αμινοξέων σε σχέση με το ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης. Τέλος, όσον αφορά την οξείδωση του DNA και του RNA, αυτή μπορεί να συμβεί και στις 4 βάσεις τους, με το RNA να οξειδώνεται ευκολότερα λόγω της παρουσίας του ελεύθερο στο κυτταρόπλασμα (σε αντίθεση με το προστατευόμενο από τον πυρήνα DNA) και το DNA να διαθέτει επιδιορθωτικούς και αποπτωτικούς μηχανισμούς ώστε να προστατεύσει το κύτταρο από τις μεταλλάξεις της οξείδωσης.

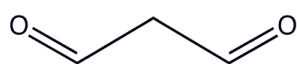


Σχήμα 6 - Βιολογικοί δείκτες οξειδωτικού στρες σε καρδιαγγειακά νοσήματα [30]. Μέρος του σχήματος περιγράφεται στην πορεία.

Συγκεντρωτικά, οι δείκτες (μερικοί από τους οποίους εντοπίζονται στο Σχήμα 6) που έχουν χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό οξειδωτικού στρες στη ΜΥ είναι οι εξής:

Λιπιδική υπεροξείδωση:

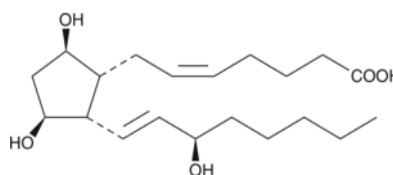
- Μηλονυλοδιαλδεΐδη (MDA)



Η MDA, μια πολύ δραστική αλδεΐδη, προκύπτει από την υπεροξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, με πιθανά ενδιάμεσα παράγωγα προσταγλαδίνες. Μπορεί να προκαλέσει καταστροφή στις μεμβράνες των κυττάρων και σχηματίζει ALEs (τελικά προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης λιπιδίων -advanced lipoxidation end products), ενώ αντιδρά με πρωτεΐνες. Η MDA αποτελεί έναν από τους πιο χαρακτηριστικούς δείκτες λιπιδικής βλάβης λόγω ROS και συνεπώς και οξειδωτικού στρες [28]. Σήμερα, θεωρείται πως πιθανώς πρόκειται για ανεξάρτητο αθηρογόνο μόριο [34]. Η παρουσία της συνήθως προσδιορίζεται μέσα από τον προσδιορισμό των δραστικών ουσιών θειοβαρβαριτικού οξέος (TBARS), οι οποίες πρακτικά αποτελούν αντίδραση του θειοβαρβαριτικού με την MDA [34] [35].

- Ισοπροστάνια (IsoPs)

Τα ισοπροστάνια αποτελούν, δομικά, παρόμοια μόρια των προσταγλανδινών F2 (PGF2) και προκύπτουν από την μη ενζυμική λιπιδική υπεροξείδωση απαραίτητων λιπαρών οξέων (και κυρίως αραχιδονικού) των φωσφολιποειδών των



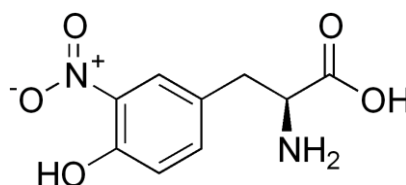
μεμβρανών που προκαλείται από ROS. Εντοπίζονται στη κυκλοφορία και σε διάφορους ιστούς, αφού μετά την υπεροξείδωση απελευθερώνονται από τις φωσφολιπάσες. Χαρακτηριστικός εκπρόσωπος στη βιβλιογραφία είναι η 8-ισο-προσταγλαδίνη F2α, της οποίας η δομή φαίνεται στην εικόνα (8-iso-PGF2α).

Άλλοι δείκτες λιπιδικής υπεροξείδωσης αποτελούν και οι ακροεΐνη, 4-υδροξυ-νονελανη (HNE), 4-οξονονελανη (ONE), όπως και οι ισολεβουγλανδίνες (IsoLGs).

Προϊόντα οξείδωσης πρωτεϊνών:

- Νιτροτυροσίνη (NT)

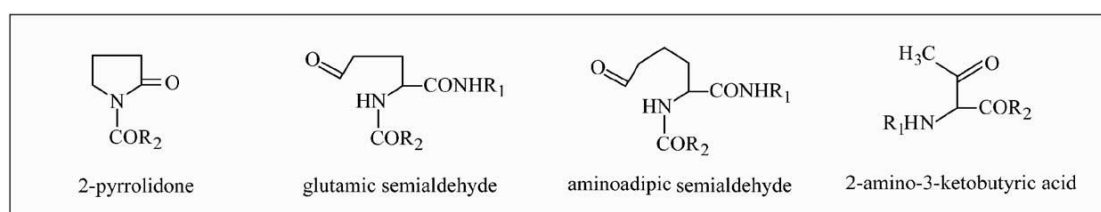
Η NT είναι προϊόν της νίτρωσης της τυροσίνης στην οποία διαμεσολαβούν RNS, όπως το ανιόν υπεροξεινιτρώδους και το διοξείδιο του αζώτου. Συνήθως προσδιορίζεται η συγκέντρωση της στον οργανισμό για τον έμμεσο προσδιορισμό του



ανιόντος υπεροξεινιτρώδους. Έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων πλάσματος σε NT και εκείνων σε γλυκόζη, ακόμα και σε υγιείς εθελοντές [36].

- Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν το προϊόν οξείδωσης των πρωτεϊνών και αναφέρονται ως ένας από τους πιο χαρακτηριστικούς δείκτες οξειδωτικού στρες στον οργανισμό [28], ειδικά μετά τις νεο-ανακαλυφθείσες συσχετίσεις μεταξύ της παθογένεσης τους και της εξέλιξης ασθενειών [29]. Ως πρωτεϊνική καρβονυλίωση αναφέρονται γενικά οι μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών, οι οποίες αποδίδουν μία δραστική καρβονυλική ομάδα στο μόριο (π.χ. αλδεΐδη, κετόνη, λακτάμη) [29].

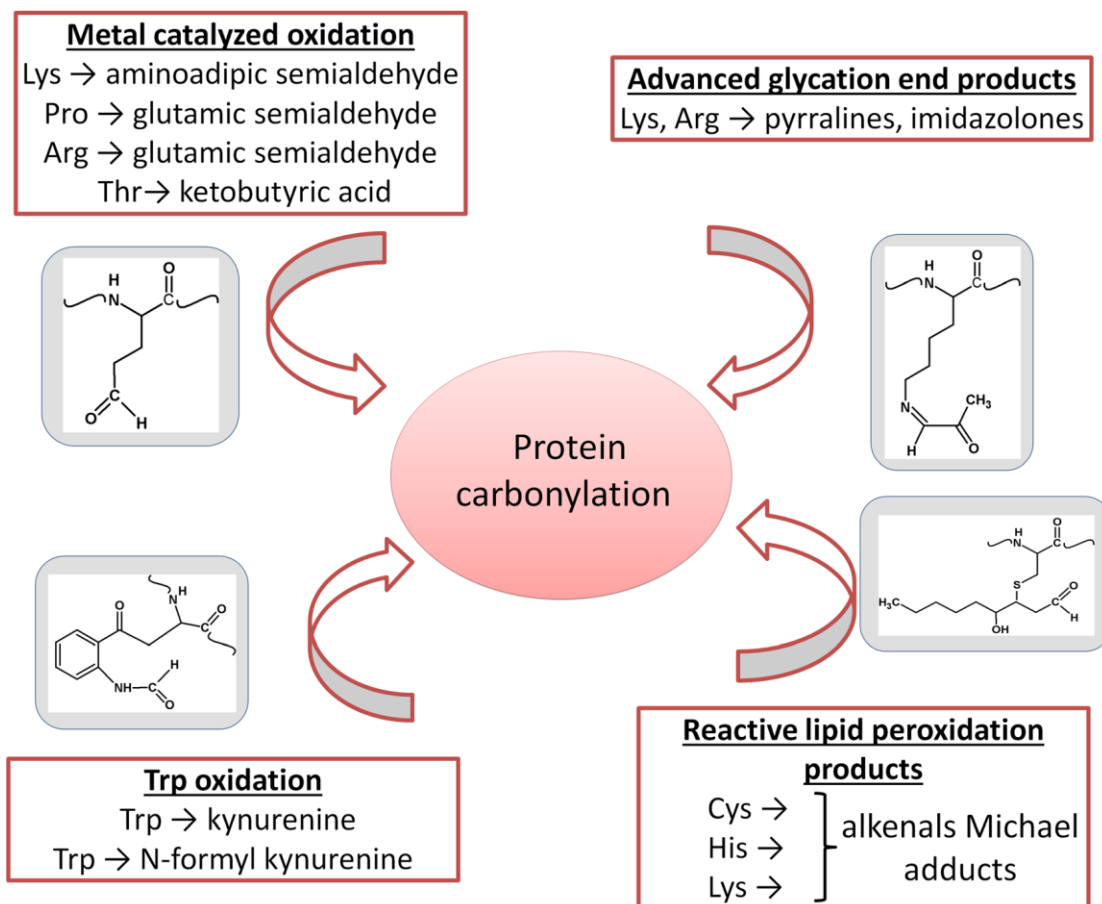


Σχήμα 7 - Δομή καρβονυλικών παραγώγων που προκύπτουν από την άμεση οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων αμινοξέων [37]. Κατά σειρά, οι παραπάνω ενώσεις προέρχονται από κατάλοιπα προλίνης, αργινίνης, λυσίνης και θρεονίνης.

Η πρώτη αντίδραση πρωτεϊνικής οξείδωσης που μελετήθηκε υπήρξε εκείνη που καταλύεται από μέταλλα [29]. Προκύπτει από την αντίδραση Fenton όταν μεταλλικά ιόντα ανάγονται παρουσία υπεροξειδίου και δημιουργούν ρίζες υδροξυλίου, οι οποίες οξειδώνουν τις πλευρικές αλυσίδες των αμινοξέων (Σχήμα 7) ή διασπούν το σκελετό των πρωτεϊνών. Κάτι τέτοιο οδηγεί στη δημιουργία ενός πεπτιδίου στο οποίο το N-τελικό αμινοξύ εμποδίζεται από ένα α-κετο-ακυλικό παράγωγο. Πέρα από τη δημιουργία των καρβονυλίων που καταλύεται από μέταλλα, αυτά μπορούν να προκύψουν και από άμεση οξείδωση καταλοίπων αμινοξέων, όπως χαρακτηριστικά της τρυπτοφάνης.

Επιπλέον, οι καρβονυλικές ομάδες μπορεί να εισαχθούν σε πρωτεΐνες διαμέσω δευτεροταγούς αντίδρασης των πυρηνόφιλων πλευρικών αλυσίδων καταλοίπων κυστεΐνης, ιστιδίνης και λυσίνης με αλδεΐδες (οι οποίες έχουν παραχθεί κατά τη λιπιδική υπεροξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων). Στον τελευταίο τρόπο παραγωγής πρωτεϊνικών καρβονυλίων αντιδρούν τα δραστικά καρβονυλικά παράγωγα της αντίδρασης αναγωγής σακχάρων (κετοαμίνες, κετοαλδεΐδες, δεοξυοσόνες), ή τα οξειδωτικά προϊόντα της αντίδρασης αυτής, με κατάλοιπα λυσίνης από πρωτεΐνες (γλυκοζυλίωση και γλυκοξείδωση) με τελική δημιουργία AGEs/ALEs (π.χ. καρβοξυ-μεθυλολυσίνη και μηλονυλοδιαλδεΐδη-λυσίνη).

Οι παραπάνω τρόποι δημιουργίας πρωτεϊνικών καρβονυλίων φαίνονται συνοπτικά στο Σχήμα 8.



Σχήμα 8- Πορείες δημιουργίας πρωτεϊνικών καρβονυλίων [29]

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, γίνεται αντιληπτό πως η παρουσία καρβονυλίων δεν είναι απαραίτητα ενδεικτική της οξείδωσης των αμινοξέων στις πρωτεΐνες. Παρόλα αυτά, αυξημένη συγκέντρωση σε καρβονύλια έχει παρατηρηθεί σε πολλά κύτταρα και το πλάσμα διαβητικών [38], και όχι μόνο ασθενών (π.χ. ασθενών με νόσο Αλτσχάιμερ) [37].

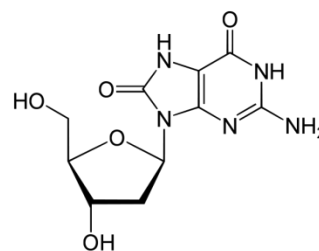
- Πρωτεϊνικά προϊόντα προχωρημένης οξείδωσης (AOPPs)

Σε χρόνιες καταστάσεις οξειδωτικού στρες, τα AOPPs σχηματίζονται από αντιδράσεις των πρωτεϊνών του πλάσματος με χλωριωμένα οξειδωτικά [28].

Οξείδωση νουκλεϊκών οξέων:

- 8-υδρόξυ-δεοξυ-γουανοσίνη (8-OHdG)

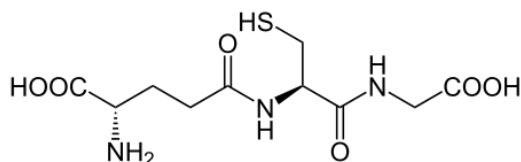
Η 8-OHdG (ή 8-οξο-dG) αποτελεί οξειδωτικό παράγωγο της δεοξυ-γουανοσίνης και θεωρείται από τα κύρια προϊόντα της οξείδωσης του DNA.



Αντιοξειδωτικοί παράγοντες:

- Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη αποτελεί την πλεονάζουσα μη-πρωτεϊνική θειόλη του οργανισμού που προστατεύει εναντίον του οξειδωτικού στρες. Προέρχεται από



τη γλυκίνη, το γλουταμικό και τη κυστεΐνη. Ανωμαλίες στην συγκέντρωση της συνεισφέρουν στη δυσλειτουργία των β-κυττάρων καθώς και στη παθογένεση των μακροπρόθεσμων επιπλοκών του διαβήτη [28]. Το σύστημα γλουταθειόνης που περιλαμβάνει την αναγωγή της γλουταθειόνης, την οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης (GSSG) καθώς και το NADPH ως συμπράγοντα, μπορεί να προσβληθεί εάν υπάρχει υπερ-παραγωγή ROS.

- Καταλάση

Η καταλάση αποτελεί ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που βρίσκεται σχεδόν σε όλους τους οργανισμούς, και δρα κυρίως ως ο κύριος ρυθμιστής του μεταβολισμού του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2). Έχει αναφερθεί πως η ανεπάρκεια στο ένζυμο αυτό ευθύνεται για την αύξηση του οξειδωτικού στρες στα β-κύτταρα και τελικά τον θάνατο τους [28].

- Δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD)

Η δισμουτάση υπεροξειδίου αποτελεί το αντιοξειδωτικό ένζυμο που καταλύει την αναγωγή του ανιόντος υπερυπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και μοριακό οξυγόνο (O_2). Η SOD μπορεί να συνδεθεί με χαλκό (Cu) και μαγγάνιο (Mn) και εντοπίζεται είτε στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια, είτε εξωκυτταρικά. Είναι χαρακτηριστικό πως αυξημένα επίπεδα SOD φαίνεται να μειώνουν το οξειδωτικό στρες, τη μιτοχονδριακή απελευθέρωση του κυτοχρώματος C αλλά και την απόπτωση νευρώνων [28].

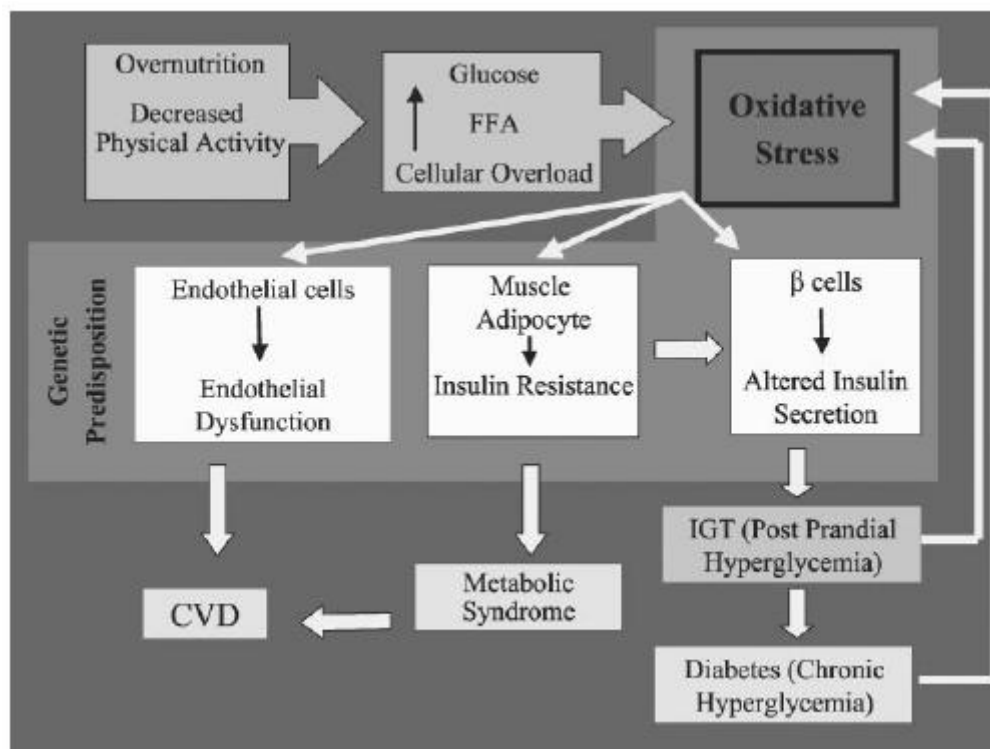
1.2.3. Κλινικές επιπτώσεις στο στάδιο MY

Ο βασικός μηχανισμός με τον οποίο το προκαλούμενο από την MY οξειδωτικό στρες επηρεάζει την παθοφυσιολογία του οργανισμού προκύπτει μέσα από την επίδραση του στα μυϊκά, λιπώδη, ενδοθηλιακά και β-κύτταρα (Σχήμα 5).

Για παράδειγμα, το οξειδωτικό στρες έχει κατηγορηθεί ως ο κοινός παθοφυσιολογικός μηχανισμός ο οποίος διαμεσολαβεί στην εμφάνιση της ινσουλινοαντίστασης, όπως και στην εξέλιξη της σε IGT και τελικά σε διαβήτη, πάντα υπό την συνοδεία αυξημένου καρδιαγγειακού κινδύνου λόγω των αθηρωματικών επιπτώσεων του [10].

Προχωρώντας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η υψηλή γλυκόζη στο αίμα έχει συσχετιστεί, ανάμεσα στα άλλα, με επαγωγή της ινσουλινοαντίστασης αλλά και με διαταραγμένη λειτουργία του ενδοθηλίου μέσα από τους μηχανισμούς του οξειδωτικού στρες τόσο *in vivo* όσο και *in vitro*. Έτσι λοιπόν φαίνεται λογική η σχέση

μεταξύ **οξειδωτικού στρες**, **ΜΥ** και **καρδιαγγειακής νόσου** (Σχήμα 9), είτε άμεσα μέσα από τη διαταραχή της ενδοθηλιακής λειτουργίας είτε έμμεσα μέσα από την ινσουλινοαντίσταση και τις μετέπειτα μεταβολικές νόσους της (π.χ. μεταβολικό σύνδρομο).



Σχήμα 9 - Υπεργλυκαιμία, οξειδωτικό στρες και ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου [10]

1.3. Οξειδωτικό Στρες & Αιμοπετάλια

Είναι φανερό στη βιβλιογραφία πως το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία πολλών φυσιολογικών μηχανισμών, όπως και στη δημιουργία και την εξέλιξη πληθώρας νοσημάτων. Ανάμεσα στις λειτουργίες που ανήκουν στη σφαίρα μεταβολικής επιρροής των ROS εντοπίζεται και η **ενεργοποίηση και η συσσώρευση των αιμοπεταλίων** και μια γενικότερη υπερ-δραστηριότητα τους.

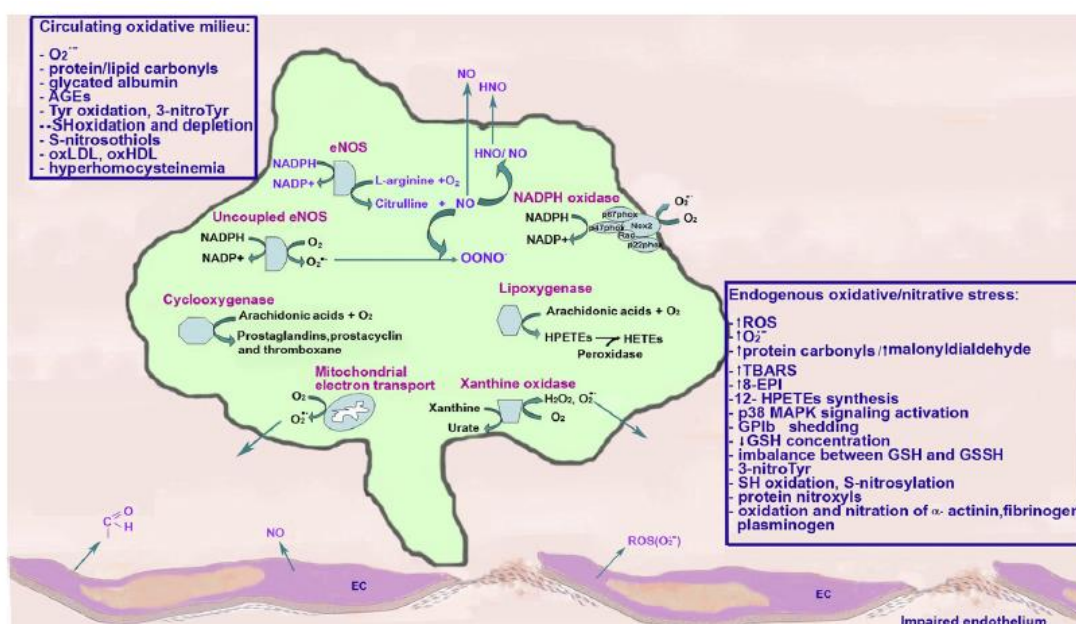
Ο βασικός ρόλος των αιμοπεταλίων έγκειται στο μηχανισμό της αιμόστασης, δηλαδή τη διακοπή αιμορραγίας στο τραυματισμένο ενδοθήλιο, μέσα από τρεις φάσεις. Οι τρεις φάσεις αυτές περιλαμβάνουν την προσκόλληση του αιμοπεταλίου σε μόρια κοντά στην επιφάνεια του τραυματισμένου ενδοθηλίου (π.χ. κολλαγόνο), την ενεργοποίησή του, δηλαδή την αλλαγή στο σχήμα και την έκκριση χημικών μηνυμάτων, και τέλος, τη συσσώρευση, δηλαδή τη σύνδεση πολλών αιμοπεταλίων μέσω ειδικών γεφυρών.

Είναι χαρακτηριστικό πως η φυσιολογική προσκόλληση και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σχετίζεται με αυξημένα επίπεδα ROS, καθώς τα κύτταρα αυτά

παράγουν φυσιολογικά τέτοια μόρια σε τέτοιες διαδικασίες, κυρίως ως μεταφορείς μηνυμάτων (π.χ. μέσα από το Ca^{2+}) και ρυθμιστές των λειτουργιών τους [39]. Η φυσιολογική αυτή παραγωγή των ROS προκύπτει μέσω διέγερσης από τους αγωνιστές των αιμοπεταλίων, με χαρακτηριστική την επιρροή του κολλαγόνου στην αύξηση της ενδοκυτταρικής παραγωγής ROS και της θρομβίνης σε εκείνη της εξωκυτταρικής παραγωγής τους [40]. Τα παραγόμενα ROS λειτουργούν και ως προ-θρομβωτικά μόρια, ενώ όπως είναι φυσιολογικό συμβάλλουν και στην αύξηση του συνολικού οξειδωτικού στρες στην κυκλοφορία. Πέρα από ROS, τα αιμοπετάλια παράγουν και NOS, των οποίων η συνδυαστική δράση στοχεύει σε μικρού μοριακού βάρους θειόλες των αιμοπεταλίων, όπως είναι η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη.

Είναι γνωστό πως το αυξημένο οξειδωτικό στρες στα αιμοπετάλια (είτε από το εξωτερικό τους περιβάλλον είτε παραγόμενο από το ίδιο το κύτταρο) επάγει την ενεργοποίησή τους είτε άμεσα είτε μειώνοντας το κατώφλι ενεργοποίησης για τους αγωνιστές [41], ενώ πλέον είναι ξεκάθαρη στην επιστημονική κοινότητα η σχέση μεταξύ αυξημένης ενεργοποίησης αιμοπεταλίων λόγω οξειδωτικού στρες και της λειτουργίας των ενδοθηλιακών κυττάρων ή της εξέλιξης της αθηροσκλήρωσης [40]. Ανάμεσα στις παθήσεις οι οποίες σχετίζονται με αυξημένο οξειδωτικό στρες και αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εντοπίζονται ο διαβήτης τύπου II, η υπέρταση, η δυσλιπιδαιμία και η παχυσαρκία.

Μια σχηματική περιληπτική απεικόνιση όλων των μηχανισμών ενδο-αιμοπεταλιακού και το εξω-αιμοπεταλιακού οξειδωτικού στρες βρίσκεται στο Σχήμα 10.



Σχήμα 10 - Περιλήψη των μηχανισμών ενδο- και εξω-κυτταρικού οξειδωτικού στρες στα αιμοπετάλια [40]

1.3.1. Οξειδωτικό στρες στο εσωτερικό του αιμοπεταλίου

Ενδογενώς στο ενεργοποιημένο αιμοπετάλιο, μπορούν να παραχθούν ROS και NOS, κυρίως μέσα από τη δράση της οξειδάσης του NADPH (αλλά από τη δράση της οξειδάσης της ξανθίνης και της κυκλο-οξυγονάσης 1) στην πορεία αραχιδονικού οξέος, στον κύκλο της γλουταθειόνης και το μεταβολισμό των φωσφολιποειδών [39].

Τα παραγόμενα μόρια ROS/NOS εμπλέκονται [42]:

- I. στη διάδοση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων μέσα από την απενεργοποίηση του NO
- II. στην απελευθέρωση αγωνιστών των αιμοπεταλίων όπως είναι το ADP οδηγώντας τελικά στη σύνθεση ισοπροστανίων και οξειδωμένη LDL
- III. στην απελευθέρωση προ-αθηρωτικών μορίων όπως το CD40L (πρωτεΐνη των Τ-λεμφοκυττάρων, μέλος της υπερ-οικογένειας των Παραγόντων Νέκρωσης Όγκων – TNF).

Το ενδογενές οξειδωτικό στρες στα αιμοπετάλια επίσης μεταβάλλει την ισορροπία των μεταξύ οξειδωμένης και ανηγμένης γλουταθειόνης [43].

Τέλος, τα ενδογενώς παραγόμενα ROS/NOS έχει αποδειχθεί πως διαθέτουν τόσο αυτοκρινή όσο και παρακρινή ρόλο στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων [41].

1.3.1.1. Δείκτες

Ο προσδιορισμός παρουσίας οξειδωμένων θειολών, S-νιτροζυλίωσης και 3-NT, όπως και της οξειδωμένης ή αζωτοποιημένης μορφής της α -ακτινίνης, του ινωδογόνου και του πλασμινογόνου μπορούν να αποτελέσουν δείκτες ενδοκυτταρικού οξειδωτικού στρες.

Πέρα από αυτούς τους προσδιορισμούς, όμως, μπορούμε να εντοπίσουμε πληθώρα άλλων δεικτών ενδο-αιμοπεταλιακού οξειδωτικού στρες στη βιβλιογραφία μέσα από [40]:

- Ενεργοποίηση $\alpha_{IIb}\beta_3$
- Αυξημένα επίπεδα καρβονυλομάδων στις αιμοπεταλιακές πρωτεΐνες
- Αυξημένα επίπεδα MDA, TBARS και 8-epi-PGF2 α
- Ενεργοποίησης της πορείας της λιποξυγονάσης και της σύνθεσης του 12-HPETE (12-υδρο-περοξυ-εικασατετραενοϊκό οξύ), ενεργοποίηση του σήματος του p38 MAPK (MAPK - mitogen-activates protein kinases) και της καταστροφής του υποδοχέα προσκόλλησης GPIb
- Μείωση της συγκέντρωσης της ανηγμένης γλουταθειόνης ή μεταβολή στην αναλογία ανηγμένης:οξειδωμένης μορφής της

1.3.1.2. Μηχανισμοί

Οι μηχανισμοί οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για τη δημιουργία ενδοκυτταρικού οξειδωτικού στρες στα αιμοπετάλια εντοπίζονται είτε στην κυτταρική τους μεμβράνη είτε στο κυτταρόπλασμα. Για παράδειγμα, έχει βρεθεί πως οι θειόλες των πρωτεϊνών της μεμβράνης (όπως π.χ. της γλυκοπρωτεΐνης IV) του αιμοπεταλίου αποτελούν στοιχεία οξειδωαγωγικής ρύθμισης, κάτι που επηρεάζει την ενεργοποίηση τους (π.χ. μέσα από το κολλαγόνο) και τη σύνδεση τους με λευκοκύτταρα.

Όπως αναφέρθηκε, τα περισσότερα ROS παράγονται ενδοκυτταρικά στο αιμοπετάλιο από το ενζυμικό σύστημα της οξειδάσης του NADPH, με τη δράση του να διεγείρεται από το κολλαγόνο, την έκθεση στη θρομβίνη και την εκπόλωση της μεμβράνης του αιμοπεταλίου [41]. Άλλες πηγές οξειδωτικού στρες ενδοκυτταρικά αποτελούν οι οξειδωαναγωγικές αντιδράσεις που περιλαμβάνουν σίδηρο, με το οξειδωτικό αποτέλεσμα να σχετίζεται με την ενεργοποίηση του υποδοχέα της ιντεγκρίνης $\alpha_{IIb}\beta_3$, και η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα [41].

1.3.2. Οξειδωτικό στρες στο περιβάλλον του αιμοπεταλίου

Τα αιμοπετάλια μπορούν να εκτεθούν και σε εξωγενές οξειδωτικό στρες, είτε στο πλάσμα είτε τοπικά, όταν τα αιμοπετάλια προσκολληθούν σε άλλα κύτταρα της κυκλοφορίας (π.χ. σε φλεγμονώδεις καταστάσεις) ή στο αγγειακό ενδοθήλιο (κατά τη συγκόλληση και τη δημιουργία θρόμβων) [40].

1.3.2.1. Δείκτες

Ανάμεσα στους δείκτες οξειδωτικού στρες στο εξωτερικό περιβάλλον των αιμοπεταλίων εντοπίζονται [40]:

- Αυξημένα επίπεδα ONOO^-
- Δημιουργία «καρβονυλικού στρες» (δηλαδή ενεργές ομάδες καρβονυλίου σε πρωτεΐνες και λιπίδια)
- Δημιουργία σταθερών προϊόντων μεταβολισμού της γλυκόζης
- Οξείδωση καταλοίπων τυροσίνης και δημιουργία 3-NT
- Λιπιδική υπεροξείδωση
- Οξείδωση θειολών και εξάντληση ανηγμένων θειολικών ομάδων (οι οποίες παίζουν ρόλο στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού)

Επιπλέον, το εξωγενές NO που απελευθερώνεται στην κυκλοφορία από τα αιμοπετάλια ή από τις S-νιτροζοθειόλες του πλάσματος (προϊόν αντίδρασης NO και πρωτεϊνικών σουλφυδρίλιων κυστεΐνης) παράγει οξειδωτικές μεταβολές στις θειολομάδες της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, ή ακόμα και του κυτταροπλάσματος.

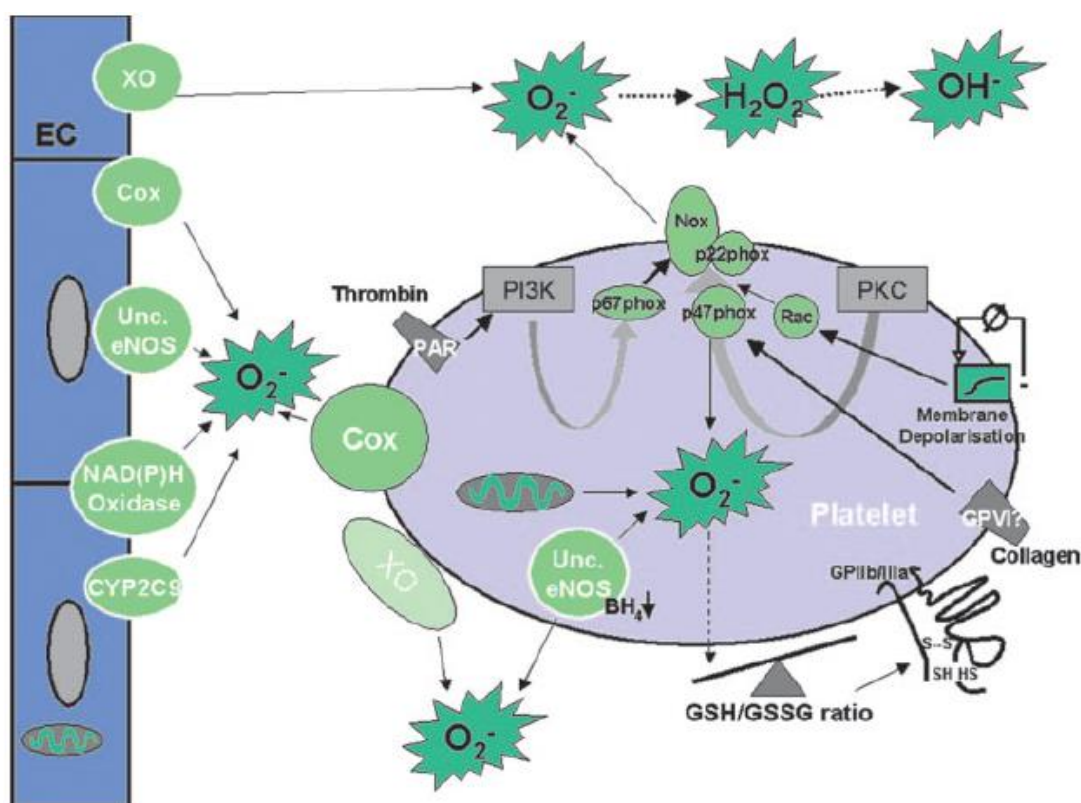
Τέλος, σε διαβητικούς ασθενείς έχει παρατηρηθεί πως αυξημένα επίπεδα γλυκοζυλιωμένης αλβουμίνης κάνουν τα αιμοπετάλια πιο επιρρεπή στην ενεργοποίηση από το πεπτίδιο-6 και το κολλαγόνο, ενώ αυξημένα επίπεδα ομοκυστεΐνης στο αίμα διεγείρουν την παραγωγή υπεροξειδίου στο αιμοπετάλιο, αυξάνουν τη συσσώρευση τους από τη θρομβίνη, και προάγουν την ανάπτυξη προ-θρομβωτικών παραγόντων [40].

1.3.2.2. Μηχανισμοί

Ο μηχανισμός με τον οποίο παράγεται εξωγενές αιμοπεταλιακό οξειδωτικό στρες περιγράφεται παρακάτω μέσα από τη λειτουργία του ενδοθηλίου.

Πιο συγκεκριμένα, στο αγγειακό ενδοθήλιο, η υπεροξειδάση του NADPH, οι ισομορφές 1 και 2 της κυκλο-οξυγονάσης (COX), το κυτόχρωμα 450, η ισομόρφη 2C9 της εποξυγονάσης (CYP2C9), η οξειδάση της ξανθίνης, η ενδοθηλιακή συνθάση του NO και η μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα συμβάλλουν στην παραγωγή ROS, τα οποία επηρεάζουν τη λειτουργία των αιμοπεταλίων εξω-κυτταρικά.

Μια σχηματική απεικόνιση με τις ενζυματικές πηγές ROS στο ενδοθηλιακό κύτταρο και το αιμοπετάλιο παρατίθεται στο Σχήμα 11.



Σχήμα 11 - Ενζυματικές πηγές ROS στο ενδοθηλιακό κύτταρο και το αιμοπετάλιο [41]

1.4. Υπεργλυκαιμία, Οξειδωτικό Στρες & Αιμοπετάλια

Εφόσον έχει ήδη περιγραφεί ο τρόπος με τον οποίο η ΜΥ επηρεάζει το οξειδωτικό στρες, αλλά και η σχέση μεταξύ οξειδωτικού στρες και αιμοπεταλίων, δεν εκπλήσσει το γεγονός ότι οι τρεις αυτές έννοιες σχετίζονται μεταξύ τους.

Σε έρευνες που έχουν γίνει σε ανθρώπινα αιμοπετάλια *in vitro*, φάνηκε πως η υπεργλυκαιμία αύξησε την παραγωγή ROS μέσα από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα ηλεκτρονίων [44]. Αυτό διαπιστώθηκε μέσα από τη δράση των TTFA (αναστολέας της δράσης του συμπλόκου II της αναπνευστικής αλυσίδας) και CCCP (αποζεύκτης οξειδωτικής φωσφορυλίωσης), τα οποία απέτρεπαν πλήρως την επιρροή της υπεργλυκαιμίας στην παραγωγή ενδο-αιμοπεταλιακών ROS. Επίσης, βρέθηκε πως η υπεργλυκαιμία ενισχύει τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, παρουσία συγκέντρωσης κολλαγόνου μικρότερης από το κατώφλι το οποίο επάγει τη λειτουργία αυτή. Δηλαδή, η υπεργλυκαιμία (όπως και η ινσουλινοαντίσταση) αποτελεί παράγοντα που αυξάνει την ευαισθησία των αιμοπεταλίων στους επαγωγείς της συσσώρευσης τους [45].

Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από *in vivo* μελέτες, οι οποίες δείχνουν πως η υπεργλυκαιμία επάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσα από το οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, τα μόρια ROS θεωρούνται υπεύθυνα για την ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων και την έκφραση οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων γονιδίων, οδηγώντας το ενδοθήλιο σε μια προσκολλητική και προθρομβωτική φάση μέσα από την ενεργοποίηση, τη προσκόλληση και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων [46].

Προχωρώντας, φαίνεται πως και η ΜΥ συγκεκριμένα επηρεάζει τη λειτουργία των αιμοπεταλίων. Η συγκέντρωση γλυκόζης αιμοπεταλίων, εφόσον τα κύτταρα δε διαθέτουν ινσουλινο-εξαρτώμενο μηχανισμό εισόδου, αντανακλά πλήρως αυτή του εξωκυτταρικού περιβάλλοντος [46]. Σε αρχικού σταδίου διαβητικούς ασθενείς η ΜΥ προκαλεί ενεργοποίηση στα αιμοπετάλια [47], κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται από έρευνες και για υγιείς εθελοντές [48]. Κάτι τέτοιο φαντάζει λογικό από τη στιγμή που είναι γνωστό πως η ΜΥ προκαλεί αύξηση του οξειδωτικού στρες και κάποιου βαθμού δυσλειτουργία στο αγγειακό ενδοθήλιο, δύο παράγοντες οι οποίοι είναι ξεκάθαρα επαγωγείς της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί πως η αλληλεπίδραση ΜΥ και αιμοπεταλίων απασχολεί την ερευνητική κοινότητα κυρίως διότι η αυξημένη αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση προωθεί μια προ-αθηρογόνο και προφλεγμονώδη κατάσταση, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν φυσιολογικά σε οξεία αγγειακά επεισόδια και τελικά αθηρογένεση.

Η σχέση αυτή ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και αγγειακού ενδοθηλίου ελέγχεται από την παραγωγή κυτταροκινών (οι οποίες εκκρίνονται φυσιολογικά κατά την αιμοπεταλιακή ενεργοποίηση), οι οποίες διεγείρουν μεταναστευτικές και

πολλαπλασιαστικές αποκρίσεις από τα λεία μυικά κύτταρα των αγγείων και διαμεσολαβούν στην προσκόλληση των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο, επιτρέποντας έτσι τη μετανάστευση των μακροφάγων. Το τελευταίο αυτό στοιχείο είναι που επιτελεί κεντρικό ρόλο στο σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας [46].

2. Σκοπός

Αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα προκαλούν αύξηση στο οξειδωτικό στρες των κυττάρων. Ένα χρόνιο οξειδωτικό στρες αποτελεί παθογενετικό μηχανισμό πολλών χρόνιων κλινικών καταστάσεων (π.χ. αθηροσκλήρωση).

Παράλληλα, στο μεταγευματικό στάδιο επάγεται μια βραχυπρόθεσμη αύξηση του οξειδωτικού στρες. Όπως είναι λογικό, μια τέτοια παθοφυσιολογική κατάσταση δεν είναι το ίδιο διαχειρίσιμη από ασθενείς και υγιείς ανθρώπους, κάτι που στρέφει την ερευνητική κοινότητα στη μελέτη των παθοφυσιολογικών μηχανισμών που επάγει η ΜΥ κυρίως σε δείγματα νοσούντων (π.χ. διαβητικοί).

Η παρούσα πτυχιακή εργασία θέλησε να συμβάλλει στη μελέτη της παθοφυσιολογίας της ΜΥ σε σχέση με το οξειδωτικό στρες σε υγιή άτομα επάγοντας φορτίσεις γλυκόζης διαφορετικής έντασης (75, 100, 150 γρ). Εφόσον η βιβλιογραφία παρέχει κυρίως πληροφορίες για ασθενείς, θεωρήθηκε σκόπιμο να μελετηθούν οι ίδιοι μηχανισμοί από τη σκοπιά υγιών οργανισμών για να τεθεί μια «βάση» σχετικά με τις φυσιολογικές αποκρίσεις του οργανισμού σε υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Έτσι θα κατανοηθούν βαθύτερα οι φυσιολογικοί μηχανισμοί μεταγευματικά, ενώ μέσα από σύγκριση, θα είναι δυνατό να αποκτηθεί μια πιο ολοκληρωμένη άποψη σχετικά με τους μηχανισμούς οι οποίοι «δυσλειτουργούν» στους ασθενείς.

Επιλέχθηκε το πρωτόκολλο φορτίσεων με καθαρή γλυκόζη στα πλαίσια μιας προσέγγισης που θέλει να μελετώνται αρχικά ξεχωριστά οι επιδράσεις των επιμέρους συστατικών ενός μικτού γεύματος στις μεταγευματικές αποκρίσεις αλλά και ως ενδεικτική των δυτικού τύπου διατροφικών συνηθειών οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλά ποσοστά υδατανθράκων. Στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής εργασίας το οξειδωτικό στρες προσδιορίστηκε μέσα από τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον ορό υγιών ατόμων. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια εκφράζουν το αποτέλεσμα της οξείδωσης των πρωτεϊνών, η οποία επάγεται φυσιολογικά από το οξειδωτικό στρες εκφραζόμενο μέσα από τις ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS/NOS).

3. Μεθοδολογία

3.1. Επιλογή εθελοντών

Στα πλαίσια της έρευνας που πραγματεύεται αυτή η πτυχιακή μελέτη, αποφασίστηκε να επιλεγθούν υγιή άτομα ως εθελοντές. Οι εθελοντές ήταν άνδρες και γυναίκες με ηλικιακό εύρος 20-40.

Κριτήρια επιλογής των εθελοντών ήταν ο φυσιολογικός Δείκτη Μάζας Σώματος ($\Delta\text{Μ}\Sigma = 18\text{-}25 \text{ Kg/m}^2$), η φυσιολογική αρτηριακή πίεση (Συστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 130 \text{ mmHg}$ και Διαστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 85 \text{ mmHg}$), επίπεδα γλυκόζης νηστείας $\leq 100 \text{ mg/dl}$, επίπεδα γλυκόζης 2 ώρες μετά από φόρτιση 75 g γλυκόζης $< 140 \text{ mg/dl}$, επίπεδα ολικής χοληστερόλης $\leq 200 \text{ mg/dl}$, επίπεδα τριακυλογλυκερολών $\leq 150 \text{ mg/dl}$, περιφέρεια μέσης $\leq 102 \text{ cm}$ και απουσία ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, οι εθελοντές δεν ήταν καπνιστές. Η αιμοληψία για τις γυναίκες πραγματοποιούνταν κατά τις πρώτες 7-10 ημέρες του εμμηνορυσιακού τους κύκλου.

Οι εθελοντές ήταν είτε μη ενεργά άτομα είτε κατ' ελάχιστο ενεργά άτομα, σύμφωνα με τη κατάταξη του ερωτηματολογίου IPAQ [49]. Επιπρόσθετα, όφειλαν να μη λαμβάνουν ασπιρίνη, ορμόνες, συμπληρώματα διατροφής και αντιϋπερτασικά φάρμακα, για τουλάχιστον 2 μήνες.

Το χρησιμοποιηθέν ερευνητικό πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από την επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπέιου πανεπιστημίου. Παράλληλα, απαραίτητη προϋπόθεση για την συμμετοχή των εθελοντών στην παρούσα μελέτη ήταν η υπογραφή συμφωνητικού εθελοντικής συμμετοχής, στο οποίο αναφερόταν αναλυτικά ο σκοπός της μελέτης και οι υποχρεώσεις του εθελοντή και του ερευνητή.

3.2. Σχεδιασμός της μελέτης για το πρωτόκολλο της υπεργλυκαιμίας

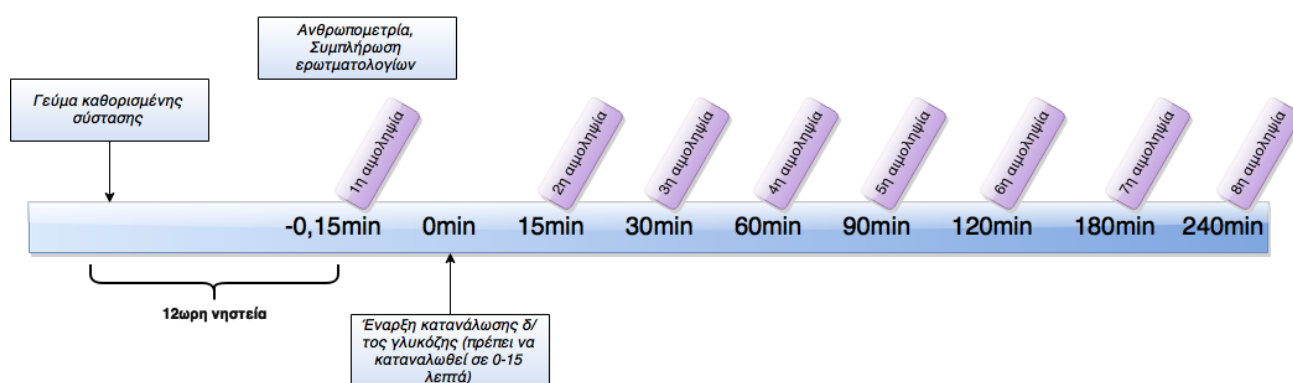
Οι εθελοντές, εφόσον είχαν ενημερωθεί για τους σκοπούς της μελέτης και είχαν υπογράψει το πρωτόκολλο εθελοντικής συμμετοχής, προσέρχονταν στο Χαροκόπειο πανεπιστήμιο τρεις διαφορετικές ημέρες, οι οποίες απείχαν μεταξύ τους χρονικά τουλάχιστον δύο εβδομάδες για τους άνδρες και κατά ένα μήνα για τις γυναίκες.

Κάθε φορά που ερχόταν ένας από τους εθελοντές, κατανάλωνε ένα διάλυμα γλυκόζης. Το διάλυμα αυτό επιλεγόταν τυχαία από μία σειρά τριών διαλυμάτων διαφορετικής συνολικής ποσότητας. Αναλυτικότερα, 75, 100 και 150 γραμμάρια γλυκόζης είχαν διαλυθεί σε 200mL νερό αντίστοιχα, για να παρασκευαστούν τα τρία είδη διαλυμάτων.

Οι εθελοντές είχαν ενημερωθεί εγκαίρως πως το προηγούμενο βράδυ όφειλαν να είχαν ακολουθήσει συγκεκριμένης σύστασης γεύμα, το οποίο έπρεπε να περιείχε 600 Kcal για τις γυναίκες και 750Kcal για τους άνδρες. Το γεύμα χαρακτηριζόταν από

περιεκτικότητα 50% σε υδατάνθρακες, 20% σε πρωτεΐνες και 30% σε λίπη. Μετά από 12ωρη νηστεία προσέρχονταν στο Χαροκόπειο πανεπιστήμιο.

Αρχικά, πραγματοποιούνταν οι ανθρωπομετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) και μέτρηση της αρτηριακής πίεσης. Πριν οι εθελοντές οδηγηθούν στη φάση της παρέμβασης, πραγματοποιούνταν αιμοληψία με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα. Στη συνέχεια, χορηγούνταν στους εθελοντές να καταναλώσουν το έτοιμο διάλυμα γλυκόζης, εντός ενός χρονικού διαστήματος 3 λεπτών. Η χορήγηση των διαφορετικών διαλυμάτων γλυκόζης έγινε με τυχαία σειρά. Από εκείνη τη στιγμή και έπειτα, ακολουθούσαν αιμοληψίες στα 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 λεπτά μετά από το πέρας της πρόσληψης του διαλύματος. Οι αιμοληψίες γίνονταν από από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό με παράλληλη παρουσία ιατρού.



3.3. Σωματομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετριόταν με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ύψος μετριόταν με τη χρήση εντοιχισμένου αναστημομέτρου σε όρθια στάση, χωρίς παπούτσια και με ακρίβεια 0,5 cm. Οι μετρήσεις αυτές γίνονταν εις διπλούν. Ακόμη, υπολογίζονταν ο μέσος όρος του βάρους και ο μέσος όρος του ύψους κάθε εθελοντή, σύμφωνα με τους οποίους έπειτα υπολογιζόταν ο ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος) για τον κάθε εθελοντή αντίστοιχα, ως το πηλίκο του βάρους (kg) προς το τετράγωνο του ύψους (m). Συμπληρωματικά, πραγματοποιούνταν μετρήσεις για την περιφέρεια μέσης και την περιφέρεια ισχίου, όπως και υπολογισμός για το πηλίκο της περιφέρειας μέσης ως προς την περιφέρεια ισχίου.

3.4. Απομόνωση και επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων

Σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, μετά την κατανάλωση του διαλύματος γλυκόζης (15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 min), λαμβανόταν αίμα με φλεβοκαθετήρα, το οποίο διαμοιραζόταν σε κατάλληλα σωληνάρια κενού (vacutainers), ανάλογα το είδος και την ποσότητα του βιολογικού δείγματος που ήταν επιθυμητό να

απομονωθεί. Επιπρόσθετα, ο διαχωρισμός του ληφθέντος αίματος στα σωληνάρια κενού γινόταν και με βάση το είδος των βιοχημικών αναλύσεων που θα πραγματοποιούνταν σε κάθε χρονική στιγμή. Τα βιολογικά δείγματα που απομονώθηκαν και το είδος των αναλύσεων ανά βιολογικό δείγμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 - Βιολογικά δείγματα και αναλύσεις

Βιολογικό Δείγμα	Αναλύσεις
Ορός	✓ Γλυκόζη ✓ Ινσουλίνη ✓ Ολική πρωτεΐνη ✓ Πρωτεϊνικά καρβονύλια
Ολικό αίμα με EDTA	Γενική αίματος
Πλάσμα με EDTA	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)
Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)
Ομογενοποίηση αιμοπεταλίων	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)
Ομογενοποίηση λευκοκυττάρων	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)

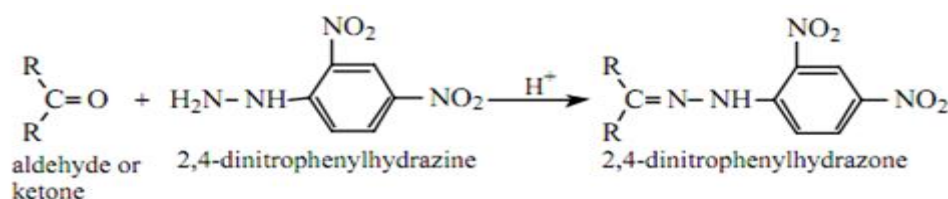
3.4.1. Απομόνωση πλάσματος και ορού

Αρχικά, 4 mL και 2 mL ληφθέντος αίματος μεταφερόταν σε vacutainers ορού ή πλάσματος με αντιπηκτικό EDTA, αντίστοιχα. Τα vacutainers ορού παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και ο ορός παραλαμβάνονταν με φυγοκέντρηση στα 1500g επί 8 λεπτά, στους 15°C. Έπειτα, ο ορός μοιραζόταν σε erpendorfs και φυλασσόταν στους -80°C. Τα vacutainers πλάσματος με αντιπηκτικό EDTA φυγοκεντρούνταν άμεσα στα 1500g επί 8 λεπτά στους 15°C. Στη συνέχεια, το πλάσμα μοιραζόταν σε erpendorfs και φυλασσόταν στους -80°C.

3.5. Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε δείγματα ορού

3.5.1. Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων που έχουν δημιουργηθεί στις πρωτεΐνες με τη χρωστική 2,4-δινιτροφαινυλϋδραζίνη (DNPH) και φωτομέτρησης του έγχρωμου συμπλόκου που δημιουργείται στα 370 nm. Η ποσότητα πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκφράζεται σε nmol/mg πρωτεΐνης.



3.5.2. Εξοπλισμός-Αντιδραστήρια

Διαλύματα:

- HCl 2,5 M : 25 ml π.HCl και 75 ml H₂O
- 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazine σε HCl 2,5 M : 0,1981 g στα 100 ml HCl 2,5 M
- TCA 10 % : 10 g TCA σε 100 ml H₂O
- TCA 35 % : 35 g TCA σε 100 ml H₂O
- Αιθανόλη:Οξικός αιθυλεστέρας 1:1
- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 6 M σε 20 mM buffer φωσφορικών pH 2,3 : 0,2722 g KH₂PO₄ και 57,32 g στα 100 ml H₂O. Ρύθμιση pH με πυκνό HCl.

3.5.3. Αναλυτική Πορεία

1. Φέρονται από 50 μL δείγματος και 150 μL απιονισμένου νερού σε δύο erpendorffs (το δείγμα πρέπει να περιέχει 1-10 mg πρωτ./mL)
2. Στο ένα erpendorff προσθέτονται 800 μL δμτος DNPH 10 mM (S) και στο άλλο 800 μL HCl 2,5 N (C)
3. Επώαση των δειγμάτων σε Θδωμ για 1 h στο σκοτάδι. Ανάδευση κάθε 15 min.
4. Προσθήκη 400 μL TCA 35%, παραμονή σε πάγο για 5 min
5. Φυγοκέντρηση 10.000g x 10 min στους 4°C.
6. Απόχυση υπερκλειμένου και αναδιάλυση ιζήματος σε 1 ml TCA 10%. Παραμονή σε πάγο για 5 min.
7. Φυγοκέντρηση 10.000g x 10 min στους 4°C.
8. Απόχυση υπερκλειμένου και αναδιασπορά ιζήματος σε 1 mL EtOH:EtAcetate (1:1). Καλή ανάδευση και φυγοκέντρηση 10.000g x 10 min στους 4°C.
9. Επανάληψη σταδίου 8 άλλες 2 φορές
10. Αναδιασπορά ιζήματος σε 500 μL διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης 6M και καλή ανάδευση.
11. Φυγοκέντρηση 10.000g x 10 min στους 4°C.
12. Μεταφορά 400 μL του S και C σε δύο κυψελίδες φωτομέτρου και μέτρηση A στα 370 nm.

3.5.4. Υπολογισμοί

Η συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο τελικό διάλυμα φωτομέτρησης υπολογίζεται ως εξής:

$$C (\mu M) = (A_s - A_c) / 0,022 (\mu M^{-1} cm^{-1}) \times 1 cm^{-1}$$

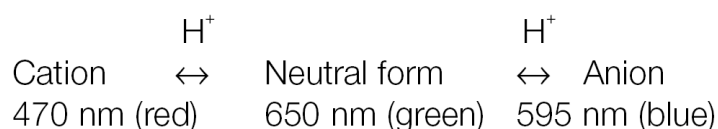
- **As:** Απορρόφηση δείγματος που περιέχει DNPH
- **Ac:** Απορρόφηση δείγματος που δεν περιέχει DNPH

Από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζονται τα ολικά ηmol στο διάλυμα και διαιρούνται με τα mg πρωτεΐνης στο τελικό διάλυμα φωτομέτρησης.

3.6. Προσδιορισμός πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

3.6.1. Αρχή μεθόδου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 η οποία απαντά σε 3 μορφές (Σχήμα 12): την κατιονική (κόκκινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 465nm), την ουδέτερη (πράσινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 650nm) και την ανιονική (μπλε χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 595nm).



Σχήμα 12 - Οι 3 μορφές της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και οι αντίστοιχες απορροφήσεις

Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης που συμβαίνει όταν η χρωστική συνδέεται με την πρωτεΐνη σε όξινο περιβάλλον. Δυνάμεις Van der Waals και υδρόφοβες δυνάμεις αναπτύσσονται μεταξύ της χρωστικής και των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα η χρωστική αποκτά 2 πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε. Η χρωματική αλλαγή που παρατηρείται οφείλεται στην παρουσία κάποιων βασικών αμινοξέων στις πρωτεΐνες όπως η αργινίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη.

3.6.2. Εξοπλισμός-Αντιδραστήρια

Διαλύματα:

- Πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) – 0,1mg/mL
- Αντιδραστήριο Bradford - Αραίωση διαλύματος Bradford με νερό 1:5 (1ml Bradford + 4ml H₂O)

3.6.3. Αναλυτική Πορεία

1. Τα αρχικά δείγματα ορού υφίστανται αραίωση 1:200 σε τελικό όγκο 1000 μl (5μl δείγματος + 995μl H₂O) μέσα σε eppendorfs.
2. Τα τελικά δείγματα φωτομέτρησης (τελικό στάδιο πορείας προσδιορισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων) υφίστανται αραίωση 1:100 σε τελικό όγκο 500 μl (5μl δείγματος + 495μl H₂O) μέσα σε eppendorfs.
3. Εφόσον πραγματοποιήθηκε αραίωση του φωτομετρούμεου δείγματος, το διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης υφίστανται αραίωση 1:100 σε τελικό όγκο 500 μl (5μl δείγματος + 495μl H₂O) μέσα σε eppendorf.
4. Το working διάλυμα BSA υφίσταται διαδοχικές αραιώσεις (μέσα στα plates) για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Τα αραιωμένα

δείγματα BSA, serum, φωτομετρούμενων διαλυμάτων και η υδροχλωρική γουανιδίνη όπως και το νερό προστίθενται στα plates όπως υποδεικνύουν οι παρακάτω πίνακες:

Για τα δείγματα ορού:

	T	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Δ
BSA (0,1mg/ml)	-	2	5	10	12	15	20	25	-
H ₂ O	200	198	195	190	188	185	180	175	196
Δείγμα serum (1:200)									4

Για τα φωτομετρούμενα δείγματα:

	T	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	Δ
BSA (0,1mg/ml)	-	2	5	10	12	15	20	25	-
H ₂ O	170	168	165	160	158	155	150	145	170
Φωτ. Δείγμα (1:200)									15
Δ/μα Υδροχλ. G.	30	30							15

5. Σε κάθε πηγάδι γίνεται προσθήκη 50μl αντιδραστηρίου Bradford, ακολουθεί καλή ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Τα plates φωτομέτρουνται στα 595nm.

3.6.4. Υπολογισμοί

1. Αρχικά εισάγονται οι απορροφήσεις της πρωτεΐνης σε ένα αρχείο τύπου excel.
2. Με βάση την ποσότητα της BSA και την απορρόφηση κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη BSA.
3. Από την εξίσωση που μας δίνει η πρότυπη καμπύλη υπολογίζεται η ποσότητα πρωτεΐνης.

3.7. Στατιστική Ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάσθηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov.

Αν και οι περισσότερες μεταβλητές εμφανίζουν κανονική κατανομή, εξαιτίας του μικρού μεγέθους του δείγματος εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD (standard deviation, τυπική απόκλιση) στα διαγράμματα και ως διάμεσος (25^ο-75^ο εκατοστημόριο). Οι συσχετίσεις μεταξύ των μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης

Spearman. Η σύγκριση των τιμών των παραμέτρων, πριν και σε διαφόρους χρόνους μετά την παρέμβαση, έγινε με τη Friedman Rank ανάλυση. Η σύγκριση των συγκεντρώσεων των μεταβλητών μεταξύ του χρόνου 0 και των άλλων χρόνων έγινε με την ανάλυση Wilcoxon. Το iAUC υπολογίσθηκε από το εμβαδόν που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης μεταβολής μίας μετρούμενης παραμέτρου και της νοητής ευθείας παράλληλης στον άξονα x , η οποία ξεκινά από την τιμή της παραμέτρου σε χρόνο 0. Οι συσχετίσεις των iAUC, μεταξύ των διαφορετικών παρεμβάσεων, έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis, ενώ η σύγκριση ανά 2 παρεμβάσεις με το κριτήριο Mann-Whitney. Κατ' αντιστοιχία, η σύγκριση των ποσοσטיαίων μεταβολών του μεταβλητών στον ίδιο χρόνο μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis, ενώ η σύγκριση ανά 2 παρεμβάσεις με το κριτήριο Mann-Whitney.

Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων (p) βασίζονται σε αμφίπλευρους ελέγχους και συγκρίνονται στο επίπεδο σημαντικότητας του 5%.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού στατιστικής SPSS 18 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

4. Αποτελέσματα

4.1. Εισαγωγή

Το πειραματικό κομμάτι της πτυχιακής εργασίας επικεντρώθηκε στην επιρροή της ΜΥ στην εκδήλωση οξειδωτικού στρες στον ορό αίματος υγιών ατόμων. Γι' αυτόν τον λόγο, πραγματοποιήθηκε ένα πειραματικό πρωτόκολλο φόρτισης γλυκόζης υγιών εθελοντών, με σκοπό την επαγωγή καταστάσεων υπεργλυκαιμίας, η οποία είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία πως επηρεάζει το οξειδωτικό στρες. Μετρήθηκε η συγκέντρωση σε πρωτεϊνικά καρβονύλια στον ορό υγιών εθελοντών, ως ένδειξη της οξείδωσης των πρωτεϊνών, μιας αντίδρασης που επάγει χαρακτηριστικά το οξειδωτικό στρες. Στο κεφάλαιο αυτό θα παρατεθούν τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν καθ' όλη την πειραματική διαδικασία.

4.2. Οι εθελοντές της μελέτης

Συνολικά συγκεντρώθηκαν 8 εθελοντές. Από τους 8, οι μετρήσεις των 7 αναλύθηκαν σε επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ενώ για τους 5 συλλέχθηκαν δεδομένα για τα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης και HOMA-IR. Τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών παρατίθενται συγκεντρωτικά στον Πίνακα 3.

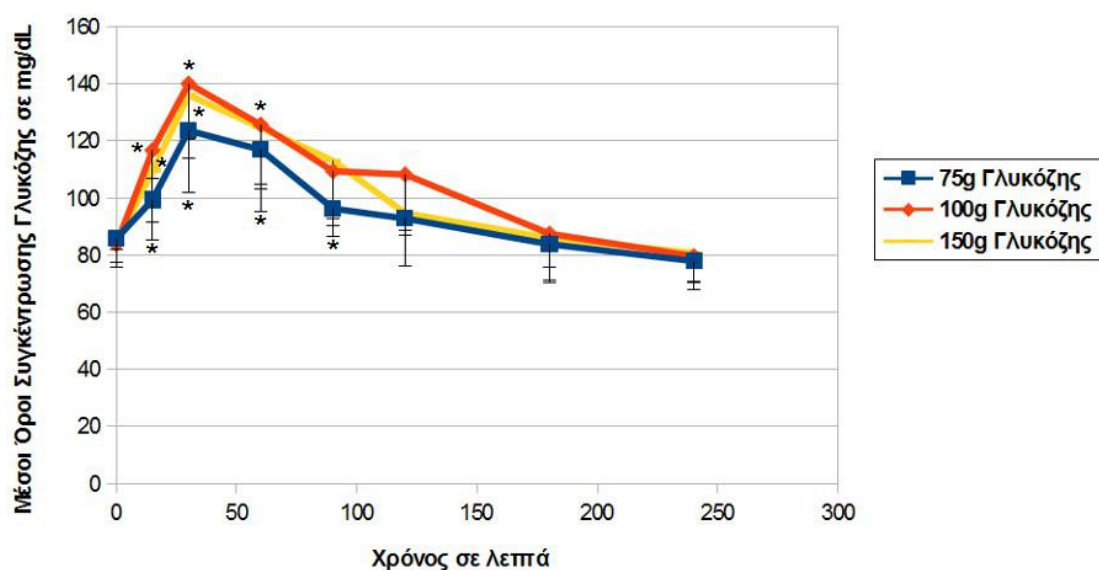
Πίνακας 3 - Διάμεσες τιμές (25^ο-75^ο τεταρτημόριο) για τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης στις 3 διαφορετικές φορτίσεις (NS= όχι σημαντική διαφορά μεταξύ των φορτίσεων)

Παράμετρος	N			75γρ	100γρ	150γρ	p
	75	100	150				
Άνδρες:Γυναίκες				5:3	5:3	5:3	
Ηλικία	8	8	8	27,5 (24-31,5)	27,5 (24-31,5)	27,5 (24-31,5)	NS
BMI (kg/m ²)	8	8	8	22,5 (21-24,9)	22,3 (20,3-24,4)	22,8 (20,6-23,9)	NS
DBP (mmHg)	7	8	8	76 (68-80)	66 (61,5-76)	69 (64-73)	NS
SBP (mmHg)	7	8	8	126 (113-128)	121 (114-125)	121 (107-135)	NS
WBC (103/μL)	8	7	7	4,4 (3,9-5,4)	4,9 (4,0-6,2)	4,2 (4-5,2)	NS
HCT	8	7	7	38,9 (37,8-41,7)	38,4 (36,4-43)	37 (35,7-40,2)	NS
PLT (103/μL)	8	7	7	205 (189-242)	203 (176-211)	194 (167-220)	NS
MPV (fL)	8	7	7	7,9 (7,7-8,2)	8 (7,4-8,2)	8 (7,6-8,3)	NS
GLU_0 (mg/dl)	5	5	5	85 (82-90)	84 (76-92)	82 (78-91)	NS
GLU_120 (mg/dl)	5	5	5	90 (89-98)	111 (88-127)	96 (79-109)	NS

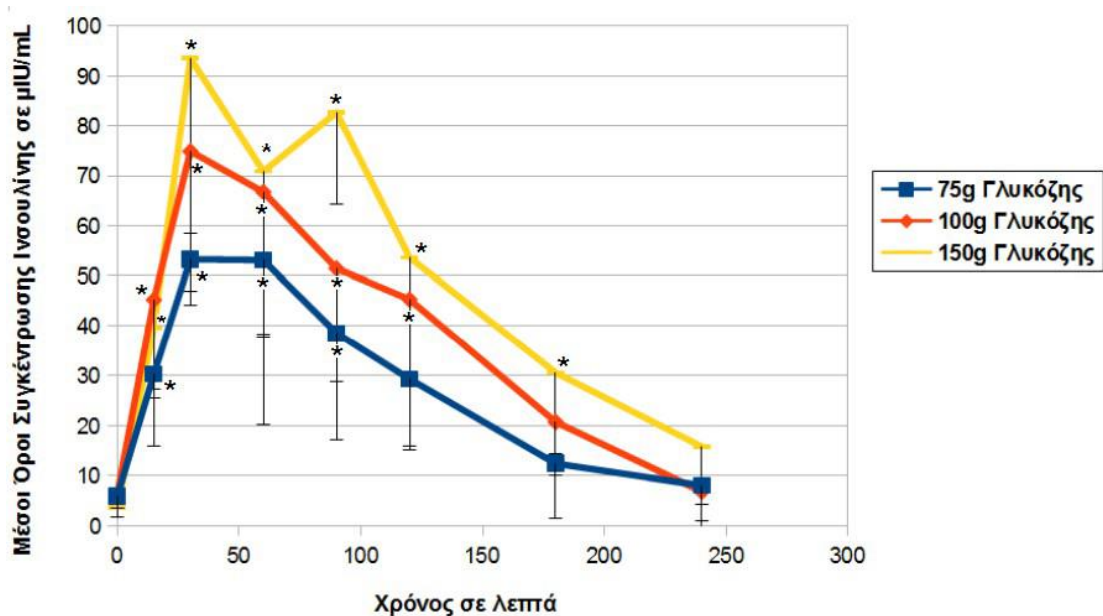
INS_0 (μIU/ml)	5	5	5	7 (3,5-8)	6,7 (3,9-8,8)	3,8 (1,7-5,6)	NS
HOMA-IR	5	5	5	1,42 (0,72-1,74)	1,3 (0,83-1,82)	0,77 (0,37-1,14)	NS

4.3. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης [50]

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα μεταβολής των απόλυτων τιμών της γλυκόζης και της ινσουλίνης όλων των εθελοντών σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση (Διάγραμμα 1 & Διάγραμμα 2).



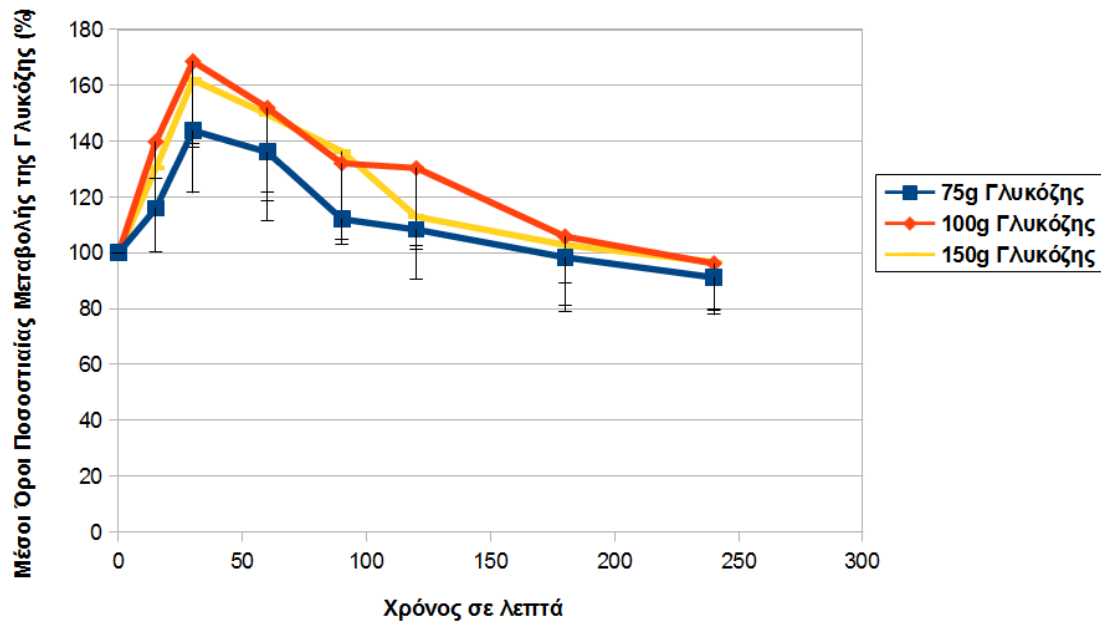
Διάγραμμα 1 - Μεταβολή απόλυτων τιμών γλυκόζης σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση (* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon) [50]



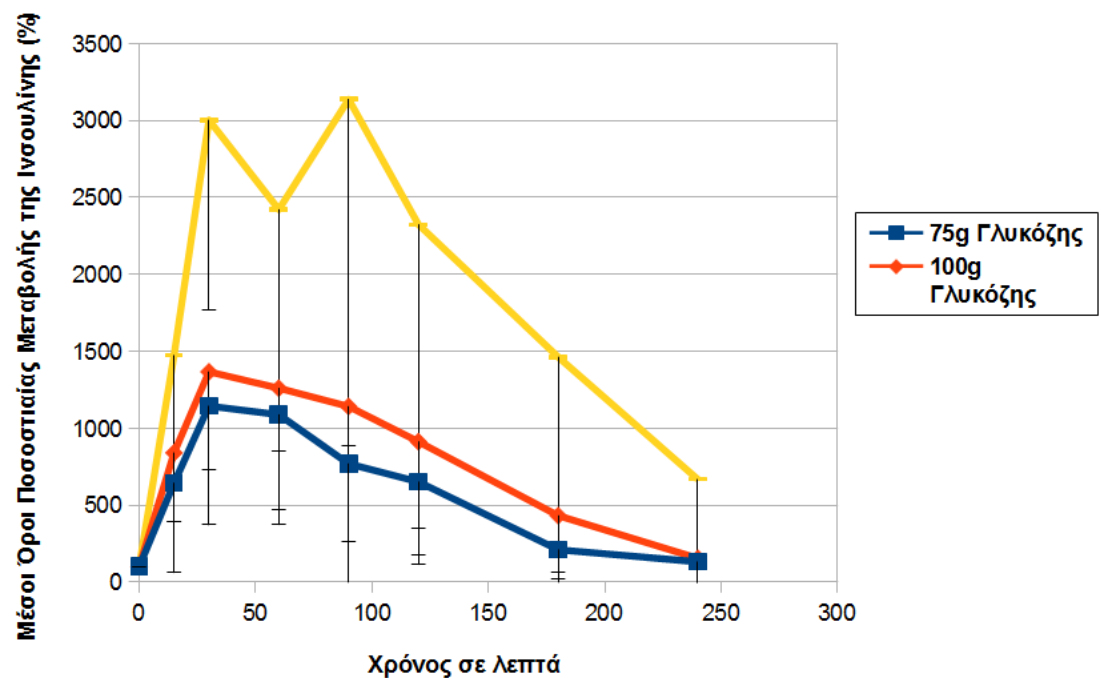
Διάγραμμα 2 - Μεταβολή απόλυτων τιμών ινσουλίνης σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση (* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon) [50]

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης αλλά και εκείνων της ινσουλίνης ως προς το χρόνο και για τις τρεις παρεμβάσεις (75γρ: $p=0,000$, $0,000$, $100γρ$: $p=0,000$, $0,000$, $150γρ$: $p=0,006$, $0,000$).

Τα διαγράμματα ποσοστιαίας μεταβολής της συγκέντρωσης της γλυκόζης και της ινσουλίνης σε σχέση με το χρόνο 0 (Διάγραμμα 3 και Διάγραμμα 4), παρατίθενται παρακάτω.

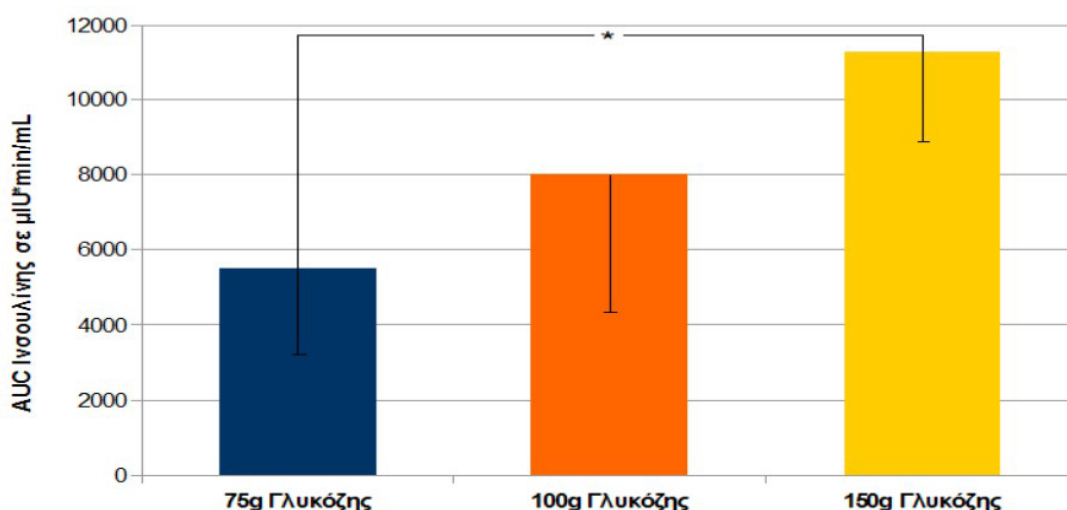


Διάγραμμα 3 - Ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση [50]



Διάγραμμα 4 - Ποσοστιαία μεταβολή ινσουλίνης σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση [50]

Τέλος, συγκρίνοντας τα iAUC της γλυκόζης, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon, παρατηρείται μία οριακά στατιστικά σημαντική διαφορά στο iAUC της γλυκόζης, μεταξύ της φόρτισης των 75gr και 150gr ($p=0,080$). Κατ' αντιστοιχία για την ινσουλίνη εμφανίζεται μια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των iAUC της ινσουλίνης μεταξύ 75gr-100gr ($p=0,043$) και μεταξύ 75gr-150gr ($p=0,043$), αλλά και οριακά στατιστική σημαντικότητα μεταξύ 100gr-150gr ($p=0,080$). Παρακάτω παρατίθεται το διάγραμμα για την ινσουλίνη (Διάγραμμα 5) [50].



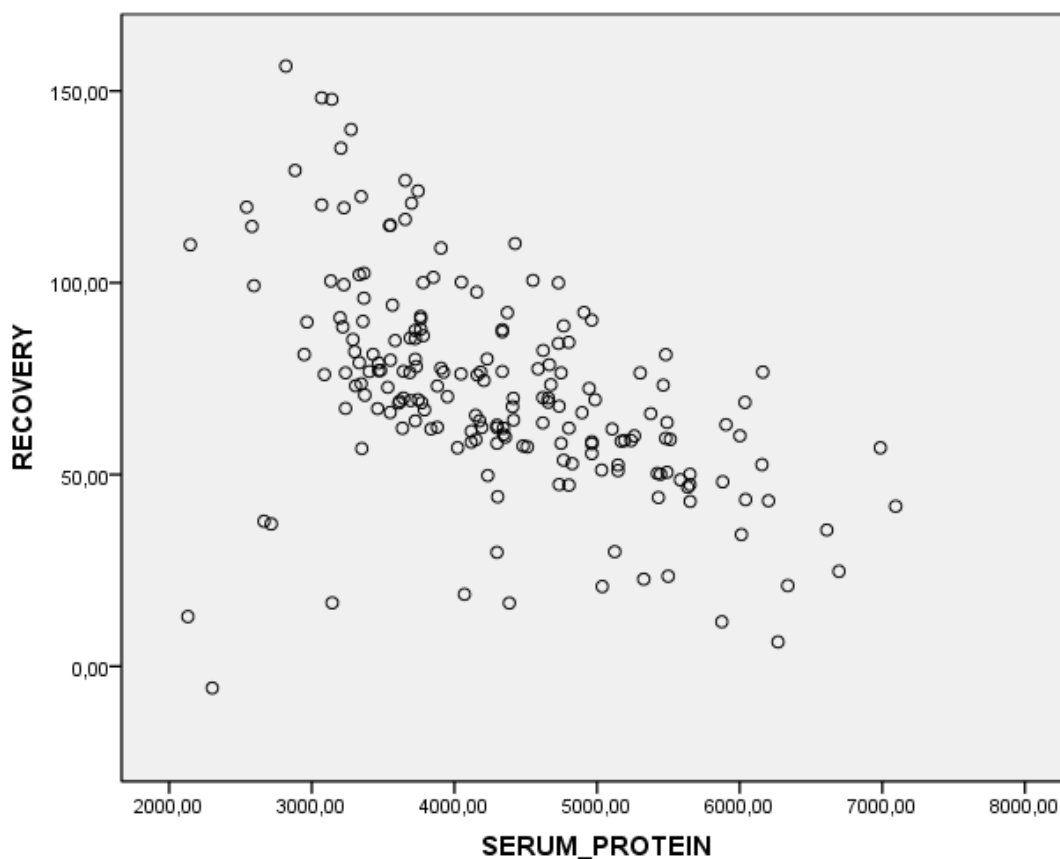
Διάγραμμα 5 - Συγκριτική παράθεση των iAUC της ινσουλίνης, ανά παρέμβαση (* = $p<0,05$ σε σχέση με τις δύο παρεμβάσεις (75g και 150g), σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon) [50]

4.4. Μέτρηση πρωτεϊνικών καρβονυλίων – Έλεγχος μεθοδολογίας

Λόγω της διαφορετικής συγκέντρωσης πρωτεΐνης στο αίμα των εθελοντών, αλλά και λόγω των πολλαπλών σταδίων της μεθοδολογίας απομόνωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (κάτι που φυσιολογικά αυξάνει τον κίνδυνο για απώλειες), υπολογίστηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης τόσο στον ορό, όσο και στο τελικό διάλυμα φωτομέτρησης. Με αυτόν τον τρόπο έγινε δυνατή η εκτίμηση εκείνης της συγκέντρωσης πρωτεΐνης που θα χρησιμοποιούταν για την κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Εκτιμήθηκε το ποσοστό ανάκτησης της πρωτεΐνης ως ποσοστό τελικής προς αρχικής ποσότητας πρωτεΐνης ($\text{recovery \%} = \text{τελική} / \text{αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης} \times 100$). Θεωρητικά, σε ιδανικές συνθήκες το ποσοστό αυτό θα έπρεπε να είναι 100.

Κοιτώντας τα ποσοστά ανάκτησης πρωτεΐνης (% recovery) για όλες τις μετρήσεις, παρατηρήθηκε πως αυτά σχετίζονται με την αρχική ποσότητα πρωτεΐνης στον ορό. Χαρακτηριστικά, με αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης στο αρχικό δείγμα του ορού υπήρχαν μεγαλύτερες απώλειες (Διάγραμμα 6). Αυτό το φαινόμενο πιθανά οφείλεται στο ότι σε ποσότητες πρωτεΐνης ορού μεγαλύτερες 3,5 mg δεν δύναται να διαλυθεί πλήρως το τελικό ίζημα της πρωτεΐνης στην υδροχλωρική γουανιδίνη. (βήμα 10 αναλυτικής πορείας προσδιορισμού πρωτεϊνικών καρβονυλίων).



Διάγραμμα 6 - Συσχέτιση της % ανάκτησης πρωτεΐνης με την αρχική ποσότητα πρωτεΐνης ορού στην δοκιμασία των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Για την καλύτερη συνεπώς κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση πρωτεΐνης στο τελικό διάλυμα φωτομέτρησης.

4.5. Συσχέτιση των επιπέδων σε πρωτεϊνικά καρβονύλια με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την παρέμβαση (χρόνος 0 - baseline)

Βρέθηκε πως δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων και ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών πριν την παρέμβαση (χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Spearman).

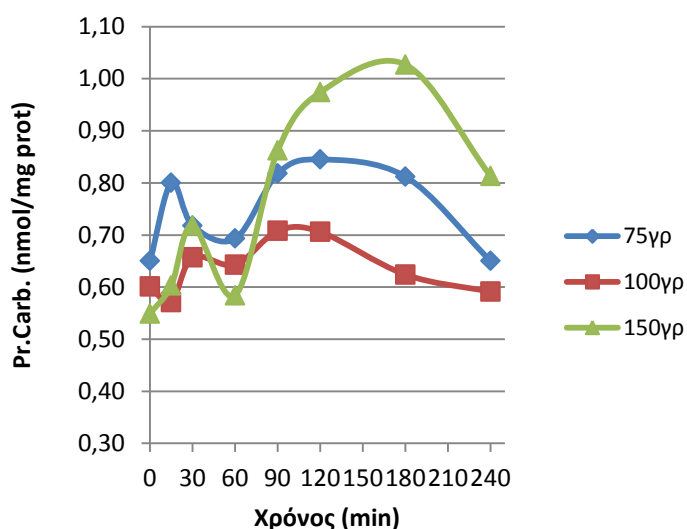
Επίσης, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ ανδρών και γυναικών στο δείγμα σχετικά με τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών πριν την παρέμβαση (σύγκριση διάμεσης τιμής χαρακτηριστικών ανάμεσα σε άνδρες και γυναίκες με την ανάλυση Mann-Whitney).

4.6. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων

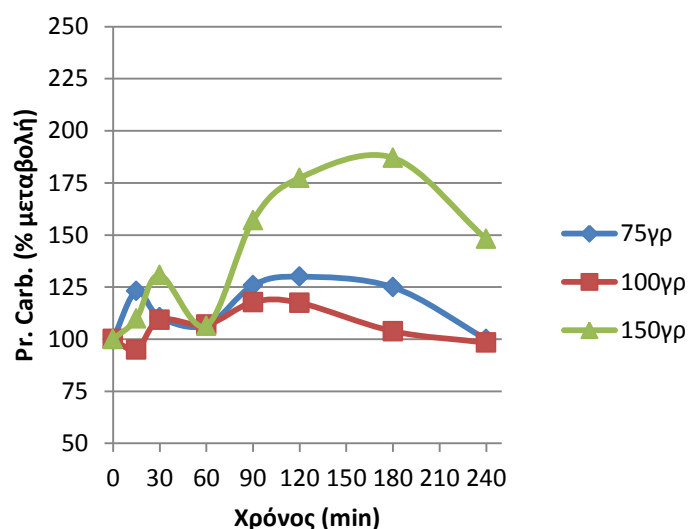
4.6.1. Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το χρόνο, ανά εθελοντή

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγράμματα συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg prot), όπως και οι ποσοστιαίες αλλαγές σε σχέση με το χρόνο 0, μετά από κάθε παρέμβαση σε σχέση με το χρόνο, δηλαδή τις διάφορες χρονικές στιγμές των παρεμβάσεων (min), για τον κάθε εθελοντή ξεχωριστά.

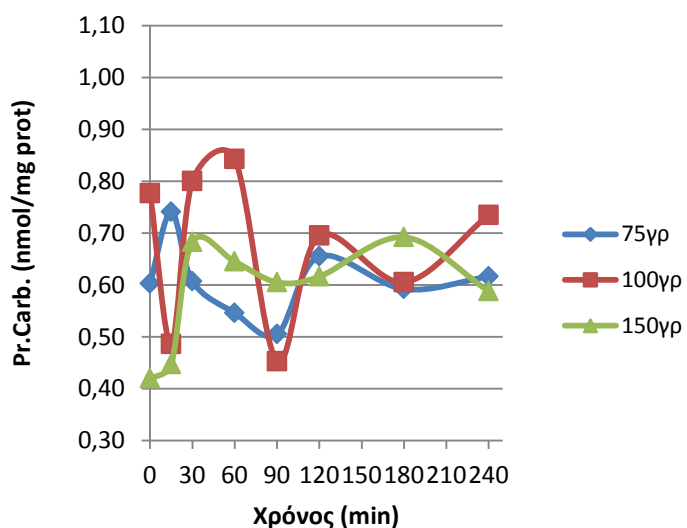
Εθελοντής 1



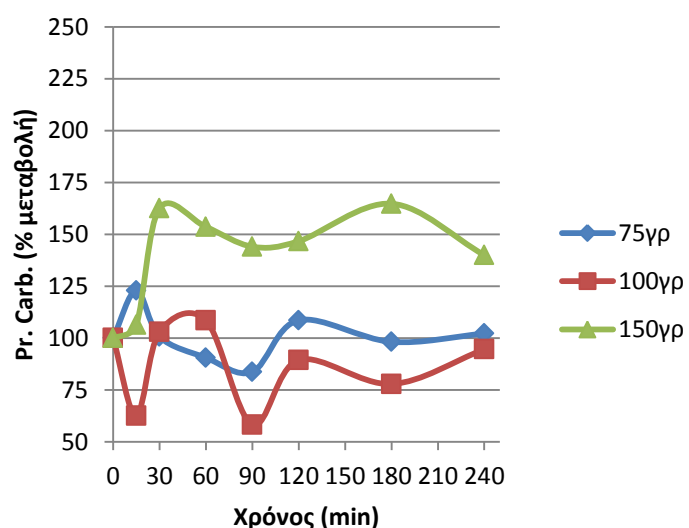
Εθελοντής 1



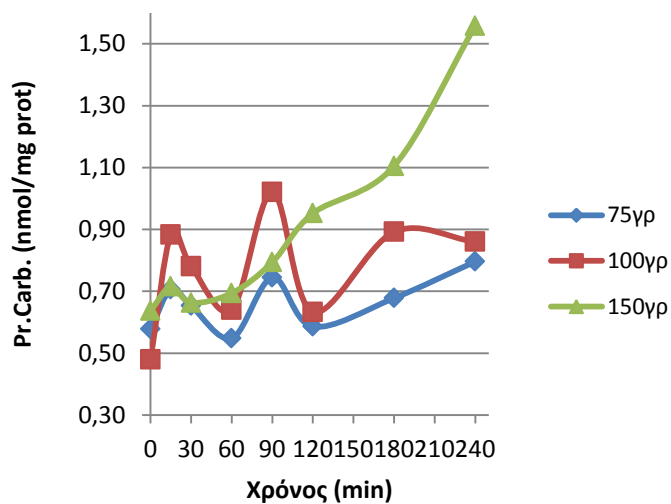
Εθελοντής 3



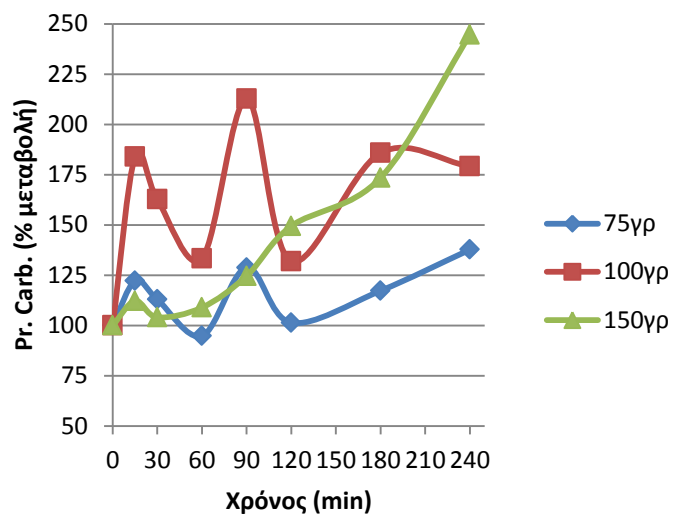
Εθελοντής 3



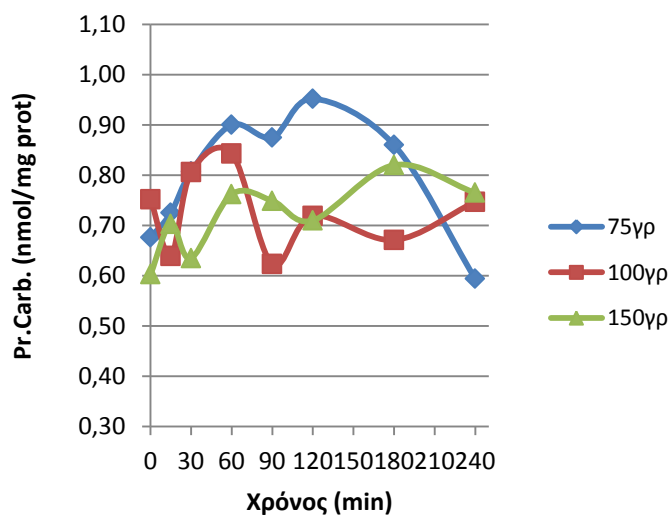
Εθελοντής 4



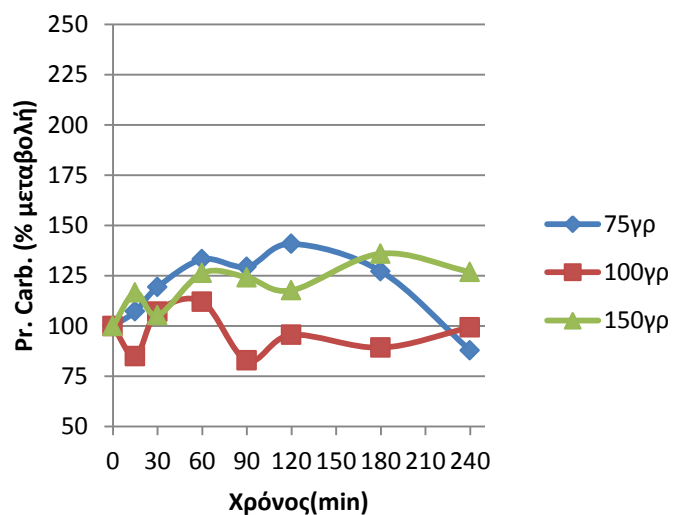
Εθελοντής 4



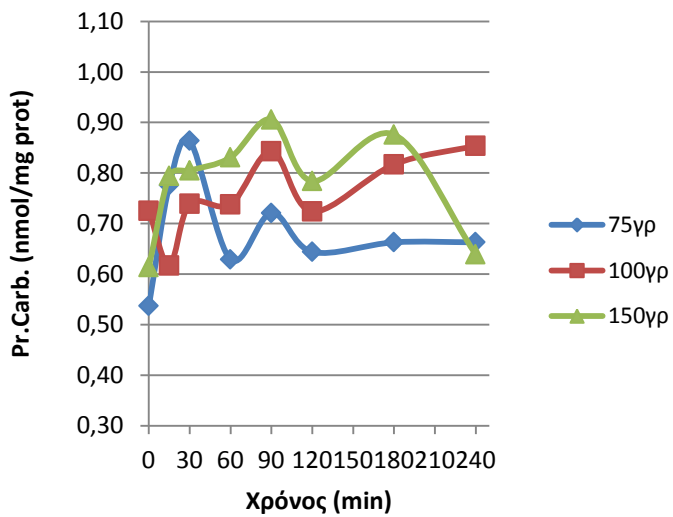
Εθελοντής 5



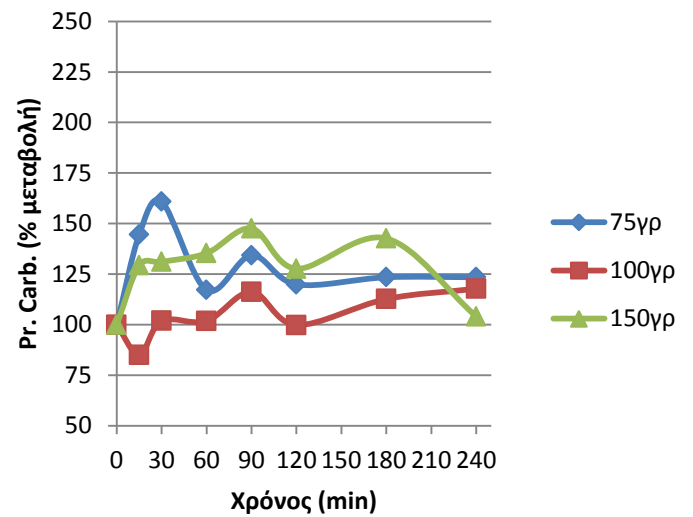
Εθελοντής 5



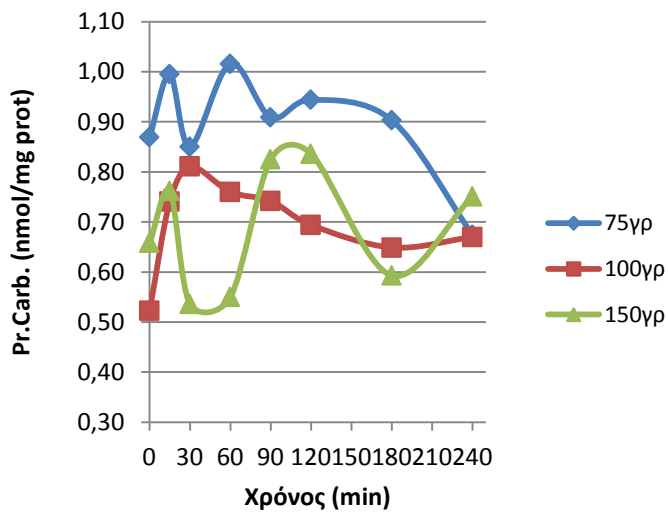
Εθελοντής 6



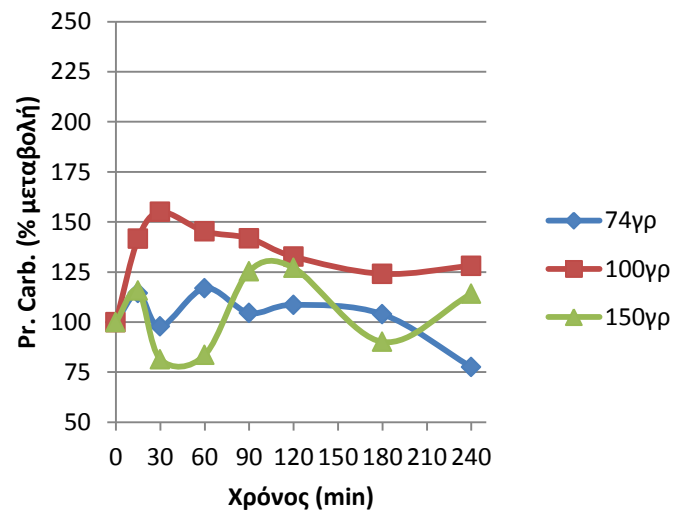
Εθελοντής 6

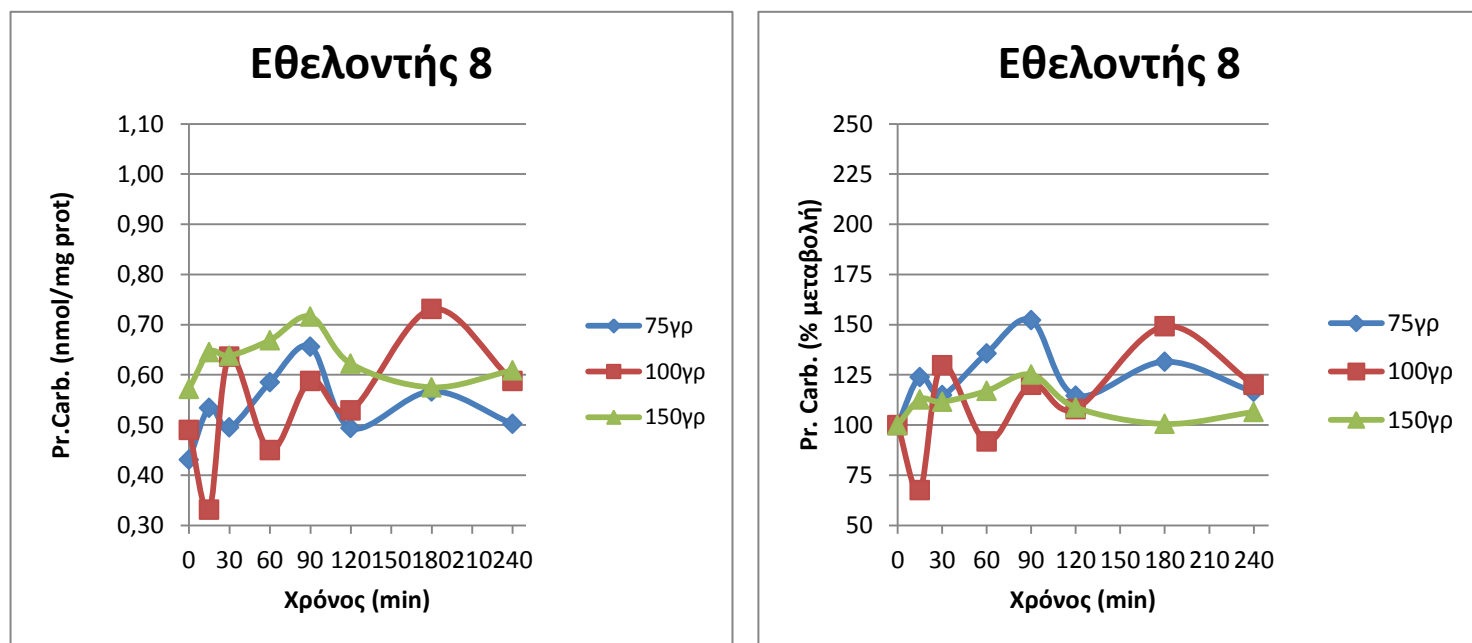


Εθελοντής 7



Εθελοντής 7





Σχήμα 13 - Μεταβολές πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Pr. Carb.) μετά από φορτίσεις γλυκόζης ανά εθελοντή

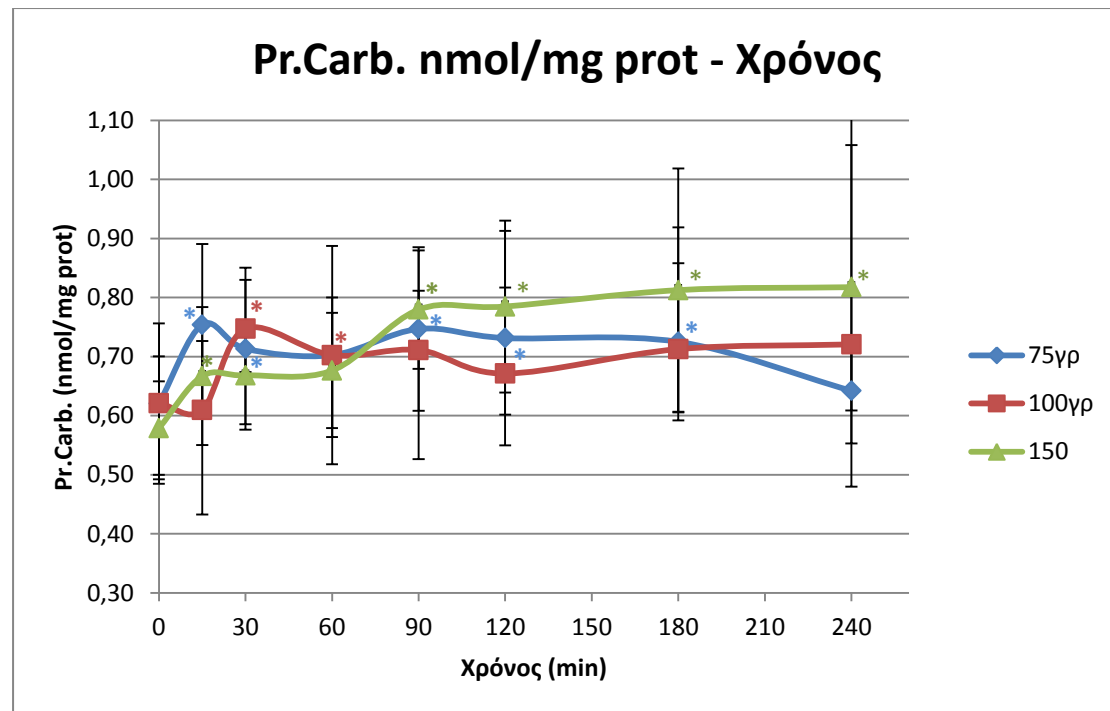
4.6.2. Συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά μέτρηση και ποσοστιαίες αλλαγές σε σχέση με το χρόνο 0, ανά παρέμβαση

Στη συνέχεια βρίσκεται ένας συγκεντρωτικός πίνακας (Πίνακας 4) με τις διάμεσες τιμές των συγκεντρώσεων πρωτεϊνικών καρβονυλίων όλων των εθελοντών, όπως και τους μ.ο. των ποσοστών επί της αρχικής συγκέντρωσης (χρόνος 0), για τις διαφορετικές παρεμβάσεις στις διάφορες χρονικές στιγμές. Τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων πριν την παρέμβαση (χρόνος 0) δεν διαφοροποιούνται σημαντικά ($p=0,884$) μεταξύ των παρεμβάσεων.

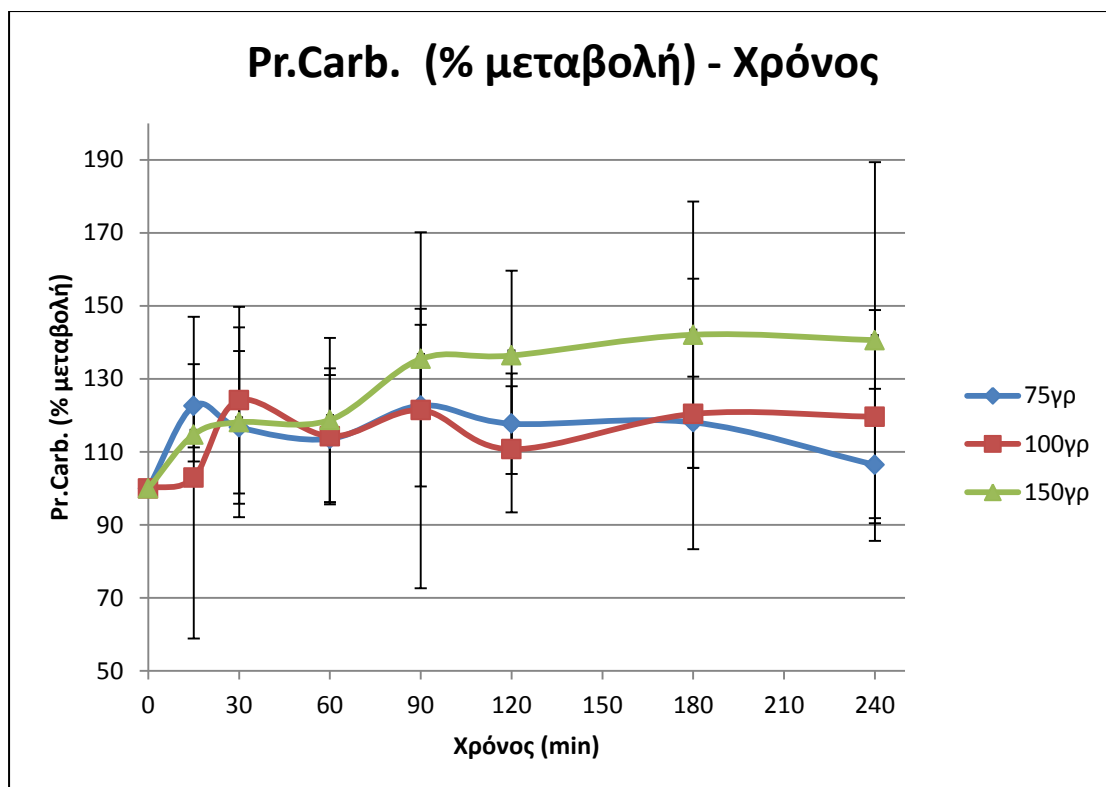
Πίνακας 4 - Διάμεσες τιμές συγκεντρώσεων πρωτεϊνικών καρβονυλίων ($25^{\circ} - 75^{\circ}$ εκατοστημόριο), και μ.ο. ποσοστών επί της αρχικής συγκέντρωσης (χρόνος 0), για τις διαφορετικές παρεμβάσεις στις διάφορες χρονικές στιγμές

Παρεμβάσεις	Χρονικές στιγμές							
	0	15	30	60	90	120	180	240
75yr	0,603 (0,537- 0,676)	0,741 (0,706-0,8)	0,718 (0,607- 0,85)	0,629 (0,548-0,9)	0,744 (0,656- 0,875)	0,655 (0,586- 0,944)	0,678 (0,592- 0,86)	0,65 (0,594- 0,674)
	100 (± 0)	122,61 ($\pm 11,43$)	116,72 ($\pm 20,94$)	113,56 ($\pm 17,46$)	122,69 ($\pm 22,14$)	117,72 ($\pm 13,73$)	118,08 ($\pm 12,51$)	106,46 ($\pm 20,85$)
	0,601 (0,49- 0,752)	0,617 (0,486- 0,741)	0,781 (0,657- 0,806)	0,738 (0,64- 0,843)	0,708 (0,588- 0,944)	0,695 (0,633- 0,719)	0,671 (0,624- 0,817)	0,735 (0,591- 0,854)
100yr	0,601 (0,49- 0,752)	0,617 (0,486- 0,741)	0,781 (0,657- 0,806)	0,738 (0,64- 0,843)	0,708 (0,588- 0,944)	0,695 (0,633- 0,719)	0,671 (0,624- 0,817)	0,735 (0,591- 0,854)
	100 (± 0)	102,98 ($\pm 44,07$)	124,14 ($\pm 25,58$)	114,27 ($\pm 18,61$)	121,4 ($\pm 48,76$)	110,7 ($\pm 17,24$)	120,39 ($\pm 37,06$)	119,62 ($\pm 29,29$)
	0,603 (0,549- 0,637)	0,703 (0,603- 0,762)	0,663 (0,635- 0,718)	0,669 (0,584- 0,762)	0,794 (0,716- 0,862)	0,784 (0,622- 0,952)	0,82 (0,593- 1,027)	0,751 (0,609- 0,813)
150yr	0,603 (0,549- 0,637)	0,703 (0,603- 0,762)	0,663 (0,635- 0,718)	0,669 (0,584- 0,762)	0,794 (0,716- 0,862)	0,784 (0,622- 0,952)	0,82 (0,593- 1,027)	0,751 (0,609- 0,813)
	100 (± 0)	114,71 ($\pm 7,31$)	118,13 ($\pm 26,01$)	118,74 ($\pm 22,49$)	135,43 ($\pm 13,76$)	136,39 ($\pm 23,22$)	142,09 ($\pm 36,49$)	140,6 ($\pm 48,75$)
	0,603 (0,549- 0,637)	0,703 (0,603- 0,762)	0,663 (0,635- 0,718)	0,669 (0,584- 0,762)	0,794 (0,716- 0,862)	0,784 (0,622- 0,952)	0,82 (0,593- 1,027)	0,751 (0,609- 0,813)

Στη συνέχεια, παρατίθενται το διάγραμμα με το μ.ο. των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων (nmol/mg prot) σε σχέση με το χρόνο (min) (Διάγραμμα 7). Ακολουθεί αντίστοιχο διάγραμμα με τους μ.ο. των ποσοστών της συγκέντρωσης τις διάφορες χρονικές στιγμές της παρέμβασης επί της αρχικής συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων (Διάγραμμα 8).



Διάγραμμα 7 –Μεταβολή συγκεντρώσεων πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση (* = $p < 0,05$ σε σχέση με το χρόνο 0, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon)



Διάγραμμα 8 – Ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών καρβονυλίων τις διάφορες χρονικές στιγμές της παρέμβασης, σε σχέση με την αρχική (χρόνος 0) συγκέντρωση

Θέλοντας να προσδιοριστεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στο χρόνο σε κάθε επιμέρους παρέμβαση βρέθηκε ότι:

Πίνακας 5 - - Στατιστική σημαντικότητα των μεταβολών των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. στο χρόνο, ανά παρέμβαση

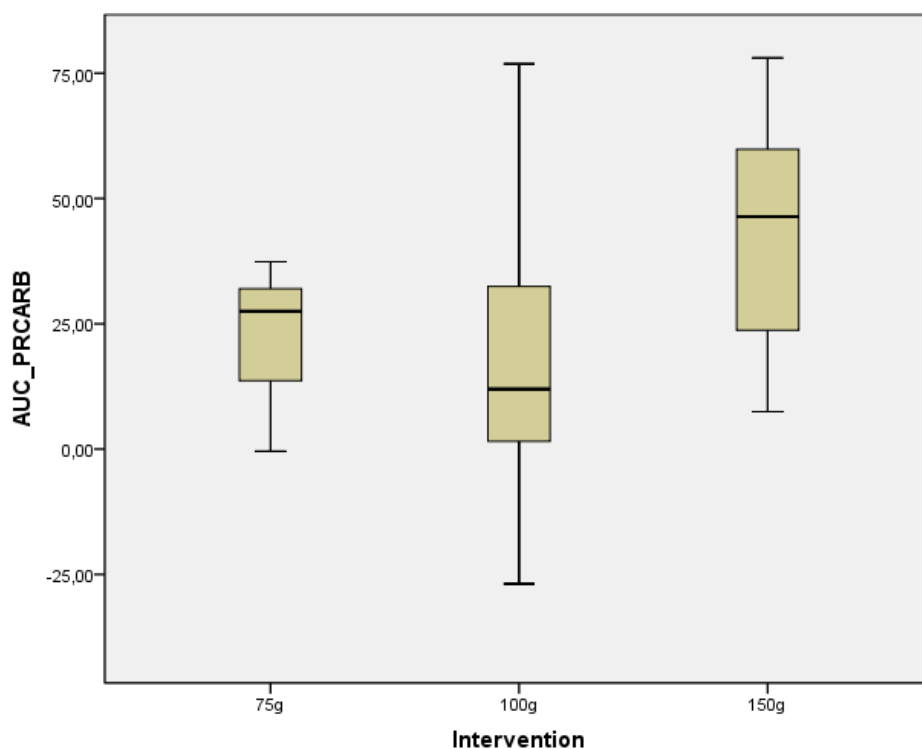
	Σ.Σ.μεταβολή στο χρόνο	p
75γpr	οριακά σ.σ.	p=0,087
100γpr	μη σ.σ.	p=0,109
150γpr	σ.σ.	p=0,008

Τα αποτελέσματα των χρονικών στιγμών τα οποία έχουν στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με το χρόνο 0 ανά παρέμβαση (ανάλυση Wilcoxon) χαρακτηρίζονται με αστερίσκο (*) στο παραπάνω Διάγραμμα 7 των συγκεντρώσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το χρόνο.

Θέλοντας να προσδιοριστεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις μεταβολές των Pr.Carb μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων υπολογίστηκε το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη (iAUC) για τις μεταβολές των Pr.Carb. Παρακάτω παρατίθενται ο πίνακας και το αντίστοιχο Διάγραμμα 9 με τις διάμεσες τιμές των iAUC για τις διάφορες παρεμβάσεις. Η ανάλυση Kruskal-Wallis δεν έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών αυτών. Επίσης, δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των παρεμβάσεων συγκρινόμενες ανά 2.

Πίνακας 6 - Διάμεσες τιμές (25^ο-75^ο εκατοστημόριο) για τα iAUC πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ανά παρέμβαση

	75γρ	100γρ	150γρ
iAUC (nmol*min/mg)	27,48	11,97	46,39
	(6,69- 35,38)	(-8,11-43,1)	(13,35- 70,78)



Διάγραμμα 9 – Συγκριτική παράθεση των iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ανά παρέμβαση

Αν συγκριθούν οι ποσοστιαίες μεταβολές ανά χρονική στιγμή μεταξύ των φορτίσεων, φαίνεται μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ($p=0,074$) τη χρονική στιγμή $t=120\text{min}$. Επιπρόσθετα, αν συγκρίνουμε τις μεταβολές αυτές ανά δύο παρεμβάσεις κάθε χρονική στιγμή προκύπτουν οι εξής στατιστικά σημαντικές διαφορές:

Πίνακας 7 - Σύγκριση ποσοστιαίων μεταβολών ανά 2 παρεμβάσεις κάθε χρονική στιγμή

	Χρονική στιγμή	Σ.Σ.διαφορά	p
75-150γρ	120min	οριακά σ.σ.	$p=0,085$
	240min	οριακά σ.σ.	$p=0,064$
100-150γρ	90min	οριακά σ.σ.	$p=0,085$
	120min	σ.σ.	$p=0,048$

4.7. Συσχέτιση των επιπέδων βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών πριν την παρέμβαση (χρόνος 0 - baseline) με τις μεταβολές των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις φορτίσεις

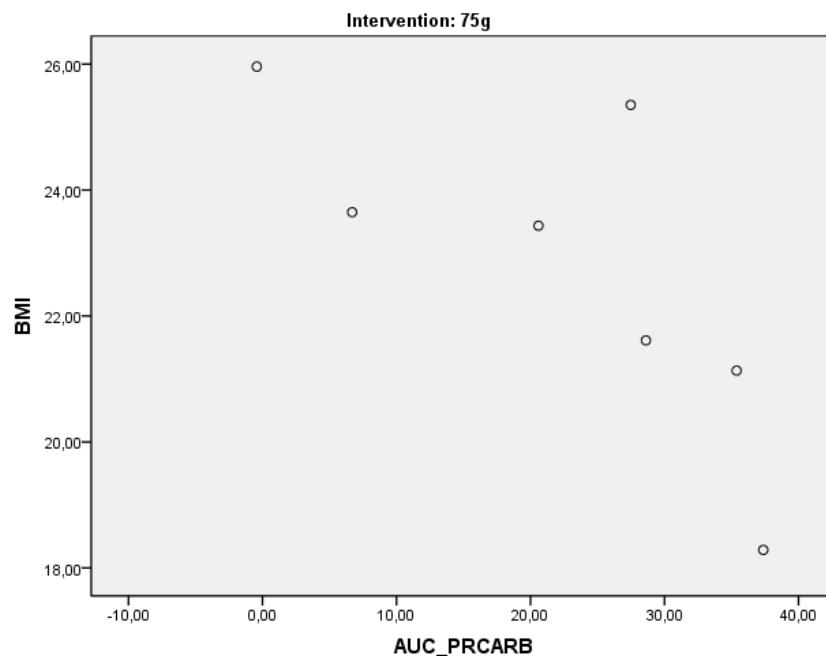
Σε μία προσπάθεια να μελετηθεί κατά πόσο υπάρχει αλληλοσυσχέτιση μεταξύ βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και αιματολογικών χαρακτηριστικών πριν την παρέμβαση με τις μεταβολές των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις φορτίσεις συσχετίστηκαν τα iAUC με τα αντίστοιχα χαρακτηριστικά των εθελοντών.

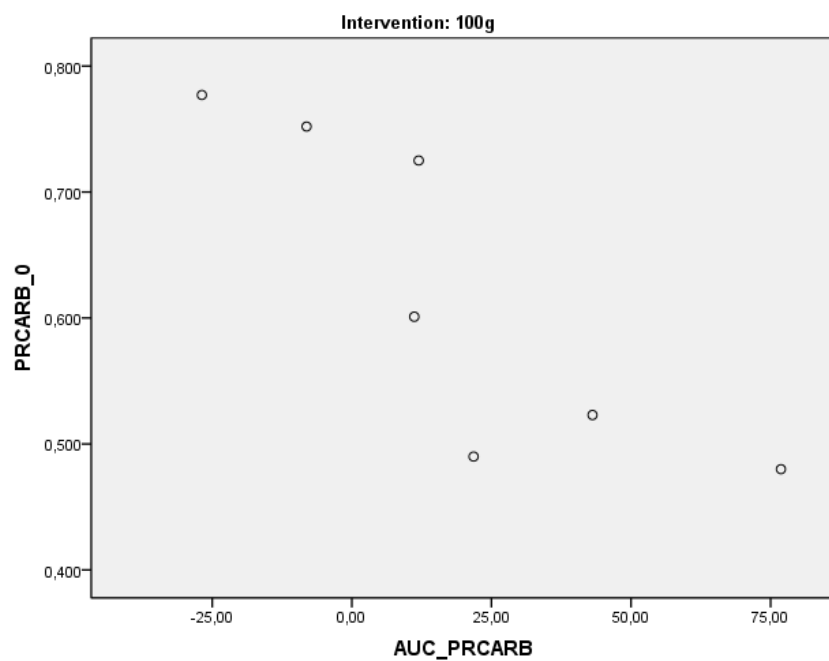
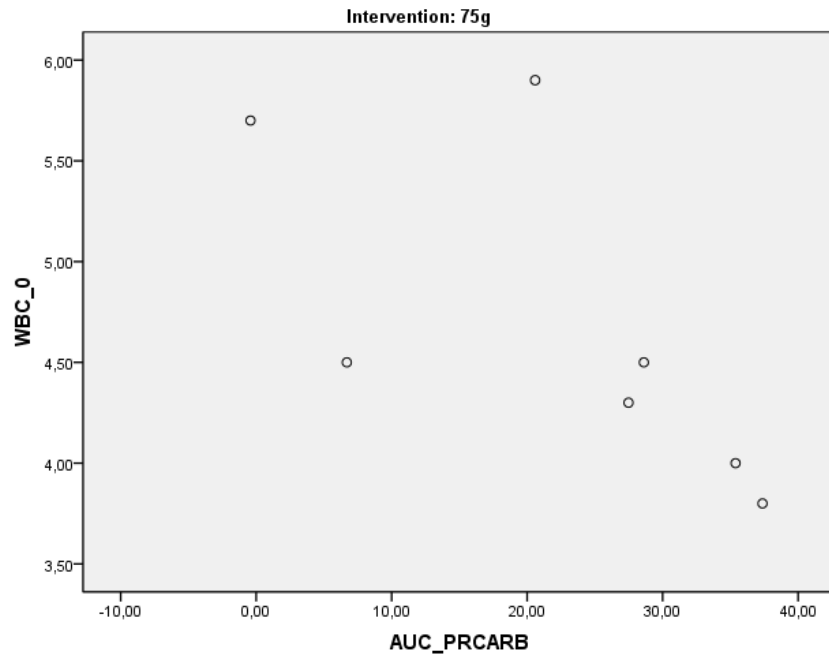
Τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακας 8.

Πίνακας 8 - Συσχέτιση βασικών χαρακτηριστικών στο χρόνο 0 με τις μεταβολές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις φορτίσεις

	Χαρακτηριστικό	r	p
75γρ	BMI	-0,893	0,007
	WBC	-0,811	0,0027
100γρ	PR.CARB.	-0,929	0,003
150γρ	-	-	-

Παρακάτω παρατίθενται και τα αντίστοιχα διαγράμματα διασποράς (Διάγραμμα 10) για τις παραπάνω συσχετίσεις.



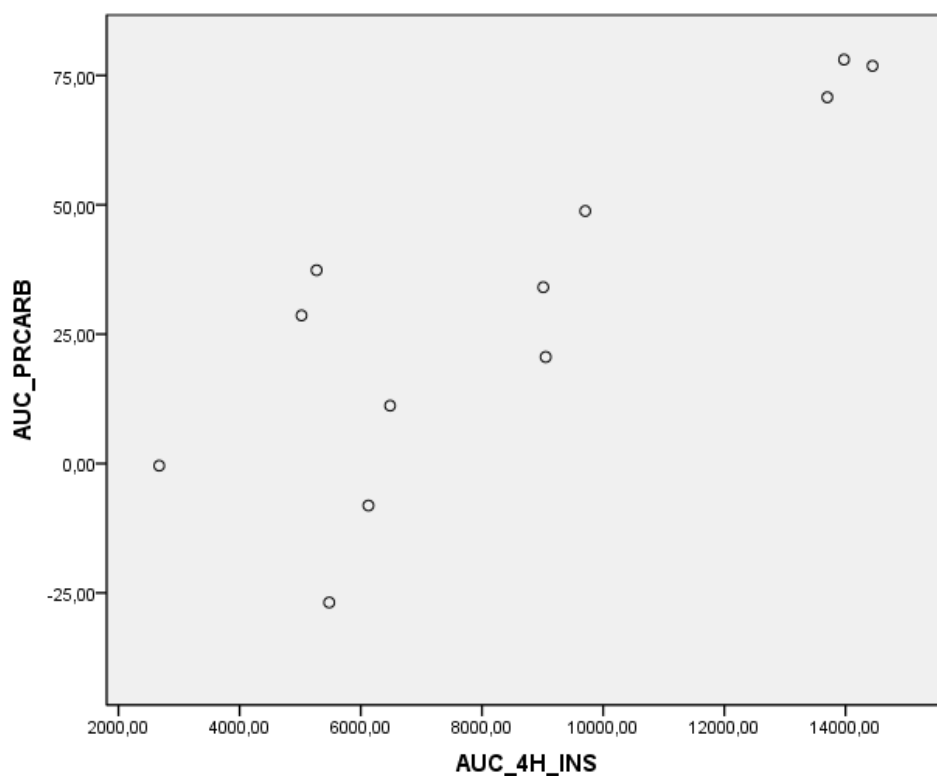


Διάγραμμα 10 - Συσχετίσεις μεταξύ BMI, WBC και PR.CARB πριν την παρέμβαση σε σχέση με τη μεταβολή στη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων.

Πέρα από τα παραπάνω, βρέθηκε πώς τα χαρακτηριστικά των εθελοντών στο χρόνο 0 δεν επηρεάζουν τις μεταβολές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, όπως εκφράζονται μέσα από το iAUC.

4.8. Συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων με τις μεταβολές των επιπέδων γλυκόζης, ινσουλίνης, ιντερλευκίνης-6 και δραστικότητα αιμοπεταλίων (EC50 ADP και EC50 TRAP)

Η μόνη σημαντική συσχέτιση ήταν εκείνη μεταξύ του iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και του iAUC της ινσουλίνης ($p=0,007$, $r=0,727$). Αυτό γίνεται φανερό και από το παρακάτω Διάγραμμα 11, στο οποίο παρουσιάζεται η σχέση μεταξύ των iAUC πρωτεϊνικών καρβονυλίων και ινσουλίνης.



Διάγραμμα 11 - Συσχέτιση iAUC πρωτεϊνικών καρβονυλίων και iAUC ινσουλίνης

5. Συζήτηση

5.1. Εισαγωγή

Πριν την ανάλυση των αποτελεσμάτων είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ο αναγνώστης πρέπει να μελετήσει την έρευνα, σε συνδυασμό και με παρόμοιες μελέτες της βιβλιογραφίας, και να συμπεράνει με επιφυλακτικότητα. Αρχικά, το δείγμα των εθελοντών της μελέτης ήταν αντικειμενικά μικρό ($N=7$), επηρεάζοντας όπως είναι λογικό τη στατιστική δύναμη της μελέτης. Επίσης, η μελέτη περιλαμβάνει βιολογικούς μηχανισμούς, που αν και εξετάστηκαν αποκλειστικά σε υγιείς ανθρώπους, αναμένονται φυσιολογικές μεταβολές και διαφορές από οργανισμό σε οργανισμό (ειδικά εξεταζόμενες σε τόσο μικρό δείγμα).

5.2. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης

Συμπερασματικά, το πειραματικό πρωτόκολλο της παρούσας εργασίας με τις 3 διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης κατάφερε να διαφοροποιήσει την υπερινσουλιναιμία και όχι την υπεργλυκαιμία. Αυτό το γεγονός φαίνεται λογικό από τη στιγμή που η μελέτη περιλάμβανε υγιείς ανθρώπους, στους οποίους η ινσουλίνη αντιστάθμιζε τα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Χαρακτηριστική είναι η γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης της ινσουλίνης με την αύξηση των γραμμαρίων γλυκόζης της παρέμβασης (Διάγραμμα 5).

5.3. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων

5.3.1. Ανά εθελοντή & ανά παρέμβαση

Μελετώντας τα διαγράμματα για κάθε εθελοντή ξεχωριστά, παρατηρείται πως δεν εμφανίζεται μία ξεκάθαρη τάση μεταβολής της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση. Παρόλα αυτά, παρατηρείται μια σχετική διαφοροποίηση στο μοτίβο μεταβολής των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα αντίστοιχα διαγράμματα, και θα μπορούσε κάποιος να ισχυριστεί πως οι μετρήσεις στα 75 και τα 100γρ σχεδόν σε όλους τους εθελοντές ακολουθούν μια πιο ομαλή πορεία μέχρι το τέλος των μετρήσεων, ειδικά σε σχέση με την παρέμβαση των 150γρ. Αυτή η παρατήρηση επαληθεύεται κοιτώντας τα διαγράμματα με τους μ.ο. των συγκεντρώσεων ανά παρέμβαση και των ποσοστιαίων αλλαγών ανά παρέμβαση (Διάγραμμα 7 & Διάγραμμα 8).

Μένοντας στο διάγραμμα των μ.ο. των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων από όλους τους εθελοντές, παρατηρείται μια γενικότερη αύξηση στη συγκέντρωση τους αμέσως μετά από όλες φορτίσεις γλυκόζης. Παρόλα αυτά, η ανάλυση Kruskal-Wallis, όπως και η Mann-Whitney, δεν έδειξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 3 παρεμβάσεων συνολικά και συγκρινόμενες ανά 2 αντίστοιχα. Βέβαια μελετώντας το αντίστοιχο Διάγραμμα 9 με τα $iAUC$, παρατηρείται κάποια τάση

αύξησης, ειδικά μεταξύ των παρεμβάσεων 75-150γρ και 100-150γρ. Το γεγονός ότι αυτή η τάση δεν επιβεβαιώνεται από τη στατιστική ανάλυση οφείλεται, όπως αναφέρθηκε στην εισαγωγή, στις μεγάλες τυπικές αποκλίσεις, όπως επίσης και στο μικρό αριθμό δείγματος (N=7).

Προχωρώντας όμως στην στατιστική ανάλυση των παρεμβάσεων μεμονωμένα, η μόνη παρέμβαση που φάνηκε να διαθέτει στατιστικά σημαντική μεταβολή στο χρόνο είναι τα 150γρ. Αν ληφθεί υπόψιν και η ανάλυση Wilcoxon, παρατηρείται πως τα σημεία στα οποία οφείλεται αυτή η μεταβολή κυρίως ανήκουν στις μετρήσεις μετά τα 90 λεπτά, όπου η γλυκόζη πλέον έχει απορροφηθεί σχεδόν πλήρως από το εντερικό επιθήλιο. Αυτό πιθανά οφείλεται στο ότι αυτά τα γραμμάρια γλυκόζης πυροδοτούν μεγαλύτερες αυξομειώσεις στο οξειδωτικό στρες του οργανισμού, όπως εκφράζεται μέσα από τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Κάτι τέτοιο φαντάζει λογικό από τη στιγμή που αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σημαίνουν αυξημένη παραγωγή των προϊόντων της γλυκοζυλίωσης, επομένως και περισσότερη τροφοδοσία της αναπνευστικής αλυσίδας με ελεύθερα ηλεκτρόνια. Τα ελεύθερα αυτά ηλεκτρόνια τελικά καταλήγουν να δημιουργήσουν ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS/NOS), οι οποίες με τη σειρά τους πλήττουν και άλλους μηχανισμούς (π.χ. πορεία πολυολών) συμβάλλοντας στην παραγωγή επιπλέον ROS/NOS.

Επιπλέον, παρατηρείται πως τα επίπεδα του οξειδωτικού στρες για τα 150γρ φαίνεται να μην έχουν επανέρθει στο φυσιολογικό ακόμα και μετά από 4 ώρες από την παρέμβαση. Τέτοιο φαινόμενο δεν παρατηρείται με τις παρεμβάσεις των 75 και των 100γρ, όπου η 4ωρη μέτρηση δε χαρακτηρίζεται από επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων διαφορετικά σε σχέση με το χρόνο 0. Επομένως, θα μπορούσε να συμπεράνει κανείς πως τα 150γρ πυροδοτούν μεγαλύτερες, τόσο σε ύψος όσο και σε διάρκεια, μεταβολές στο οξειδωτικό στρες στον οργανισμό υγιών ατόμων, μέσα από την εντονότερη και μακρύτερη τροφοδότηση της μιτοχονδριακής αλυσίδας ηλεκτρονίων με ηλεκτρόνια από τα γλυκοζυλιωτικά προϊόντα. Τέλος, σαν σχολιασμό του αντίστοιχου Διάγραμμα 7, θα μπορούσε κανείς να παρατηρήσει πως στις 4 ώρες, οι συγκεντρώσεις των 3 παρεμβάσεων ακολουθούν μια βαθμίδωση όμοια με εκείνη των γραμμαρίων γλυκόζης, αν και όχι με στατιστικά σημαντική σχέση.

Παραπάνω ειπώθηκε πως ενδεχομένως η στατιστική σημαντικότητα της παρέμβασης των 150γρ οφείλεται στο ότι ο οργανισμός μπαίνει σε κατάσταση υπερ-τροφοδότησης ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια προάγωντας έτσι την παραγωγή οξειδωτικού στρες. Αν κρίνουμε βέβαια από το γεγονός ότι η παρέμβαση των 75γρ, δηλαδή μιας πιο χαμηλής αν όχι και πιο «φυσιολογικής» για την καθημερινότητα συγκέντρωσης, φαίνεται να διαθέτει οριακά στατιστικά σημαντική μεταβολή στο χρόνο, δεν βγάζει νόημα το παραπάνω. Δηλαδή, πέρα από το ότι φαίνεται ότι μια συγκέντρωση (75γρ) και η διπλάσια της (150γρ) πυροδοτούν μεταβολές στο

οξειδωτικό στρες, θα περίμενε κανείς, βλέποντας πως οι παρεμβάσεις των 75 και των 150γρ διαθέτουν (σχετικά) στατιστικά σημαντικές μεταβολές στο χρόνο, πως και εκείνη των 100γρ θα προκαλούσε ως ένα βαθμό διαφοροποίηση στις συγκεντρώσεις πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Αυτές οι μεταβολές, αν και εμφανείς ως ένα βαθμό στο Διάγραμμα 7 δεν επιβεβαιώνονται στατιστικά, και εδώ πλέον πιθανά λόγω των μεγάλων τυπικών αποκλίσεων και του μικρού αριθμού του δείγματος στη μελέτη (N=7).

Παραπάνω αναφέρθηκε πως παρατηρείται κάποια ευρύτερη αύξηση στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων αμέσως μετά από όλες φορτίσεις γλυκόζης. Στατιστικά, σημαντικές διαφορές παρατηρούνται σε όλες τις παρεμβάσεις μεταξύ του χρόνου 0 και των αρχικών μετρήσεων (15 και 30 λεπτά). Τα 75 και τα 150γρ φαίνονται να αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στα πρώτα 15 λεπτά, με τα 75 γρ (όπως και τα 100γρ) να συνεχίζουν την σημαντική αύξηση σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα και στα 30 λεπτά. Επομένως, η υπόθεση πως η επίδραση των αυξημένων επιπέδων γλυκόζης στο οξειδωτικό στρες είναι άμεση φαίνεται ιδιαίτερα ρεαλιστική. Επιπλέον, μέσα σε αυτό το χρονικό διάστημα, είναι και που η γλυκόζη αποκτά τα υψηλότερα επίπεδα της στο αίμα, κάτι που σημαίνει πως όχι μόνο η επίδραση της γλυκόζης είναι άμεση στον οργανισμό αλλά και «ταυτόχρονη» με την αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Συμπερασματικά,θα μπορούσε κανείς να παρατηρήσει πως η γλυκοζυλίωση αρχίζει να πραγματοποιείται από τα πρώτα κιόλας λεπτά, και μάλιστα πως τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης πλήττουν από νωρίς την αναπνευστική αλυσίδα, αυξάνοντας άμεσα τα επίπεδα οξειδωτικού στρες στον οργανισμό.

Βέβαια, δεν πρέπει να παραλειφθεί πως όλες οι παραπάνω στατιστικά σημαντικές ή όχι μεταβολές σε σχέση με το χρόνο 0 δεν είναι απαραίτητο ότι ισχύουν και στην πραγματικότητα. Παρατηρώντας τα διαγράμματα της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το χρόνο, ανά εθελοντή, φαίνεται πως σε μερικές παρεμβάσεις υπάρχουν αρκετά μεγάλες αυξομειώσεις και υψηλές κορυφές, οι οποίες είναι σίγουρο πως επηρέασαν τα στατιστικά κριτήρια ανάλυσης. Στην ουσία, πρόκειται για μετρήσεις οι οποίες μπορεί να έδωσαν στατιστική σημαντικότητα στις μεταβολές χωρίς όμως ουσιαστική βιολογική σημασία.

Οπότε, συμπερασματικά (αν και πάντα με επιφυλακτικότητα) παρατηρείται πως τα 150γρ γλυκόζης προκαλούν αρκετά σημαντικές μεταβολές σε σχέση με το χρόνο στο οξειδωτικό στρες του οργανισμού, όπως εκφράζεται μέσα από τη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Κάτι τέτοιο φαντάζει ίσως λογικό στα μάτια πολλών ερευνητών εφόσον πρόκειται για αρκετά αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης, και ειδικά χωρίς συνοδεία άλλων μακροσυστατικών στο γεύμα. Πέρα λοιπόν από τους παραπάνω προβληματισμούς, κάτι τέτοιο ίσως οφείλεται στο ότι ο μεταβολισμός

150γρ γλυκόζης δεν ανήκει στη σφαίρα των «εύκολα διαχειρίσιμων» ποσοτήτων γλυκόζης, ακόμα και από υγιή άτομα.

Τα αναψυκτικά φαίνονται να αποτελούν μία «πρακτική» προσέγγιση πίσω από μια τέτοια ποσότητα γλυκόζης σε ένα γεύμα. Για παράδειγμα, ένα αναψυκτικό 330ml και ένα 500ml περιέχουν 35 και 55 γραμμάρια ζάχαρης αντίστοιχα [51]. Σε συνδυασμό και με άλλες τροφές (π.χ. με κάποιο γεύμα) ή σε κατανάλωση σε πολλαπλάσια ποσότητα προσεγγίζουν τις φορτίσεις γλυκόζης που μελετήθηκαν στο παρόν πρωτόκολλο. Αν σκεφτεί κανείς για πόσες παθήσεις και κλινικές καταστάσεις έχουν κατηγορηθεί τέτοιου είδους ποτά (π.χ. την ανάπτυξη μεταβολικού συνδρόμου), ειδικά σε συνδυασμό με τα ευρήματα της παρούσας πτυχιακής, γίνεται αντιληπτό ως ένα βαθμό το πώς και γιατί επηρεάζουν διαμέσω οξειδωτικού στρες τον οργανισμό τέτοιες κλίμακες καθαρής γλυκόζης σε ένα μόλις γεύμα.

5.3.2. Μεταξύ των παρεμβάσεων-ποσοστιαίες μεταβολές

Μέσα από τη σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών (Διάγραμμα 8) ανά χρονική στιγμή μεταξύ των παρεμβάσεων, παρατηρείται μια οριακά στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση ($p=0,074$) για τα 120 λεπτά, δηλαδή στις 2 ώρες μετά την κατανάλωση του διαλύματος γλυκόζης. Αυτό δείχνει πως το πυροδοτούμενο από τις διαφορετικές ποσότητες γλυκόζης οξειδωτικό στρες των 2 ωρών φαίνεται πως δεν ακολουθεί παρόμοιες αυξομειώσεις στις 3 παρεμβάσεις.

Επίσης, συγκρίνοντας τις μεταβολές αυτές ανά δύο παρεμβάσεις προκύπτουν μερικές στατιστικά σημαντικές διαφορές σε χρονικές στιγμές που ανήκουν στη σύγκριση 75-150γρ και 100-150γρ, μαρτυρώντας πως ο οργανισμός ίσως δεν αντιλαμβάνεται ιδιαίτερη διαφορά με την αύξηση μόνο 25γρ γλυκόζης (από τα 75 στα 100γρ).

Οι διαφορές στις 2 αυτές συγκρίσεις παρατηρούνται μετά τα 90 λεπτά, όπου πλέον η γλυκόζη έχει απορροφηθεί σχεδόν ολοκληρωτικά από το εντερικό επιθήλιο. Στη σύγκριση μεταξύ των υψηλότερων ποσοτήτων γλυκόζης (100-150γρ), οι διαφορές παρατηρούνται νωρίτερα από ότι σε εκείνη των 75-150γρ, κάτι που αποκαλύπτει την αμεσότητα της γλυκοζυλίωσης στην παραγωγή ROS/NOS. Και εδώ τα 120 λεπτά έχουν σχετικά στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των παραπάνω παρεμβάσεων, επιβεβαιώνοντας ως ένα βαθμό την αρχική συνολική διαφοροποίηση.

5.3.3. Επίδραση χαρακτηριστικών χρόνου 0 στις μεταβολές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ανά παρέμβαση

Ο συντελεστής συσχέτισης του Spearman έδειξε πως υπάρχει αρνητική γραμμική σχέση μεταξύ των επιπέδων BMI και λευκοκυττάρων για τα 75γρ (δηλαδή όσο πιο χαμηλά τα επίπεδα τους τόσο μεγαλύτερες οι μεταβολές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά την παρέμβαση).

Παρόλα αυτά, το γεγονός ότι οι παραπάνω συσχετίσεις δεν βρέθηκαν να ισχύουν σε όλες τις παρεμβάσεις προκαλεί προβληματισμό σχετικά με την αξιοπιστία των μεμονωμένων αυτών γεγονότων, που το πιο πιθανό είναι να είναι **τυχαία**. Έτσι, οι παραπάνω σχέσεις δεν οδηγούν σε ξεκάθαρα συμπεράσματα παρά μόνο σε πιθανολογικές σχέσεις που μόνο με περεταίρω έρευνα θα μπορέσουν να διαλευκανθούν.

Γενικά, θα μπορούσε να ειπωθεί με σχετική ασφάλεια πως, ειδικά λαμβάνοντας υπόψιν το παραπάνω σχόλιο, τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά στον χρόνο 0 δεν επηρεάζουν την έκβαση των μεταβολών στη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων ανά παρέμβαση.

5.4. Επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων και επίπεδα ινσουλίνης

Συγκρίνοντας την αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και εκείνης της ινσουλίνης στο αίμα μέσα από το διάγραμμα διασποράς (Διάγραμμα 11) παρατηρείται πως αυτές είναι «παράλληλες». Στα αντίστοιχα iAUC φαίνεται πως η ινσουλίνη και τα πρωτεϊνικά καρβονύλια έχουν παρόμοιες μεταβολές στον χρόνο για τις 3 παρεμβάσεις, με εκείνη των 150gr να εκφράζει τη μεγαλύτερη μεταβολή.

Αν τα ευρήματα αυτά προσεγγιστούν από φυσιολογική άποψη, είναι εμφανής η τάση αύξησης της παραγωγής οξειδωτικού στρες λόγω της υπεργλυκαιμίας και της αύξησης της ινσουλίνης. Κάτι τέτοιο είναι λογικό μιας και με την αύξηση της γλυκόζης στο αίμα ενός υγιούς οργανισμού (υπεργλυκαιμία) από τη μια ενεργοποιείται η παραγωγή και η έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα (υπερινσουλιναίμία) η οποία οδηγεί σε αύξηση της εισόδου γλυκόζης στα κύτταρα και συνεπώς στην αυξημένη παραγωγή ROS λόγω μεγαλύτερου οξειδωτικού καταβολισμού της γλυκόζης, ο οποίος τελικά οδηγεί στη παραγωγή ROS/NOS.

5.5. Δεδομένα άλλων μελετών

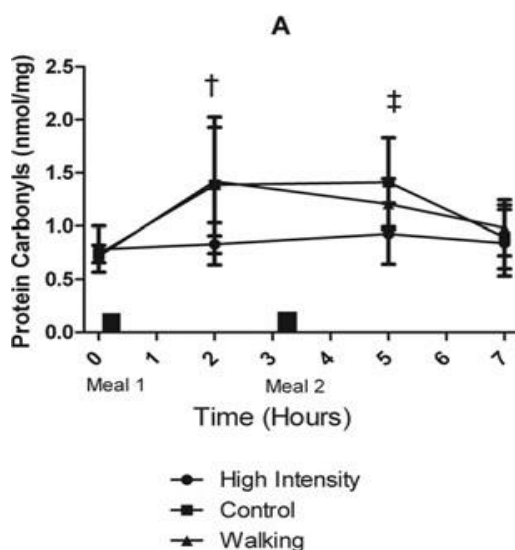
Σε γενικά πλαίσια, η βιβλιογραφία είναι εξαιρετικά περιορισμένη όσον αφορά έρευνες και κλινικές δοκιμασίες γύρω από την επίδραση της μεταγευματικής κατάστασης, και ειδικά της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, στην μεταβολή της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε υγιείς ανθρώπους. Οι περισσότερες έρευνες μελετούν τη μεταγευματική κατάσταση είτε μέσα από μεικτά γεύματα είτε από τη σκοπιά της υπερλιπιδαιμίας, και συνήθως μετρούν άλλους δείκτες οξειδωτικού στρες, όπως είναι τα TBARS. Πέρα από αυτό, οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί γύρω από ανθρώπους είναι πολύ περιορισμένες, καθώς οι αντίστοιχες μελέτες σε ζώα ή σε κύτταρα *in vitro* φαίνονται να καλύπτουν το μεγαλύτερο μέρος της σχετικής βιβλιογραφίας. Η έλλειψη αυτή της βιβλιογραφίας σε δεδομένα γύρω από πρωτεϊνικά καρβονύλια σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας σε υγιείς ανθρώπους, εν μέρει καταλογίζεται στην εξειδίκευση του θέματος και εν μέρει στο εργαστηριακό πρωτόκολλο απομόνωσης των ενώσεων αυτών, το οποίο είναι αρκετά χρονοβόρο και επίπονο.

Παρόλα αυτά, στη συνέχεια αυτού του υποκεφαλαίου θα γίνει μια προσπάθεια προσέγγισης της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας σε συνδυασμό με τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, καθώς και μια σύγκριση με τα ερευνητικά αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

5.5.1. Πρωτεϊνικά καρβονύλια και οξειδωτικό στρες

Στην έρευνα των Gabriel et al [52], οι οποίοι μελέτησαν την επαγωγή οξειδωτικού στρες μετά από άσκηση υψηλής έντασης σε υγιείς άνδρες, βρέθηκαν ενδιαφέροντα αποτελέσματα σχετικά με την συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταγευματικά. Αν και το γεύμα της μελέτης ήταν μεικτό, αποτελούμενο από 56% της ολικής ενέργειας από λιπίδια, 33% από υδατάνθρακες και 11% από πρωτεΐνη, λαμβάνοντας υπόψιν ότι ο μ.ο. περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες ήταν $75,2 \pm 8,2$ γρ, θα μπορούσε να γίνει μια χοντρική σύγκριση με την παρούσα μεθοδολογία, τουλάχιστον αποκτώντας μια ιδέα για την μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων των 75 γρ.

Αρχικά, κοιτώντας αποκλειστικά την ομάδα ελέγχου, τα επίπεδα συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων του χρόνου 0, κυμαίνονται μεταξύ 0,5 και 1 nmol/mg prot, κάτι που επιβεβαιώνει και τις αρχικές μετρήσεις για την παρούσα ερευνητική εργασία. Ακόμη, μελετώντας το Διάγραμμα 12 φαίνεται πως τα επίπεδα αυξάνονται άμεσα σε σχέση με το χρόνο 0. Μάλιστα τα επίπεδα των 2 ωρών αυξάνονται σε σχέση με το χρόνο 0 στα 1-2 nmol/mg prot ($p < 0,005$), βέβαια σε καμία περίπτωση στα επίπεδα της παρούσας εργασίας τα οποία στην αντίστοιχη μέτρηση κυμαίνονται στα 0,5-0,7 nmol/mg για τα 75γρ (και στα 0,65-0,8 nmol/mg γενικά). Όπως γίνεται αντιληπτό αυτή η διαφορά εύρους καταλογίζεται στην παρουσία και των υπόλοιπων μακροσυστατικών, και ιδιαίτερα στα λιπίδια, τα οποία είναι γνωστό πως επάγουν ιδιαίτερα το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες [53] [54].

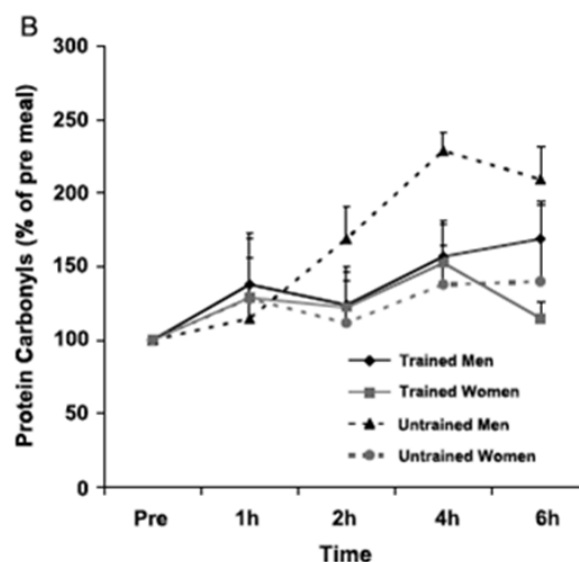


Διάγραμμα 12- Μεταβολή επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στις 3 ομάδες (υψηλής έντασης άσκηση, περπάτημα, έλεγχος) († = $p < 0,005$) [52]

Ένα ακόμη ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι οι συμμετέχοντες της μελέτης οι οποίοι είχαν υποβληθεί σε υψηλής έντασης άσκηση την προηγούμενη ημέρα, παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη αύξηση στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων (στο 2ώρο: $p < 0,001$) τόσο από την ομάδα ελέγχου όσο και από την ομάδα που την προηγούμενη μέρα υποβλήθηκε σε χαμηλής έντασης άσκηση, δηλαδή περπάτημα. Χαρακτηριστικό αποτελεί το γεγονός ότι τα επίπεδα στον χρόνο 0 φαίνονται να κυμαίνονται το ίδιο εύρος σε όλες τις ομάδες (Διάγραμμα 12).

Σε μία άλλη έρευνα από τον Bloomer [55], η οποία πραγματοποιήθηκε σε δείγμα αθλητών και σε ομάδα ελέγχου (άνδρες και γυναίκες), μετρήθηκαν τα μεταγευματικά επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως δείκτης οξειδωτικού στρες. Το γεύμα και εδώ ήταν μεικτό (λιπίδια, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες) με τα λιπίδια να κυριαρχούν στην ενεργειακή απόδοση. Μελετώντας αποκλειστικά τις ομάδες ελέγχου, δόθηκαν από το μεικτό γεύμα 70-100γρ υδατανθράκων (κατά μ.ο. 100γρ στους άνδρες και 70γρ στις γυναίκες). Η ποσοστιαίες μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στην παρέμβαση βρίσκονται στο Διάγραμμα 13 παρακάτω.

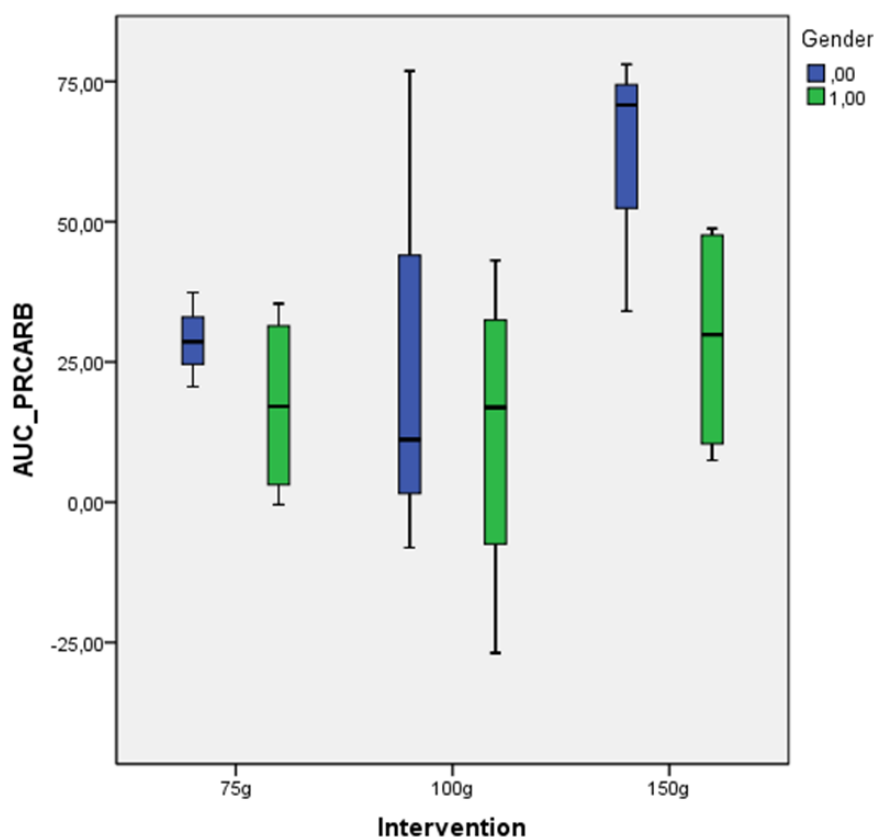
Όπως και στην έρευνα που αναφέρθηκε παραπάνω [52], παρατηρούνται μεταβολές, και μάλιστα αυξήσεις στη συγκέντρωση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταγευματικά, βέβαια είναι μεγαλύτερες σε σχέση με την μελέτη της παρούσας εργασίας, κάτι που αποδίδεται στη διαφορετική σύσταση των γευμάτων. Παρόλα αυτά, επιβεβαιώνεται η ανοδική τάση στις ποσοστιαίες αλλαγές.



Διάγραμμα 13 - Ποσοστιαία μεταβολή επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με το χρόνο 0, σε ομάδες αθλητών και φυσιολογικών ανδρών και γυναικών [55]

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι στην έρευνα του Bloomer et al, οι άνδρες φαίνεται να υπόκεινται ισχυρότερες σε μέγεθος μεταβολές σε σχέση με τις γυναίκες του δείγματος (οι συγγραφείς σχολιάζουν πώς κάτι τέτοιο ίσως

συμβαίνει λόγω των παρατηρηθέντων υψηλότερων συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών στις γυναίκες στη βιβλιογραφία). Στην έρευνα της παρούσας εργασίας, βρέθηκε το αντίθετο, όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 14 (0: γυναίκες, 1: άνδρες). Πάντως είναι χαρακτηριστικό πως το φύλο δεν προκαλεί στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε καμιά από τις 2 έρευνες ($p>0,005$).



Διάγραμμα 14 - Συγκριτική παράθεση των iAUC πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε γυναίκες (0) και άνδρες (1), ανά παρέμβαση

Στην έρευνα του Bloomer, παρόλα αυτά, η φυσική κατάσταση φαίνεται να μην ασκεί στατιστικά σημαντικό ρόλο στις μεταβολές των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο χρόνο ούτε στους άνδρες ούτε στις γυναίκες, αν και φαίνονται μειωμένες μεταβολές στους αθλητές στο Διάγραμμα 13.

5.6. Προβληματισμοί

Οι προβληματισμοί σχετικά με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, πέρα από τα προαναφερθέντα σημεία (π.χ. για το μικρό δείγμα εθελοντών), έγκεινται και στην πολυπαραγοντική φύση επιρροής για το οξειδωτικό στρες, καθώς είναι γνωστό πως πληθώρα παραγόντων και ουσιών επηρεάζουν το οξειδωτικό στρες του οργανισμού, είτε αναστέλλοντας είτε ενισχύοντας το. Για παράδειγμα, στην παρούσα έρευνα η κατανάλωση καφεΐνης [56] ή το πρόσφατο ιστορικό φυσικής δραστηριότητας [52] (π.χ. ο τρόπος με τον οποίο έφθασαν στο Χαροκόπειο

Πανεπιστήμιο για την αιμοληψία) θα μπορούσαν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα των μετρήσεων των επιπέδων του οξειδωτικού στρες. Μέρος αυτών των παραγόντων, όπως η καφεΐνη, γίνονται γνωστά από τις ανακλήσεις 24ωρου, αλλά όπως είναι φυσικό εφόσον πρόκειται για πρόσωπα με εξατομικευμένο τρόπο ζωής και συνήθειες, είναι κατανοητό να έχουν «ξεφύγει» από την προσοχή τους συγκεκριμένες λεπτομέρειες που επιδρούν στις μεταβολές οξειδωτικού στρες μεταγευματικά. Τέτοιου είδους προβληματισμοί μπορούν να λυθούν με περαιτέρω έρευνα και μελέτη.

5.7. Συμπεράσματα

Κλείνοντας αυτό το υποκεφάλαιο, θα γίνει μια συμπερασματική αποτίμηση των αποτελεσμάτων και της ερευνητικής εργασίας στο σύνολο της.

Αρχικά, μέσα από το ερευνητικό κομμάτι της εργασίας έγιναν περισσότερο κατανοητοί οι μηχανισμοί με τους οποίους καταστάσεις υπεργλυκαιμίας επηρεάζουν το οξειδωτικό στρες στον οργανισμό. Παρατηρήθηκε, ειδικά για τη φόρτιση των 150gr γλυκόζης, πως η υπεργλυκαιμία προκαλεί σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ενός χαρακτηριστικού δείκτη οξειδωτικού στρες, στον οργανισμό. Έτσι, επιβεβαιώθηκε η βιβλιογραφία η οποία υποστηρίζει πως αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα επάγουν την παραγωγή ROS/NOS στα μιτοχόνδρια, τα οποία πλήττουν τα μακρομόρια είτε άμεσα είτε μέσα από την περαιτέρω παραγωγή τους από πορείες που περιλαμβάνουν ενδιάμεσα προϊόντα της γλυκοζυλίωσης. Μελετήθηκαν επίσης οι μεταβολές στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ανά εθελοντή, ανά παρέμβαση αλλά και μεταξύ των παρεμβάσεων και έγινε μια προσπάθεια φυσιολογικής εξήγησης των μεταβολών αυτών.

Σε αυτήν την ερευνητική εργασία εντοπίζονται μερικά σημεία άξια αναφοράς. Αρχικά, η εργασία αποτέλεσε προσπάθεια στη συμβολή στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της υπεργλυκαιμίας στο οξειδωτικό στρες σε υγιείς ανθρώπους, ένα θέμα το οποίο έχει απασχολήσει ιδιαίτερα την ερευνητική κοινότητα τα τελευταία χρόνια. Επίσης, μετρήθηκαν τα μεταγευματικά επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων, ενός δείκτη οξειδωτικού στρες για τον οποίο δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα, ειδικά σε υγιείς οργανισμούς. Ακόμη, το ερευνητικό και εργαστηριακό πρωτόκολλο το οποίο χρησιμοποιήθηκε περιλάμβανε τη μέτρηση των χαρακτηριστικών με αναλυτικές πειραματικές μεθόδους, έτσι ώστε τα αποτελέσματα να βασίζονται σε επιστημονικά τεκμηριωμένες μεθοδολογίες και αναλύσεις. Πέρα από αυτό, η μέτρηση αυτών των χαρακτηριστικών ανοίγει και μονοπάτια για περαιτέρω συσχετίσεις και ερευνητικούς προβληματισμούς, και φυσικά αποτελεί σημείο έναρξης πολλών μελλοντικών ερευνητικών εργασιών.

Παρόλα αυτά, οφείλεται να σημειωθούν και τα αρνητικά στοιχεία της παραπάνω έρευνας. Αρχικά, δεν μπορούν να εξαχθούν αποτελέσματα με ασφάλεια από ένα τόσο μικρό δείγμα εθελοντών, καθώς μικρές διαφορές στις μετρήσεις ανά εθελοντή

μπορούν να επηρεάζουν σημαντικά τη στατιστική ανάλυση. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν πως πρόκειται για υγιείς οργανισμούς, δεν είναι δυνατόν να προκύψουν απόλυτα συμπεράσματα σχετικά με τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη δημιουργία οξειδωτικού στρες και τη συνολικότερη παθοφυσιολογία της υπεργλυκαιμίας. Ο ανθρώπινος οργανισμός διαθέτει εκατομμύρια μεταβολικά μονοπάτια και χιλιάδες λειτουργίες σε όλα τα επίπεδα οργάνωσης, τα οποία αλληλο-επιδρούν και αλληλο-επηρεάζονται. Επομένως, αν και θεωρητικά είναι γνωστοί οι ομοιοστατικοί μηχανισμοί σχετικά με τη γλυκόζη στο αίμα, αναμένονται φυσιολογικές διαφορές και διακυμάνσεις μεταξύ των εθελοντών.

Κλείνοντας, θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί η ανάγκη για περισσότερες ερευνητικές προσεγγίσεις του επαγώγιμου από τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία οξειδωτικού στρες, ώστε να κατανοηθεί πλήρως η φυσιολογία πίσω από ένα τέτοιο φαινόμενο με τόσο μεγάλο εύρος επιρροής. Η παρούσα ερευνητική εργασία ελπίζει να βοηθήσει στο ταξίδι της κατανόησης, μειώνοντας το όποιο βιβλιογραφικό κενό, παρέχοντας πληροφορίες και ενδιαφέροντα ευρήματα και τέλος, διεγείροντας το ενδιαφέρον των επιστημόνων υγείας για περαιτέρω ενασχόληση και έρευνα.

6. Βιβλιογραφία

- [1] World Health Organization and International Diabetes Federation, "Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia."
- [2] A. D. A. 1701 N. B. S. Alex, ria, and V. 22311 1-800-Diabetes, "Diagnosing Diabetes and Learning About Prediabetes," *American Diabetes Association*. [Online]. Available: <http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diagnosis/>. [Accessed: 03-Jul-2015].
- [3] American Diabetes Association, "Postprandial Blood Glucose," *Clin. Diabetes*, vol. 19, no. 3, pp. 127–130, Jul. 2001.
- [4] S. S. Gropper, J. L. Smith, and J. L. Groff, *Διατροφή & Μεταβολισμός*, vol. 1, 2 vols. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.
- [5] C. D. Saudek and J. C. Brick, "The Clinical Use of Hemoglobin A1c," *J. Diabetes Sci. Technol. Online*, vol. 3, no. 4, pp. 629–634, Jul. 2009.
- [6] J. H. O'Keefe and D. S. H. Bell, "Postprandial Hyperglycemia/Hyperlipidemia (Postprandial Dysmetabolism) Is a Cardiovascular Risk Factor," *Am. J. Cardiol.*, vol. 100, no. 5, pp. 899–904, Sep. 2007.
- [7] R. A. Rizza, "Pathogenesis of Fasting and Postprandial Hyperglycemia in Type 2 Diabetes: Implications for Therapy," *Diabetes*, vol. 59, no. 11, pp. 2697–2707, Nov. 2010.
- [8] J. R. Gavin III, "Pathophysiologic mechanisms of postprandial hyperglycemia," *Am. J. Cardiol.*, vol. 88, no. 6, Supplement 1, pp. 4–8, Jul. 2001.
- [9] A. E. Kitabchi, M. Tempresa, W. C. Knowler, S. E. Kahn, S. E. Fowler, S. M. Haffner, R. Andres, C. Saudek, S. L. Edelstein, R. Arakaki, M. B. Murphy, H. Shamoon, and Diabetes Prevention Program Research Group, "Role of insulin secretion and sensitivity in the evolution of type 2 diabetes in the diabetes prevention program: effects of lifestyle intervention and metformin," *Diabetes*, vol. 54, no. 8, pp. 2404–2414, Aug. 2005.
- [10] A. Ceriello and E. Motz, "Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 5, pp. 816–823, May 2004.
- [11] P. Swärd and B. Rippe, "Acute and sustained actions of hyperglycaemia on endothelial and glomerular barrier permeability," *Acta Physiol. Oxf. Engl.*, vol. 204, no. 3, pp. 294–307, Mar. 2012.
- [12] Gerich JE, "Clinical significance, pathogenesis, and management of postprandial hyperglycemia," *Arch. Intern. Med.*, vol. 163, no. 11, pp. 1306–1316, Jun. 2003.
- [13] A. J. Garber, "Postprandial Dysmetabolism and the Heart," *Heart Fail. Clin.*, vol. 8, no. 4, pp. 563–573, Oct. 2012.
- [14] "Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33)," *The Lancet*, vol. 352, no. 9131, pp. 837–853, Sep. 1998.
- [15] K. Node and T. Inoue, "Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure," *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 8, p. 23, Apr. 2009.
- [16] T. Y. Ryu, J. Park, and P. E. Scherer, "Hyperglycemia as a Risk Factor for Cancer Progression," *Diabetes Metab. J.*, vol. 38, no. 5, pp. 330–336, Oct. 2014.
- [17] K. Masur, C. Vetter, A. Hinz, N. Tomas, H. Henrich, B. Niggemann, and K. S. Zänker, "Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation," *Br. J. Cancer*, vol. 104, no. 2, pp. 345–352, Jan. 2011.
- [18] M. J. Hammer, C. Casper, T. A. Gooley, P. V. O'Donnell, M. Boeckh, and I. B. Hirsch, "The contribution of malglycemia to mortality among allogeneic hematopoietic cell transplant recipients," *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, vol. 15, no. 3, pp. 344–351, Mar. 2009.

- [19] J. M. Olausson, M. J. Hammer, and V. Brady, "The Impact of Hyperglycemia on Hematopoietic Cell Transplantation Outcomes: An Integrative Review," *Oncol. Nurs. Forum*, vol. 41, no. 5, pp. E302–E312, Sep. 2014.
- [20] J. M. Gervasio, W. P. Garmon, and M. Holowatyj, "Nutrition support in acute kidney injury," *Nutr. Clin. Pract. Off. Publ. Am. Soc. Parenter. Enter. Nutr.*, vol. 26, no. 4, pp. 374–381, Aug. 2011.
- [21] S. O. Butler, I. F. Btaiche, and C. Alaniz, "Relationship between hyperglycemia and infection in critically ill patients," *Pharmacotherapy*, vol. 25, no. 7, pp. 963–976, Jul. 2005.
- [22] A. L. Brennan, K. M. Gyi, D. M. Wood, J. Johnson, R. Holliman, D. L. Baines, B. J. Philips, D. M. Geddes, M. E. Hodson, and E. H. Baker, "Airway glucose concentrations and effect on growth of respiratory pathogens in cystic fibrosis," *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.*, vol. 6, no. 2, pp. 101–109, Apr. 2007.
- [23] B. W. R. Balzer, C. L. Graham, M. E. Craig, H. Selvadurai, K. C. Donaghue, J. C. Brand-Miller, and K. S. Steinbeck, "Low Glycaemic Index Dietary Interventions in Youth with Cystic Fibrosis: A Systematic Review and Discussion of the Clinical Implications," *Nutrients*, vol. 4, no. 4, pp. 286–296, Apr. 2012.
- [24] T. Cukierman-Yaffe, "Diabetes, dysglycemia and cognitive dysfunction," *Diabetes Metab. Res. Rev.*, vol. 30, no. 5, pp. 341–345, Jul. 2014.
- [25] K. Horie, T. Miyata, T. Yasuda, A. Takeda, Y. Yasuda, K. Maeda, G. Sobue, and K. Kurokawa, "Immunohistochemical Localization of Advanced Glycation End Products, Pentosidine, and Carboxymethyllysine in Lipofuscin Pigments of Alzheimer's Disease and Aged Neurons," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 236, no. 2, pp. 327–332, Jul. 1997.
- [26] T. V. Fiorentino, A. Prioletta, P. Zuo, and F. Folli, "Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases," *Curr. Pharm. Des.*, vol. 19, no. 32, pp. 5695–5703, 2013.
- [27] F. de Carvalho Vidigal, P. Guedes Cocate, L. Gonçalves Pereira, and R. de Cássia Gonçalves Alfenas, "The role of hyperglycemia in the induction of oxidative stress and inflammatory process," *Nutr. Hosp.*, vol. 27, no. 5, pp. 1391–1398, Oct. 2012.
- [28] B. K. Tiwari, K. B. Pandey, A. B. Abidi, and S. I. Rizvi, "Markers of Oxidative Stress during Diabetes Mellitus," *J. Biomark.*, vol. 2013, p. e378790, Dec. 2013.
- [29] M. Fedorova, R. C. Bollineni, and R. Hoffmann, "Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 33, no. 2, pp. 79–97, Apr. 2014.
- [30] K. A. Δημόπουλος and Σ. Αντωνοπούλου, *Βασική Βιοχημεία*, 2η έκδοση. 2009.
- [31] J. S. Beckman and W. H. Koppenol, "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly," *Am. J. Physiol.*, vol. 271, no. 5 Pt 1, pp. C1424–1437, Nov. 1996.
- [32] A. Ceriello, "Postprandial Hyperglycemia and Diabetes Complications Is It Time to Treat?," *Diabetes*, vol. 54, no. 1, pp. 1–7, Jan. 2005.
- [33] J. A. Beckman, A. B. Goldfine, M. B. Gordon, and M. A. Creager, "Ascorbate Restores Endothelium-Dependent Vasodilation Impaired by Acute Hyperglycemia in Humans," *Circulation*, vol. 103, no. 12, pp. 1618–1623, Mar. 2001.
- [34] E. Ho, K. Karimi Galougahi, C.-C. Liu, R. Bhindi, and G. A. Figtree, "Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice," *Redox Biol.*, vol. 1, pp. 483–491, 2013.
- [35] A. C. Maritim, R. A. Sanders, and J. B. Watkins, "Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: A review," *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, vol. 17, no. 1, pp. 24–38, Jan. 2003.
- [36] A. Ceriello, "Nitrotyrosine: new findings as a marker of postprandial oxidative stress," *Int. J. Clin. Pract. Suppl.*, no. 129, pp. 51–58, Jul. 2002.

- [37] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo, "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress," *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 329, no. 1–2, pp. 23–38, Mar. 2003.
- [38] K. B. Pandey, N. Mishra, and S. I. Rizvi, "Protein oxidation biomarkers in plasma of type 2 diabetic patients," *Clin. Biochem.*, vol. 43, no. 4–5, pp. 508–511, Mar. 2010.
- [39] B. Olas and B. Wachowicz, "Role of reactive nitrogen species in blood platelet functions," *Platelets*, vol. 18, no. 8, pp. 555–565, Jan. 2007.
- [40] N. Alexandru, D. Popov, and A. Georgescu, "Intraplatelet oxidative/nitrative stress: inducers, consequences, and control," *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 20, no. 7, pp. 232–238, Oct. 2010.
- [41] F. Krötz, H.-Y. Sohn, and U. Pohl, "Reactive oxygen species: players in the platelet game," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 1988–1996, Nov. 2004.
- [42] F. Violi and P. Pignatelli, "Platelet oxidative stress and thrombosis," *Thromb. Res.*, vol. 129, no. 3, pp. 378–381, Mar. 2012.
- [43] X.-M. Zhao and S.-C. Qin, "[Oxidative stress of platelet and atherosclerosis]," *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, vol. 42, no. 1, pp. 33–38, Feb. 2011.
- [44] S. Yamagishi, D. Edelstein, X. Du, and M. Brownlee, "Hyperglycemia Potentiates Collagen-Induced Platelet Activation Through Mitochondrial Superoxide Overproduction," *Diabetes*, vol. 50, no. 6, pp. 1491–1494, Jun. 2001.
- [45] T. E. Suslova, A. V. Sitozhevskii, O. N. Ogurkova, E. S. Kravchenko, I. V. Kologrivova, Y. Anfinogenova, and R. S. Karpov, "Platelet hemostasis in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: cGMP- and NO-dependent mechanisms in the insulin-mediated platelet aggregation," *Front. Physiol.*, vol. 5, Jan. 2015.
- [46] P. Ferroni, S. Basili, A. Falco, and G. Davì, "Platelet activation in type 2 diabetes mellitus," *J. Thromb. Haemost. JTH*, vol. 2, no. 8, pp. 1282–1291, Aug. 2004.
- [47] F. Santilli, G. Formoso, P. Sbraccia, M. Averna, R. Miccoli, P. Di Fulvio, A. Ganci, N. Pulizzi, S. Lattanzio, G. Ciabattini, A. Consoli, R. Lauro, C. Patrono, and G. Davì, "Postprandial hyperglycemia is a determinant of platelet activation in early type 2 diabetes mellitus," *J. Thromb. Haemost.*, vol. 8, no. 4, pp. 828–837, Apr. 2010.
- [48] V. R. Vaidyula, G. Boden, and A. K. Rao, "Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects," *Platelets*, vol. 17, no. 8, pp. 577–585, Dec. 2006.
- [49] M. Hagströmer, P. Oja, and M. Sjöström, "The International Physical Activity Questionnaire (IPAQ): a study of concurrent and construct validity," *Public Health Nutr.*, vol. 9, no. 06, pp. 755–762, Sep. 2006.
- [50] Α. Καραγιάννης, "Προσδιορισμός Δραστικότητας Αντιοξειδωτικών Ενζύμων σε Λευκοκύτταρα και Αιμοπετάλια Υγιών Εθελοντών κατά το Μεταγευματικό Σταδίο," Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, Αθήνα.
- [51] "Nutritional information and ingredients for Coca-Cola | Coca-Cola GB." [Online]. Available: <http://www.coca-cola.co.uk/drinks/coca-cola/coca-cola/>. [Accessed: 17-Jul-2015].
- [52] B. Gabriel, A. Ratkevicius, P. Gray, M. P. Frenneaux, and S. R. Gray, "High-intensity exercise attenuates postprandial lipaemia and markers of oxidative stress," *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979*, vol. 123, no. 5, pp. 313–321, Sep. 2012.
- [53] A. Ceriello, C. Taboga, L. Tonutti, L. Quagliaro, L. Piconi, B. Bais, R. D. Ros, and E. Motz, "Evidence for an Independent and Cumulative Effect of Postprandial Hypertriglyceridemia and Hyperglycemia on Endothelial Dysfunction and Oxidative Stress Generation Effects of Short- and Long-Term Simvastatin Treatment," *Circulation*, vol. 106, no. 10, pp. 1211–1218, Sep. 2002.
- [54] J.-H. Bae, E. Bassenge, K.-B. Kim, Y.-N. Kim, K.-S. Kim, H.-J. Lee, K.-C. Moon, M.-S. Lee, K.-Y. Park, and M. Schwemmer, "Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial

function by enhanced oxidant stress," *Atherosclerosis*, vol. 155, no. 2, pp. 517–523, Apr. 2001.

[55] D. E. F. Richard J Bloomer, "Postprandial oxidative stress: influence of sex and exercise training status.," *Med. Sci. Sports Exerc.*, vol. 41, no. 12, pp. 2111–9, 2009.

[56] M. S. Butt and M. T. Sultan, "Coffee and its Consumption: Benefits and Risks," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 51, no. 4, pp. 363–373, Mar. 2011.