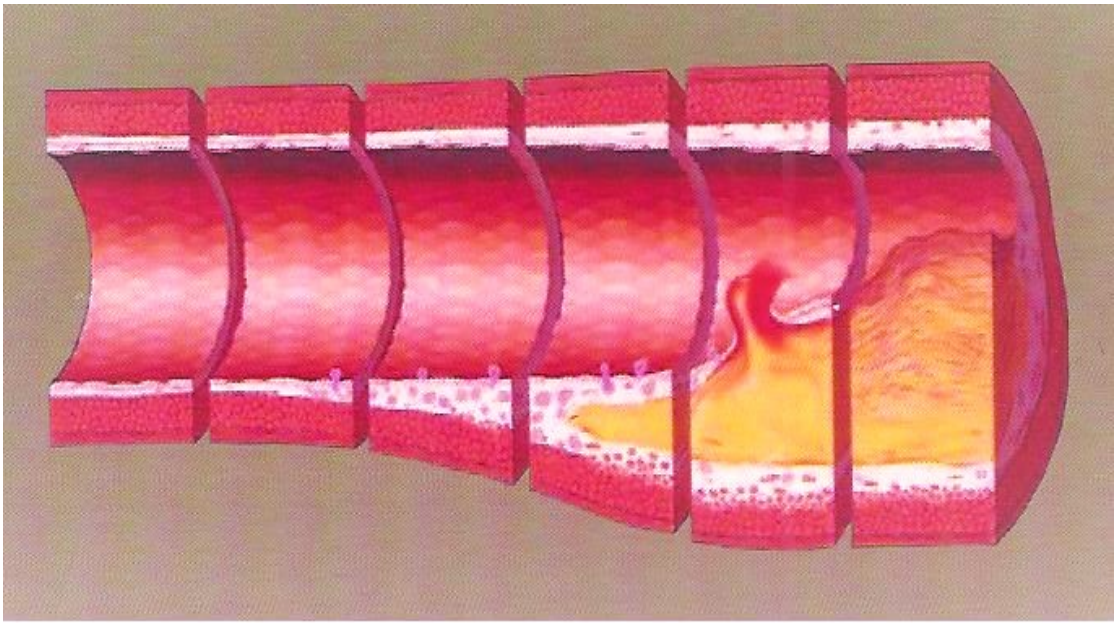
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επίδραση της υπεργλυκαιμίας μετά από φόρτιση γλυκόζης σε βιοχημικούς δείκτες ενδοθηλιακής λειτουργίας υγιών εθελοντών. Συσχέτιση με τη δραστικότητα των αιμοπεταλίων»



ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ - ΠΟΖΑΤΖΙΔΟΥ ΔΑΦΝΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

2015-2016

Περιεχόμενα

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ 4

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο} 4

- ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ 4
- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ 4
- Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΣΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο} 11

- ΔΟΜΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ 11
- ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ 12
- ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ 14
- ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΝΕΣΗ.....23

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο} 26

- ΕΙΣΑΓΩΓΗ 26
- ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΞΗΓΟΥΝ ΠΩΣ ΕΠΙΔΡΑ Η ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ ΣΤΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ.....26
- ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ.....32
- ΔΙΑΒΗΤΗΣ, ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....34
- ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ.....35

ΣΚΟΠΟΣ.....36

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....37

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....37

- ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ 37

- ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ.....38
- ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ.....39
- ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....40
- ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΙΚΩΝ+ΝΙΤΡΩΔΩΝ (NOx) ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ 41
- ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....44

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 45

- ΕΙΣΑΓΩΓΗ 45
- ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 45

ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....55

- ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....55
- ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΤΑΙ ΤΟ ΝΟ ΚΑΙ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ.....56
- ΤΑ ΝΙΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΝΙΤΡΩΔΗ ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΝΟ.....59
- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 61

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....71

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^{Ο}

ΔΟΜΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ

Το καρδιαγγειακό σύστημα, από την καρδιά μέχρι τα τριχοειδή, έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, μια λεία μονοκυττάρια στιβάδα από ενδοθηλιακά κύτταρα, το ενδοθήλιο, το οποίο επικαλύπτει την εσωτερική επιφάνεια των αγγείων, δηλαδή την επιφάνεια που έρχεται σε επαφή με το αίμα. Συγκεκριμένα, τα τριχοειδή αποτελούνται μόνο από ενδοθήλιο, ενώ όλα τα άλλα αγγεία φέρουν επιπλέον στιβάδες από συνδετικό ιστό και λείο μυ. Από μία στοιβάδα ενδοθηλιακών κύτταρων, η οποία βρίσκεται πάνω σε μια βασική μεμβράνη, είναι φτιαγμένα και τα λεμφικά τριχοειδή, τα οποία βέβαια είναι εντελώς διαφορετικά από αυτά των αιμοφόρων αγγείων. Συγκεκριμένα, τα λεμφικά τριχοειδή έχουν μεγάλους υδατοβρίθεις διαύλους, που είναι διαπερατοί σε όλα τα συστατικά του μεσοκυττάριου υγρού, συμπεριλαμβανομένης της πρωτεΐνης.

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα:

- χρησιμεύουν ως μια φυσική εσωτερική επένδυση της καρδιάς και ολόκληρου του αγγειακού συστήματος στην οποία κανονικά τα κύτταρα του αίματος δεν προσκολλώνται
- χρησιμεύουν ως φραγμός διαπερατότητας για την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, υγρών και τελικών μεταβολικών παραπροϊόντων ανάμεσα στο πλάσμα και το μεσοκυττάριο υγρό, ρυθμίζουν, έτσι, την μεταφορά μακρομορίων και άλλων ουσιών
- εκκρίνουν παρακρινείς παράγοντες οι οποίοι επενεργούν σε παρακείμενα κύτταρα λείου μυός των αγγείων. Τέτοιοι παράγοντες είναι αγγειοδιαστολείς, όπως προστακυκλίνη (PGI2) και μονοξείδιο του αζώτου (NO) και αγγειοσυστολείς, όπως η ενδοθηλίνη-1 (ET-1). Πιο συγκεκριμένα,

τα ενδοθηλιακά κύτταρα ανταποκρινόμενα σε ορισμένα μηχανικά ερεθίσματα και σε ουσίες που δρουν έμμεσα στον λείο μυ των αρτηριδίων, μέσω των ενδοθηλιακών κυττάρων εκκρίνουν παρακρινείς παράγοντες οι οποίοι διαχέονται στον λείο μυ και προκαλούν είτε χάλαση είτε συστολή, οδηγώντας σε αγγειοδιαστολή ή αγγειοσυστολή, αντίστοιχα. Το NO απελευθερώνεται συνεχώς σε σημαντικές ποσότητες από τα ενδοθηλιακά κύτταρα στα αρτηρίδια και συμβάλλει στην αγγειοδιαστολή αυτών σε κατάσταση ηρεμίας. Η έκκριση του αυξάνεται γρήγορα και έντονα σε απόκριση χημικών μεσολαβητών που ενέχονται και στην αντανακλαστική και στην τοπική ρύθμιση της ακτίνας των αρτηριδίων. Η PGI2 εκκρίνεται σε μικρές ποσότητες στην ηρεμία, αλλά η έκκριση της αυξάνει σημαντικά ως απόκριση σε διάφορα ερεθίσματα. Η ET-1, η οποία είναι ένας από τους σπουδαιότερους αγγειοσυσταλτικούς παρακρινείς παράγοντες, εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως απόκριση σε ορισμένα μηχανικά και χημικά ερεθίσματα. Η ET-1 μπορεί να φτάσει σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις στο αίμα, κάτω από ορισμένες συνθήκες, λειτουργώντας ως ορμόνη, προκαλώντας ευρέως διαδεδομένη αγγειοσυστολή των αρτηριδίων. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αρτηριών, εκτός αυτά των αρτηριδίων, εκκρίνουν επίσης παρακρινείς παράγοντες που επηρεάζουν τον λείο μυ των αρτηριών συνεπώς και την διάμετρο τους και την αντίσταση στην ροή. Το αίμα που ρέει στα αγγεία, ασκεί δύναμη στην εσωτερική επιφάνεια του αρτηριακού τοιχώματος και συγκεκριμένα στα ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία ονομάζεται τάση διάτμησης και που η τιμή της αυξάνει με την αύξηση της ροής αίματος μέσα στο αγγείο. Το αρτηριακό ενδοθήλιο, αποκρινόμενο στην αυξημένη τάση διάτμησης, απελευθερώνει PGI2, αυξημένη ποσότητα NO καθώς και μειωμένη ET-1. Οι αλλαγές αυτές προκαλούν χάλαση του λείου μυός των αρτηριακών αγγείων και συνεπώς οδηγούν στην διαστολή της αρτηρίας.

- παίζουν μεσολαβητικό ρόλο στην αγγειογένεση, δηλαδή στην παραγωγή νέων τριχοειδών αγγείων. Τα αγγειακά ενδοθηλιακά κύτταρα παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη νέου τριχοειδικού δικτύου μετά από μετατόπιση και διαίρεση των κυττάρων αυτών. Για να πραγματοποιηθεί αυτό, είναι απαραίτητο να διεγερθούν από αγγειογενείς παράγοντες, όπως ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF). Οι αγγειογενείς

αυτοί παράγοντες εκκρίνονται τοπικά από κύτταρα διαφόρων ιστών, π.χ. ινοβλάστες, αλλά και από τα ίδια τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

- παίζουν κεντρικό ρόλο στην αναδόμηση των αγγείων, ανιχνεύοντας σήματα και απελευθερώνοντας παρακρινείς παράγοντες, που επενεργούν σε παρακείμενα κύτταρα στο τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων
- παράγουν αυξητικούς παράγοντες σε περιπτώσεις τραυματισμών
- συμβάλουν στο σχηματισμό και τη διατήρηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας
- εκκρίνουν ουσίες που ρυθμίζουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και δρουν ως πηκτικά και αντιπηκτικά του αίματος
- επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό του λείου μυός των αγγείων στην ασθένεια της αρτηριοσκλήρυνσης
- συνθέτουν δραστικές ορμόνες από ανενεργείς προδρομικές ουσίες
- εξάγουν ή αποδομούν ορμόνες και άλλους χημικούς μεσολαβητές
- εκκρίνουν κυτοκίνες κατά τη διάρκεια ανοσοποιητικών αντιδράσεων

Η ΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΝΔΟΘΗΛΙΟΥ ΣΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ

Η αθηροσκλήρωση είναι μια πάθηση των αρτηριών που χαρακτηρίζεται από πάχυνση του τμήματος του αιμοφόρου αγγείου που βρίσκεται πιο κοντά στον αυλό με 1) μεγάλο αριθμό παθολογικών κυττάρων λείων μυικών ινών, μακροφάγων και λεμφοκυττάρων, 2) εναπόθεση χοληστερόλης και άλλων λιπαρών ουσιών τόσο μέσα στα κύτταρα αυτά όσο και στον εξωκυττάριο χώρο και 3) πυκνά στρώματα συνδετικού ιστού στη θεμέλια ουσία των κυττάρων. Η αθηροσκλήρωση στις στεφανιαίες αρτηρίες, έχει σαν συνέπεια τη μείωση της αιματικής ροής και έτσι αποτελεί την κύρια αιτία στεφανιαίας νόσου. Οι μηχανισμοί με τους οποίους η αθηροσκλήρωση οδηγεί στη μείωση της στεφανιαίας αιματικής ροής είναι 1) τα επιπρόσθετα μυικά κύτταρα και διάφορες εναποθέσεις στο τοίχωμα προβάλλουν στον αυλό του αγγείου και αυξάνουν την αντίσταση στην ροή, 2) τα παθολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα της αθηροσκληρωτικής περιοχής απελευθερώνουν σε πολύ μεγάλες ποσότητες αγγειοσυσταλτικές ουσίες όπως ET-1 και ανεπαρκείς ποσότητες αγγειοδιασταλτικών ουσιών όπως NO και PGI2. Κατά την εξέλιξη αυτών των διεργασιών μπορεί να συμβεί πλήρης απόφραξη των

αγγείων. Πλήρης απόφραξη, ωστόσο, συνήθως γίνεται με τη δημιουργία θρόμβου αίματος στην ήδη στενωμένη σθηροσκληρωτική αρτηρία, το οποίο οδηγεί στην εμφάνιση εμφράγματος του μυοκαρδίου (1).

Η αρτηριοσκλήρυνση είναι μια κατάσταση που προσβάλλει τις μεγάλου και μέσου μεγέθους αρτηρίες, και είναι μια διαταραχή που αρχίζει ήδη από την παιδική ηλικία και σε απουσία επιβαρυντικών παραγόντων, εξελίσσεται αργά μέχρι την γεροντική ηλικία, κατά την οποία, είναι πλέον πολύ εκτεταμένη. Χαρακτηρίζεται από περιοχές ινώδους πάχυνσης του τοιχώματος των αρτηριών, που συνοδεύονται από πλάκες λιπιδίων, οι οποίες τελικά μπορεί να ασβεστοποιηθούν. Η αρτηριοσκλήρυνση αρχίζει με κάποια εντοπισμένη βλάβη στο ενδοθήλιο, το οποίο εκτίθεται σε διατμητικές τάσεις, και, μάλιστα, η βλάβη του ενδοθηλίου (τραυματισμός του αγγείου) εντοπίζεται, κυρίως, στα σημεία όπου αυτές οι τάσεις είναι υψηλές, όπως τα σημεία διχασμού των αρτηριών. Η βλάβη του ενδοθηλίου οδηγεί στην έκφραση των μορίων προσκόλλησης των αγγειακών κυττάρων, από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Μέσω των μορίων αυτών, τα μονοκύτταρα προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και στη συνέχεια, το διαπερνούν και τελικά εισέρχονται στην υπενδοθηλιακή περιοχή. Εκεί μετατρέπονται σε ενεργοποιημένα μακροφάγα λιπιδιοφάγα των ιστών (2).

Τα ενεργοποιημένα μονοκύτταρα / φαγοκύτταρα μετακινούν την ισορροπία μεταξύ των αντιθρομβογόνων και των θρομβογόνων λειτουργιών του ενδοθηλίου συμμετέχοντας στις θρομβοτικές επιπλοκές της αθηροσκλήρυνσης. Παρέχουν τον ιστικό παράγοντα, απαραίτητο για την έναρξη της εξωαγγειακής οδού πήξεως καθώς και τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, αναστολέα της ινωδόλυσης. Επιπλέον, παράγουν μεταλλοπρωτεάσες με συμπαράγοντα Zn, υπεύθυνες για την αποικοδόμηση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και τη ρήξη της αθηρωματικής πλάκας. Τελικά, τα μακροφάγα συναθροίζονται στον πυρήνα μια τυπικής πλάκας. Εκεί κάποια πεθαίνουν μέσω αποπτωτικών μηχανισμών και αντικαθίστανται με μια μάζα εξωκυττάριων λιπιδίων και κυτταρικών υπολειμμάτων, σχηματίζοντας τον νεκρωτικό πυρήνα (3).

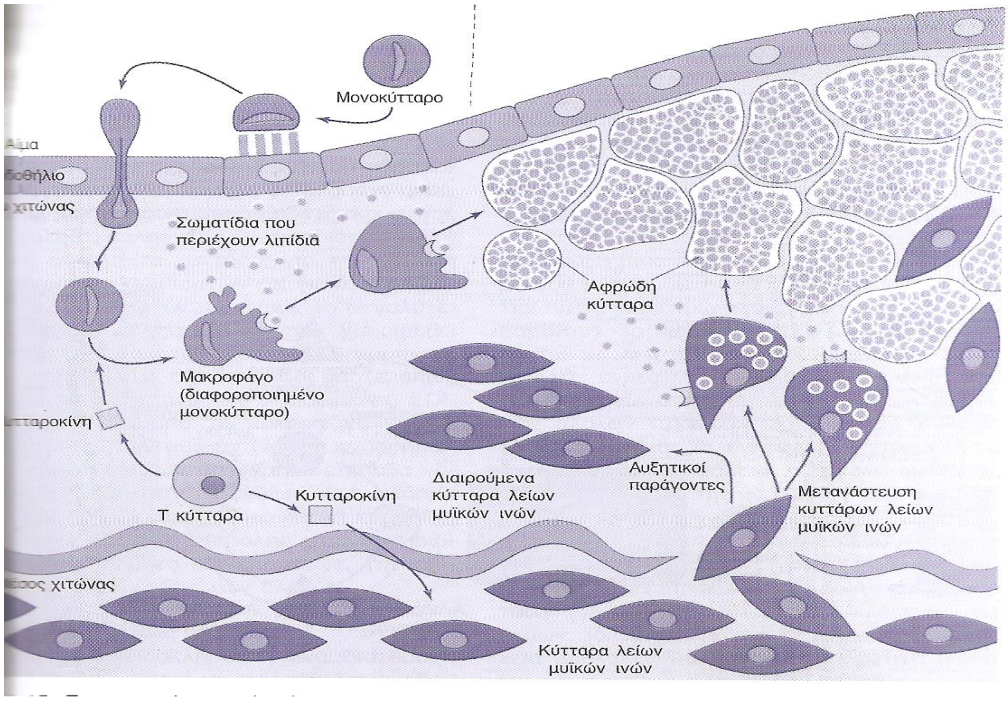
Τα μακροφάγα αυτά ,φαγοκυτταρώνουν, κυρίως, χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) και συγκεκριμένα την οξειδωμένη τους μορφή. Τα μακροφάγα προμηθεύουν τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και τις λιποξυγονάσες που είναι απαραίτητες για την οξειδωτική μετατροπή των LDL. Ακόμα, παράγουν

κυτταροκίνες που αυξάνουν εκθετικά την τοπική φλεγμονώδη απάντηση και συμμετέχουν στην εξέλιξη της βλάβης. Τα μακροφάγα, εφόσον έχουν φαγοκυτταρώσει την οξειδωμένη LDL, μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα. Τα τελευταία κατά μήκος της αρχικής θέσης της ενδοθηλιακής βλάβης, σχηματίζουν μια λιπώδη γράμμωση. Οι γραμμώσεις αυτές είναι χαρακτηριστικές της εξελισσόμενης αρτηριοσκλήρυνσης. Τα κύτταρα των λείων μυικών ινών, τα οποία βρίσκονται στην περιοχή της αρχικής βλάβης, διεγείρονται και μετακινούνται από τον μέσο στο έσω χιτώνα, όπου εκεί πολλαπλασιάζονται και εναποθέτουν κολλαγόνο και άλλα μόρια της θεμέλιας ουσίας (πρωτεογλυκάνες, ελαστίνη) συμβάλλοντας στην αύξηση του όγκου της βλάβης. (2) Η αγγειοτενσίνη ΙΙ, ο βασικός αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών και τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστείνης αποτελούν τα μιτογόνα ερεθίσματα των λείων μυικών κυττάρων. Αντίθετα, η ηπαρίνη, η γ-ιντερφερόνη και ο μετατρεπτικός αυξητικός παράγοντας β δρουν ανταγωνιστικά. Ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων εγείρει την μετανάστευση (3).

Τα κύτταρα των λείων μυικών ινών προσλαμβάνουν και αυτά την οξειδωμένη LDL, και μετατρέπονται σε αφρώδη, όπως τα μακροφάγα. Ο μετασχηματισμός των λείων μυικών κυττάρων σε αφρώδη κατευθύνεται από την λιποπρωτεϊνική λιπάση, την apoE, τον TNF-a και την γ-IFN. (2) Τα οιστρογόνα ασκούν ωφέλιμη δράση στη συγκέντρωση λιποπρωτεϊνών του πλάσματος, παρακινούν την παραγωγή NO και προστακυκλίνης. (3) Στο παραμορφωμένο τοίχωμα της αρτηρίας εναποτίθεται ασβέστιο και σχηματίζεται μια εύθραυστη πλάκα.

Για την μετατροπή των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, είναι υπεύθυνος ένας παράγοντας, που εκκρίνεται από τα Τ- κύτταρα του ανοσοποιητικού. Επίσης, προϋπόθεση για την μετατροπή αυτή, είναι η έκφραση ενός εξειδικευμένου τύπου υποδοχέα των οξειδωμένων LDL, του υποδοχέα- εκκαθαριστή, στην επιφάνεια του μονοκυττάρου. Όταν τα μονοκύτταρα διεγερθούν από τον παράγοντα που διεγείρει τις αποικίες των μακροφάγων, και ο οποίος εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα κύτταρα των λείων μυικών ινών των αγγείων, τότε εκφράζονται οι υποδοχείς- εκκαθαριστές. Μετά το σχηματισμό των συμπλεγμάτων οξειδωμένων LDL- υποδοχέων, αυτά μεταφέρονται στο εσωτερικό του κυττάρου (ο υποδοχέας ανακυκλώνεται προς την μεμβράνη και τα λιπίδια αποθηκεύονται στο εσωτερικού

του κυττάρου). Επιπλέον, αυξητικοί παράγοντες και κυτταροκίνες που παράγονται από τα κύτταρα των λείων μυικών ινών και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, συμμετέχουν στην διαδικασία μετανάστευσης και πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Υπό την επίδραση των αυξητικών παραγόντων τα κύτταρα των λείων μυικών ινών μετακινούνται στον υποενδοθηλιακό χώρο, όπου παράγουν κολλαγόνο και προσλαμβάνουν τις LDL (2).



Σχήμα 1. Παθογενετικός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας **(2)**

Προχωρημένη βλάβη

Η ρήξη ή η εξέλκωση της πλάκας δίνουν κλινικά συμπτώματα. Η φλεγμονή με συστηματικές εκδηλώσεις, όπως η παραγωγή πρωτεϊνών οξείας φάσης αλλά και τοπικές, όπως η έκφραση ιστικών παραγόντων και η αναστολή της δράσης του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, αποσταθεροποιούν την αθηρωματική πλάκα και προάγουν την θρόμβωση. Η επασβέστωση της βλάβης είναι μια ενεργής και ρυθμιζόμενη διαδικασία στην οποία μετέχουν τα περικύτταρα, τα οποία σχετίζονται με τα τοιχώματα μικρών αιμοφόρων αγγείων. Τα κύτταρα αυτά δεν προσομοιάζουν ούτε με τα μυικά ούτε με τα ενδοθηλιακά και προσφέρουν τον σκελετό τους για την εναπόθεση του φωσφορικού ασβεστίου. Η δράση μεσολαβητών της φλεγμονής ή επίθεση από ενεργοποιημένα φονικά Τ κύτταρα προκαλούν τον θάνατο των ενδοθηλιακών κυττάρων. Οι μεσολαβητές της

φλεγμονής και η οξειδωμένη LDL διεγείρουν την έκφραση και ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεασών εξειδικευμένων στην αποικοδόμηση των συστατικών της βασικής μεμβράνης των ενδοθηλιακών κυττάρων. Κατά αυτόν τον τρόπο η φλεγμονή συμβάλλει στην απώλεια του ενδοθηλίου. Οι μηχανισμοί του σχηματισμού των μικροαγγείων στο αθήρωμα δεν διαφέρουν αυτών των άλλων θέσεων αγγειογένεσης. Ακόμα, σε αγγεία που η αθηρωματική πλάκα καταλαμβάνει τμήμα της διαμέτρου τους, η αγγειογένεση περιορίζεται μόνο στο αντίστοιχο προσβεβλημένο τμήμα. Τα μικροαγγεία στην πλάκα είναι προδιαθεσικός παράγοντας για αιμορραγία και θρόμβωση. Παράλληλα, παρέχουν στην πλάκα τα απαραίτητα θρεπτικά υλικά για την ανάπτυξη της και τους αναγκαίους χημειοτακτικούς παράγοντες για την εξέλιξη της. (3)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^{Ο}

ΔΟΜΗ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Τα αιμοπετάλια είναι άχρωμα θραύσματα κυττάρων, μη εμπύρηνα, που περιέχουν πολυάριθμα κοκκία και παράγονται όταν το κυτταρόπλασμα μεγάλων κυττάρων του μυελού των οστών, που ονομάζονται μεγακαρυοκύτταρα (ΜΚ), διασπάται και ένα μέρος του εισέρχεται στην κυκλοφορία (1). Συνεπώς, είναι μικρού μεγέθους και ακανόνιστου δισκοειδούς σχήματος απύρηνα κύτταρα, έχουν κυτταρόπλασμα, που έχουν κληρονομήσει από τα ΜΚ, πλήρες από κόκκους, μιτοχόνδρια, και mRNA. Πράγματι, τα απύρηνα αιμοπετάλια στερούνται γονιδιωματικού DNA, αλλά κληρονομούν ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών RNAs, κωδικοποιήσιμων ή μη κωδικοποιήσιμων, και μεταφραστικών μηχανισμών από τα πατρικά τους κύτταρα. Με αυτόν τον τρόπο τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια έχουν την ικανότητα να συνθέσουν πρωτεΐνες, γεγονός που υποδηλώνει την πιθανότητα μετα-μεταγραφικής γονιδιακής ρύθμισης. Οι διαλυτές πρωτεΐνες που αποθηκεύονται στην μήτρα των α-κοκκίων, όπως ο παράγοντας von Willebrand και θρομβοσπονδίνη, προέρχονται από σύνθεση στα ΜΚs, αποκλειστικά, ενώ πρωτεΐνες όπως το ινωδογόνο και η λευκωματίνη, προέρχονται από ενδοκυττάρωση από πρωτεΐνες του πλάσματος.

Όταν ένα ΜΚ εξαναγκάζεται σε τελική ωρίμανση διαχωρίζεται σε έναν υποβαθμισμένο πυρήνα και σε αιμοπετάλια, τονίζοντας την φύση των αιμοπεταλίων που είναι μόνο κυτταροπλασματικά θραύσματα. Ένα ΜΚ μπορεί να παράγει 10 με 20 προαιμοπετάλια, καθένα από τα οποία ξεκινά ως μια αμβλεία προεξοχή που με την πάροδο του χρόνου μακραίνει, λεπταίνει και διακλαδίζεται επανειλημμένα. Τα προαιμοπετάλια εκτείνονται σε ημιτονοειδή χώρους, όπου αποκολλώνται και τεμαχίζονται σε επιμέρους αιμοπετάλια, δίνοντας περίπου 2000-5000 νέα αιμοπετάλια (4).

Η δομή τους είναι πολύπλοκη. Συγκεκριμένα, η μεμβράνη τους φέρει διάφορες πρωτεΐνες – υποδοχείς για την επαφή τους με διάφορες ουσίες, καθώς και φωσφολιπίδια, που σχετίζονται με την παραγωγή ουσιών, όπως για παράδειγμα, προσταγλαδίνες. Το κυτταρόπλασμα περιέχει μικροϊνίδια ακτίνης

απαραίτητα για την κινητικότητα των αιμοπεταλίων. Τα κοκκία που περιέχουν είναι τριών ειδών και παράγουν πλήθος ουσιών όπως ADP, τον παράγοντα von Willebrand, τον αιμοπεταλιογενή αυξητικό παράγοντα (PDGF), ινωδογόνο, θρομβοξάνη, θρομβοσπονδίνη, Ca, διάφορα ένζυμα κ.α (2).

ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

- Τα αιμοπετάλια έχουν γλυκοπρωτεΐνες (GPS), οι οποίες αισθάνονται τις εκτεθειμένες υπο-ενδοθηλιακές δομές μετά από αγγειακό στρες, προσβολή, ή φθορά (συμπεριλαμβανομένων και της μηχανικής διάβρωσης και της γήρανσης). Τα αιμοπετάλια μπορούν να αισθανθούν εξωγενή σήματα κινδύνου λοίμωξης μέσω μιας πανοπλία από υποδοχείς . Διαθέτουν επίσης «συναγερμούς», οι οποίοι μπορούν να αισθανθούν τον αυτο-τραυματισμό.
- Τα αιμοπετάλια μπορούν να ανταποκριθούν σε διαλυτά μόρια, μέσω των υποδοχέων τους, και αυτό μπορεί να αποδειχθεί ιδιαίτερα για τη θρομβίνη. Ως εκ τούτου, τα αιμοπετάλια είναι δραστικά προς αγωνιστές και ανταγωνιστές αιμοστατικών / θρομβωτικών παραγόντων. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια μπορούν να αντιδράσουν σε βιολογικούς τροποποιητές ,όπως οι κυτταροκίνες και οι χημειοκίνες, και να ενεργοποιηθούν ή ανασταλούν.
- Τα αιμοπετάλια βρίσκονται μαζί με πρωτεΐνες / γλυκοπρωτεΐνες για πολλούς και διαφορετικούς σκοπούς, συμπεριλαμβανομένης της αιμόστασης, της θρόμβωσης, της φυσικής άμυνας ενάντια σε λοιμώξεις (βακτηριακές, ιογενείς, ίσως από μύκητες), την επικοινωνία των κυττάρων, την αγγειογένεση, την επούλωση και την επισκευή ιστών. Είναι σαφές, ότι τα αιμοπετάλια μπορούν να κάνουν διάκριση μεταξύ των «κινδύνων» που αντιμετωπίζουν. Μπορούν να αποκρυπτογραφήσουν την αγγειακή προσβολή και την παρουσία κυκλοφορόντων λοιμωδών παραγόντων ή συστατικών της μικροχλωρίδας (μολυσματικών ή όχι) και εκκρίνουν διακριτά, και τους πιο κατάλληλους συνδυασμούς "προϊόντων".
- Τα αιμοπετάλια έχουν λειτουργίες στην αγγειακή διαπερατότητα, δηλαδή περιστασιακά διηθούν ιστούς και μπορούν να προκαλέσουν φθορές και φλεγμονή. Τα αιμοπετάλια έχουν πρόσφατα ταυτοποιηθεί ως σημαντικώς υπεύθυνα για τον επιλεκτικό έλεγχο της αγγειακής διαπερατότητας, με

εξαγγείωση λεμφοκυττάρων, ενεργοποιημένα ως παράγοντες που επιδρούν στην ανοσία. Επίσης, κάνουν τα λευκοκύτταρα επιρρεπή στο να απελευθερώνουν εξωκυττάριες παγίδες (δίχτυα) από ουδετερόφιλα με λειτουργίες ενάντια σε λοίμωξη (Π.χ. σήψη) ακόμα και στον καρκίνο, ευνοώντας την θρόμβωση σε κάθε περίπτωση.

- Τα αιμοπετάλια μπορούν να δεσμεύσουν παθογόνα. Τα αιμοπετάλια μπορούν να αισθανθούν κάποια λοιμώδη παθογόνα και, σε ορισμένες περιστάσεις προσδένονται σε αυτά, είτε άμεσα είτε έμμεσα (4).

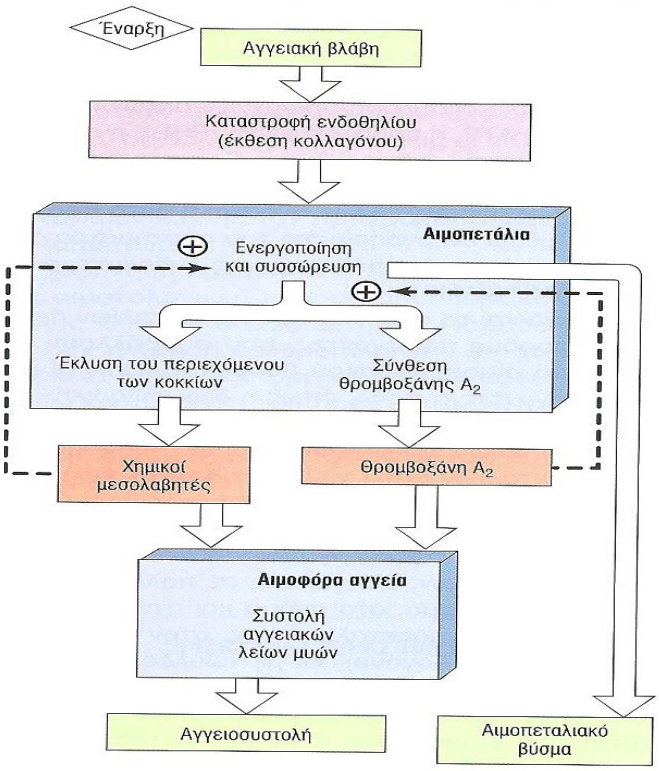
Τα αιμοπετάλια μπορούν να προκαλέσουν φλεγμονή. Δηλαδή, είναι σίγουρα φλεγμονώδη κύτταρα που ο κύριος ρόλος τους στην φυσιολογία του ενδοθηλίου είναι η ανίχνευση κινδύνων (αγγειακές προσβολές και φθορές) και η επισκευή αγγειακής βλάβης σε μόνιμη βάση. Αυτή η φυσιολογική παρέμβαση και η επισκευή, δεν είναι λιγότερο από μια διαδικασία επούλωσης, η οποία από μόνη της σχετίζεται με φυσιολογική φλεγμονή. Για να βοηθήσουν αυτή τη φυσιολογική φλεγμονή, τα αιμοπετάλια παράγουν ποικιλία από «εργαλεία επισκευής», όπως είναι οι παράγοντες πήξης, οι κυτταροκίνες, και άλλοι βιολογικοί τροποποιητές, καθώς και παράγοντες ανάπτυξης και αγγειογενετικοί παράγοντες. Όμως, τα αιμοπετάλια μπορεί να ξεπεράσουν τον φυσιολογικό ρόλο τους και να συμμετέχουν σε παθολογική φλεγμονή, όπως σε καρδιαγγειακή νόσο, σοβαρή λοίμωξη και σήψη (4).

ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

Αιμοπεταλιακή συσσώρευση

Τα αιμοπετάλια είναι τα βασικά κύτταρα της πρωτογενούς αιμόστασης και του σχηματισμού θρόμβων. Τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αιμόσταση, πράγμα το οποίο προϋποθέτει την προσκόλληση τους σε μια επιφάνεια. Παρότι τα αιμοπετάλια έχουν τάση προσκόλλησης σε επιφάνειες, δεν προσκολλώνται σε φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία καλύπτουν την εσωτερική επιφάνεια των αιμοφόρων αγγείων. Η διακοπή της συνέχειας του ενδοθηλίου και η έκθεση των υποκείμενων μορίων κολλαγόνου του συνδετικού ιστού, που προκαλούνται από κάκωση ενός αγγείου οδηγούν τα αιμοπετάλια να προσκολλώνται στο κολλαγόνο. Αυτό γίνεται μέσω μιας ουσίας- μεσολαβητή, του παράγοντα von Willebrand (vWF), που είναι μια πρωτεΐνη του πλάσματος η οποία εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και τα αιμοπετάλια. Η πρωτεΐνη αυτή συνδέεται με τα εκτεθειμένα μόρια κολλαγόνου και τότε αλλάζει δομή με την οποία καθίσταται ικανή να δεσμεύσει αιμοπετάλια (1). Ο GPIbα, ο οποίος είναι ένας διαμεμβρανικός υποδοχέας των αιμοπεταλίων δεσμεύεται στον vWF, που είναι συνδεδεμένος με τα μόρια κολλαγόνου, επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την κύλιση των αιμοπεταλίων **(5)**. Έτσι, ο vWF δημιουργεί μια γέφυρα μεταξύ του κατεστραμμένου αγγειακού τοιχώματος και των αιμοπεταλίων (1). Η σταθερή προσκόλληση αιμοπεταλίων απαιτεί, επίσης, την συμβολή του παράγοντα GPVI και των ιντεγκρινών. Ο GPVI είναι ένας από τους υποδοχείς κολλαγόνου αιμοπεταλίων, ο οποίος παρέχει ισχυρή μηχανική προσκόλληση, αλλά επίσης, χρησιμεύει ως ο κύριος επαγωγέας της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Ακόμα η ενεργοποίηση του GPVI προκαλεί αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca2 + και την επακόλουθη μεταβολή του σχήματος των αιμοπεταλίων. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εξαρτάται από την έκκριση διαλυτών παραγόντων από τα κοκκία των αιμοπεταλίων, τα πιο σημαντικά από τα οποία είναι, το ADP και η θρομβοξάνη A2 (5). Όταν τα αιμοπετάλια συνδεθούν με το κολλαγόνο τα εκκριτικά κυστίδια που διαθέτουν τα τελευταία απελευθερώνουν το περιεχόμενο τους, δηλαδή διάφορους χημικούς παράγοντες. Πολλοί από αυτούς, όπως η σεροτονίνη και η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), προκαλούν τοπικά πολλαπλές μεταβολές στον μεταβολισμό, το σχήμα και τις πρωτεΐνες επιφάνειας των αιμοπεταλίων, μια διεργασία που λέγεται ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Μερικές από τις

μεταβολές αυτές, προκαλούν προσκόλληση νέων αιμοπεταλίων στα παλιά, ένα φαινόμενο θετικής ανατροφοδότησης που λέγεται συσσώρευση αιμοπεταλίων. Το φαινόμενο αυτό, επιφέρει ταχύτατα το σχηματισμό ενός θρόμβου (αιμοπεταλιακού βύσματος) μέσα στο αγγείο. Η ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων δεν διεγείρεται μόνο από τους χημικούς παράγοντες που αναφέρθηκαν. Με την προσκόλληση των αιμοπεταλίων τα φωσφολιπίδια των μεμβρανών τους παράγουν ταχέως θρομβοξάνη Α2, η οποία απελευθερώνεται στο εξωκυττάριο υγρό και δρα και αυτή τοπικά όπως η σεροτονίνη και η ADP. Η θρομβοξάνη Α2 διεγείρει περαιτέρω τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και την απελευθέρωση του περιεχομένου των εκκριτικών κυστιδίων τους. Το ινωδογόνο, που είναι πρωτεΐνη πλάσματος, παίζει σημαντικό ρόλο στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δημιουργώντας γέφυρες μεταξύ των συναθροιζόμενων αιμοπεταλίων. Οι υποδοχείς (θέσεις δέσμευσης) του ινωδογόνου επί της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων αποκαλύπτονται και ενεργοποιούνται κατά τη φάση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων.

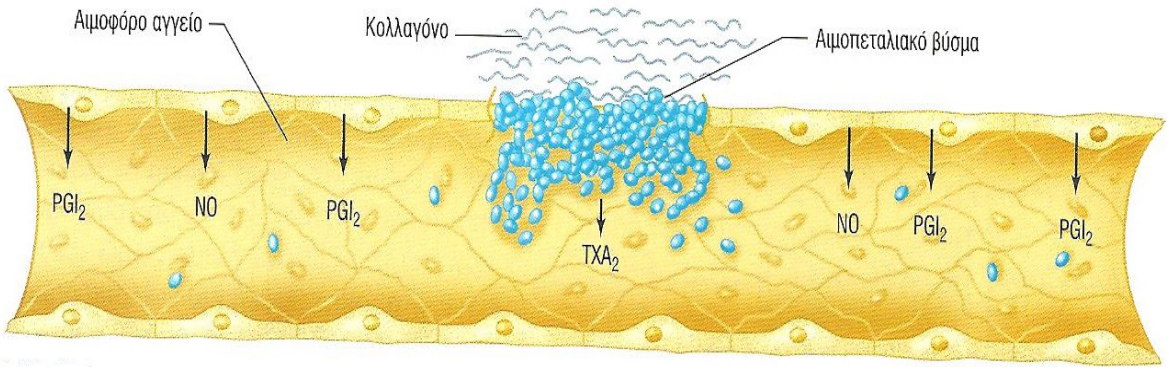


Σχήμα 2. Δημιουργία αιμοπεταλιακού βύσματος **(1)**

Τα αιμοπετάλια έχουν μια επιπλέον ιδιότητα αυτή της αγγειοσυστολής, η οποία ενισχύει την αποτελεσματικότητα του αιμοπεταλιακού βύσματος να στεγανοποιεί τις μικρές ρήξεις των τοιχωμάτων των αιμοφόρων αγγείων πλήρως. Η αγγειοσυσταλτική ιδιότητα των αιμοπεταλίων έγκειται στο γεγονός ότι αυτά περιέχουν ακτίνη και μυοσίνη σε μεγάλες συγκεντρώσεις και η διέγερση τους στα συσσωρευμένα αιμοπετάλια οδηγεί σε συστολή των αγγείων. Προκαλείται έτσι σύσπαση και ενίσχυση του αιμοπεταλιακού βύσματος. Όταν το αιμοπεταλιακό βύσμα αναπτυχθεί και γίνει συμπαγές, οι αγγειακές λείες μυικές ίνες του αγγείου που υπέστη την βλάβη διεγείρονται και συστέλλονται, μειώνοντας την αιματική ροή στη συγκεκριμένη περιοχή και την πίεση μέσα στο κατεστραμμένο αγγείο. Αυτή η αγγεισυστολή είναι το αποτέλεσμα της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων καθώς επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση της θρομβοξάνης Α2 και ποικίλων άλλων χημικών ουσιών που περιέχονται στα εκκριτικά κυστίδια των αιμοπεταλίων.

Το αιμοπεταλιακό βύσμα αρχίζει να δημιουργείται στο κατεστραμμένο ενδοθήλιο, όμως, δεν επεκτείνεται πέρα από την περιοχή της περιοχής που έχει υποστεί την βλάβη, δηλαδή κατά μήκος του υγιούς ενδοθηλίου. Αυτό συμβαίνει γιατί τα παρακείμενα μη κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και

απελευθερώνουν προστακυκλίνη (PGI2), η οποία είναι ένας σημαντικός αναστολέας συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Έτσι, ενώ τα αιμοπετάλια διαθέτουν ένζυμα που μετατρέπουν το αραχιδονικό οξύ σε θρομβοξάνη Α2, τα φυσιολογικά ενδοθηλιακά κύτταρα περιέχουν διαφορετικά ένζυμα που μετατρέπουν τις ενδιάμεσες ουσίες που σχηματίζονται από το αραχιδονικό οξύ σε προστακυκλίνη, αντί θρομβοξάνη. Τα παρακείμενα υγιή ενδοθηλιακά κύτταρα εκτός από προστακυκλίνη απελευθερώνουν και μονοξείδιο του αζώτου (NO), το οποίο είναι αγγειοδιαστολέας και αναστολέας της προσκόλλησης, της ενεργοποίησης και συσσώρευσης αιμοπεταλίων (1).

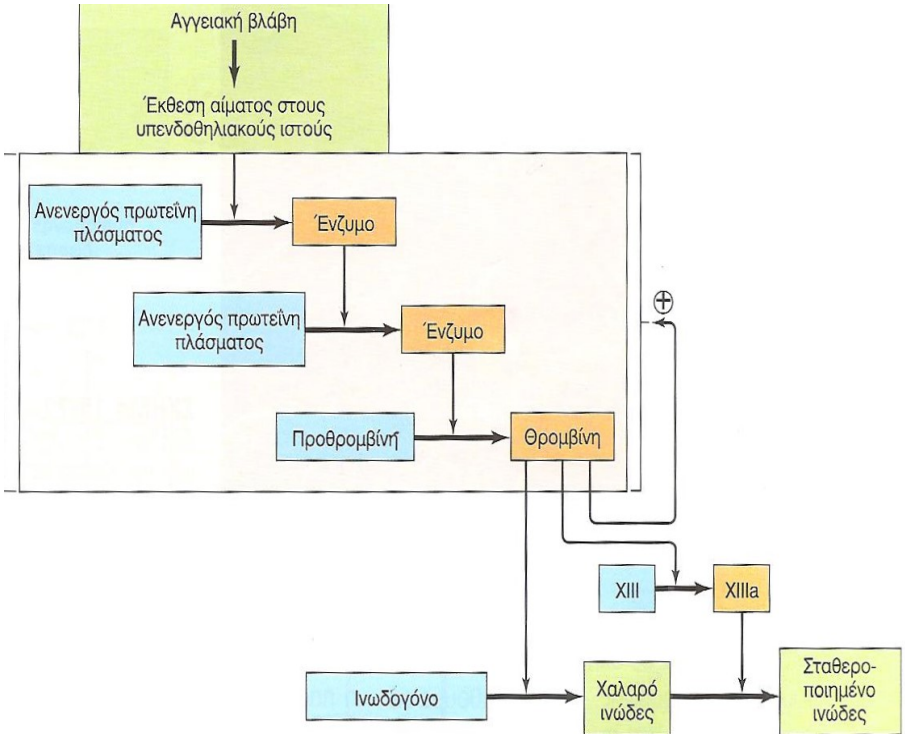


Σχήμα 3. Παραγωγή ενεργοποιητών και αναστολέων των αιμοπεταλίων από τον ενδοθηλιακό χώρο **(1)**

<u>Πήξη αίματος: Δημιουργία θρόμβου</u>

Η πήξη του αίματος, δηλαδή η θρόμβωση, είναι η μετατροπή του αίματος σε κολλοειδές πήγμα που λέγεται θρόμβος και αποτελείται από το ινώδες, το οποίο είναι ένα πρωτεϊνικό πλέγμα. Η θρόμβωση αποτελεί τον κυρίαρχο αιμοστατικό μηχανισμό και γίνεται γύρω από το αρχικό αιμοπεταλιακό βύσμα. Με αυτήν την διαδικασία υποστηρίζεται και ενισχύεται το αιμοπεταλιακό βύσμα και στερεοποιείται το αίμα που παραμένει στον αυλό της πληγής. Η δημιουργία του θρόμβου αρχίζει όταν μια κάκωση του αγγείου διακόψει το ενδοθήλιο και επιτρέψει στο αίμα να έρθει σε επαφή με τον υποκείμενο ιστό. Η επαφή αυτή αποτελεί το έναυσμα για την έναρξη μιας τοπικής αλληλουχίας, που χαρακτηρίζεται ως καταρράκτης χημικών αντιδράσεων. Σε κάθε στάδιο του καταρράκτη, μια ανενεργός πρωτεΐνη ενεργοποιείται, δηλαδή μετατρέπεται σε ένα

πρωτεολυτικό ένζυμο, το οποίο στη συνέχεια καταλύει τη δημιουργία του επόμενου ενζύμου στην αλληλουχία. Συγκεκριμένα, η κάθε ανενεργός πρωτεΐνη ενεργοποιείται με την απόσπαση ενός μικρού πεπτιδίου από αυτήν, εκθέτοντας έτσι την ενεργό πλευρά του ενζύμου. Πολλοί από τους πρωτεϊνικούς παράγοντες του πλάσματος αφού ενεργοποιηθούν δεν λειτουργούν ως ένζυμα, αλλά ως συνένζυμα, απαραίτητα για την δράση των ενζύμων (1).



Σχήμα 4. Γενικός μηχανισμός πήξης **(1)**

Στάδια του καταρράκτη της πήξης του αίματος

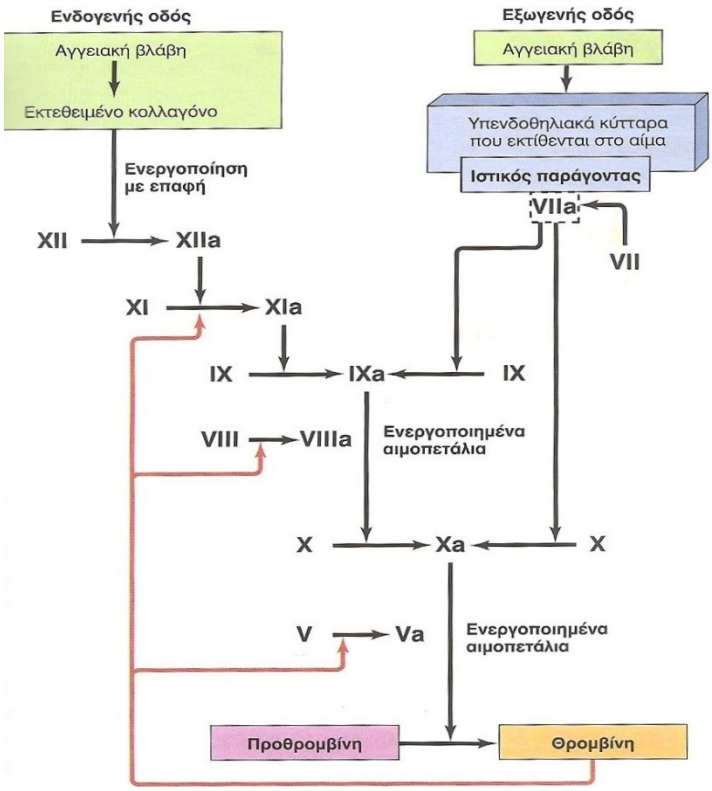
Ο καταρράκτης της πήξης ξεκινά όταν λόγω κάποιας αγγειακής βλάβης εκτεθεί το κολλαγόνο και τα υπενδοθηλιακά κύτταρα στο αίμα. Τα αρχικά στάδια αποτελούνται από δυο οδούς που φαίνονται παράλληλες αλλά ενώνονται στο στάδιο πριν την αντίδραση προθρομβίνης- θρομβίνης. Σε φυσιολογικές συνθήκες οι οδοί αυτές δεν είναι παράλληλες αλλά διαδοχικές με κοινό σημείο τους την θρομβίνη. Οι δυο οδοί είναι η ενδογενής και η εξωγενής. Η πρώτη ονομάζεται έτσι γιατί όλα τα απαραίτητα στοιχεία για να επιτελεσθεί βρίσκονται μέσα στο αίμα, ενώ η δεύτερη χαρακτηρίζεται έτσι γιατί χρειάζεται ένα κυτταρικό συστατικό που βρίσκεται εκτός του αίματος, τον ιστικό παράγοντα. Ο παράγοντας αυτός

εντοπίζεται στην εξωτερική κυτταρική μεμβράνη διάφορων ιστικών κυττάρων, όπως οι ινοβλάστες και άλλα κύτταρα στα τοιχώματα των αιμοφόρων αγγείων κάτω από το ενδοθήλιο.

Στην ενδογενή οδό η πρώτη πρωτεΐνη είναι ο παράγοντας XII, ο οποίος ενεργοποιείται σε XIIa, όταν έρθει σε επαφή με τις ίνες κολλαγόνου που βρίσκονται κάτω από το κατεστραμμένο ενδοθήλιο. Ο XIIa καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα XI σε XIa, ο οποίος με τη σειρά του ενεργοποιεί τον παράγοντα IX προς IXa. Ο τελευταίος ενεργοποιεί τον παράγοντα X σε Xa, ο οποίος είναι ο παράγοντας αυτός που μετατρέπει την προθρομβίνη σε θρομβίνη. Ο παράγοντας VIIa, που έχει προέλθει από τον VII, χρησιμεύει ως συνένζυμο στην ενεργοποίηση του παράγοντα X από τον παράγοντα IXa.

Η εξωγενής οδός αρχίζει όταν το αίμα έρθει σε επαφή με τα υπενδοθηλιακά κύτταρα, λόγω αγγειακής βλάβης που προκαλεί διακοπή της συνέχειας του ενδοθηλίου, οπότε ο ιστικός παράγοντας δεσμεύει μια πρωτεΐνη του πλάσματος, τον παράγοντα VII, η οποία ενεργοποιείται σε VIIa. Δημιουργείται έτσι ένα σύμπλεγμα ιστικού παράγοντα-VIIa, το οποίο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ιστικού κυττάρου και καταλύει απευθείας την ενεργοποίηση του παράγοντα X αλλά και την ενεργοποίηση του IX, ο οποίος με τη σειρά του καταλύει περαιτέρω την ενεργοποίηση του παράγοντα X συμμετέχοντας στην ενδογενή οδό.

Συνοψίζοντας η θρόμβωση μπορεί να γίνει είτε με την ενεργοποίηση του παράγοντα XII είτε με τη δημιουργία του συμπλέγματος ιστικού παράγοντα- VIIa. Οι δυο οδοί συγχωνεύονται στον παράγοντα Xa, ο οποίος καταλύει τη μετατροπή της προθρομβίνης σε θρομβίνη.



Σχήμα 5. Οι δύο οδοί της πήξης **(1)**

Από τη στιγμή που η προθρομβίνη μετατραπεί σε θρομβίνη, η τελευταία καταλύει μια αντίδραση στην οποία αρκετά πολυπεπτίδια διαχωρίζονται από τα μόρια μιας ραβδόμορφης πρωτεΐνης του πλάσματος, του ινωδογόνου. Τα κατάλοιπα του ινωδογόνου, που παραμένουν μεγάλα, συνδέονται μεταξύ τους σχηματίζοντας ινώδες. Το ινώδες αρχικά είναι ένα χαλαρό δίκτυο διαπλεκόμενων νηματίων, στη συνέχεια, όμως, σταθεροποιείται και ενισχύεται ταχύτατα με τη δημιουργία ομοιοπολικών δεσμών, μια διαδικασία που καταλύεται από τον παράγοντα XIIIa. Ο παράγοντας αυτός είναι η ενεργοποιημένη μορφή του πρωτεϊνικού παράγοντα XIII του πλάσματος. Η ενεργοποίηση αυτή καταλύεται και πάλι από την θρομβίνη. Με αυτόν τον τρόπο, η θρομβίνη καταλύει και το σχηματισμό του χαλαρού ινώδους, αλλά και την σταθεροποίηση του, ενεργοποιώντας τον παράγοντα XIII, ο οποίος είναι υπεύθυνος για αυτή την διαδικασία. Η θρομβίνη ασκεί θετική ανατροφοδότηση στον ίδιο το σχηματισμό της, ενεργοποιώντας διάφορες πρωτεΐνες στον καταρράκτη αιμόπηξης και ενεργοποίησης περαιτέρω των αιμοπεταλίων. Έτσι, μόλις αρχίσει η δημιουργία

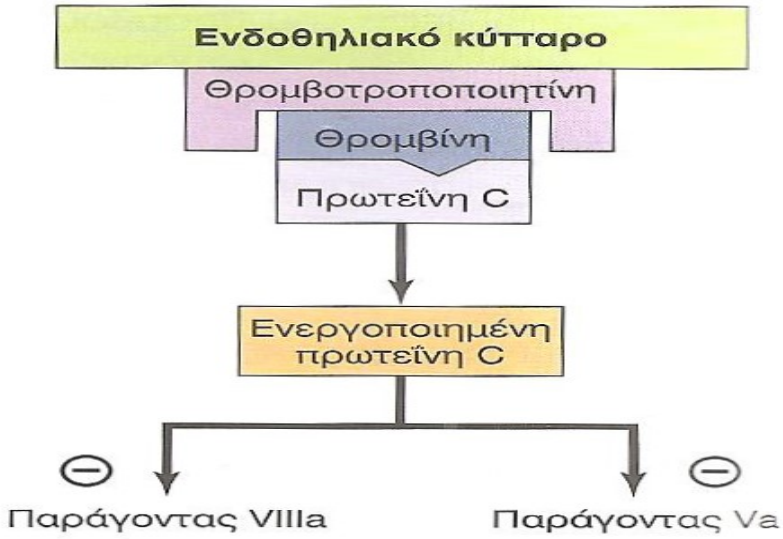
θρομβίνης η ίδια αυτή αρχική ποσότητα θρομβίνης οδηγεί στον σχηματισμό πολύ μεγαλύτερων ποσοτήτων της ίδιας (1).

Αντιπηκτικά συστήματα

Μηχανισμοί που αντιτάσσονται στο σχηματισμό θρόμβου

Υπάρχουν τρεις μηχανισμοί που αντιτάσσονται στο σχηματισμό ενός θρόμβου όταν αυτός αρχίσει να αναπτύσσεται, συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό αυτής της διεργασίας και στην πρόληψη της υπέρμετρης επέκτασης του.

- Ο πρώτος αντιπηκτικός μηχανισμός δρα κατά την αρχική φάση της θρόμβωσης και χρησιμοποιεί την πρωτεΐνη του πλάσματος που λέγεται αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI), ο οποίος εκκρίνεται κυρίως από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η ουσία αυτή δεσμεύεται στο σύμπλεγμα ιστικού παράγοντα- παράγοντα VIIα και αναστέλλει την ικανότητα του να δημιουργεί τον παράγοντα Χα. Λόγω αυτού του μηχανισμού η εξωγενής οδός δημιουργεί μόνο μικρές ποσότητες θρομβίνης.
- Ο δεύτερος διεγείρεται από την θρομβίνη. Η θρομβίνη συνδέεται με έναν υποδοχέα των ενδοθηλιακών κυττάρων, την θρομβοποιητίνη. Με την σύνδεση αυτή αναστέλλονται όλες οι δράσεις της θρομβίνης για το σχηματισμό θρόμβου και προκαλείται σύνδεση της συνδεδεμένης θρομβίνης με μια ειδική πρωτεΐνη του πλάσματος, την πρωτεΐνη C. Με την σύνδεση θρομβίνης – πρωτεΐνης C, η τελευταία ενεργοποιείται, η οποία σε συνδυασμό με μια ακόμα πρωτεΐνη του πλάσματος, αδρανοποιεί τους παράγοντες VIIIα και Vα.



Σχήμα 6. Αντιπηκτικά συστήματα **(1)**

- Ο τρίτος αντιπηκτικός μηχανισμός σχετίζεται με την αντιθρομβίνη ΙΙΙ, η οποία είναι και αυτή μια πρωτεΐνη του πλάσματος και που αδρανοποιεί την θρομβίνη και άλλους παράγοντες πήξης. Για να το κάνει αυτό φυσικά πρέπει η ίδια αντιθρομβίνη που βρίσκεται στο αίμα να ενεργοποιηθεί, το οποίο γίνεται μόλις συνδεθεί με την ηπαρίνη. Η τελευταία βρίσκεται στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αντιθρομβίνη ΙΙΙ εμποδίζει την επέκταση ενός θρόμβου αδρανοποιώντας ταχύτατα τους παράγοντες της πήξης, που απομακρύνονται από την άμεση θέση του θρόμβου με την αιματική ροή (1).

<u>Το ινωδολυτικό σύστημα</u>

Κάθε θρόμβος ινώδους δεν έχει σχεδιαστεί για να διαρκέσει για πάντα, αλλά πρόκειται για μια μεταβατική διάταξη μέχρι να επιτευχθεί μόνιμη διόρθωση του αγγείου. Το ινωδολυτικό σύστημα αποτελεί τον κύριο μηχανισμό για την απομάκρυνση του θρόμβου. Η φυσιολογία του συστήματος είναι η εξής: αρχικά, δημιουργείται ένα προένζυμο του πλάσματος, το πλασμινογόνο, το οποίο όταν ενεργοποιηθεί από ειδικές πρωτεΐνες, τους ενεργοποιητές του πλασμινογόνου, προς το ενεργό ένζυμο, πλασμίνη, η τελευταία διασπά το ινώδες, προκαλώντας έτσι λύση του θρόμβου.

Το ινωδολυτικό σύστημα έχει ποικίλους τύπους ενεργοποιητών του πλασμινογόνου και ποικίλες οδούς σχηματισμού τους, καθώς και διάφορους

αναστολείς αυτών των ενεργοποιητών του πλασμινογόνου. Για παράδειγμα, ο ιστικός ενεργοποιητής του πλασμινογόνου (t-PA), που εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, δείχνει πως κινητοποιείται το σύστημα αυτό. Κατά τη θρόμβωση, τόσο το πλασμινογόνο όσο και ο t-PA δεσμεύονται με το ινώδες και ενσωματώνονται σε όλη την έκταση του θρόμβου. Η δέσμευση του t-PA με το ινώδες είναι πολύ σημαντική, γιατί ο t-PA έχει πολύ ασθενή ενζυμική δράση σε απουσία του ινώδους. Η παρουσία του ινώδους αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την ενζυμική δράση του t-PA να καταλύει την ενεργοποιήση του πλασμινογόνου προς πλασμίνη. Έτσι, το ινώδες είναι το ίδιο που οδηγεί στην διάλυση του (1).

Συνοπτικά οι αντιπηκτικοί ρόλοι των ενδοθηλιακών κυττάρων

- Φυσιολογικά παρέχουν έναν άθικτό φραγμό μεταξύ του αίματος και του υποενδοθηλιακού συνδετικού ιστού με αποτέλεσμα να μην διεγείρεται η συσσώρευση αιμοπεταλίων και ο σχηματισμός συμπλεγμάτων ιστικού παράγοντα- παράγοντα VIIα.
- Συνθέτουν και απελευθερώνουν PGI2 και NO, τα οποία αναστέλλουν την ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων.
- Εκκρίνουν αναστολείς της οδού του ιστικού παράγοντα και έτσι αναστέλλεται η ικανότητα παραγωγής του παράγοντα Χα από το σύμπλεγμα ιστικού παράγοντα- παράγοντα VIIα.
- Δεσμεύουν τη θρομβίνη μέσω της θρομβοποιητίνης, και έτσι η συνδεδεμένη θρομβίνη ενεργοποιεί την πρωτεΐνη C. Η ενεργός πια πρωτεΐνη C αδρανοποιεί τους παράγοντες πήξης VIIIα και Vα.
- Εκθέτουν τα μόρια της ηπαρίνης στις επιφάνειες των κυτταροπλασματικών τους μεμβρανών. Η ηπαρινή δεσμεύει την αντιθρομβίνη III, και η τελευταία με τη σειρά της αδρανοποιεί τη θρομβίνη και άλλους παράγοντες πήξης.
- Εκκρίνουν τον ιστικό ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, ο οποίος καταλύει το σχηματισμό πλασμίνης, που προκαλεί λύση των θρόμβων (1).

ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΝΕΣΗ

Όταν η μονοστοιβάδα των ενδοθηλιακών κυττάρων, η οποία καλύπτει εσωτερικά όλα τα αγγεία, διαρρηγνύεται, τότε ενεργοποιείται μια διαδικασία που αναφέρεται ως σχηματισμός θρόμβου, και είναι μια καλά οργανωμένη και σύνθετη

αλληλουχία γεγονότων. Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού θρόμβων, άλλα συστήματα που βρίσκονται εντός του αγγειακού συστήματος μπορεί να ενεργοποιηθούν, το πιο σημαντικό από τα οποία είναι το ανοσοποιητικό σύστημα και η φλεγμονή αποτελεί μέρος της έμφυτης απόκρισης του. Η φλεγμονώδης απόκριση στην βλάβη των ιστών, προκαλεί διάφορες εκδηλώσεις, οι οποίες επιτρέπουν την άμυνα έναντι πιθανών εισβολέων και κινούν τη διαδικασία επούλωσης. Ταυτόχρονα, τα αιμοπετάλια συγκεντρώνονται στην περιοχή της πληγής για να αποκαταστήσουν την ενδοθηλιακή ακεραιότητα. Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα αιμοπετάλια δεν είναι μόνο τελεστές σχηματισμού θρόμβου, αλλά συμμετέχουν ενεργά στην φλεγμονή και σε άλλες διαδικασίες, που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση των ιστών.

Η αθηροσκλήρωση είναι μία χρόνια φλεγμονώδης ασθένεια, που χαρακτηρίζει διάφορες πολύπλοκες διαδικασίες, οι οποίες συμβάλλουν στην παθοφυσιολογία και την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας για δεκαετίες

.

Στην αθηροσκλήρωση, τα αιμοπετάλια συμβάλλουν στα πρώιμα στάδια αυτής της χρόνιας αγγειακής παθολογίας, όπως η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, αλλά επίσης και στα τελικά γεγονότα, όπως η ρήξη της ευάλωτης πλάκας. Για παράδειγμα, τα αιμοπετάλια συμμετέχουν στην αθηρογένεση με απελευθέρωση χημειοκινών, σύνδεση της επιφάνειας τους με οξειδωμένη LDL, απευθείας αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων, απελευθέρωση μικροσωματιδίων και παροχή φλεγμονωδών μεσολαβητών. Τα αιμοπετάλια εντός της αθηροσκληρωτικής πλάκας μπορεί να παραμείνουν ενεργοποιημένα, για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρέχοντας παραγωγή προφλεγμονώδους IL-1β. Μια από τις πιο βασικές λειτουργίες των αιμοπεταλίων στην αθηροσκλήρωση, είναι η επαγωγή συγκέντρωσης των λευκοκυττάρων μέσω απευθείας αλληλεπιδράσεων υποδοχέα-συνδέτη ή επαυξημένης με απελευθέρωση παραγόντων, όπως οι χημειοκίνες.

Τα αιμοπετάλια σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση και μέσω του συστήματος του συμπληρώματος, το οποίο αποτελεί μέρος της έμφυτης ανοσοαπόκρισης. Η ενεργοποίηση του συμπληρώματος είναι σημαντική για φλεγμονώδεις καταστάσεις που σχετίζονται με αγγειακή βλάβη. Διάφορα συστατικά του συμπληρώματος μπορεί να δεσμευτούν στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, σε ασθενείς με αθηροσκλήρωση, υποδοχείς

αναφυλατοξίνης του συμπληρώματος συνδέονται με τα αιμοπετάλια, κάτι το οποίο οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων.

Σε προχωρημένα στάδια της αθηροσκλήρωσης, τα ερυθρά αιμοσφαίρια κολλούν στην αθηρωματική πλάκα απελευθερώνοντας αιμοσφαιρίνη και σίδηρο. Οι μηχανισμοί αυτοί οδηγούν τελικά, σε αποσταθεροποίηση της πλάκας. Αφρώδη κύτταρα παράγουν ιστικό παράγοντα και μόλις ο θρομβογενής πυρήνας λιπιδίων εκτεθεί στον αυλό, αρχίζει η παραγωγή ινώδους. Παράλληλα, τα αιμοπετάλια, καθώς και ο καταρράκτης πήξης ενεργοποιούνται, στη συνέχεια έπεται η ρήξη της πλάκας (5).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^{Ο}

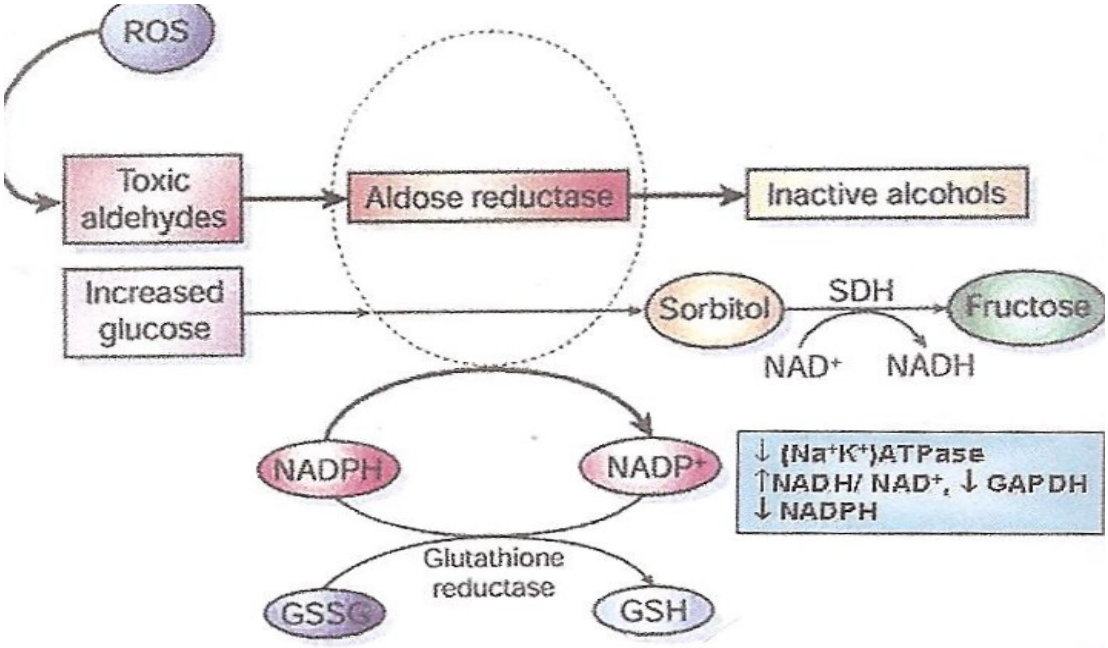
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρόνια υπεργλυκαιμία, όπως αυτή που εμφανίζεται στο διαβήτη, σχετίζεται σημαντικά με καρδιαγγειακή νόσο (CVD) (6). Η υπεργλυκαιμία ευνοεί και ενισχύει, διαμέσου παθοφυσιολογικών μηχανισμών, την αθηρωματική διαδικασία. Η επίδραση της υπεργλυκαιμίας στο αγγειακό τοίχωμα γίνεται μέσω βιοχημικών και μοριακών μηχανισμών, ενώ ο σακχαρώδης διαβήτης σχετίζεται με υπερπηκτικότητα, αυξημένη φλεγμονή, επηρεασμένη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, λόγω και της ινσουλινοαντίστασης, και ασταθείς ευένδοτες αθηρωματικές πλάκες (3).

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΠΟΥ ΕΞΗΓΟΥΝ ΠΩΣ ΕΠΙΔΡΑ Η ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ ΣΤΟ ΑΓΓΕΙΑΚΟ ΤΟΙΧΩΜΑ

- Κύκλος των πολυολών

Το ένζυμο αναγωγάση της αλδόζης φυσιολογικά, μειώνει και μετατρέπει τις ενδοκυττάριες τοξικές αλδεΰδες σε αδρανείς αλκοόλες. Σε κατάσταση όμως ενδοκυττάριας υπεργλυκαιμίας διαμεσολαβεί για την μετατροπή της αυξημένης ενδοκυττάριας γλυκόζης σε σορβιτόλη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται σε φρουκτόζη. Κατά την διαδικασία σχηματισμού της σορβιτόλης το ένζυμο αναγωγάση της αλδόζης καταναλώνει τον συμπαράγοντα NADPH, ο οποίος είναι κρίσιμος παράγοντας για την δημιουργία αναχθείσας γλουταθειόνης, γνωστό αντιοξειδωτικό μόριο. Έτσι, ο περιορισμός παραγωγής της αναχθείσας γλουταθειόνης έχει σαν αποτέλεσμα αυξημένη ενδοκυττάρια οξειδωτική καταπόνηση.



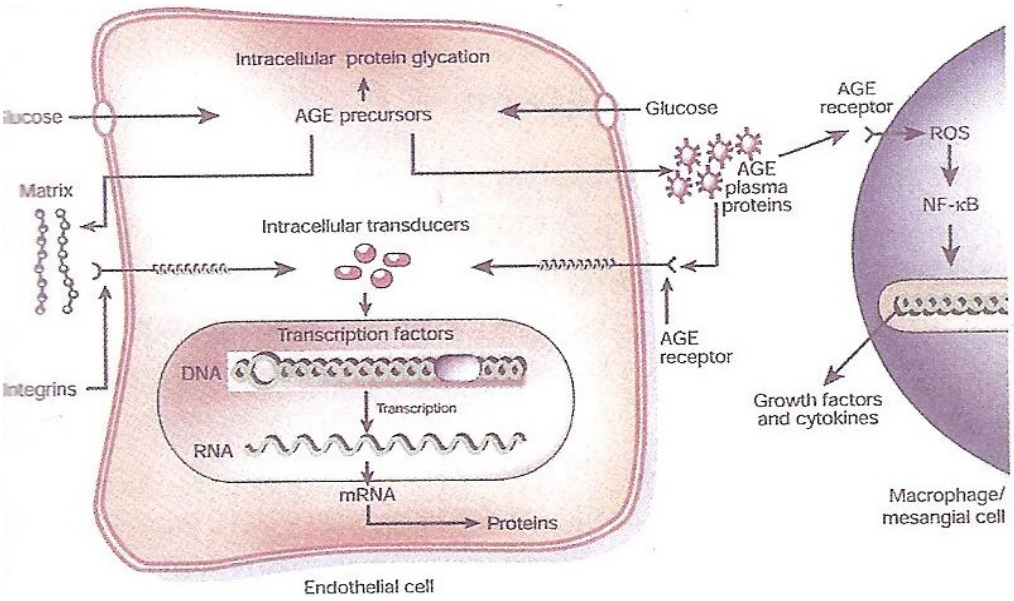
Σχήμα 7. Ενεργοποίηση κύκλου πολυολών στην υπεργλυκαιμία **(3)**

- Γλυκοζυλίωση και AGEs

Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και των λιποπρωτεϊνών αποτελεί έναν μηχανισμό, ο οποίος είναι υπεύθυνος για την αθηρωμάτωση στον σακχαρώδη διαβήτη. Η γλυκοζυλίωση είναι μια μη ενζυμική αντίδραση μεταξύ γλυκόζης και πρωτεϊνών. Η γλυκόζη αντιδρά με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών του πλάσματος ή του αγγειακού τοιχώματος και παράγονται χημικώς αναστρέψιμα γλυκοζυλιωμένα παράγωγα, οι βάσεις Schiff, τα οποία αργότερα οδηγούν σε γένεση πιο σταθερών προϊόντων, όπως τα προϊόντα Amadori. Μερικά από τα πρώιμα γλυκοζυλιωμένα προϊόντα σε πρωτεΐνες μεγάλου χρόνου ημίσειας ζωής, όπως το κολλαγόνο των αγγειακών τοιχωμάτων, συνεχίζουν να υφίστανται χημικές μεταβολές μέχρι να σχηματιστούν σταθερά μη αναστρέψιμα προϊόντα τελικής γλυκοζυλίωσης, τα AGEs.

Τα παραγόμενα AGEs μπορούν να επιταχύνουν και να επηρεάσουν καθοριστικά την αθηρωματική διαδικασία με διάφορους μηχανισμούς. Οι πρώτοι μηχανισμοί σχετίζονται με τον εξωκυττάριο συνδετικό ιστό (διασταυρούμενη σύνδεση κολλαγόνου, αυξημένη σύνθεση κολλαγόνου) με αποτέλεσμα τη «μηχανική» δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. Σχετίζονται, επίσης, με λειτουργικές

διαταραχές ρυθμιστικών πρωτεϊνών, καθώς και με τροποποιήσεις των λιποπρωτεϊνών, κυρίως της LDL.



Σχήμα 8. AGEs και ενδοθηλιακή δυσλειτουργία **(3)**

Η αλληλεπίδραση των AGEs με τους υποδοχείς τους (RAGEs) στα ενδοθηλιακά κύτταρα, δραστηριοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF- kB, με συνέπεια να επάγεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών O_2 και το οξειδωτικό stress. Επιπλέον, η δέσμευση των AGEs με τους ενδοθηλιακούς τους υποδοχείς συμβάλλει σε περιορισμένη λειτουργικότητα του ενδοθηλιακού φραγμού, άρα και σε αυξημένη διαπερατότητα των πρωτεϊνών διαμέσου των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η αλληλεπίδραση των AGEs με τους υποδοχείς των μακροφάγων συμβάλει στην παραγωγή μεσολαβητών που έχουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηρωμάτωσης όπως είναι η ιντερλευκίνη-1, ο TNF-a και ο IGF-1. Στις λείες μυικές ίνες η σύνδεση των AGEs με τους αντίστοιχους υποδοχείς συνοδεύεται με αυξημένο κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ διαμεσολαβητικοί παράγοντες για τη δράση αυτή είναι οι κυτταροκίνες ή αυξητικοί παράγοντες.

- Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης (PKC)

Η PKC περιλαμβάνει 11 ισομορφές σερίνης και θεονίνης. Οι β και δ-ισομορφές, είναι αυτές που δραστηριοποιούνται κυρίως στα αγγειακά κύτταρα. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να ενεργοποιήσει τις ισομορφές PKC, έμμεσα, διαμέσου της

δραστηριοποίησης των υποδοχέων των AGEs ή μέσω αυξημένης δραστηριότητας του κύκλου των πολυολών και ίσως διαμέσου αυξημένης παραγωγής ελεύθερων ριζών. Η ενεργοποίηση της PKC προκαλεί τις εξής παθολογικές συνέπειες:

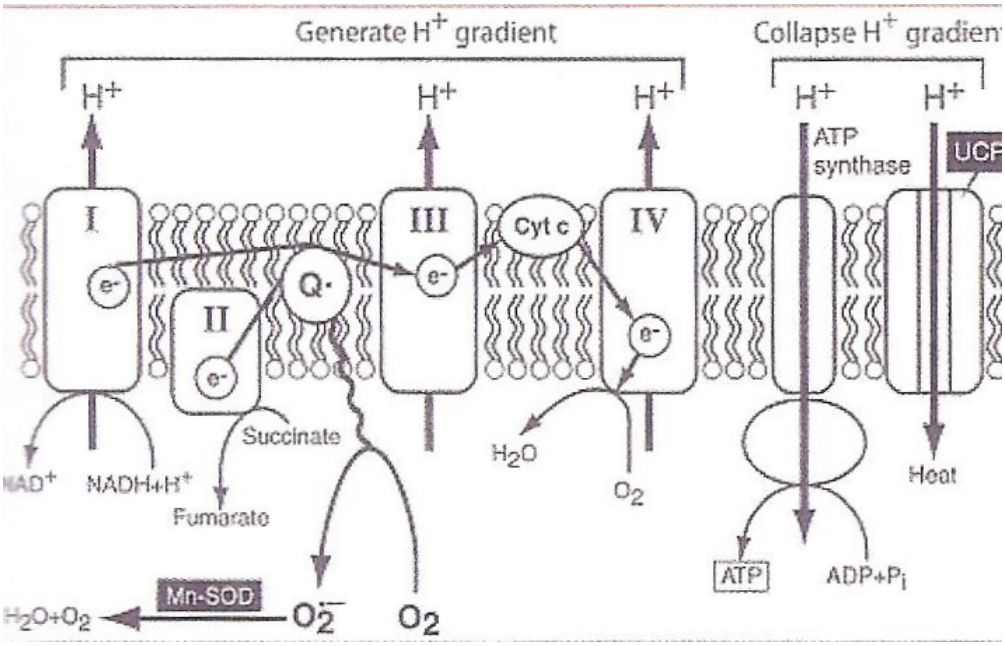
- Αναστολή έκφρασης του m-RNA για την ενδοθηλιακή συνθετάση του NO.
- Αύξηση δραστηριότητας της ενδοκυττάριας MAP κινάσης με αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση της ενδοθηλίνης-1.
- Αυξημένη έκφραση του παράγοντα NEGF, που έχει ως συνέπεια αυξημένη αγγειακή διαπερατότητα.
- Αυξημένη έκφραση του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού- β (TGF-β), ο οποίος είναι αυξητικός παράγοντας που ρυθμίζει την παραγωγή του εξωκυττάριου συνδετικού ιστού (3).

- Οξειδωτικό stress

Το οξειδωτικό στρες είναι ένας βασικός παράγοντας για την έναρξη αγγειακής ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας, κατά τη διάρκεια της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας. Αυτό οφείλεται στον πολύπλευρο ρόλο του, στη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και στην επαγωγή προφλεγμονωδών αποκρίσεων (6). Το οξειδωτικό stress είναι αποτέλεσμα υπερπαραγωγής ελεύθερων ριζών O_2 στο κυτταρικό επίπεδο ή μειωμένης αντιοξειδωτικής άμυνας και συνεπώς ελλιπούς εκκαθάρισης των ριζών αυτών, ή ο συνδυασμός και των δύο. Το οξειδωτικό stress διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των αγγειακών επιπλοκών, ενώ είναι πρώιμος δείκτης ανάπτυξης της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να αυξήσει το οξειδωτικό stress διαμέσου διάφορων μηχανισμών :

1. Διαμέσου της οξείδωσης που συνυπάρχει στη διαδικασία της γλυκοζυλίωσης και της παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος, δικαρβονυλικών παραγώγων, κατά την αυτοοξείδωση των προϊόντων Amadori.
2. Ως αποτέλεσμα αυτοοξείδωσης της ελεύθερης γλυκόζης και παραγωγής υπεροξειδικού ανιόντος και υπεροξειδίου του υδρογόνου.
3. Διαμέσου της μείωσης της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού, που παρατηρείται στα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη, λόγω μειωμένων επιπέδων γλουταθειόνης, βιταμίνης Ε και βιταμίνης C.

Ο πιο σημαντικός μηχανισμός τροφοδότησης του οξειδωτικού stress είναι η αυξημένη μιτοχονδριακή παραγωγή του υπεροξειδικού ανιόντος (O^{-}_{2}) στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων υπάρχουν 4 πρωτεϊνικοί σχηματισμοί, τα συμπλέγματα I, II, III, και IV. Κατά τον ενδοκυττάριο μεταβολισμό της γλυκόζης στην γλυκολυτική διαδικασία δημιουργούνται δότες ηλεκτρονίων, οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι τα NADH και $FADH_2$, που δίνουν ηλεκτρόνια στο σύμπλεγμα I. Τα ηλεκτρόνια αυτά με την επίδραση του συνενζύμου Q και του κυτοχρώματος C μεταφέρονται στα συμπλέγματα II, III, IV και τελικά στο μοριακό O_2 με παραγωγή H_2O. Στη μεταφορά αυτή των ηλεκτρονίων δημιουργείται ενεργειακή διαφορά δυναμικού κατά μήκος της μιτοχονδριακής μεμβράνης, με αποτέλεσμα διέγερση της ATP συνθάσης και σύνθεση ATP. Για την διατήρηση σταθερού του ρυθμού παραγωγής ATP, οι μη συζευγμένες πρωτεΐνες μετασχηματίζουν σε θερμότητα την πλεονάζουσα διαφορά δυναμικού στην μιτοχονδριακή μεμβράνη.



Σχήμα 9. Σχηματισμός $O_2^{-\cdot}$ Στην αναπνευστική αλυσίδα **(3)**

Στα διαβητικά ενδοθηλιακά κύτταρα υπάρχει μεγαλύτερη ποσότητα γλυκόζης που οξειδώνεται στον κύκλου της γλυκόλυσης, μεγαλύτερη παραγωγή δοτών ηλεκτρονίων, αύξηση της διαφοράς δυναμικού κατά μήκος της μιτοχονδριακής

μεμβράνης. Σε αυτό το σημείο η μεταφορά ηλεκτρονίων στο σύμπλεγμα IV εμποδίζεται, και δημιουργούνται ελεύθερες ρίζες O_2, με την επίδραση του συνενζύμου Q. Η υπεργλυκαιμία κατά αυτόν τον τρόπο συνδέεται με αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών (ROS). Οι ROS προκαλούν βλάβη στο πυρηνικό DNA με αποτέλεσμα δραστηριοποίηση ενός ενζύμου, της πολύ-ADPριβοζυλο-πολυμεράσης. Η δραστηριοποίηση του ενζύμου αυτού έχει ως συνέπεια τη μείωση του NAD^+, προκαλώντας μείωση του ρυθμού της γλυκόλυσης και του σχηματισμού ATP, και ριβοζυλίωση του GAPDH, κρίσιμο ένζυμο της γλυκόλυσης.

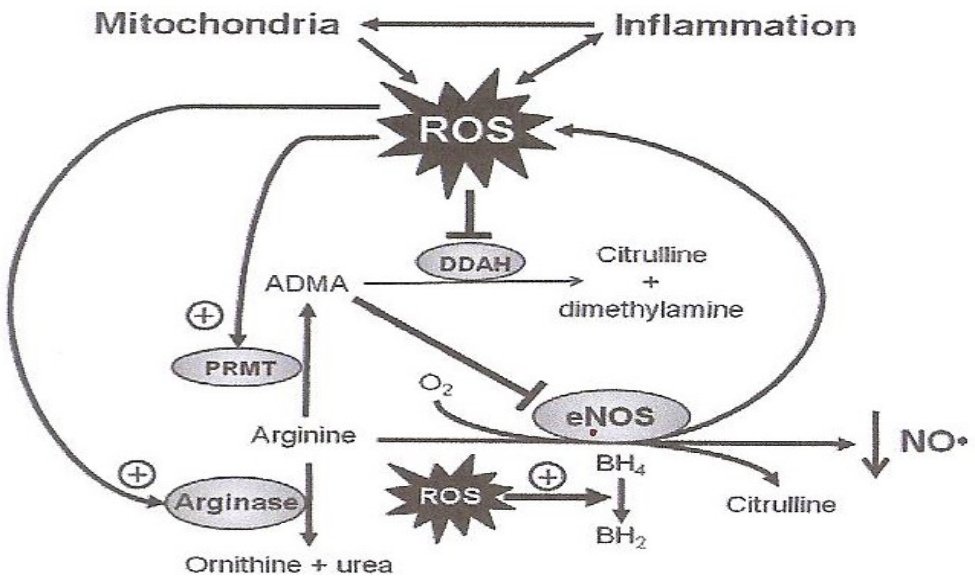
Το GAPDH είναι ένα από τα βασικά μεταβολικά προϊόντα της γλυκόλυσης. Η ριβοζυλίωση του και άρα η αναστολή εξέλιξης του μεταβολισμού του έχει σαν συνέπεια την αύξηση των προηγουμένων από αυτό, μεταβολικών προϊόντων της γλυκόλυσης και εκτροπή του μεταβολισμού της γλυκόζης από τη σειρά της γλυκόλυσης σε άλλες παθοφυσιολογικές οδούς μεταβολισμού της γλυκόζης, όπως ο κύκλος των πολυολών, PKC, AGEs.

Το οξειδωτικό stress έτσι φαίνεται ότι είναι η αφετηρία διέγερσης όλων των παθοφυσιολογικών μηχανισμών με τους οποίους η υπεργλυκαιμία ευνοεί την αθηρωματική διαδικασία. Αυξημένο οξειδωτικό stress, εξάλλου, δείχνει να δημιουργεί και η ενδοκυττάρια οξείδωση αυξημένης ποσότητας ελεύθερων λιπαρών οξέων (FFA). Η ενδομιτοχονδριακή οξείδωση των FFA δημιουργεί τους ίδιους δότες ηλεκτρονίων, δηλαδή NADH και $FADH_2$, με την οξείδωση της υπεργλυκαιμίας και με τον ίδιο μηχανισμό οδηγεί σε αύξηση των ελεύθερων ριζών O_2 (3).

- Ενεργοποίηση της αργινάσης

Η βιοσύνθεση του μονοξείδιο του αζώτου από την ενδοθηλιακή συνθάση του NO εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα της L-αργινίνης. Ωστόσο, η L-αργινίνη μπορεί να καταβολίζεται μεσω της αργινάσης σε ορνιθίνη και ουρία. Υπάρχουν δύο ισομορφές αργινάσης, που έχουν παρόμοιες ενζυματικές δραστηριότητες αλλά διαφέρουν στον υποκυτταρικό εντοπισμό τους, την κατανομή στους ιστούς, στην ρύθμιση της έκφρασης και στην ανοσολογική αντίδραση. Η κυτοσολική αργινάση ή τύπου Ι εκφράζεται έντονα στο ήπαρ, ενώ η μιτοχονδριακή αργινάση τύπου ΙΙ εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα σε εξωηπατικούς ιστούς και στα μακροφάγα και

είναι η κυρίαρχη ισομορφή στα ανθρώπινα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα (HAEC). Η ενδοκυτταρική χρησιμοποίηση αργινίνης σε φυσιολογικά επίπεδα (0,1-1 mM) είναι μεγαλύτερη για την αργινάση από την ενδοθηλιακή συνθάση του NO. Έτσι, οι αυξήσεις στην δραστικότητα της αργινάσης είναι πιθανόν να μειώσει τη διαθεσιμότητα της αργινίνης για παραγωγή NO. Η αργινάση ΙΙ ή η ταυτόχρονη θεραπεία με έναν αναστολέα αργινάσης εμποδίζει την εξαρτώμενη, από την οξειδωμένη LDL, αύξηση στη δραστικότητα της αργινάσης και μειώνει τα επίπεδα των μεταβολιτών του NO λόγω της oxLDL . Συλλογικά, αυτά τα ευρήματα δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες εξασθενίζει την NO-εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή, αυξάνοντας τον καταβολισμό της αργινίνης από την αργινάση, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητα αργινίνης για σύνθεση NO. Σύμφωνα με έρευνα, η έκθεση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε υψηλές ποσότητες γλυκόζης έδειξε αυξημένη δραστηριότητα αργινάσης. Έτσι, η υπεργλυκαιμία φαίνεται να ρυθμίζει τη δραστικότητα της αργινάσης στο οξειδωτικό στρες (6).



Σχήμα 10. Υπεργλυκαιμία, οξειδωτικό στρες και άρση βιοδιαθεσιμότητας NO **(6)**

ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΗ ΔΥΣΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ

Ο σακχαρώδης διαβήτης επηρεάζει την ενδοθήλιο- εξαρτώμενη διαμέσου του NO, αγγειοδιαστολή πολύ πριν την έναρξη δημιουργίας του αθηρώματος(3). Ο κεντρικός ρόλος του αγγειακού ενδοθηλίου στη ρύθμιση της ομοιόστασης του

αγγειακού συστήματος, επηρεάζεται από το ΝΟ, το οποίο αποτελεί βασικό αγγειοδιασταλτικό παράγοντα. Το μονοξείδιο του αζώτου έχει αντιαθηρογόνα δράση και σταθεροποιητικές ιδιότητες της πλάκας, αναστέλλοντας την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μείωση των λευκοκυττάρων και την πρόσφυση των αιμοπεταλίων, και ασκώντας αντιθρομβωτικές και ινωδολυτικές δράσεις. Εκτός από το ΝΟ και άλλα αγγειοδιασταλτικά, η αγγειακή ομοιόσταση ρυθμίζεται επίσης από βασικούς αγγειοσυσταλτικούς παράγοντες που υπάρχουν στο ενδοθήλιο, όπως η ενδοθηλίνη, τα προστανοειδή, και η αγγειοτενσίνη ΙΙ. Οι αγγειοδιαστολείς και οι αγγειοσυστολείς βρίσκονται σε ισορροπία σε φυσιολογικές συνθήκες. (6)

Η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία είναι αποτέλεσμα ανισσοροπίας μεταξύ παραγωγής ΝΟ, διαμέσου της ΝΟ-συνθάσης (NOS) και καταστροφής του ΝΟ, λόγω της παρουσίας ελεύθερων ριζών οξυγόνου. Πολλές από τις μεταβολικές διαταραχές που συνυπάρχουν στον διαβήτη, όπως η υπεργλυκαιμία, τα αυξημένα ελεύθερα λιπαρά οξέα, η ινσουλινοαντίσταση, συμβάλλουν στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία επηρεάζοντας την σύνθεση ή την καταστροφή του ΝΟ. Το οξειδωτικό stress που προκαλέι η υπεργλυκαιμία μπορεί να αυξήσει τα επίπεδα της ασύμμετρης διμεθυλο- αργινίνης (ADMA) που είναι ανταγωνιστής και αναστολέας της NOS, (3) να μειώσει την διαθεσιμότητα της αργινίνης ενεργοποιώντας την δράση της αργινάσης και να οδηγήσει στην οξείδωση των συμπαραγόντων της eNOS. Με αυτούς τους μηχανισμούς μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα του ΝΟ. Σημαντικές πηγές οξειδωτικού στρες κατά τη διάρκεια της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας οδηγούν στην παραγωγή δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS) που προέρχονται από τα μιτοχόνδρια, στην επαγωγή του NFκB, προφλεγμονωδών ενζύμων, κυτταροκινών, και ενδοθηλιακής συνθάσης του ΝΟ (eNOS).

Σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως η παχυσαρκία και ο διαβήτης, που σχετίζονται με μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα των αγγειοδιασταλτικών παραγόντων, ειδικά του ΝΟ και ταυτόχρονα με αυξημένα επίπεδα αγγειοσυσταλτικών παραγόντων, η ομοιοστατική ισορροπία διαταράσσεται και οδηγείται σε αγγειακή δυσλειτουργία και αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά. Το μονοξείδιο του αζώτου προστατεύει από αθηροσκλήρωση, διαμέσου της ρύθμισης της πήξης και της

ινωδόλυσης. Σε περίπτωση αγγειακού τραυματσμού ξεκινά η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, τα οποία επάγουν την δημιουργία ινωδογόνου. Τα γεγονότα αυτά, ρυθμίζονται από αντιαιμοπεταλιακούς και προαιμοπεταλιακούς παράγοντες, και οι σημαντικότεροι αντιαιμοπεταλιακοί παράγοντες που ελευθερώνονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι η προσταγλαδίνη I2 και το NO. Οι παράγοντες αυτοί δρουν συνεργιστικά και αυξάνουν τα επίπεδα της αιμοπεταλιακής κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (AMP), μειώνοντας έτσι την συσσώρευση και τον σχηματισμό θρόμβων. Ο πολλαπλασιασμός των αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων (VSMC) είναι θεμελιώδης για την αναδιαμόρφωση του τοιχώματος του αγγείου, ως απόκριση στον αγγειακό τραυματισμό. Υπό κανονικές συνθήκες, ο πολλαπλασιασμό των VSMC και η μετανάστευση τους, περιορίζονται από την απόπτωση, και έτσι προλαμβάνεται ο υπερβολικός σχηματισμός του νέο έσω χιτώνα και η στένωση του αγγείου. Ωστόσο, ο μηχανισμός αυτός μπορεί να απορυθμιστεί σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας (6).

Η ινσουλίνη φυσιολογικά διεγείρει την παραγωγή NO από τα ενδοθηλιακά κύτταρα αυξάνοντας τη δραστηριότητα της NOS μέσω της PI-3 κινάσης. Σε υγιή άτομα η ινσουλίνη κατά αυτόν τον τρόπο αυξάνει την ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή. Σε άτομα με διαβήτη που η ινσουλινοαντίσταση είναι παρούσα, η ενδοθηλιοεξαρτώμενη αγγειοδιαστολή είναι διαταραγμένη. Το γεγονός αυτό πρέπει να αποδοθεί στην ενδοκυττάρια διαταραχή μετάδοσης του σήματος με αποτέλεσμα περιορισμό της παραγωγής NO. Συγκεκριμένα, η ινσουλινοαντίσταση φαίνεται να συνδέεται με επηρεασμένη ενεργοποίηση της μεταβολικής οδού της PI-3 κινάσης με συνέπεια η ινσουλίνη να είναι λιγότερο ικανή στη δραστηριοποίηση NOS και στην παραγωγή NO. Αντίθετα, η μεταβολική οδός MAP κινάσης παραμένει ανεπηρέαστη από την παρουσία της ινσουλινοαντίστασης, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή της ενδοθηλίνης-1 και την ευόδωση της φλεγμονής και της θρόμβωσης. (3)

ΔΙΑΒΗΤΗΣ, ΘΡΟΜΒΩΣΗ ΚΑΙ ΠΗΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Οι ασθενείς με διαβήτη παρουσιάζουν υπερπηκτικότητα, η οποία χαρακτηρίζεται από διαταραχές στην πήξη, στην ινωδόλυση και στη λειτουργία αιμοπεταλίων.

Οι διαταραχές στην πήξη είναι αποτέλεσμα αυξημένης έκφρασης πολλών παραγόντων πήξης, όπως ο παράγοντας VII, η θρομβίνη, ο παράγοντας Von Willebrand και ο ιστικός παράγοντας, οι οποίοι είναι σε υψηλά επίπεδα στους διαβητικούς ασθενείς, ενώ αντίθετα σε αυτά τα άτομα παρατηρείται μειωμένη δραστηριότητα αντιθρομβίνης ΙΙΙ και διάφορων ενδογενών αντιπηκτικών.

Όσον αφορά στις ινωδολυτικές διαταραχές, τα άτομα με ΣΔ έχουν αυξημένα επίπεδα αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου στον ορό, συνεπώς καταστολή της ινωδόλυσης.

Ο ΣΔ χαρακτηρίζεται και από διαταραγμένη λειτουργία αιμοπεταλίων. Παρατηρείται αυξημένη έκφραση των γλυκοπρωτεϊνών Ια, ΙΙβ, ΙΙΙα στο τοίχωμα των αιμοπεταλίων, με αποτέλεσμα να ευνοείται η αλληλεπίδραση του ινωδογόνου και του παράγοντα Von Willebrand με τα αιμοπετάλια για τη δημιουργία θρόμβου.

Η ενδοκυττάρια άθροιση γλυκόζης που αντανακλά το εξωκυττάριο υπεργλυκαιμικό περιβάλλον, συνοδεύεται με αυξημένη δραστηριότητα της PKC και μειωμένη παραγωγή NO από τα αιμοπετάλια. Η υπεργλυκαίμια διαταράσσει την αιμοπεταλιακή λειτουργία επηρεάζοντας την ομοιοστασία του ασβεστίου, ευνοώντας την αυξημένη συνάθροιση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων, ως απάντηση στην αυξημένη έκκριση διάφορων μεσολαβητών (θρομβίνη, θρομβοξάνη $A_{2,}$ ADP), που συμβαίνει στον ΣΔ (3).

ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΚΑΙ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΠΛΑΚΑ

Όπως είναι γνωστό, οι κυτταροκίνες διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στην έναρξη αλλά και στην εξέλιξη της αθηρωματικής βλάβης. Στον σακχαρώδη διαβήτη η έκκριση των κυτταροκινών είναι μεγαλύτερη, επειδή παθοφυσιολογικές καταστάσεις που ενεργοποιούν τα μακροφάγα είναι αυξημένες σε διαβητικά άτομα. Τέτοιες καταστάσεις είναι η οξείδωση και η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων. Η διεγειρόμενη έκκριση των κυτταροκινών μέσω των AGEs, συνοδεύεται με υπερπαραγωγή αυξητικών παραγόντων, όπως οι PAF, IGF-1, TGF-β, με ανάλογες κυτταρικές επιδράσεις στη κατεύθυνση δημιουργίας αθηρωματικής αλλοίωσης.

Ένα επιπλέον παθογενετικό φαινόμενο στον ΣΔ, είναι η αυξημένη δημιουργία ανοσοσυμπλεγμάτων στην υπενδοθηλιακή στιβάδα, τα οποία περιέχουν τροποποιημένες λιποπρωτεΐνες. Τα ανοσοσυμπλέγαμτα ενοχοποιούνται όχι μόνο για την αυξημένη έκκριση κυτταροκινών, αλλά επίσης και για την αυξημένη έκφραση και έκκριση μετταλοπρωτεϊνασών, ενζύμων που είναι κυρίως υπεύθυνα για τον καταβολισμό του κολλαγόνου της ινώδους κάψας της αθηρωματικής πλάκας.

Σε διαβητικά άτομα, σε σχέση μη διαβητικά, η αθηρωματική πλάκα είναι περισσότερο διηθημένη από μακροφάγα, ενώ παρατηρούνται και περισσότερες νεκρωτικές περιοχές. Στην αθηρωματική πλάκα των διαβητικών ατόμων παρατηρείται αυξημένη περιεκτικότητα σε μακροφάγα, το οποίο είναι συνέπεια της αυξημένης προσκόλλησης των μακροφάγων στο αγγειακό τοίχωμα λόγω των αυξημένων κυτταροκινών. Ακόμα, στα άτομα με διαβήτη, η μικροαγγειακή περιεκτικότητα , η διήθηση από μακροφάγα Τα- λεμφοκύτταρα και η ενδοπλακική αιμορραγία είναι αυξημένες στις αθηρωματικές πλάκες. Αυτές οι δομικές διαφορές εξηγούν τον αυξημένο κίνδυνο ρήξης των διαβητικών αθηρωματικών πλακών (3).

ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να προσδιορίσει τις μεταβολές των ολικών νιτρικών/νιτρωδών ιόντων στο πλάσμα υγειών εθελοντών μετά από διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης που οδηγούν σε διαφορετικά επίπεδα υπεργλυκαιμίας/υπερινσουλιναιμίας. Τα επίπεδα νιτρικών+νιτρωδών ιόντων στο πλάσμα αποτελούν δείκτη της βιοδιαθεσιμότητας του ΝΟ. Απώτερος σκοπός ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσο η οξεία υπεργλυκαιμία μπορεί να επηρεάσει τη βιοδιαθεσιμότητα του ΝΟ και μέσω αυτού τη δραστικότητα των αιμοπεταλίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

ΕΠΙΛΟΓΗ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ

Στα πλαίσια της έρευνας που πραγματεύεται αυτή η πτυχιακή μελέτη, αποφασίστηκε να επιλεχθούν υγιή άτομα ως εθελοντές. Οι εθελοντές ήταν συνολικά 8, άνδρες και γυναίκες με ηλικιακό εύρος 20-40.

Στους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες. Η αιμοληψία για τις γυναίκες πραγματοποιούταν κατά τις πρώτες 7-10 ημέρες του εμμηνορυσιακού τους κύκλου. Κριτήρια επιλογής των εθελοντών ήταν ο φυσιολογικός Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ = 18-25 Kg/m^2), η φυσιολογική αρτηριακή πίεση (Συστολική Αρτηριακή Πίεση ≤130 mmHg και Διαστολική Αρτηριακή Πίεση ≤85mmHg), επίπεδα γλυκόζης νηστείας ≤ 100mg/dl, επίπεδα γλυκόζης 2 ώρες μετά από φόρτιση 75g γλυκόζης <140 mg/dl, επίπεδα ολικής χοληστερόλης ≤200mg/dl, επίπεδα τριακυλογλυκερολών ≤150 mg/dl, περιφέρεια μέσης ≤102cm και απουσία ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, οι εθελοντές δεν ήταν καπνιστές. Για την καταγραφή των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο.

Συμπληρωματικά, πριν την είσοδο των εθελοντών στο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος, ώστε να εξακριβωθεί ότι οι εθελοντές πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια. Οι εθελοντές προτιμήθηκε να είναι είτε μη ενεργά άτομα είτε κατ' ελάχιστο ενεργά άτομα, σύμφωνα με τη κατάταξη του ερωτηματολογίου IPAQ. 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 Χαροκοπείου 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.

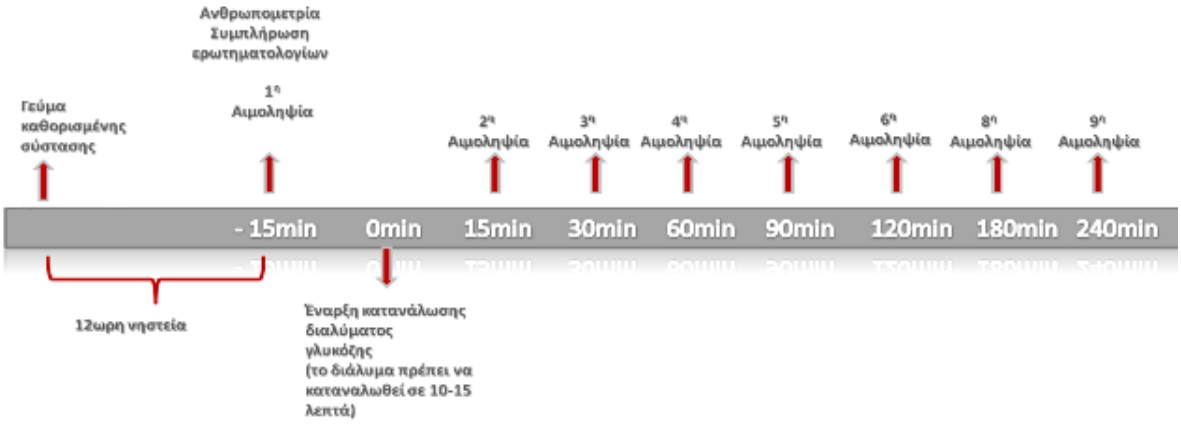
ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΙΑ ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ

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 (το ακριβές διαιτολόγιο είχε συνταχθεί και είχε δοθεί στους εθελοντές από διαιτολόγο). 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, πραγματοποιούταν αιμοληψία με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα. Στη συνέχεια, δινόταν στους εθελοντές να καταναλώσουν το τυχαία επιλεγμένο έτοιμο διάλυμα γλυκόζης, εντός ενός χρονικού διαστήματος 3 λεπτών. 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 ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό με παράλληλη παρουσία ιατρού.



Σχήμα 11. Πρωτόκολλο της μελέτης

ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ

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 σε κιλά (Kg) προς το τετράγωνο του ύψους σε μέτρα (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.

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συνολική Περιγραφή

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.

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 παραλαμβανόταν με φυγοκέντρηση στα 1500g επί 8 λεπτά, στους 15^{o}C. Έπειτα, ο ορός μοιραζόταν σε eppendorfs και φυλασσόταν στους -80^{o}C.

Τα vacutainers πλάσματος με αντιπηκτικό EDTA φυγοκεντρούνταν άμεσα στα 1500g επί 8 λεπτά στους 15^{o}C. Στη συνέχεια, το πλάσμα μοιραζόταν σε eppendorfs και φυλασσόταν στους -80^{o}C.

Απομόνωση ομογενοποιήματος αιμοπεταλίων ανθρώπου για βιοχημικές μετρήσεις

Για την απομόνωση των αιμοπεταλίων, 14 mL αίματος μεταφέρονταν σε σωλήνες που περιείχαν αντιπηκτικό ACD (Acid Citrate Dextrose). Το ολικό αίμα φυγοκεντρούταν στα 173g x 18 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει απομόνωση του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP). Στη συνέχεια 1 mL από το PRP φυγοκεντρούνταν στα 700g x 15 min στους 15^{o}C και το ίζημα των αιμοπεταλίων ξεπλένονταν με 500μL φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια με άλλη μία φυγοκέντρηση στα 700g x 15 min στους 15^{o}C παραλαμβανόταν το ίζημα των πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων, το οποίο αναδιαλυόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 50 mM (pH 7,4) και τα αιμοπετάλια ομογενοποιούνταν με τη βοήθεια

υπερήχων. Στο τέλος, το ομογενοποίημα των αιμοπεταλίων μοιραζόταν σε eppendorfs και φυλασσόταν στους -80^{o}C.

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΝΙΤΡΙΚΩΝ+ΝΙΤΡΩΔΩΝ (NOx) ΣΕ ΠΛΑΣΜΑ

Για τον προσδιορισμό του μονοξειδίου του αζώτου σε πλάσμα αίματος μετρήθηκαν τα νιτρώδη και νιτρικά τα οποία είναι μεταβολίτες του NO, εφόσον το NO είναι αέριο και δεν μπορεί να μετρηθεί άμεσα.

Διαλύματα

Πρότυπο διάλυμα νιτρικού νατρίου συγκέντρωσης 200μM: Ζύγιση 0,017 g νιτρικού νατρίουκαι αραίωση σε 1 λίτρο απεσταγμένο νερό.

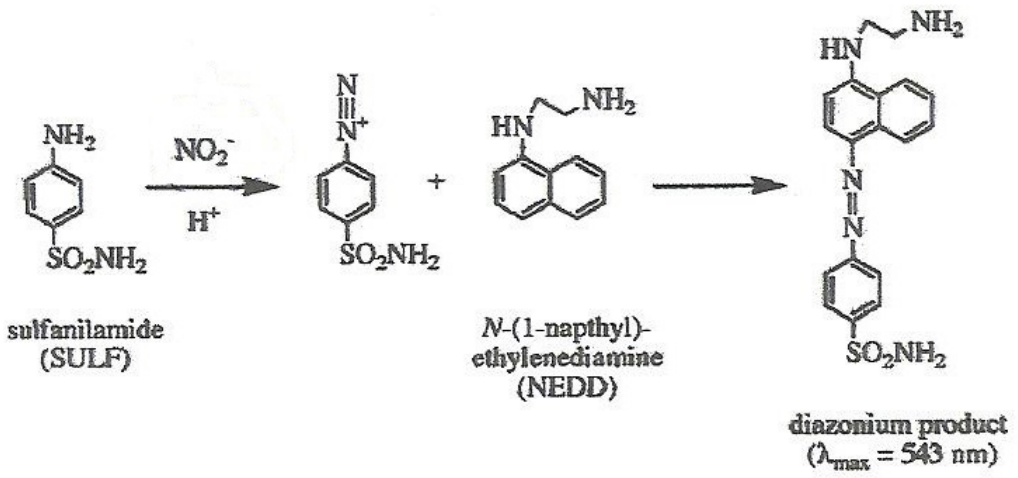
Διάλυμα χλωριούχου βαναδίου: Διαλύθηκαν 80 mg βανάδιο σε 10 mL HCl συγκέντρωσης 1M.

Διάλυμα σουλφονιλαμιδίου (SULF) 2%: Για την παρασκευή διαλύματος SULF συγκέντρωσης 2%, λαμβάνουμε 2 g sulfanililamide, τα οποία ζυγίζουμε στον ζυγό και τα διαλύουμε σε 100 mL HCl 5%.

Διάλυμα N-(1-ναφθολο)αιθλενοδιαμίνη (NEDD) 0,1%: Για την παρασκευή διαλύματος NEDD συγκέντρωσης 0,1%, λαμβάνουμε 0,1 g N-(1-Naphthyl)ethylenediamine, τα οποία ζυγίζουμε στον ζυγό και τα διαλύουμε σε 100 mL H_2O.

Αρχή της μεθόδου

Στο πλάσμα του αίματος υπάρχουν δύο μεταβολίτες του μονοξειδίου του αζώτου, τα νιτρώδη και τα νιτρικά ιόντα, το σύνολο των οποίων δείχνει τελικά πόσο μονοξείδιο του αζώτου υπάρχει στο πλάσμα. Η συγκεκριμένη μέθοδος προσδιορίζει τα νιτρώδη ιόντα, που υπάρχουν στο πλάσμα, μετατρέποντας τα σε ένα διαζωνιακό παράγωγο μετά από την προσθήκη των SULF και NEDD. Το παράγωγο αυτό δίνει χρώμα και έτσι μπορεί να φωτομετρηθεί στα 540 nm.



Για τον προσδιορισμό του συνόλου νιτρωδών και νιτρικών πριν την δοκιμασία γίνεται αναγωγή των νιτρικών, από χλωριούχο βανάδιο, σε νιτρώδη. Κατά αυτόν τον τρόπο, μετρούνται τελικά, τα νιτρώδη που υπήρχαν εξ αρχής στο πλάσμα και τα νιτρώδη που παράχθηκαν μετά την αντίδραση του χλωριούχου βαναδίου με τα υπάρχοντα νιτρικά ιόντα στο πλάσμα. Σύμφωνα με αυτό το πρωτόκολλο θα μπορούσαμε να μετρήσουμε νιτρώδη και νιτρικά ξεχωριστά, αλλά και το άθροισμα των δύο, αλλά τελικά μετρήσαμε μόνο το άθροισμα. Αυτό έγινε γιατί, για να μπορέσουν να προσδιοριστούν μόνο τα νιτρώδη που υπήρχαν στο πλάσμα από την αρχή και χωρίς την αντίδραση του χλωριούχου βαναδίου, απαιτούνταν μεγάλη ποσότητα βιολογικού δείγματος, συγκεκριμένα πλάσματος, το οποίο δεν ήταν διαθέσιμο.

Πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό των νιτρωδών σε πλάσμα αίματος

Αποπρωτεΐνωση

Για τον προσδιορισμό των νιτρωδών και συνεπώς του NO, σε πλάσμα αίματος έπρεπε πρώτα να γίνει αποπρωτεΐνωση του πλάσματος, εφόσον οι πρωτεΐνες διαθέτουν αμινομάδες και κατά αυτόν τον τρόπο θα προέκυπτε θετικό σφάλμα στον προσδιορισμό.

Η αναλυτική πορεία της διαδικασίας της αποπρωτεΐνωσης είναι η εξής:

- Λαμβάνονται 200μL από το κάθε δείγμα πλάσματος με πιπέτα και τοποθετούνται σε νέα επισημασμένα eppendorfs.

- Στη συνέχεια, σε κάθε ένα από τα επισημασμένα eppendorfs , δηλαδή σε κάθε ένα από το δείγμα πλάσματος προστίθεται ίση ποσότητα ακετονιτριλίου δηλαδή 200 μL.
- Γίνεται καλή ανάδευση με vortex.
- Ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά στους 4^{o} C.
- Τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10 λεπτά, στα 20000g και στους 4^{o} C.
- Μετά την φυγοκέντρηση λαμβάνεται το υπερκείμενο το οποίο είναι 300μL με πιπέτα και τοποθετείται σε νέα επισημασμένα eppendorfs.
- Στο κάθε νέο eppendorf το οποία περιέχει το υπερκείμενο της πρώτης φυγοκέντρησης προστίθενται 600μL $CHCl_3$.
- Στη συνέχεια ακολουθεί δεύτερη φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στα 20000g και στους 4^{o} C.
- Μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης λαμβάνονται 70 μL από το νέο υπερκείμενο.

<u>Προσδιορισμός νιτρωδών στο απόπρωτεΐνομένο πλάσμα</u>

Σε ένα πλακίδιο (plate) στα πηγάδια των δύο πρώτων στηλών τοποθετούνται με πιπέτα 100 μL από τα πρότυπα διαλύματα των νιτρικών για συγκεντρώσεις 100, 50, 25, 12.5, 6.25 και 3.12 μM. Προφανώς η πρώτη σειρά των δύο πρώτων στηλών περιέχει τυφλό, δηλαδή 100 μL νερό. Στις επόμενες στήλες στα πηγάδια τοποθετούνται 30 μL από το υπερκείμενο της δεύτερης φυγοκέντρησης της διαδικασίας της αποπρωτεΐνωσης για κάθε δείγμα (σύνολο 24) με πιπέτα. Στα 30 μL των υπερκείμενων των δειγμάτων προστίθενται 70 μL H_2O με πολυπιπέτα. Εφόσον έχουν τοποθετηθεί στα πηγάδια του πλακιδίου όλα τα πρότυπα διαλύματα, το νερό για το τυφλό και τα υπερκείμενα των δειγμάτων μαζί με το νερό, προστίθενται με πολυπιπέτα 100 μL χλωριούχου βαναδίου και τέλος 100 μL GR. Το GR έχει παρασκευαστεί με ανάμιξη SULF συγκέντρωσης 2% και NEDD συγκέντρωσης 0,1% με αναλογία 1:1. Μετά από επώαση του plate για μισή ώρα στους 37^{o} C, το plate τοποθετείται στο φασματοφωτομέτρο μικροπλακιδίων ELISA, για φωτομέτρηση των πρότυπων και των δειγμάτων στα 540nm. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την καταγραφή των μετρήσεων.

ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

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 ± SD (standard deviation, τυπική απόκλιση) στα διαγράμματα και ως διάμεσος (25ο-75ο εκατοστημόριο). Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Spearman. Η αναζήτηση σημαντικών μεταβολών στο χρόνων για κάθε φόρτιση γλυκόζης 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. Σύγκριση των ποσοστιαίων μεταβολών του μεταβλητών στον ίδιο χρόνο αλλά για τις διαφορετικές φορτίσεις έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis. Το iAUC υπολογίσθηκε από το εμβαδόν που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης μεταβολής μίας μετρούμενης παραμέτρου και της νοητής ευθείας παράλληλης στον άξονα χ, η οποία ξεκινά από την τιμή της παραμέτρου σε χρόνο 0. Οι συσχετίσεις των iAUC, μεταξύ των 24 διαφορετικών παρεμβάσεων, έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis. 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).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πειραματικό κομμάτι αυτής της πτυχιακής εργασίας επικεντρώθηκε γύρω από τη διαλεύκανση του ερωτήματος: εάν η μεταγευματική υπεργλυκαιμία μπορεί να επηρεάσει την δράση του ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων υγιών ατόμων και συγκεκριμένα την βιοδιαθεσιμότητα του ΝΟ, που αποτελεί αντιαιμοπεταλιακό - αντιθρομβωτικό παράγοντα. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ένα πειραματικό πρωτόκολλο φόρτισης γλυκόζης υγιών εθελοντών, με σκοπό την επαγωγή καταστάσεων υπεργλυκαιμίας, οι οποίες είναι γνωστό βιβλιογραφικά πως επηρεάζουν την βιοδιαθεσιμότητα του ΝΟ. Επειδή το ΝΟ είναι αέριο και δεν μπορεί να μετρηθεί, μετρήθηκαν τα νιτρικά και νιτρώδη ιόντα, τα οποία αποτελούν μεταβολίτες του ΝΟ. Το ΝΟ επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες, το οποίο αποτελεί βασικό παράγοντα ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού και της αιμόστασης. Συνεπώς, μέσω της μέτρησης της βιοδιαθεσιμότητας του ΝΟ μπορεί να γίνει συσχέτιση της μεταβολής των επιπέδων του ΝΟ με την δράση των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων των εθελοντών, με τελικό στόχο την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης που μπορεί να έχει στα κύτταρα αυτά, η συγκεκριμένη μεταγευματική υπεργλυκαιμία. Στο κεφάλαιο αυτό παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την πειραματική διαδικασία και μετά την στατιστική ανάλυση τους.

ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Οι εθελοντές της μελέτης

Συνολικά, συγκεντρώθηκαν 8 εθελοντές, των οποίων τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά παρατίθενται στον πίνακα 1.

Η σύγκριση των προ-φόρτισης χαρακτηριστικών αυτών αναμέσα στις 3 παρεμβάσεις φαίνεται στον Πίνακα 1. Απ'όλα τα χαρακτηριστικά στατιστική

σημαντική διαφορά μεταξύ των παρεμβάσεων εμφανίζουν το BMI η ΔΑΠ και το ουρικό οξύ ωστόσο, οι διαφοροποιήσεις αυτές είναι κλινικά ασήμαντες.

Πίνακας 1: Βασικά ανθρωπομετρικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών.

Παράμετρος	75 γρ (N=8)	100 γρ (N=8)	150 γρ (N=8)	P value
Ηλικία	27,5 (24,0 - 31,5)	27,5 (24,0 – 31,5)	27,5 (24,0 – 31,5)	NS
΄Υψος (m)	1,75 (1,69 – 1,8)	1,75 (1,69 – 1,8)	1,75 (1,69 – 1,8)	NS
Βάρος (Kg)	67,0 (59,1 – 78,3)	65,0 (58,6 – 76,7)	66,0 (59,6 – 75,8)	NS
ΔΜΣ (Kg/m2)	22,5 (20,9-24,9)	22,3 (22,3-24,3)	22,7 (20,6-23,9)	**0,001**
ΔΑΠ (mmHg)	76,0 (68,0 – 80,0)	66,0 (61,5 – 75,7)	69,0 (63,8 – 73,2)	**0,016**
ΣΑΠ (mmHg)	126,0 (113,0 – 128,0)	120,5 (114,0 – 124,7)	120,5 (107,2 – 134,5)	NS
WBC (cells 103/μL)	4,4 (3,8 – 5,4)	4,9 (4,0 – 6,2)	4,2 (4,0 – 5,2)	NS
HCT	38,9 (37,8 – 41,7)	38,4 (36,4 – 43,0)	37,0 (35,7 – 40,2)	NS
PLT (cells 103/μL)	204,5 (188,7 – 241,7)	203,0 (176,0 – 211,0)	194,0 (167,0 – 220,0)	NS
GLU (mg/dL)	83,6 (80,5 – 87,5)	81,4 (77,6 – 87,5)	81,0 (76,4 – 88,0)	NS
INS (mU/L)	8,0 (5,2 – 10,4)	7,2 (5,9 – 8,8)	5,5 (2,8 – 9,2)	NS
HOMA_IR (mg/dL x mU/L)	1,6 (1,1 – 2,2)	1,4 (1,25 – 1,9)	1,1 (0,6 – 1,8)	NS
URIC (mg/dL)	4,5 (2,9 – 5,0)	4,1 (3,0 – 5,3)	3,7 (2,8 – 4,7)	**0,016**

2. Σχετίζονται τα επίπεδα των NO_X σε t=0 κάθε παρέμβασης με τα σωματομετρικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών;

Στα πλαίσια αύξησης της χρηστικότητας και της λειτουργικότητας των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν στατιστικές συσχετίσεις, κατά τις οποίες μελετήθηκε ο βαθμός συσχέτισης των επιπέδων NO_X για την χρονική στιγμή 0 κάθε παρέμβασης με όλους τους υπόλοιπους βιολογικούς δείκτες και ανθρωπομετρικές μετρήσεις που έγιναν.

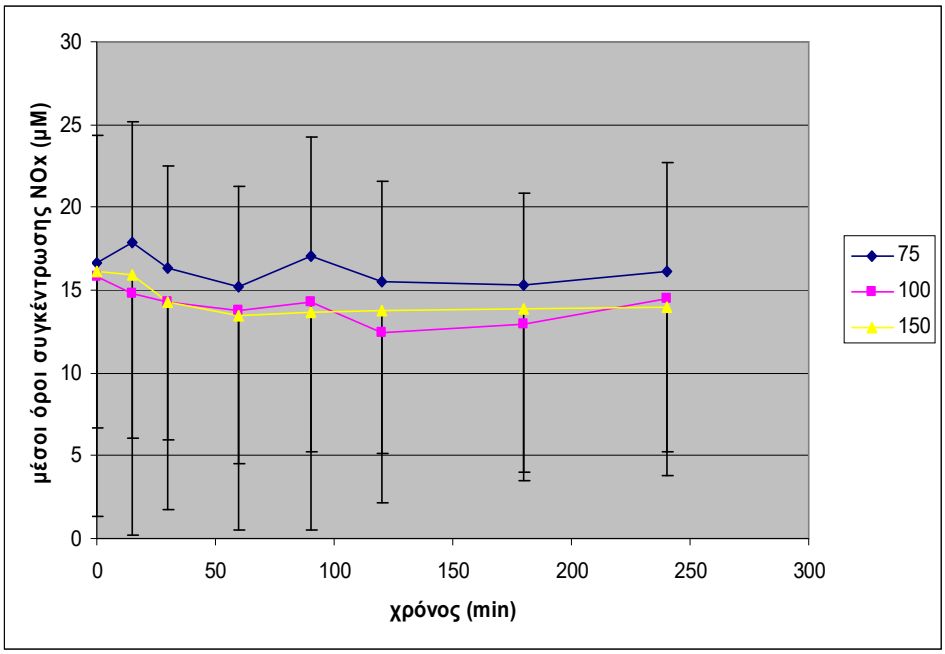
Από όλες αυτές, οι μόνες που αποδείχθηκαν στατιστικές σημαντικές είναι εκείνες που παρατίθενται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2: Στατιστικά Σημαντικές Συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων NO_x και βασικών ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων.

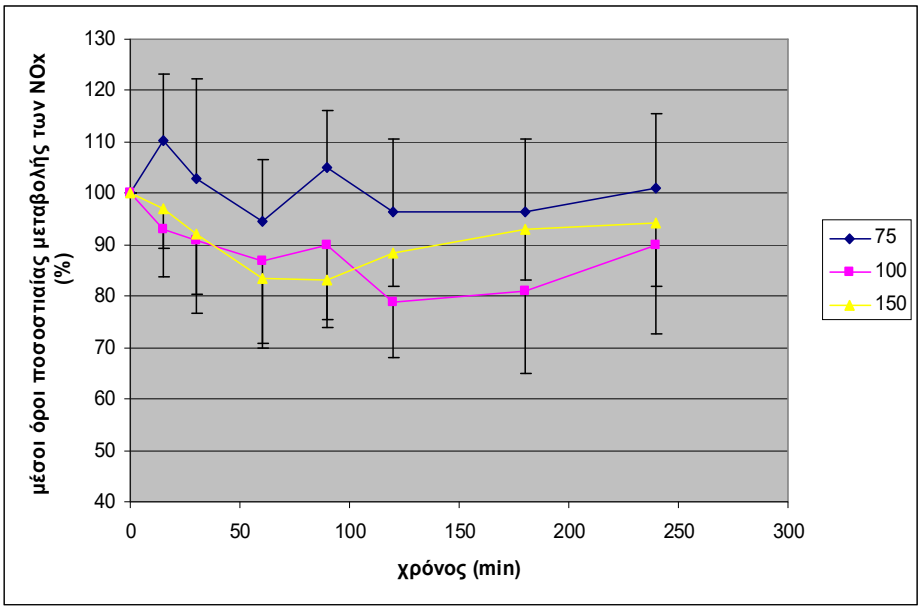
Μεταβλητή	Συντελεστής συσχέτισης r του Spearman	Επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας (p)
ADP_EC50	**0,425**	**0,039**
ADP_25	**-0,382**	**0,065**
HGB	**0,436**	**0,042**
MPV	**-0,560**	**0,007**
INS	**-0,383**	**0,064**
GLU_INS	**0,625**	**0,013**
GPX1_PLT	**-0,699**	**0,004**

3. Επίδραση των διαφορετικών επιπέδων φόρτισης γλυκόζης στις μεταβολές των επιπέδων NO_x μετά την φόρτιση.

Τα διαγράμματα των μεταβολών των επιπέδων των NO_x , μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.



Σχήμα 11: Διαγράμματα Μεταβολής Απολύτων Τιμών των επιπέδων NO_X όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση.



Σχήμα 12 : Διαγράμματα Ποσοστιαίας Μεταβολής των επιπέδων NO_X όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση.

Η μη παραμετρική ανάλυση Friedman έδειξε ότι δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων NO_X στο χρόνο, για την φόρτιση γλυκόζης των 100γρ, συγκεκριμένα με p = 0,056. Αντίθετα, για τις φορτίσεις γλυκόζης των 75 και

150 γρ η ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων $NO_χ$ συγκεκριμένα με p = 0,038 και p = 0,001, αντίστοιχα .

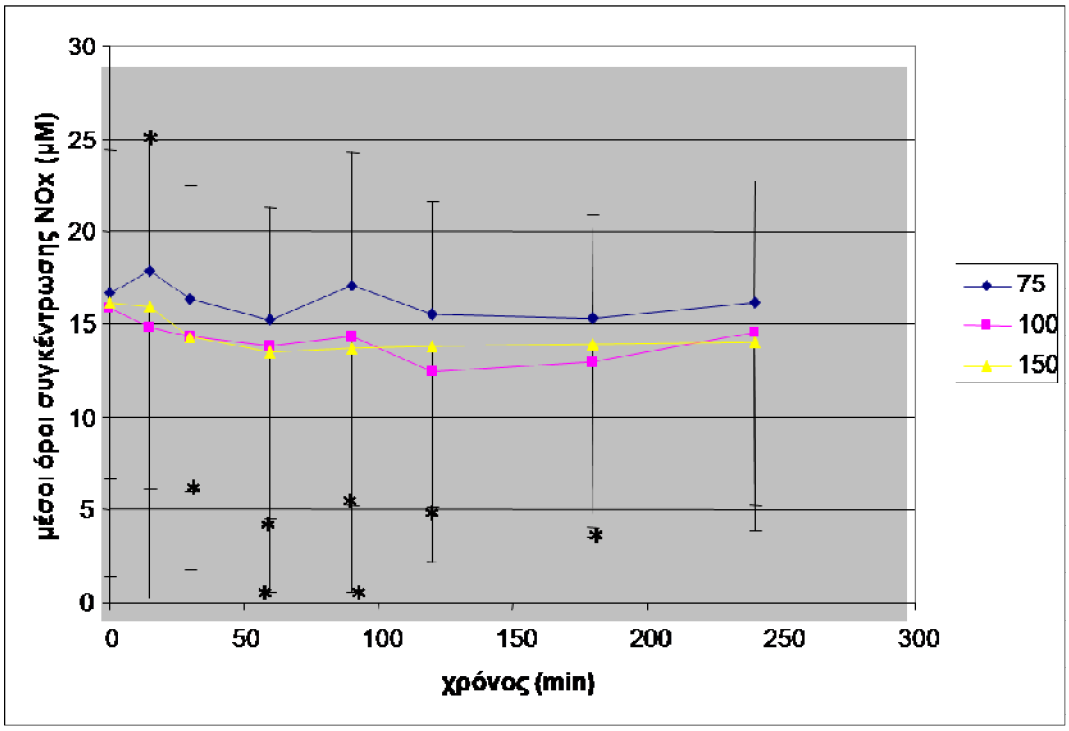
4. Σύγκριση των τιμών των $NO_χ$ στις διάφορες χρονικές στιγμές σε σχέση με την χρονική στιγμή 0, για κάθε παρέμβαση ξεχωριστά.

Η μη παραμετρική ανάλυση Wilcoxon έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των τιμών $NO_χ$ για συγκεκριμένες χρονικές στιγμές σε σχέση με την χρονική στιγμή 0 σε κάθε παρέμβαση. Οι χρονικές στιγμές που υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των τιμών των $NO_χ$ σε σχέση με την χρονική στιγμή 0, ανά παρέμβαση φαίνονται στον πίνακα 3.

Πίνακας 3: Στατιστικά Σημαντικές μεταβολές των επιπέδων $NO_χ$ για συγκεκριμένες χρονικές στιγμές σε σχέση με την χρονική στιγμή 0 σε κάθε παρέμβαση.

Παρέμβαση	Χρονική στιγμή (min)	P value
75 gr	**15**	**0,036**
100 gr	**30**	**0,043**
100 gr	**60**	**0,05**
100 gr	**120**	**0,018**
100 gr	**180**	**0,017**
150 gr	**60**	**0,017**
150 gr	**90**	**0,012**
150 gr	**120**	**0,012**
150 gr	**180**	**0,046**

Στο διάγραμμα του σχήματος 3, φαίνεται η μεταβολή των απολύτων τιμών των επιπέδων $NO_χ$, ενώ οι χρονικές στιγμές στις οποίες υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των τιμών των $NO_χ$ σε σχέση με την χρονική στιγμή 0, είναι επισημασμένες με μαυρισμένο τετραγωνάκι.



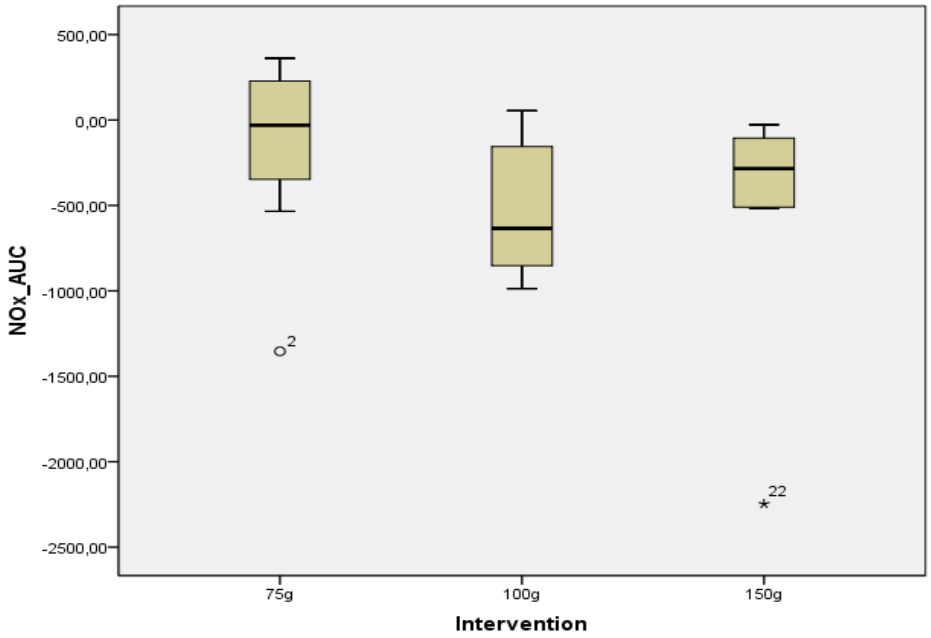
Σχήμα 3 : Διαγράμματα Μεταβολής Απολύτων Τιμών των επιπέδων NO_X όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση με επισημασμένες τις χρονικές στιγμές που υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των τιμών των NO_X σε σχέση με την χρονική στιγμή 0.

5. Σύγκριση των απόλυτων τιμών NO_X των διαφορετικών παρεμβάσεων μεταξύ τους, σε κάθε χρονική στιγμή.

Έγινε μη παραμετρική ανάλυση Friedman για να δειχθεί εάν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά των τιμών των NO_X για κάθε χρονική στιγμή μεταξύ και των τριών παρεμβάσεων, δηλαδή για τις τρεις φορτίσεις γλυκόζης των 75, 100 και 150 γρ. Σύμφωνα, με την ανάλυση φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών NO_X για τις τρεις παρεμβάσεις μόνο στις χρονικές στιγμές 60 min και 90 min, με p= 0,044 και στις δύο. Για τις υπόλοιπες χρονικές στιγμές η σύγκριση των 3 παρεμβάσεων μεταξύ τους έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στις τιμές NO_X.

6. Σύγκριση των AUC των $NO_χ$ του ίδιο ατόμου στις 3 διαφορετικές παρεμβάσεις.

Έγινε μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman όπου συγκρίθηκαν τα AUC των $NO_χ$ των τριών διαφορετικών παρεμβάσεων (75, 100, 150g) για το ίδιο άτομο. Σύμφωνα με την ανάλυση υπάρχει μια τάση διαφοροποίησης στον χρόνο μεταξύ των τριών παρεμβάσεων των AUC των $NO_χ$, εφόσον προέκυψε p=0,093.



Σχήμα 4 : Σύγκριση των iAUC των $NO_χ$ μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης.

Στη συνέχεια, έγινε μη παραμετρική ανάλυση Willcoxon, όπου συγκρίθηκαν τα AUC των $NO_χ$ ανά δύο παρεμβάσεις, δηλαδή μεταξύ παρεμβάσεων 75-100g, 75-150g και 100-150g. Για την σύγκριση μεταξύ των 75-100g προέκυψε p=0,069, για 75-150g p=0,017 και για 100-150g p=0,575. Αυτό δείχνει ότι υπάρχει μια τάση διαφοροποίησης των $NO_χ$ μεταξύ των 75-100g, μια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των $NO_χ$ μεταξύ των 75-150g, ενώ μεταξύ των 100-150g δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των $NO_χ$. Τελικά αποδεικνύεται ότι, κατά την παρέμβαση φόρτισης γλυκόζης 150g τα $NO_χ$ πέφτουν πιο πολύ σε σχέση με την παρέμβαση φόρτισης γλυκόζης 75g.

7. Επίδραση βασικών χαρακτηριστικών των εθελοντών στην χρονική στιγμή

0, στις μεταβολές των NO_X μετά τις φορτίσεις.

Έγινε μη παραμετρική ανάλυση Spearman κατά την οποία συσχετίστηκαν κάποια βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών με τα AUC των NO_X και για τις 3 παρεμβάσεις μαζί, αλλά και ανά παρέμβαση ξεχωριστά. Δηλαδή, με την ανάλυση αυτή φαίνεται κατά πόσο αυτά τα χαρακτηριστικά στην χρονική στιγμή 0, επηρεάζουν τις μεταβολές των NO_X μετά τις φορτίσεις. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα βασικά χαρακτηριστικά που επηρεάζουν στατιστικά σημαντικά ή έστω οριακά τα AUC των NO_X.

Πίνακας 5: Βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών την χρονική στιγμή 0, που σχετίζονται με το iAUC των NO_X.

Μεταβλητή	**AUC_{NOx_total} N=24***		**AUC_{NOx_75} N=8***		**AUC_{NOx_100} N=8***		**AUC_{NOx_150} N=8***	
	r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
ADP_EC50_0	-0,583	0,003	-	-	-0,881	0,004	-0,857	0,007
ADP_2.5_0	0,417	0,043	-	-	-	-	0,714	0,047
ADP_25_0	0,534	0,007	-	-	0,913	0,002	0,854	0,007
TRAP_EC50_0	-	-	-	-	-	--	-0,833	0,010
TRAP_2_0	0,368	0,077	-	-	-	-	0,791	0,019
RDWSD_0	0,510	0,026	0,782	0,038	-	-	0,794	0,059
MPV_0	0,499	0,018	0,647	0,083	0,883	0,008	-	-
HGB_0	-	-	-	-	-	-	-0,721	0,068
HCT_0	-	-	-	-	-	-	-0,750	0,052
RBC_0	-	-	-	-	-	-	-0,714	0,071
PDW_0	-	-	-	-	0,857	0,014	-	-
URIC_0	-	-	-	-	-0,683	0,062	-	-
PLT_0	-	-	-0,905	0,002	-	-	-	-
PCT_0	-	-	-0,810	0,015	-	-	-	-
PRCARB_0	0,496	0,022	-	-	0,821	0,023	0,786	0,036
GPX1_LEUK_0	-0,661	0,007	-	-	-	-	-	-
GPX1_PLT_0	0,586	0,022	-	-	-	-	-	-
NO_X_0	-0,647	0,001	-0,667	-0,071	-	-	-0,833	0,010
Cu_Zn_SOD_0	-	-	-0,714	0,071	-	-	-	-

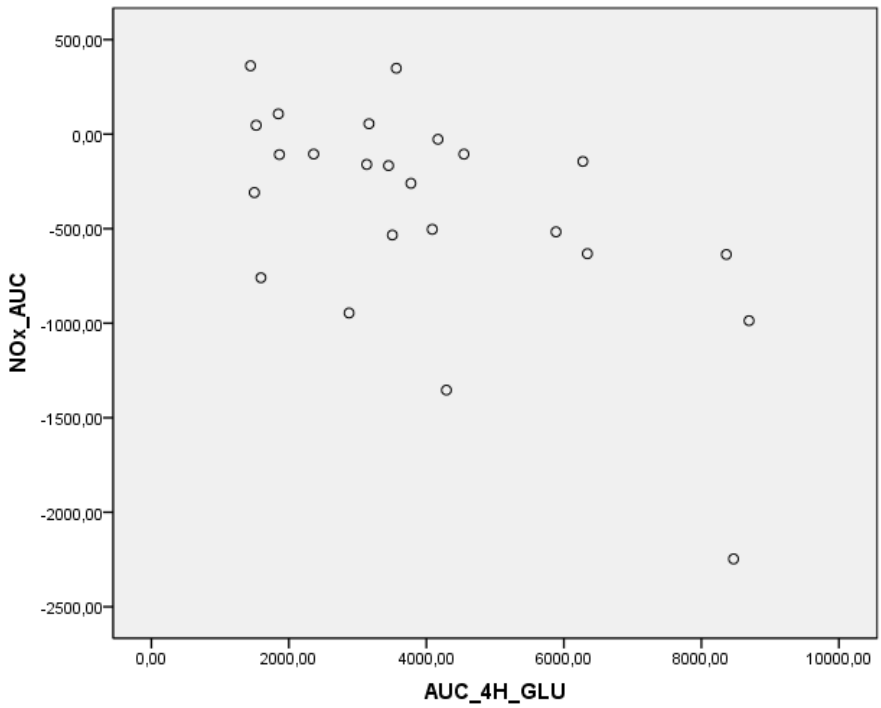
8. Συσχέτιση των μεταβολών των $NO_χ$ με τις μεταβολές άλλων δεικτών.

Έγινε μη παραμετρική ανάλυση Spearman κατά την οποία συσχετίστηκαν οι μεταβολές κάποιων δεικτών με τις μεταβολές των $NO_χ$ μεταξύ και των 3 παρεμβάσεων αλλά και ανά παρέμβαση ξεχωριστά. Συγκεκριμένα, συσχετίστηκαν τα AUC των $NO_χ$ με τα AUC κάποιων δεικτών. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται μόνο οι μεταβολές των δεικτών που προκαλούν στατιστικά σημαντική ή έστω οριακά, μεταβολή στα επίπεδα των $NO_χ$.

Πίνακας 6:

Μεταβλητή	**AUC_{NOx_total} N=24**		**AUC_{NOx_75} N=8**		**AUC_{NOx_100} N=8**		**AUC_{NOx_150} N=8**	
	r	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**	**r**	**p**
AUC_4H_GLU	-0,503	0,012	-	-	-	-	-	-
AUC_4H_INS	-0,348	0,096	-	-	-0,762	0,028	-	-

Σύμφωνα με την συσχέτιση των AUC των $NO_χ$ και των 3 φορτίσεων με το AUC της γλυκόζης, προκύπτει ότι όσο πιο μεγάλη είναι η υπεργλυκαιμία τόσο πιο πολύ πέφτουν τα επίπεδα των $NO_χ$ (r=-0,503 με p=0,012). Αυτή η σχέση φαίνεται και στο σχήμα 5.



Σχήμα 5 : Διάγραμμα μεταβολής των επιπέδων των $NO_χ$ σε σχέση με την φόρτιση γλυκόζης.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ο σκοπός αυτής της πειραματικής έρευνας – μελέτης είναι να ερευνηθεί η επίδραση που έχει, έμμεσα, η μεταγευματική υπεργλυκαιμία στη δράση του ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων επιδρώντας σε αντιαιμοπεταλιακούς παράγοντες που εκκρίνουν. Συγκεκριμένα, πώς επιδρά η μεταγευματική υπεργλυκαιμία στα επίπεδα και την βιοδιαθεσιμότητα του μονοξειδίου του αζώτου, το οποίο αποτελεί αντιαιμοπεταλιακό – αντιθρομβωτικό παράγοντα και πώς αυτό οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες, με συνέπεια αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα.

Σύμφωνα με την βιβλιογραφία , είναι γνωστό ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία μπορεί να ενεργοποιήσει τους μηχανισμούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, σε άτομα που πάσχουν από διαβήτη (τύπου I ή II). Έχει φανεί ακόμα, ότι η αυξημένη γλυκόζη αίματος μπορεί να οδηγήσει σε μείωση του NO, πράγμα το οποίο αυξάνει το οξειδωτικό στρες σύμφωνα με φυσιολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς.

Οι έρευνες που έχουν γίνει και τα πειραματικά δεδομένα που έχουν υπάρξει, για το κατά πόσο τελικά η μεταυγευματική υπεργλυκαιμία μείωνει το NO, είναι λίγα και ταυτόχρονα όχι ξεκάθαρα λόγω του ότι επιδρούν πολλοί παράγοντες, πολύπλοκοι και περίπλοκοι μηχανισμοί στον ανθρώπινο οργανισμό. Ειδικά, για υγιή άτομα και όχι για πάσχοντες με διαβήτη, οι έρευνες είναι πολύ περιορισμένες και τα συμπεράσματα δεν είναι ξεκάθαρα και ασφαλή.

Το ερευνητικό έλλειμμα που παρουσιάζεται στο συγκεκριμένο τομέα, αποσκοπεί να καλυφθεί εν μέρει και κατά το δυνατό από την έρευνα, η οποία περιγράφεται στα πλαίσια αυτής της πτυχιακής μελέτης.

Η μελέτη αυτή εστιάστηκε συγκεκριμένα στη μέτρηση, συνολικά, των νιτρικών και νιτρωδών σε πλάσμα αίματος 8 υγιών εθελοντών (το πρωτόκολλο και τα κύρια χαρακτηριστικά των εθελοντών παρουσιάζονται σε προηγούμενο κεφάλαιο) μετά από φόρτιση γλυκόζης 3 διαφορετικών συγκεντρώσεων. Μέσω

των νιτρικών και νιτρωδών, ουσιαστικά, προσδιορίστηκε το νιτρικό οξείδιο του πλάσματος, εφόσον το τελευταίο είναι αέριο και δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί, ενώ ταυτόχρονα ισχύει ότι τα νιτρικά και νιτρώδη είναι μεταβολίτες του NO.

ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕ ΤΟΥΣ ΟΠΟΙΟΥΣ ΜΕΤΑΒΑΛΛΕΤΑΙ ΤΟ NO ΚΑΙ ΕΠΑΓΕΤΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ

Είναι αποδεδειγμένο ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν και εκκρίνουν νιτρικό οξείδιο (NO), το οποίο είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της ακεραιότητας και της ομοιόστασης του ενδοθηλίου. Το NO συντίθεται από L-αργινίνη με τη δράση της ενδοθηλιακής συνθάσης νιτρικού οξειδίου (eNOS) και την παρουσία οξυγόνου, NADP(H) και τον συμπαράγοντα της eNOS, τετραϋδροβιοπτερίνη (BH4). Το NO που συντίθεται διαχέεται γρήγορα στα λεία μυϊκά κύτταρα και στα αιμοπετάλια, όπου και ενεργοποιεί την γουανυλική κυκλάση (GCA), με επακόλουθη παραγωγή του κυκλικού GMP (cGMP). Η παρουσία του cGMP, με τη σειρά του, προωθεί την αγγειακή χαλάρωση και την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, διατηρώντας την ισορροπία μεταξύ προ και αντι-θρομβωτικών παραγόντων στο αίμα και στο αρτηριακό τοίχωμα. Ωστόσο, καθώς ο χρόνος ημίσειας ζωής του NO είναι πολύ σύντομος, γρήγορα οξειδώνεται σε νιτρικά, συνεπώς η συνεχής ενεργοποίηση της eNOS, γίνεται ο καθοριστικός παράγοντας της σύνθεσης και της βιοδιαθεσιμότητας NO στους ιστούς.

Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει σε διαβητικούς, έχει φανεί ότι η υπεργλυκαιμία επάγει την περίσσεια ηλεκτρονίων, τα οποία διαρρέουν από την οξειδωτική αλυσίδα και δεσμεύονται από το οξυγόνο, δημιουργώντας έτσι περίσσεια υπεροξειδίου και συνεπώς οξειδωτικό στρες. Η υπερβολική παραγωγή υπεροξειδίου επηρεάζει την eNOS, και οδηγεί σε μειωμένη παραγωγή NO.

Η υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει υπερβολική παραγωγή υπεροξειδίου στην μιτοχονδριακή οξειδωτική αλυσίδα των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η περίσσεια του υπεροξειδίου αντιδρά γρήγορα με το NO, μειώνοντας την δραστικότητα του NO και παράγοντας υπεροξυνιτρώδη ρίζα (ONOO-). Η υπεροξυνιτρώδη ρίζα αποτελεί έναν ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα και έναν ενεργοποιητή της υπεροξείδωσης των λιπιδίων, που μπορεί να επηρεάσει την ενδοθηλιακή λειτουργία με διέγερση του μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος. Η

υπερπαραγωγή του υπεροξειδίου και του NO ευνοεί τον σχηματισμό του νιτρικού υπεροξειδίου (ONOO-) παρεμβαίνοντας στην παραγωγή της τετραϋδροβιοπτερίνης (BH4), που όπως είπαμε αποτελεί συμπαράγοντα της eNOS. (7)

Η παρουσία της υπεργλυκαιμίας, λόγω της αυτοοξείδωσης της γλυκόζης, συμβάλλει στο σχηματισμό του υπεροξειδικού ανιόντος, το οποίο αλληλεπιδρά με το NO. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στο σχηματισμό του νιτρικού υπεροξειδίου (ONOO-) το οποίο με τη σειρά του συμβάλει στην μείωση της περιεκτικότητας σε NO. Ακόμα, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα αιμοπετάλια εκφράζουν λειτουργική NOS, εξαρτώμενη από Ca^{2+}- καλμοδουλίνη. Η γλυκοζυλίωση της καλμοδουλίνης μπορεί να προκαλέσει μείωση της βασικής έκκρισης NO. Επιπλέον, οι ανωμαλίες του μεταβολισμού μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση της NOS στα μεγακαρυοκύτταρα και να μειώσουν την δράση του ενζύμου στα αιμοπετάλια . Οι πειραματικές και κλινικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η παρατεταμένη υπεργλυκαιμία συμβάλλει στην ενεργοποίηση της οδού της πολυόλης του μεταβολισμού της γλυκόζης, που έχει ως συνέπεια την εξάντληση του NADP, το οποίο είναι υποχρεωτικός συμπαράγοντας της eNOS. (8)

Ένας ακόμη μηχανισμός με τον οποίο η υπεργλυκαιμία αυξάνει το οξειδωτικό στρες είναι αυτός που σχετίζεται με τον σχηματισμό ROS στο μιτοχόνδριο. Είναι γνωστό ότι, ο οξειδωτικός μεταβολισμός της γλυκόζης μειώνει το NAD και το FAD. Αυτοί οι φορείς ηλεκτρονίων κατευθύνονται προς την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων για σύνθεση ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η ροή των ηλεκτρονίων μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων διαμεσολαβείται από 4 ενζυμικά σύμπλοκα (σύμπλοκα I-IV), μαζί με το κυτόχρωμα c και την ουβικινόνη. Η μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω των συμπλοκών I, III, και IV καταλήγει σε μία κλίση πρωτονίων που οδηγεί στην δραστηριότητα της συνθάσης του ATP (σύμπλοκο V). Η διαρροή ηλεκτρονίων από την οξειδωτική φωσφορυλίωση οδηγεί σε παραγωγή υπεροξειδίου, αλλά ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα, υπό κανονικές συνθήκες, εύκολα καταστρέφουν τις ελεύθερες ρίζες (ROS) που παράγονται, για να μειώσουν το οξειδωτικό στρες. Όμως, όταν είναι αυξημένη η διαθεσιμότητα του υποστρώματος (δηλαδή, η γλυκόζη) για το μεταβολισμό της ενέργειας, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, τότε επιδεινώνει

την παραγωγή υπεροξειδίου σε επίπεδα που υπερβαίνουν την ικανότητα των ενδογενών αντιοξειδωτικών συστημάτων. (6)

Ακόμα ένας μηχανισμός που σχετίζεται με αυτό που μελετάμε, είναι η δράση της ασύμμετρης NG, NG-διμεθυλαργινίνης (ADMA), που αποτελεί έναν ενδογενή ανταγωνιστή της eNOS, και του αναστολέα της σύνθεσης ενδογενούς NO, δηλαδή της N^G -μονομεθυλ-L-αργινίνης (LNMMA). Οι ADMA και LNMMA αναστέλλουν NOS. Συγκεκριμένα, η ADMA ανταγωνίζεται άμεσα την αργινίνη για να συνδεθεί με την NOS μειώνοντας έτσι την βιοσύνθεση του NO. Τα βασικά επίπεδα ADMA σε υγιή άτομα είναι περίπου 0.5 μM, και οι αυξήσεις της ADMA στο πλάσμα μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο για CVD. Πράγματι, οι ασθενείς με καρδιαγγειακή νόσο έχουν υψηλότερα επίπεδα ADMA και μειωμένα επίπεδα NO, σε συνδυασμό με αγγειακή δυσλειτουργία. (6)

Μελέτες που έχουν γίνει σε φυσιολογικά, μη διαβητικά άτομα, έχουν δείξει ότι, η οξεία υπεργλυκαιμία είναι σε θέση να προκαλέσει αναστρέψιμη ενδοθηλιακή δυσλειτουργία σε φυσιολογικά άτομα. Συγκεκριμένα, όταν μη-διαβητικά άτομα εκτέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης κατά τη διάρκεια έγχυσης δεξτρόζης για 6 ώρες, φάνηκε ότι υπήρχε μια εξασθένηση της αγγειοδιαστολής που προκαλείται από μεταχολίνη (εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο αγγειοδιαστολή), διατηρώντας παράλληλα την αγγειοδιασταλτική απόκριση προς νιτροπρωσσικό (μη ενδοθήλιο εξαρτώμενη αγγειοδιαστολή). Αυτό υποδεικνύει ότι, σε ένα φυσιολογικό ενδοθήλιο η οξεία αύξηση της γλυκόζης του αίματος μπορεί να προκαλέσει οξεία δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, αλλά δεν είναι αρκετή για να προωθήσει δυσλειτουργία του αγγειακού λείου μυός. Σε μια άλλη μελέτη σε φυσιολογικά άτομα, αποδείχθηκε επίσης ότι η οξεία υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αιμοδυναμικές και ρεολογικές αλλαγές, όπως αυξήσεις στη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, τον καρδιακό ρυθμό και τις κατεχολαμίνες του πλάσματος καθώς και προσαυξήσεις στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων και το ιξώδες του αίματος. Όταν έγινε έγχυση L-αργινίνης, από την οπόια παράγεται NO, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, η αρτηριακή πίεση και η ροή του αίματος μέσα στο αγγείο αντιστράφηκαν. Όταν έγινε έγχυση του αναστολέα της σύνθεσης ενδογενούς NO, δηλαδή N^G -μονομεθυλ-L-αργινίνης (L-NMMA), αιμοδυναμικές

επιδράσεις της υπεργλυκαιμίας αναπαράχθηκαν, υποδεικνύοντας ότι η οξεία υπεργλυκαιμία μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα ΝΟ ακόμη και σε φυσιολογικά άτομα.

Η επίδραση της οξείας αύξησης της γλυκόζης του αίματος στο φυσιολογικό ενδοθήλιο που αναφέρθηκε παραπάνω, δεν παρατηρήθηκε σε όλες τις μελέτες. Σε έρευνα όπου μελέτησαν την επίδραση της οξείας έγχυσης γλυκόζης για 24 ώρες σε φυσιολογικά άτομα, δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στην αγγειακή διαστολή της μικροκυκλοφορίας του δέρματος που προκαλείται από την ακετυλοχολίνη (Ach), στο νιτροπρωσσικό, στην νορεπινεφρίνη ή στον ανταγωνιστή της συνθάσης του νιτρικού οξειδίου. Οι διαφορές μεταξύ των μελετών μπορεί να οφείλονται σε μεθοδολογικές διαφορές. Είναι αποδεκτό, ωστόσο, ότι η ινσουλίνη μπορεί να μετριάσει την οξεία δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. (7)

ΤΑ ΝΙΤΡΙΚΑ ΚΑΙ ΝΙΤΡΩΔΗ ΩΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΟΥ ΝΟ

Στην παρούσα μελέτη μετρήθηκαν νιτρικά και νιτρώδη για τον έμμεσο προσδιορισμό του ΝΟ. Όπως έχει αναφερθεί πολλές φορές, το ΝΟ αποτελεί έναν ενδογενή μεσολαβητή για ποικίλες φυσιολογικές διαδικασίες. Ο σχηματισμός του ΝΟ από την αργινίνη καταλύεται από την συνθάση του νιτρικού οξειδίου. Παρόλο που το ΝΟ μπορεί να μετρηθεί με πολλούς άμεσους και έμμεσους τρόπους, όπως με υγρή και αέρια χρωματογραφία κ.α., ο μικρός χρόνος ημίσειας ζωής που έχει και οι μικρές συγκεντρώσεις in vivo, μειώνουν την πρακτικότητα των μεθόδων αυτών για την εκτίμηση των βιολογικών δειγμάτων. Επίσης, αυτές οι διαδικασίες είναι ακατάλληλες για το κλινικό εργαστήριο εξαιτίας της απαίτησης ειδικών οργάνων – μηχανημάτων και της ανάγκης μεγάλου αριθμού δείγματος. Οι δυσκολίες που προκύπτουν κατά την ποσοτικοποίηση του ΝΟ, μπορούν να εξαλειφθούν, μετρώντας σταθερούς μεταβολίτες του ΝΟ, και συγκεκριμένα νιτρικά και νιτρώδη. Ισχύει ότι τα νιτρώδη είναι το μόνο σταθερό τελικό προϊόν της αυτοοξείδωσης του ΝΟ σε υδατικό διάλυμα. Τα νιτρικά σχηματίζονται από την αντίδραση του ΝΟ με το υπεροξείδιο ή την οξυαιμοσφαιρίνη. Επίσης, τα νιτρώδη μετατρέπονται σε νιτρικά από την οξυαιμοσφαιρίνη. Κατά συνέπεια, το πλάσμα και ο ορός περιέχουν κυρίως νιτρικά. Έχει αποδειχθεί μια υψηλή συσχέτιση μεταξύ ενδογενούς παραγωγής ΝΟ και επιπέδων νιτρικών/νιτρωδών στο πλάσμα και στον ορό. Επομένως, η μέτρηση αυτών των επιπέδων αποτελεί μια αξιόπιστη και

μετρήσιμη εκτίμηση της παραγωγής NO in vivo. Υπάρχουν πολλές τεχνικές για την μέτρηση των ιόντων αυτών. Η πιο απλή και συχνά εφαρμόσιμη μέθοδος που χρησιμοποιείται για την χρωματομετρική ανίχνευση των ιόντων αυτών, είναι με το Griess reagents, το οποίο χρησιμοποιήθηκε τελικά σε αυτή την έρευνα. (9)

Παρόλα τα παραπάνω πλεονεκτήματα που έχουν τα $NO_χ$ για τον έμμεσο προσδιορισμό του NO, έχουν φυσικά και κάποια μειονεκτήματα. Τα επίπεδα των κυκλοφορόντων νιτρωδών και των νιτροζυλιωμένων πρωτεϊνών σε ένα βαθμό αντικατοπτρίζουν την παραγωγή του NO, αλλά είναι δύσκολο να μετρηθούν και ίσως κάποιες φορές να μην εκπροσωπούν την ενδοθηλιακή και αιμοπεταλιακή παραγωγή του NO. Ειδικότερα, οι τιμές που μπορεί να προκύψουν από την μέτρηση των $NO_χ$ μπορεί να είναι αναληθείς. Δηλαδή, μπορεί να υπάρξει σφάλμα λόγω σύγχυσης των παραγόμενων από το ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια $NO_χ$, από τον σχηματισμό άλλων ειδών που περιέχουν άζωτο, άλλες πηγές του NO και από μια ποικιλία NO που προέρχεται από την διατροφή. (10)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το αντικείμενο της μελέτης αυτής είναι να αποδειχθεί στα πλαίσια του δυνατού, το αν και κατά πόσο μειώνεται το NO, και εν προκειμένω τα $NO_χ$, σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, σύμφωνα με τους φυσιολογικούς και βιοχημικούς μηχανισμούς που θεωρητικά ισχύουν και που έχουν περιγραφεί παραπάνω. Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές, υπάρχουν έρευνες και μελέτες που δείχνουν ότι ισχύει αυτή η υπόθεση. Ακόμα έγινε συσχέτιση των επιπέδων των NOχ με άλλους δείκτες όπως η δραστικότητα των αιμοπεταλίων, ο μέσος όγκος των αιμοπεταλίων, η ινσουλίνη και το αντιοξειδωτικό ένζυμο GPX1.

Για παράδειγμα, σε συστηματική ανασκόπηση και μετα -ανάλυση εξετάστηκε το αν η οξεία υπεργλυκαιμία επηρεάζει την αγγειακή λειτουργία σε υγιείς και σε πάσχοντες από καρδιαγγειακά νοσήματα. Συγκεκριμένα, η μελέτη ξεκινά με την υπόθεση ότι κατά την διάρκεια οξείας υπεργλυκαιμίας, αυξάνεται το οξειδωτικό στρες και αυτό αποτελεί το έναυσμα της αγγειακής δυσλειτουργίας με μείωση του NO και της βιοδιαθεσιμότητας του. Επειδή πρόκειται για μετα-ανάλυση συγκεντρώνονται πολλές παλαιότερες μελέτες οι οποίες έχουν τα εξής χαρακτηριστικά: όλες οι μελέτες αξιολογούν την ενδοθηλιακή λειτουργία κατά την διάρκεια οξείας υπεργλυκαιμίας και σε φυσιολογική γλυκαιμία σε 1065 άτομα συνολικά που ταξινομούνται ως υγιείς (n = 525), ως παχύσαρκοι (n = 72), με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη (n = 104), με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (n = 229), με υπέρταση (n = 94), με μεταβολικό σύνδρομο (n = 30), ή με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 (n = 11). Αυτή η μετα-ανάλυση έδειξε μακροαγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία κατά τη διάρκεια οξείας υπεργλυκαιμίας σε υγιείς ανθρώπους, καθώς και σε πάσχοντες από καρδιαγγειακά (CVD), γεγονός που υποδηλώνει ότι η παθογένεση της CVD μπορεί να αρχίσει, μεταξύ άλλων, με οξεία υπεργλυκαιμία. Είναι ενδιαφέρον ότι η αντίστροφη σχέση μεταξύ μακροαγγειακής ενδοθηλιακής λειτουργίας και βασικών παραγόντων καρδιαγγειακού κινδύνου, αποδεικνύει το βαθμό στον οποίο η οξεία υπεργλυκαιμία μεσολαβεί για μακροαγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και συσχετίζεται με την αύξηση της ηλικίας, της αρτηριακής πίεσης, ή τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης.

Σε αυτή την μετα-ανάλυση , φάνηκε ότι η μακροαγγειακή ενδοθηλιακή λειτουργία επηρεάστηκε τόσο στους πάσχοντες από καρδιαγγειακά, όσο και στους

υγιείς. Εκτιμήθηκε ότι η μακροαγγειακή ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που παρατηρείται κατά τη διάρκεια οξείας υπεργλυκαιμίας εξαρτάται από την αγγειοδιαστολή εξαρτώμενη από το ενδοθήλιο, και στο γεγονός ότι μειώθηκε η βιοδιαθεσιμότητα του NO και στους υγιείς και σε όσους νοσούν από καρδιαγγειακά. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην οξεία υπεργλυκαιμία η οποία αυξάνει το οξειδωτικό στρες και διαταράσσει την οδό σύνθεσης του NO. Το γεγονός ότι ακόμη και υγιείς άνθρωποι εμφάνισαν μειωμένη μακροαγγειακή ενδοθηλιακή λειτουργία κατά τη διάρκεια της οξείας υπεργλυκαιμίας δείχνει πόσο έντονα μπορεί να επηρεαστεί η βιοδιαθεσιμότητα του NO από την υπερβολική κατανάλωση ζάχαρης. Αν και διαταραχές στην βιοδιαθεσιμότητα του NO, που προκαλούνται από την οξεία υπεργλυκαιμία, και η προκύπτουσα δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μπορεί αρχικά να είναι παροδικές, αν επαναλαμβάνονται αρκετά συχνά, μπορεί να οδηγήσουν σε σωρευτικές αρνητικές επιπτώσεις για το αγγειακό σύστημα. Εν κατακλείδι, με βάση τις μελέτες που περιλαμβάνονται σε αυτή την μετα- ανάλυση, τα τρέχοντα στοιχεία δείχνουν ότι η οξεία υπεργλυκαιμία μειώνει την μακροαγγειακή ενδοθηλιακή λειτουργία σε όλα τα υγιή και με καρδιαγγειακή νόσο άτομα. Αποδεικνύεται ότι, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που προκαλείται από μειωμένη διαθεσιμότητα NO, και αποτελεί τον πρωταρχικό μηχανισμό στην παθογένεση της CVD, μπορεί να αρχίσει πολύ πριν είναι ανιχνεύσιμη η αγγειακή αναδιαμόρφωση ή η έναρξη της καρδιαγγειακής νόσου (11).

Σε άλλη μελέτη έγινε τεστ ανοχής στην γλυκόζη (OGTT) σε διαβητικά άτομα και φάνηκε ότι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων εξασθένισε, όταν δόθηκε παράγοντας με δότες NO, υποδηλώνοντας ότι η εξασθενημένη ομοιόσταση του NO, είναι τουλάχιστον εν μέρει υπεύθυνη για την απορρύθμιση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων στους διαβητικούς. Μεγαλύτερη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων παρατηρήθηκε επίσης σε υγιείς ενήλικες μετά από 24ωρη υπεργλυκαιμία και υπερινουλιναιμία που προκλήθηκε από ενδοφλέβια έγχυση γλυκόζης (~ 11 mM γλυκόζη). Ωστόσο, το NO δεν εκτιμήθηκε, περιορίζοντας έτσι την κατανόηση του κατά πόσο η μεταγευματική υπεργλυκαιμία επηρεάζει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων διαμέσου της μεταβολής των επιπέδων του NO, σε ενήλικες με φυσιολογική γλυκαιμία. Στην ίδια μελέτη αναφέρεται ότι το οξειδωτικό στρες σχετίζεται καλά με παθοφυσιολογικές αποκρίσεις που συμβάλλουν στην CVD συμπεριλαμβανομένων εκείνων που προκαλούνται από

την παχυσαρκία, το κάπνισμα, και τον διαβήτη. Συμβάλλει σημαντικά στην αγγειακή δυσλειτουργία με τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας του NO μέσω διαφόρων μηχανισμών. Εκτεταμένες γνώσεις δείχνουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι αυξημένο σε καταστάσεις χρόνιας υπεργλυκαιμίας και, πιο πρόσφατα, τα στοιχεία δείχνουν ότι οι διακυμάνσεις της γλυκόζης μεταγευματικά μπορούν επίσης να αυξήσουν το οξειδωτικό στρες παροδικά (6).

Τέλος, σύμφωνα με άλλη μελέτη όπου μετρήθηκαν τα επίπεδα της ADMA, που όπως έχουμε αναφέρει παραπάνω, αποτελεί ανταγωνιστή της αργινίνης και οδηγεί σε μείωση της σύνθεσης NO, σε φυσιολογικούς και διαβητικούς φάνηκε ότι τα επίπεδα ADMA είναι υψηλότερα σε άτομα με διαβήτη και σε άτομα με IGT συγκρινόμενα με νορμογλυκαιμικά άτομα. Συγκεκριμένα, μετά από OGTT φάνηκε ότι τα επίπεδα ADMA στο πλάσμα αυξήθηκε σε όλα τα γρουπ των εθελοντών, αλλά σε μεγαλύτερο βαθμό σε άτομα με διαβήτη, μετά σε άτομα με IGT και τέλος στα υγιή. Ακόμα, το OGTT έδειξε ότι στους υγιείς άνδρες αυξήθηκε η αναλογία του ADMA / αργινίνη. Η αναλογία αυτή, είναι ένας δείκτης που δείχνει την μειωμένη βιοσύνθεση του NO. Αυτό το εύρημα είναι το πρώτο που υποστηρίζει ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία επηρεάζει την αγγειακή λειτουργία με έναν εξαρτώμενο από το οξειδωτικό στρες τρόπο, ο οποίος πιθανά μειώνει την βιοδιαθεσιμότητα του NO, περιορίζοντας την διαθεσιμότητα της αργινίνης και αυξάνοντας την ανταγωνιστική αναχαίτιση της eNOS από την ADMA. Βέβαια, ο μηχανισμός με τον οποίο η υπεργλυκαιμία ρυθμίζει την ADMA είναι ακόμα ασαφής. Στην έρευνα αυτή έγινε επώαση ενδοθηλιακών κυττάρων με γλυκόζη (30 mM για 48 ώρες) και φάνηκε ότι η δραστηριότητα της NOS μειώθηκε και τα επίπεδα των μεταβολιτών του NO μειώθηκαν ενώ τα επίπεδα της ADMA αυξήθηκαν. Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, αυτή η μελέτη έδειξε ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία ρυθμίζει την αγγειακή λειτουργία, διακόπτοντας την ομοιόσταση του NO, επάγοντας αντιδράσεις οξειδωτικού στρες**.** (6)

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας των αποτελεσμάτων και της στατιστικής ανάλυσης της δικής μας μελέτης, φάνηκε ότι τα επίπεδα των NO_X, συνεπώς και του NO, μεταβλήθηκαν αρνητικά, δηλαδή μειώθηκαν, μετά από φόρτιση γλυκόζης 75γρ και 150 γρ, ενώ για φόρτιση 100γρ δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική μεταβολή παρά μόνο μια τάση διαφοροποίησης. Συγκεκριμένα, η

μεταβολή των επιπέδων των $NO_χ$ στον χρόνο για την φόρτιση των 100γρ δεν ήταν σημαντική (p=0,056), όπως για τις φορτίσεις 75 και 150γρ (p=0,038 και p=0,001 αντίστοιχα). Ακόμα, όταν έγινε ανάλυση για το αν τα επίπεδα των $NO_χ$ μεταβάλλονται διαφορετικά στις 3 διαφορετικές φορτίσεις αποδείχθηκε ότι για τις φορτίσεις 100- 150 γρ δεν υπάρχει διαφοροποίηση (p=0,575), ότι για τις φορτίσεις 75 -100 γρ υπάρχει μόνο τάση διαφοροποίησης (p=0,069) και μόνο για τις φορτίσεις 75 -150 γρ υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση (p=0,017). Αυτό σημαίνει ότι όσο αυξάνει η γλυκόζη στο αίμα τόσο μειώνονται τα επίπεδα των $NO_χ$ (φαίνεται από την σχέση 75-150γρ), αλλά από ένα σημείο όσο και να αυξηθεί η γλυκόζη δεν παρουσιάζεται περαιτέρω μείωση στα επίπεδα των $NO_χ$ (φαίνεται από την σχέση 100-150γρ). Το γεγονός ότι, όσο πιο πολύ αυξάνει η υπεργλυκαιμία, τόσο πιο πολύ μειώνονται τα επίπεδα των $NO_χ$, αποδεικνύεται και από το αποτέλεσμα της συσχέτισης των AUC των $NO_χ$ με το AUC της γλυκόζης (r= -0,503 με p=0,012). Ακόμα, αξίζει να αναφερθεί ότι στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα των $NO_χ$ σε σχέση με τα επίπεδα αυτά την χρονική στιγμή 0, παρατηρείται μετά την χρονική στιγμή των 60 min (για 100γρ p=0,05 και για 150γρ p=0,017). Δηλαδή, μετά από μια ώρα από την κατανάλωση μια ποσότητας γλυκόζης, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των επιπέδων των $NO_χ$.

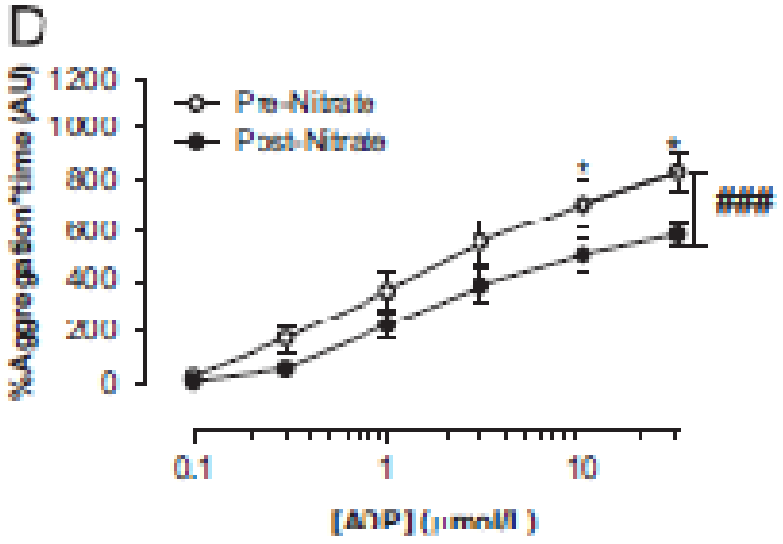
Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω έγινε συσχέτιση των επιπέδων των $NO_χ$ μετά από φόρτιση γλυκόζης και με άλλους δείκτες. Η δραστικότητα των αιμοπεταλίων προσδιορίστηκε μέσω του δείκτη ADP_EC50. Ο δείκτης αυτός αποτυπώνει την ευαισθησία των αιμοπεταλίων στο ADP, δηλαδή όσο πιο ευαίσθητα είναι τα αιμοπετάλια, τόσο λιγότερο ADP απαιτούν για να ενεργοποιηθούν. Από την συσχέτιση του ADP_EC50 σε χρόνο 0 σε σχέση με τα επίπεδα των $NO_χ$ την ίδια χρονική στιγμή, φάνηκε ότι όσο χαμηλότερα είναι τα επίπεδα των $NO_χ$ την στιγμή 0, τόσο πιο χαμηλή είναι η ADP_EC50 (r=0,425, p= 0,039). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι όσο πιο χαμηλά είναι τα επίπεδα των $NO_χ$, τόσο αυξημένη είναι η δραστικότητα των αιμοπεταλίων άρα και η συσσώρευσης τους, άρα τα αιμοπετάλια είναι ευαίσθητα στο ADP, και απαιτούν χαμηλή ADP_EC50. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από την συσχέτιση του ADP_25 με τα επίπεδα των $NO_χ$ για την στιγμή 0. Το ADP προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων, άρα όσο πιο πολύ ADP τόσο πιο μεγάλη είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων άρα και η δραστικότητα τους, το οποίο σημαίνει μειωμένα επίπεδα $NO_χ$ (r= -0,382, p= 0,065). Αυτό αποδεικνύεται στο βαθμό του δυνατού

και από την ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία και είναι σύμφωνο με όλους τους μηχανισμούς που έχουν αναφερθεί παραπάνω.

Ένας άλλος δείκτης που δείχνει την δραστικότητα των αιμοπεταλίων είναι ο MPV. Είναι γνωστό ότι, ο MPV αυξάνει, όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται. Σύμφωνα με έρευνα που έχει γίνει, τα αιμοπετάλια έχουν ετερογένεια όσον αφορά στο μέγεθος τους, και συγκεκριμένα αυτά που είναι μεταβολικά πιο ενεργά με προθρομβωτικές ιδιότητες είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος. Υπάρχουν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των μεγαλύτερων σε μέγεθος αιμοπεταλίων και σε αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακή νοσηρότητα και θνησιμότητα (12).

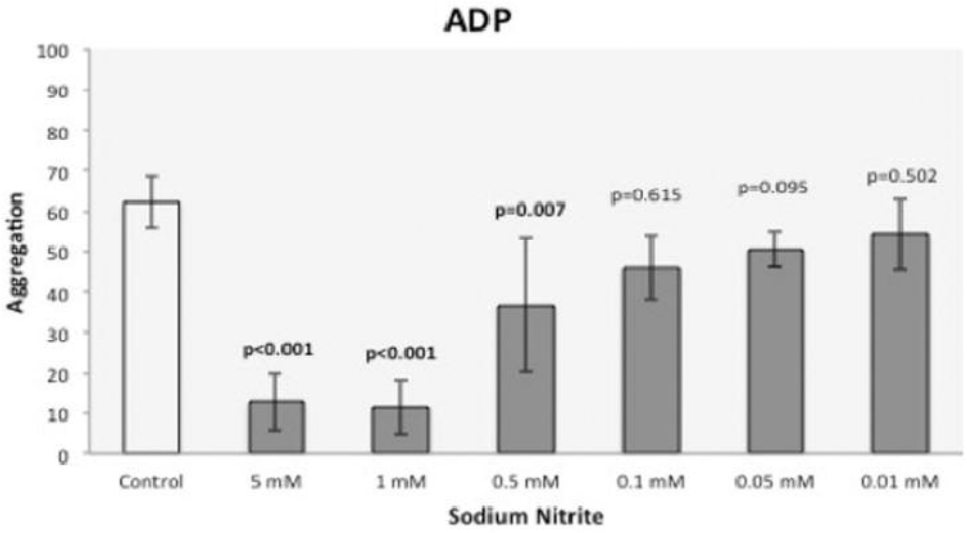
Συνεπώς, είναι λογικό το αποτέλεσμα που δείχνει ότι όσο μειωμένα είναι τα NO_X, άρα η δραστικότητα των αιμοπεταλίων είναι αυξημένη, τόσο πιο αυξημένο είναι το MPV (r= -0,560, p= 0,007).

Οι 3 δείκτες που αναφέρθηκαν δείχνουν την δραστικότητα των αιμοπεταλίων και αποδεικνύουν την ίδια σχέση, ότι δηλαδή όσο πιο αυξημένη είναι η δραστικότητα των αιμοπεταλίων τόσο πιο μειωμένα είναι τα επίπεδα των NO_X ή αλλιώς ότι όσο πιο υψηλά είναι τα επίπεδα των NO_X τόσο πιο μειωμένη είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Σύμφωνα με έρευνα όπου δόθηκαν σε υγιείς εθελοντές NO_X μέσω τροφής, αποδείχθηκε το παραπάνω συμπέρασμα και της δικής μας έρευνας. Παρουσιάζεται το διάγραμμα της μεταβολής αυτής. (13)



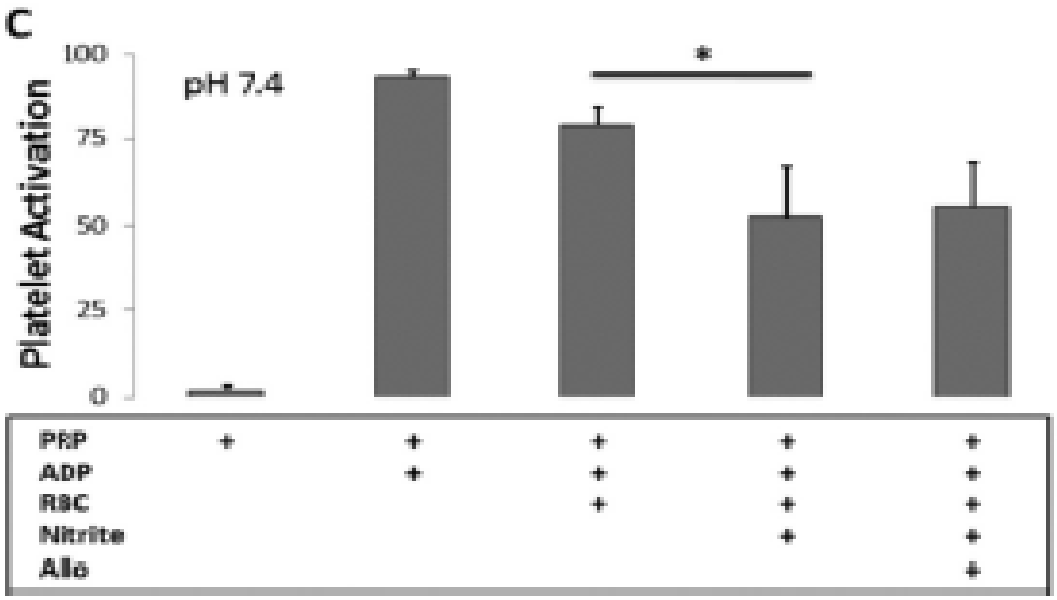
Η σχέση αυτή αποδεικνύεται και από άλλη έρευνα που έγινε in vitro σε πλάσμα εθελοντών και φάνηκε ότι για συγκεκριμένη ποσότητα ADP, όσο πιο αυξημένα

ήταν τα επίπεδα των νιτρωδών, χορηγώντας νιτρώδες νάτριο, τόσο πιο μειωμένη ήταν η συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Τα ευρήματά αυτής της μελέτης δείχνουν ότι το νιτρώδες νάτριο αναστέλλει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων σε φυσιολογικές συνθήκες in vitro, αν και ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι γνωστός. (14)



Υπάρχουν έρευνες που δείχνουν πως η προσθήκη νιτρωδών σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια αλλά και παρουσία ερυθροκυττάρων θα μπορούσε να αναστείλει τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αυτό επιτυγχάνεται με αποξυγόνωση αφού η δεοξυαιμοσφαιρίνη μετατρέπει το νιτρώδες σε NO. Στην ίδια έρευνα φάνηκε ότι τα νιτρώδη άλατα ανέστειλαν την έκφραση της P-σελεκτίνης επί της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, αλλά και την ενεργοποίηση του GPIIb / IIIa. Είναι γνωστό ότι κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων εκκρίνεται P-σελεκτίνη από τους κόκκους τους, η οποία τοποθετείται στη μεμβράνη τους και μεσολαβεί στην συγκόλληση των κυττάρων. Ακόμα, ο υποδοχέας ινωδογόνου, GPIIb / IIIa, υφίσταται μεταβολές διαμόρφωσης κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, οι οποίες επιτρέπουν τελικά στο ινωδογόνο να δεσμεύεται σε αυτόν με αποτέλεσμα τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, τα νιτρώδη μειώνουν την δραστικότητα των αιμοπεταλίων, με την παρουσία μερικώς αποξυγονωμένων ερυθροκυττάρων, μέσω της μετατροπής τους σε NO. (15) Η υπόθεση ότι η δεοξυαιμοσφαιρινη είναι η κύρια ερυθροκυτταρική αναγωγάση του νιτρώδους ενισχύεται και από άλλη έρευνα. Στην έρευνα αυτή φάνηκε ότι παρουσία δεόξυαιμοσφαιρίνης τα νιτρώδη μετατράπηκαν σε NO. Κάτω από

φυσιολογικές συνθήκες, παρατηρήθηκε μείωση της δραστικότητας των αιμοπεταλίων παρουσία νιτρωδών. (16)



Φυσικά, στις έρευνες αυτές φάνηκε ότι, τα νιτρώδη προκάλεσαν μείωση της δραστικότητας και αναστολή συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από μετατροπή τους σε NO από την αιμοσφαιρίνη των ερυθροκυττάρων, ενώ στην δικιά μας μελέτη δεν έγινε συσχέτιση με τα ερυθροκύτταρα. Παρόλα αυτά, και οι δύο τελευταίες έρευνες που αναφέρθηκαν, ενισχύουν την υπόθεση ότι τα νιτρώδη μειώνουν την δραστικότητα των αιμοπεταλίων όπως προέκυψε και από τα δικά μας αποτελέσματα.

Όταν συσχετίστηκαν τα ADP_EC50, ADP_25 και MPV της χρονικής στιγμής 0 με το AUC των $NO_χ$ προέκυψαν τα εξής αποτελέσματα: (r= -0,583, p= 0,003), (r= 0,534, p= 0,007) και (r= 0,499, p= 0,018), αντίστοιχα. Η ερμηνεία για την σχέση μεταξύ του ADP_EC50 και του AUC των $NO_χ$ είναι ότι όσο πιο αυξημένη είναι η ADP_EC50 την στιγμή 0, τόσο πιο μικρό είναι το AUC των $NO_χ$, δηλαδή τόσο πιο πολύ μειώνονται τα $NO_χ$. Όσον αφορά στην σχέση του ADP_25 την στιγμή 0 και του AUC των $NO_χ$, φαίνεται ότι όσο πιο αυξημένο είναι το ADP_25, τόσο πιο υψηλό είναι το AUC των $NO_χ$, άρα τόσο πιο λίγο μειώνονται τα $NO_χ$, δηλαδή πέφτουν λιγότερο. Τέλος, για την σχέση του MPV της χρονικής στιγμής 0 με το AUC των $NO_χ$ ισχύει ότι όσο πιο αυξημένη είναι το MPV την στιγμή 0, τόσο πιο μεγάλο είναι το AUC των $NO_χ$, δηλαδή μειώνονται λιγότερο τα $NO_χ$. Από τις

συσχετίσεις αυτές προκύπτει ότι όσο πιο δραστικά είναι τα αιμοπετάλια ενός ανθρώπου, τα επίπεδα των $NO_χ$ μειώνονται λιγότερο, δηλαδή η υψηλή δραστικότητα των αιμοπεταλίων συγκρατεί την μείωση των $NO_χ$.

Έγινε συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων των $NO_χ$ και της ινσουλίνης για την χρονική στιγμή 0. Από αυτήν την συσχέτιση προέκυψε ότι όσο πιο αυξημένα είναι τα επίπεδα της ινσουλίνης για την χρονική στιγμή 0, τόσο πιο χαμηλά είναι τα επίπεδα των $NO_χ$ την ίδια χρονική στιγμή (r= -0,383, p= 0,064). Αυτό εξηγείται και από την βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, η ινσουλίνη ασκεί την δράση της μέσω δύο οδών, της PI3-K και της ενεργοποίησης της MAPK. Η αντίσταση στην ινσουλίνη λαμβάνει μέρος στην αγγειακή δυσλειτουργία σε ασθενείς με T2DM. Στην πραγματικότητα, η μείωση της PI3-K που παρατηρείται σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2, προκαλεί μείωση της δραστικότητας της eNOS, το οποίο οδηγεί στην μείωση παραγωγής NO. (17) Η συσχέτιση αυτή (r= -0,383, p= 0,064), ακόμα σημαίνει ότι όσο πιο αυξημένα είναι τα επίπεδα των $NO_χ$ τόσο πιο μειωμένη είναι η ινσουλίνη. Σε μελέτη που έγινε σε ποντίκια φάνηκε ότι αυξημένα $NO_χ$ βελτιώνουν την ινσουλινοευαισθησία και αυξάνουν τον ρυθμό πρόσληψης της γλυκόζης, επιτυγχάνοντας ευγλυκαιμία. Η ευαισθησία στην ινσουλίνη που φαίνεται πως προκαλούν τα $NO_χ$ οδηγεί στην μείωση της ινσουλίνης εφόσον απαιτούνται μικρότερες ποσότητες αυτής για να επιτευχθεί ευγλυκαιμία. (18)

Επίσης, συσχετίστηκαν τα επίπεδα των $NO_χ$ την χρονική στιγμή 0 με τα επίπεδα της GPx1_PLT, και φάνηκε ότι όσο πιο υψηλά είναι τα επίπεδα των $NO_χ$ την χρονική στιγμή 0, τόσο πιο μειωμένα είναι τα επίπεδα της GPx1 (r= -0,699, p=0,004). Πιθανόν λόγω αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας NO άρα και $NO_χ$ το οξειδωτικό στρες είναι μειωμένο. Δεδομένου ότι η έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, συμπεριλαμβανομένης και της GPx1, ενεργοποιούνται από τις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν με ομοιοστατικούς μηχανισμούς, η αντίστροφη σχέση που προκύπτει, πιθανότατα, αντικατοπτρίζει δύο διαφορετικές εκφάνσεις του οξειδωτικού στρες, δηλαδή υψηλή βιοδιαθεσιμότητα NO άρα και $NO_χ$ και μειωμένη δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων.

Συσχετίστηκαν, ακόμα, τα επίπεδα της GPx1_PLT την χρονική στιγμή 0 με το AUC των $NO_χ$, και φάνηκε ότι όσο πιο υψηλή είναι η GPx1 την χρονική στιγμή

0 τόσο πιο μεγάλο είναι το AUC του $NO_χ$, δηλαδή τα επίπεδα των $NO_χ$ μετά την φόρτιση γλυκόζης πέφτουν λιγότερο στην πάροδο του χρόνου, άρα τα $NO_χ$ συγκρατούνται σε υψηλότερα επίπεδα (r=0,586, p=0,022). Συμπεραίνουμε ότι όσο πιο αυξημένες είναι οι αρχικές τιμές της GPx1_PLT ενός ανθρώπου, τα επίπεδα των $NO_χ$ μειώνονται λιγότερο.

Τέλος, συσχετίστηκαν τα επίπεδα των PRCARB_0 την χρονική στιγμή 0 με το AUC των $NO_χ$, και φάνηκε ότι όσο πιο αυξημένα είναι τα PRCARB την χρονική στιγμή 0, τόσο πιο μεγάλο είναι το AUC του $NO_χ$, δηλαδή τα επίπεδα των $NO_χ$ δεν πέφτουν τόσο πολύ μετά την φόρτιση γλυκόζης στην πάροδο του χρόνου, άρα τα επίπεδα των $NO_χ$ είναι υψηλότερα (r=0,496, p=0,022). Ισχύει δηλαδή ότι όσο πιο αυξημένες είναι οι αρχικές τιμές των PRCARB ενός ανθρώπου, τα επίπεδα των $NO_χ$ δεν μειώνονται τόσο πολύ. Τα αυξημένα PRCARB δείχνουν αυξημένο οξειδωτικό στρες, κάτι το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση ομοιοστατικών μηχανισμών όπως τα αυξημένα επίπεδα $NO_χ$.

Η συσχέτιση που έγινε μεταξύ των επιπέδων $NO_χ$ την στιγμή 0 με το AUC του $NO_χ$, δηλαδή την σχέση που έχουν τα αρχικά επίπεδα των $NO_χ$, με το κατά πόσο μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου μετά την φόρτιση γλυκόζης, έδειξε ότι r= -0,647 με p=0,001. Αυτό δείχνει ότι όσο πιο αυξημένα είναι τα αρχικά επίπεδα $NO_χ$, τόσο πιο μικρό είναι το AUC, που σημαίνει ότι μειώνονται περισσότερο τα επίπεδα $NO_χ$. Αυτό εξηγείται μαθηματικά, δηλαδή όσο πιο αυξημένα τα αρχικά $NO_χ$ τόσο περισσότερο πέφτουν ποσοστιαία, δεδομένου ότι υπάρχει ένα κατώτατο όριο μέχρι το οποίο μπορούν να φτάσουν τα $NO_χ$.

Συμπερασματικά, υπάρχουν μελέτες που δείχνουν ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία επηρεάζει την παραγωγή και την βιοδιαθεσιμότητα του NO, επάγει το οξειδωτικό στρες και τελικά προκαλεί ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και αυξημένη συσσώρευση και συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας τον κίνδυνο για αθηροσκλήρωση και θρομβώσεις. Οι μελέτες αυτές έχουν γίνει κυρίως σε διαβητικά και σε πάσχοντα από καρδιαγγειακή νόσο άτομα, ενώ οι μελέτες που έχουν γίνει σε φυσιολογικά, υγιή άτομα είναι περιορισμένες. Σε όλες τις μελέτες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως κατά πόσο η μεταγευματική υπεργλυκαιμία επηρεάζει την παραγωγή και την βιοδιαθεσιμότητα του NO σε φυσιολογικά άτομα,

παρόλο που υπάρχει μια ισχυρή ένδειξη. Στην δικιά μας έρευνα, έγινε προσπάθεια να αποσαφηνιστεί κατά το δυνατό αυτή η υπόθεση και φάνηκε μια τέτοια τάση, όπως ακριβώς υπάρχει στην ήδη υπάρχουσα επιστημονική βιβλιογραφία και αρθογραφία. Παρόλα αυτά, δεν μπορούν να βγουν ακόμα ασφαλή και ξεκάθαρα συμπεράσματα, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την περαιτέρω έρευνα στον συγκεκριμένο τομέα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. **VANDER.** *ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ.* ΑΘΗΝΑ : ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ.

2. **MCPHEE-ΜΟΥΤΣΟΠΟΥΛΟΣ.** *ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ.* ΑΘΗΝΑ : ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΛΙΤΣΑΣ, 2009.

3. **ΜΕΛΙΔΩΝΗΣ, ΑΝΔΡΕΑΣ, [επιμ.].** *ΚΑΡΔΙΟΜΕΤΑΒΟΛΙΚΟΣ ΚΙΝΔΥΝΟΣ* . s.l. : ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΖΙΑΝΟΣ.

4. **Cognasse, Olivier Garraud and Fabrice.** Are Platelets Cells?And if Yes, are They immune Cells? *Frontiers in immunology.* February, 2015, Τόμ. 6.

5. **Henry M. Nording, Peter Seizer and Harald F. Langer.** Platelets in inflammation and atherogenesis. *Frontiers in immunology.* March 6, 2015, Τόμ. 6.

6. **Eunice Maha, Richard S. Bruno.** Postprandial hyperglycemia on vascular endothelial function: mechanisms and consequences. *ELSEVIER.* August 3, 2012.

7. **Marcello C Bertoluci, Gislaine V Cé, Antônio MV da Silva, Marco V Wainstein, Winston Boff, Marcia Puñale.** Endothelial dysfunction as a predictor of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *World Journal of Diabetes.* June 10, 2015, Τόμ. 6, 5.

8. **Tatiana E. Suslova, Alexei V. Sitozhevskii, Oksana N. Ogurkova, Elena S. Kravchenko, Irin.** Platelet hemostasis in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: cGMP- and NO-dependent mechanisms in the insulin-mediated platelet aggregation. *Frontiers in physiology.* January 5, 2015, Τόμ. 5.

9. **Katrina M. Miranda, Michael G. Espey, and David A. Wink.** A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *PubMed-NCBI.* [Ηλεκτρονικό] 16 January 2001.

10. **John E. Deanfield, MB, BCh, FRCP, Julian P. Halcox, MD, MA, MRCP και Ton J. Rabelink, MD, Ph.** Endothelial Function and Dysfunction Testing and Clinical Relevance. *Contemporary Reviews in Cardiovascular Medicine.* March 13, 2007.

11. **ordan Loader, David Montero, Christian Lorenzen, Rani Watts, Cindy Méziat, Cyril Reboul, Simon Stewart, Guillaume Walthe.** Acute Hyperglycemia Impairs Vascular Function in Healthy and Cardiometabolic Diseased Subjects Systematic Review and Meta-Analysis, J. *ARTERIOSCLEROSIS THROMBOSIS AND VASCULAR BIOLOGY.* June, 2015.

12. **Shah B, Valdes V, Nardi MA, Hu L, Schrem E, Berger JS.** Mean platelet volume reproducibility and association with platelet activity and anti-platelet therapy. *PubMed-NCBI.* [Ηλεκτρονικό] 20 June 2013.

13. **Shanti, Velmurugana, Vikas Kapila, Suborno M. Ghosha, Sheridan Daviesa, Andrew McKnighta, Zainab Abouda, Rayomand S. Khambataa, Andrew J. Webba, Alas.** Antiplatelet effects of dietary nitrate in healthy volunteers: Involvement of cGMP and influence of sex. *ELSEVIER.* June 24, 2013.

14. **Preliminary report M. KADAN1, S. DOĞANCI1, V . YILDIRIM2, G. ÖZGÜR3, G. EROL1, K. KARABACAK1, F . AVCU).** In vitro effect of sodium nitrite on platelet aggregation in human platelet rich plasma. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2015.

15. **Krittapoom Akrawinthawong1, 3, Ji Won Park1, Barbora Piknova1, Nathawut Sibmooh2, Suthat Fucharoen4, Alan N. Schechter1.** A Flow Cytometric Analysis of the Inhibition of Platelet Reactivity Due to Nitrite Reduction by Deoxygenated Erythrocytes. *PLOS ONE.* March, 2014, Τόμ. 9, 3.

16. **Chen Liu, Nadeem Wajih, Xiaohua Liu, Swati Basu, John Janes, Madison Marvel ,Christian Keggi, Christine C. Helms,Amber N. Lee, Andrea M. Belanger, DebraI. Diz, Paul J. Laurienti, David L. Caudell,.** Mechanisms of Human Erythrocytic Bioactivation of Nitrite. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY.* January 9, 2015, Τόμ. 290.

17. **Xu, Ren-Shi.** Pathogenesis of diabetic cerebral vascular disease complication. *World Journal of Diabetes.* February, february 2015, Τόμ. 6, 1.

18. **Srikanth Singamsetty, Yoshio Watanabe, Lanping Guo, Catherine Corey, Yinna Wang1, Jesus Tejero1, Bryan J. MMcVerry, Mark T. Gladwin , Sruti Shiva1 and Christopher P. O'Donnell.** Inorganic nitrite improves components of the metabolic syndrome independent of weight change in a murine model of obesity and insulin resistance. *The journal of physiology.* May 8, 2015.