



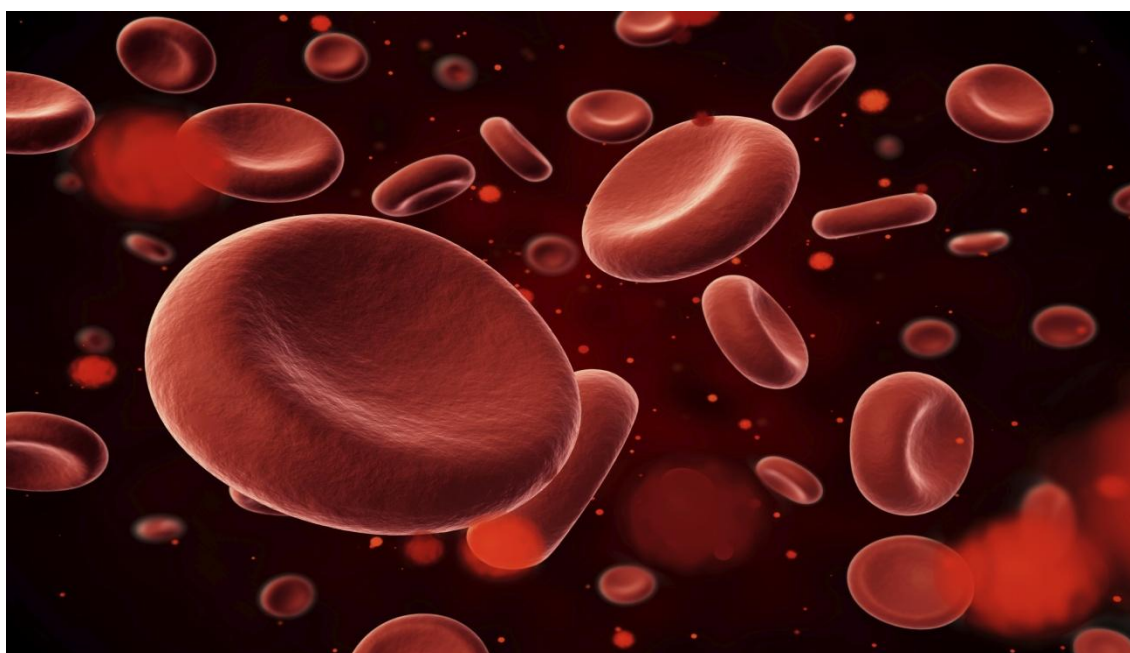
ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΦΟΡΤΙΣΕΙΣ
ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Κυβετού Χριστίνα

A.M. 4421208



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)
ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ
ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

ΑΘΗΝΑ 2015



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΔΕΙΚΤΩΝ ΦΛΕΓΜΟΝΗΣ ΣΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΤΩΝ
ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΦΟΡΤΙΣΕΙΣ
ΓΛΥΚΟΖΗΣ

Κυβετού Χριστίνα

A.M. 4421208

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ : ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ)

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ

ΦΡΑΓΚΟΠΟΥΛΟΥ ΕΛΙΣΑΒΕΤ

ΑΘΗΝΑ 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη-abstract

1. Εισαγωγή	5
1.1 Φλεγμονή και αιμόσταση	5
1.1.1 Εισαγωγή	5
1.1.2 Η επίδραση της φλεγμονής στο αιμοστατικό σύστημα	5
1.1.3 Διαταραχές στη λειτουργία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων(ECs)	6
1.1.4 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων λόγω φλεγμονής	9
1.1.5 Η ενεργοποίηση των αντιδράσεων της πήξης του πλάσματος σε κατάσταση φλεγμονής	12
1.1.6 Η επίδραση του αιμοστατικού συστήματος στη φλεγμονώδη απόκριση	14
1.1.7 IL-6	15
1.1.7.1 Γενικά	15
1.1.7.2 IL-6 και ανοσοποιητικό σύστημα	16
1.1.7.3 IL-6 και μεταβολικός έλεγχος	16
1.2 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και μηχανισμοί αιμόστασης	18
1.2.1 Ορισμός μεταγευματική υπεργλυκαιμία και η σημασία της	18
1.2.2 Οι επιπτώσεις της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας	19
1.2.3 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία - προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης	20
1.2.4 Ενεργοποίηση της πήξης	21
1.2.5 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων	23
1.3 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και ενεργοποίηση μηχανισμών φλεγμονής	25
1.3.1 Γενικά	25
1.3.2 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και φλεγμονή	25
1.3.3 Μηχανισμοί φλεγμονής	26
1.3.3.1 Κυτοκίνες	26
1.3.3.2 Φαγοκυττάρωση	27

1.3.3.3 Απόπτωση ουδετερόφιλων.....	27
2. Σκοπός	
3. Μεθοδολογία.....	28
3.1 Επιλογή εθελοντών και σχεδιασμός της μελέτης	28
3.1.1 Επιλογή εθελοντών	28
3.1.2 Σχεδιασμός της μελέτης.....	30
3.2 Ανθρωπομετρία.....	31
3.3 Απομόνωση βιολογικών δειγμάτων.....	31
3.4 Προσδιορισμός IL-6 (Quantikine HS ELISA).....	35
3.5 Στατιστική ανάλυση	36
4. Αποτελέσματα	37
4.1 Οι εθελοντές της μελέτης.....	37
4.2 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης	37
4.3 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα ινσουλίνης	40
4.4 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στον αριθμό και τη σχετική αναλογία λευκοκυττάρων	42
4.5 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα ουρικού οξέως	50
4.6 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα IL-6..	52
4.7 Συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών φλεγμονής και άλλων ανθρωπομετρικών, κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων πριν την παρέμβαση	53
4.8 Επίδραση των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών στις ποσοστιαίες (%) μεταβολές των δεικτών φλεγμονής μετά τη παρέμβαση	56
4.9 Συσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των χημικών δεικτών μετά τη παρέμβαση	58
5. Συζήτηση	59
6. Βιβλιογραφία	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ένα έντονο μεταγευματικό υπεργλυκαιμικό φορτίο είναι γνωστό ότι συνοδεύεται από φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και ενεργοποίηση των μηχανισμών θρόμβωσης. Οι συνθήκες αυτές αποτελούν προδιαθεσικό παράγοντα αθηροσκλήρωσης. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια, τα οποία φαίνεται να είναι ενεργοποιημένα υπό αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατόν να αλληλεπιδρούν με το αγγειακό ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα και να αποτελούν τον ενδιάμεσο σύνδεσμο μεταξύ της φλεγμονής, της θρόμβωσης και της αθηρογένεσης. Δεδομένου ότι ο σύγχρονος Δυτικός τρόπος διατροφής χαρακτηρίζεται από έντονα μεταγευματικά υπεργλυκαιμικά επεισόδια, οι παραπάνω μηχανισμοί θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σε καθημερινή βάση στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης.

Σκοπός: Η παρούσα εργασία έχει ως ευρύτερο αντικείμενο την διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης σε δείκτες φλεγμονής όπως η IL-6, ο συνολικός αριθμός και η σχετική αναλογία των λευκοκυττάρων καθώς και το ουρικό οξύ. Απώτερος σκοπός είναι να εκτιμηθεί κατά πόσο οξεία υπεργλυκαιμικά επεισόδια μπορούν να επηρεάσουν τη προφλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού και μέσω αυτής τις μεταβολές τις δραστηριότητας των αιμοπεταλίων.

Μεθοδολογία: Επιλέχθηκαν 6 φαινομενικά υγιείς εθελοντές, άνδρες ή γυναίκες 20-40 ετών, με φυσιολογικό ΔΜΣ, φυσιολογική αρτηριακή πίεση, επίπεδα γλυκόζης και λιπιδίων νηστείας /dl, χωρίς ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου, μη καπνιστές, με ελάχιστη ή καθόλου φυσική δραστηριότητα. Με τυχαία σειρά, ο κάθε εθελοντής μετά από 12ωρη νηστεία προσήλθε στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο 3 φορές όπου κατανάλωσε διαλύματα γλυκόζης (75g, 100g και 150g γλυκόζης σε 200ml νερό). Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία πριν από τη παρέμβαση, στη συνέχεια κατανάλωσαν το έτοιμο διάλυμα γλυκόζης μέσα σε διάστημα 10min και ακολούθησαν αιμοληψίες στα 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 λεπτά μετά από την έναρξη της πρόσληψης του διαλύματος. Η μέτρηση των βιοχημικών δεικτών έγινε με εμπορικά διαθέσιμα kit και η γενική αίματος με αιματολογικό αναλυτή.

Αποτελέσματα: Παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στα επίπεδα του ουρικού οξέως ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης ($p=0,043$). Συγκεκριμένα, σημειώθηκε αύξηση σε μικρούς χρόνους (έως 60 min) και μείωση 2h μετά τη φόρτιση σε

σχέση με το χρόνο 0. Επίσης, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των παρεμβάσεων των 100g και των 150g γλυκόζης ($p=0,016$) και συγκεκριμένα τη χρονική στιγμή 60min ($p=0,039$), όπου η αύξηση του ουρικού οξέος ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στη φόρτιση των 100g. Τέλος, όσον αφορά την hsIL-6 παρατηρήθηκε αύξηση ως προς το χρόνο σε όλες τις παρεμβασεις ($p=0,000$).

Συμπέρασματα: Η ένταση του φαινομένου της υπεργλυκαιμίας δεν αυξάνεται αναλογικά με τη φόρτιση γλυκόζης. Όταν πρόκειται για «φυσιολογικό» πληθυσμό οι επιπτώσεις της υπεργλυκαιμίας αλλά και η ίδια η κατάσταση της υπεργλυκαιμίας είναι παροδικά φαινόμενα αφού ανταποκρίνονται άμεσα οι μηχανισμοί μεταβολικής ομοιόστασης και καταστέλλουν το φαινόμενο. Επίσης, τα επίπεδα της hsIL-6 αυξάνονται σημαντικά κάτω από έντονες συνθήκες φόρτισης γλυκόζης ακόμα και σε φυσιολογικούς εθελοντές γεγονός που υποδεικνύει την ενεργοποίηση μηχανισμών υποκλινικής φλεγμονής κάτω από αυτές τις συνθήκες. Τέλος, η αύξηση της hsIL-6 σχετίζεται θετικά με τα επίπεδα υπεργλυκαιμίας και όχι με τα επίπεδα υπερινσουλιναϊμίας.

Λέξεις-κλειδιά: φλεγμονή, αιμοπετάλια, υπεργλυκαιμία, hsIL-6, ουρικό οξύ

ABSTRACT

Introduction: An intense postprandial hypoglycemic load is known to be accompanied by inflammation, oxidative stress and activation of coagulation mechanisms. These conditions are considered a risk factor of atherosclerosis. Furthermore, platelets, which seem to be activated under these conditions, it is possible to interact with the vascular endothelium and leukocytes, and constitute the intermediate link between inflammation, thrombosis and atherogenesis. Given that the modern western diet is associated with intense postprandial hyperglycemic episodes, these mechanisms could contribute on a daily basis in the development of atherosclerosis.

Aim: The purpose of this study was to investigate the effect of different glucose loads on inflammatory markers such as IL-6, the total number and ratio of leukocytes and uric acid. The ultimate goal is to assess whether acute hyperglycemic episodes can affect the proinflammatory response and thereby cause changes in platelet activation.

Materials and methods: The volunteers in this study were 6 healthy men and women aged 20-40 years old, with normal BMI, normal blood pressure, fasting glucose and lipids, no history of cardiovascular disease, non-smokers, with little or no physical activity. In random order each volunteer, after 12-hour fasting, came to Harokopion University 3 times. They consumed glucose solutions (75g, 100g and 150g in 200ml of tap water). Blood samples were drawn prior to the intervention and after the consumption of the solution at 15, 30, 60, 90, 120, 180 and 240 minutes. Biochemical analyses were conducted with the use of commercially available kits and the measurement of blood cell counts with a hematological analyzer.

Results: There was a significant change in uric acid levels after the intervention with 100g glucose ($p = 0,043$). Specifically, there was an increase of uric acid levels shortly after the intervention (up to 60 min) which turned into a decrease for the following hour. Also, there was significant differentiation between the interventions of 100g and 150g of glucose ($p = 0,016$) and in particular at the time point of 60min ($p=0,039$), when the increase of uric acid levels was significantly stronger after the

intervention with 100g glucose. Finally, regarding hsIL-6 there was significant increase after all 3 interventions ($p = 0,000$).

Conclusion: The intensity of the phenomenon of hyperglycemia does not increase proportionally to the glucose load. When it comes to 'healthy' population hyperglycemia and its impact are transient as there is immediate response of metabolic homeostasis mechanisms and therefore suppression of the phenomenon. Also, levels of hsIL-6 increase dramatically under intense glucose loading conditions, even in normal volunteers indicating activation of subclinical inflammation mechanisms. Finally, increase of hsIL-6 levels is associated with hyperglycemia but not with hyperinsulinemia.

Key words: inflammation, platelets, hyperglycemia, hsIL-6, uric acid

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Φλεγμονή και αιμόσταση

1.1.1 Εισαγωγή

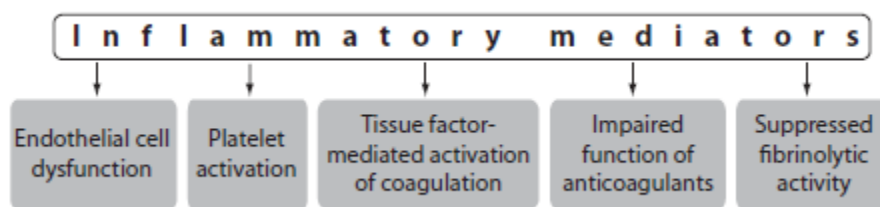
Τα αιμοπετάλια είναι απύρρηνα μυελοειδή κύτταρα του αίματος μοναδικά στα θηλαστικά. Σε κάθε ενήλικο ανθρώπινο οργανισμό εντοπίζονται περίπου ένα τρισεκατομμύριο αιμοπετάλια στην κυκλοφορία του αίματος, ενώ καθημερινά παράγονται 100 δισ. νέα αιμοπετάλια στο μυελό των οστών με μέση διάρκεια ζωής μόνο 8-10 ημέρες το καθένα. Η κύρια λειτουργία τους είναι η αιμόσταση, δηλαδή η κινητοποίηση τους σε περίπτωση τραυματισμού αιμοφόρου αγγείου ώστε να αποφευχθεί η απώλεια αίματος. Αλλάζουν το σχήμα τους, εκκρίνουν σωματίδια και συναθροίζονται σχηματίζοντας θρόμβο αίματος ο οποίος προσκολλάται στο σημείο που υπάρχει η ρήξη. Εκτός από τον κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση της αιμοραγίας και τη θρόμβωση, τα αιμοπετάλια φαίνεται να σχετίζονται άμεσα τόσο με την παρουσία φλεγμονής και το ανοσοποιητικό σύστημα αλλά και με τη ρύθμιση της αγγειογένεσης. Στοιχεία δείχνουν ότι τα αιμοπετάλια κατέχουν σημαντικό ρόλο στη φυσική και επίκτητη ανοσολογική απόκριση του οργανισμού σε φλεγμονώδεις καταστάσεις. Οι μηχανισμοί λειτουργίας των αιμοπεταλίων και η αλληλεπίδραση τους με τη φλεγμονή συνδέονται άμεσα με μεγάλο αριθμό ασθενειών, γεγονός που καθιστά την κατανόηση τους ιδιαίτερα σημαντική.[1-3]

1.1.2 Η επίδραση της φλεγμονής στο αιμοστατικό σύστημα

Φλεγμονή και αιμόσταση είναι στενά αλληλένδετες παθοφυσιολογικές διαδικασίες που επηρεάζουν σημαντικά η μία την άλλη. Σε αυτή την αμφίδρομη σχέση, η φλεγμονή προκαλεί την ενεργοποίηση του αιμοστατικού συστήματος το οποίο με τη σειρά του επηρεάζει εξίσου σημαντικά τη φλεγμονώδη δραστηριότητα. Η ενεργοποίηση του μηχανισμού αιμόστασης κατέχει ουσιαστικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού και στην απόκριση του σε μολυσματικές ή όχι φλεγμονώδεις καταστάσεις. Ο στόχος της φλεγμονής είναι η αποκατάσταση της ακεραιότητας απειλούμενων ή κατεστραμμένων ιστών λόγω τραυματισμού ή λοίμωξης. Από την άλλη πλευρά, η αιμόσταση είναι ένας

φυσιολογικός μηχανισμός άμυνας με στόχο να σταματήσει αιμορραγία που οφείλεται σε βλάβη του τοιχώματος του αγγείου. Ωστόσο, μια υπερβολική και ανεπαρκώς ελεγχόμενη αιμοστατική δραστηριότητα λόγω φλεγμονής μπορεί να λειτουργήσει αρνητικά προκαλώντας θρόμβωση ή/και βλάβη σε όργανα με αποτέλεσμα επιβλαβείς συνέπειες για τον οργανισμό. Συνεπώς, δημιουργείται ένας κύκλος αιμόσταση-φλεγμονή, με τη μια διαδικασία να προάγει την άλλη στα πλαίσια τόσο αλληλεξάρτησης αλλά και συντονισμού.

Η αμφίδρομη σχέση φλεγμονής και αιμοστατικού συστήματος διαφαίνεται σε όλα τα επίπεδα της διαδικασίας της αιμόστασης επηρεάζοντας όλες τις συνιστώσες που συμμετέχουν, συμπεριλαμβανομένων των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων (ECS), των αιμοπεταλίων, τη διαδικασία της πήξης, τις φυσιολογικές αντιπηκτικές διαδικασίες και την ινωδολυτική δραστηριότητα. Κατά τη διάρκεια φλεγμονώδους απόκρισης μεσολαβητές της φλεγμονής, συγκεκριμένα προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, παίζουν κεντρικό ρόλο επιδρώντας σημαντικά στο αιμοστατικό σύστημα. Οι κύριες κυτταροκίνες στην διαδικασία ενεργοποίησης της αιμόστασης που προκαλείται από φλεγμονή είναι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες, ο TNF- α , η IL-1 και η IL-6, οι οποίες είναι πιθανό να προκαλέσουν διαταραχές στην ομαλή λειτουργία του αιμοστατικού συστήματος πλήττοντας διάφορους μηχανισμούς όπως φαίνεται στο σχήμα (Εικόνα 1).[4-6]



Εικόνα 1 Διαταραχές του αιμοστατικού συστήματος σε περίπτωση φλεγμονής.

1.1.3 Διαταραχές στη λειτουργία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων(ECS)

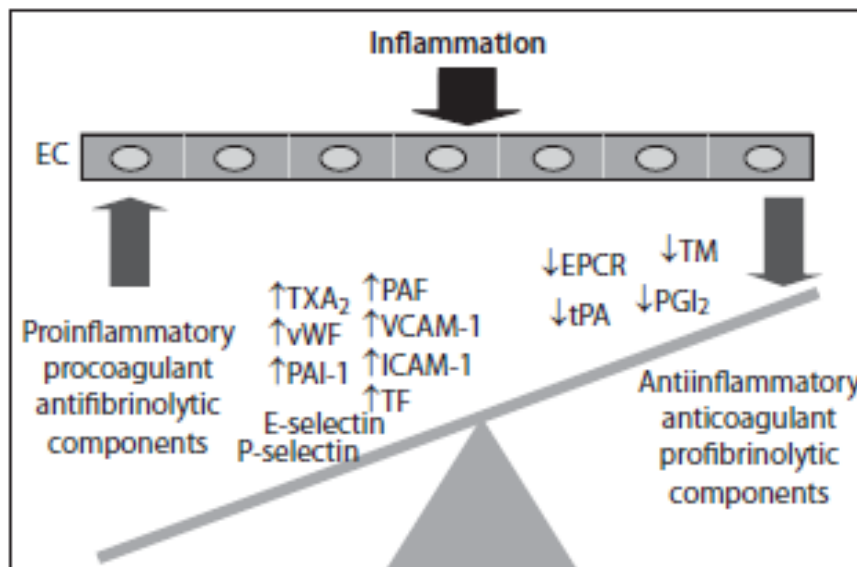
Τα ECS εμπλέκονται ενεργά στην αιμόσταση. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, το ενδοθήλιο λειτουργεί αντιθρομβωτικά εμποδίζοντας την άσκοπη ενεργοποίηση της πήξης. Τα ECS είναι η κύρια πηγή παραγωγής μεσολαβητών με προφλεγμονώδη, προπηκτική και αντινωδολυτική δράση, καθώς και στοιχείων με τις αντίθετες δράσεις,

δηλαδή αντιπηκτική, αντιφλεγμονώδη και προϊνωδολυτική. Όλα αυτά τα στοιχεία είναι απαραίτητα για τη σωστή και ομαλή ρύθμιση του αιμοστατικού συστήματος (Πίνακας 1).

Πίνακας 1 Αναπόσπαστα στοιχεία των αγγειακών ενδοθηλιακών κυττάρων.

Component	Function
Thrombomodulin (TM)	By binding thrombin enables activation of the protein C (PC)
Endothelial protein C receptor (EPCR)	By binding protein C (PC), augments its activation into activated protein C (APC) at the cell surface. It is considered that it also has an important role in anti-inflammatory actions of the APC
Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	Inhibitor of tissue factor-FVIIa complex
Prostacyclin (PGI ₂)	Vasodilator, inhibitor of platelet aggregation and leukocyte adhesion
Nitric oxide (NO)	Vasodilator, inhibitor of platelet aggregation and leukocyte adhesion
Thromboxane A ₂ (TXA ₂)	Vasoconstrictor, stimulates secretion from the platelet granules (agonist for platelet aggregation)
Von Willebrand factor (vWF)	Primary haemostasis: platelet adhesion Secondary haemostasis: carrier protein for coagulation factor VIII
Platelet-activating factor (PAF)	Chemoattraction and rolling of leukocytes to endothelium
Tissue plasminogen activator (tPA)	Plasminogen activator (activation of fibrinolytic system)
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)	Inhibition of fibrinolysis by binding plasminogen activators t-PA and urokinase plasminogen activator (uPA)
Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)	Mediates leukocyte adhesion and endothelial transmigration
Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)	Mediates leukocyte adhesion and endothelial transmigration
P-selectin	Mediates cell interactions between ECs and leukocytes (enables recruitment of leukocytes to the site of injury during inflammation)
E-selectin	Mediates cell interactions between ECs and leukocytes (enables recruitment of leukocytes to the site of injury during inflammation)
Heparan sulphate	Physiologic heparin-like cofactor for anticoagulant activity of antithrombin
Tissue factor (TF)	Activation of plasma coagulation cascade

Ανεξάρτητα από την αιτιολογία της, η φλεγμονή οδηγεί σε μια ανισορροπία μεταξύ προφλεγμονωδών και προπηκτικών και αντιφλεγμονωδών και αντιπηκτικών μηχανισμών του ενδοθηλίου συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στη διαταραχή του αιμοστατικού συστήματος (Εικόνα 2). Σε κατάσταση φλεγμονής τα ECs εκκρίνουν άμεσα κυρίως προπηκτικά ή αντιϊνωδολυτικά στοιχεία, όπως ο παράγοντας von Willebrand (vWF), η θρομβοξάνη A2 (TXA₂) ή τον αναστολέα του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1), ενώ παράλληλα μειώνεται σημαντικά η έκκριση στοιχείων αντιπηκτικής και προϊνωδολυτικής δράσης. Ακόμα, τα ενεργοποιημένα ECs εκφράζουν στην επιφάνειά τους τον ιστικό παράγοντα (TF) και μόρια προσκόλλησης όπως selectin P και E, VCAM-1 και ICAM-1. Τα μόρια προσκόλλησης παίζουν σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των ουδετερόφιλων και των αιμοπεταλίων με το ενδοθήλιο, συμβάλλοντας στη φλεγμονώδη και αιμοστατική απόκριση του οργανισμού. Λόγω της διαταραχής που προκαλεί η φλεγμονή στη λειτουργία των ECs η αντιπηκτική, αντιφλεγμονώδη και αγγειοδιασταλτική δράση αντικαθιστάται από μια προφλεγμονώδη και προπηκτική κατάσταση. Είναι ξεκάθαρο λοιπόν ότι σε κατάσταση φλεγμονής το ενδοθήλιο δρα ρυθμιστικά στη σκόπιμη ενεργοποίηση της αιμόστασης,



Εικόνα 2 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία των κυττάρων που επάγεται από φλεγμονή.

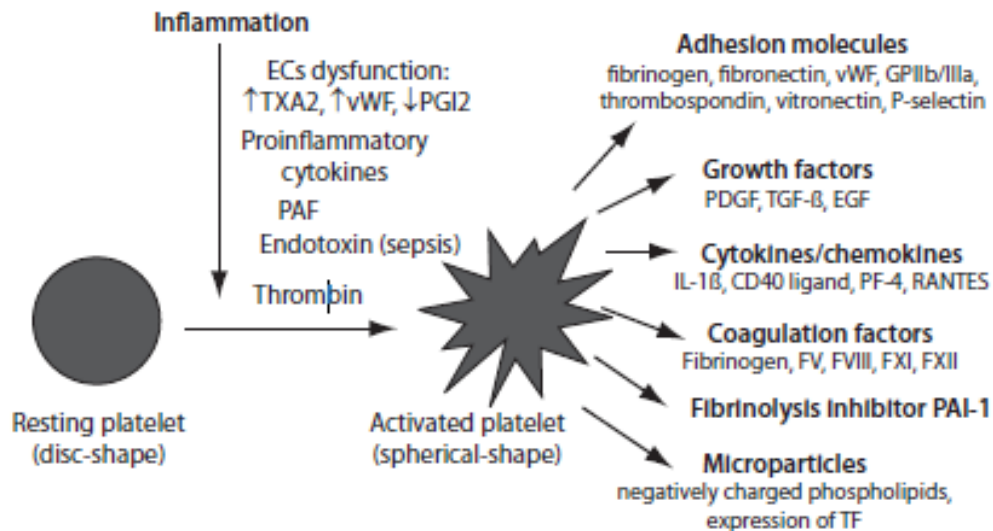
Τα ECs επηρεάζουν όλους τους μηχανισμούς που συμβάλουν στη διαταραχή του αιμοστατικού συστήματος λόγω φλεγμονής όπως την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

και άλλων φλεγμονωδών κυττάρων (ιδίως λευκοκυττάρων), την παραγωγή και ρύθμιση θρομβίνης καθώς και τη καταστολή λειτουργίας των φυσιολογικών αντιπηκτικών και τη μείωση της ινωδολυτικής δραστηριότητας. Οι φυσιολογικοί αναστολείς της πήξης όπως η πρωτεΐνη C και ο αναστολέας της οδού του ιστικού παράγοντα (TFPI) είναι άμεσα συνδεδεμένοι με το ενδοθήλιο με αποτέλεσμα τα ECs να επηρεάζουν καταλυτικά όλους τους αντιπηκτικούς μηχανισμούς, ενώ παράλληλα προκαλούν καταστολή της ινωδολυτικής δραστηριότητας. Όλες οι παραπάνω μεταβολές στη λειτουργία των ECs καταλήγουν στη διοχέτευση προπηκτικών στοιχείων στην κυκλοφορία του αίματος και συμβάλουν στη δημιουργία ενός προθρομβωτικού περιβάλλοντος σε κατάσταση φλεγμονής.[5, 7]

1.1.4 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων λόγω φλεγμονής

Εκτός από το σημαντικό ρόλο τους στην αιμόσταση, τα αιμοπετάλια δρουν ως προφλεγμονώδη κύτταρα σε κατάσταση φλεγμονής. Τα αιμοπετάλια υπάρχουν στην κυκλοφορία του αίματος σε κατάσταση ηρεμίας λόγω της δράσης ανασταλτικών μεσολαβητών, όπως το μονοξείδιο του αζώτου (NO) και της προστακυκλίνης (PGI₂) που εκκρίνονται από τα ECs. Η διαταραχή λοιπόν της λειτουργίας των ECs έχει ως συνέπεια την αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων λόγω αυξημένης παραγωγής TXA₂ και vWF και μειωμένης παραγωγής PGI₂. Όταν υπάρχει τραυματισμός αγγείου τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και προσκολλώνται στο σημείο τραυματισμού με τη βοήθεια κυτταρικών υποδοχέων και πρωτεϊνών προσκόλλησης και ρύθμισης που εξασφαλίζουν την αλληλεπίδραση αιμοπεταλίου-αγγείου και στη συνέχεια το σχηματισμό θρόμβου. Ωστόσο, σε κατάσταση φλεγμονής τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται άμεσα με τη βοήθεια φλεγμονωδών μεσολαβητών όπως προφλεγμονωδών κυτταροκινών ή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) ή της ενδοτοξίνης στην περίπτωση σήψης. Η θρομβίνη που παράγεται κατά τη διαδικασία πήξης είναι ακόμα ένας σημαντικός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται, αλλάζουν το σχήμα τους σε σφαιρικό και εκκρίνουν τοπικά ένα σύνολο προφλεγμονωδών και προπηκτικών στοιχείων, όπως μόρια προσκόλλησης, αυξητικούς παράγοντες, κυτταροκίνες και χημειοκίνες, παράγοντες πήξης και ινωδολυτικούς

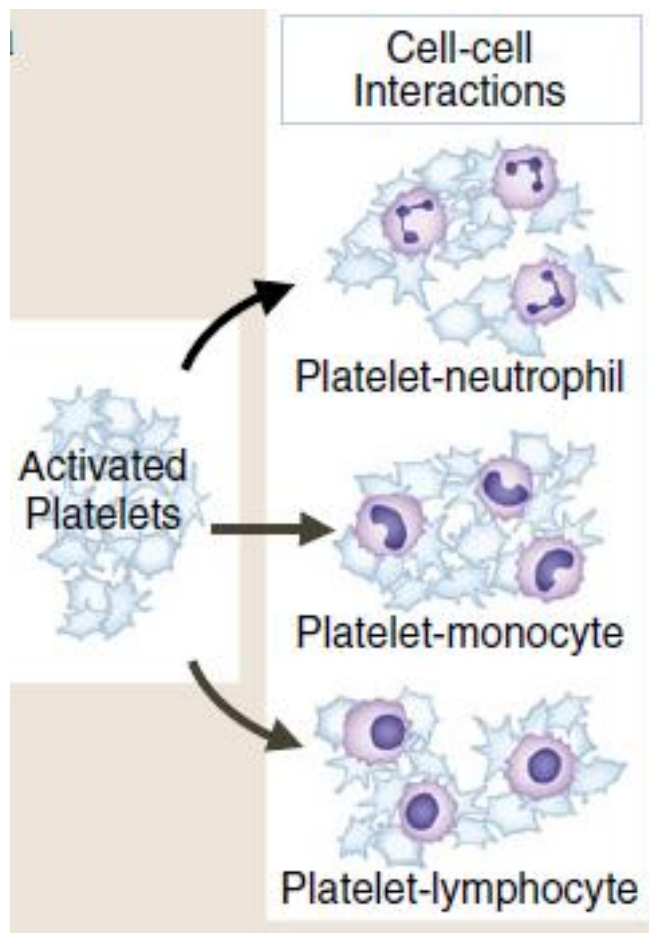
αναστολείς PAI-1. Τέλος, τα αιμοπετάλια είναι δυνατό να παράγουν προπηκτικά σωματίδια που ονομάζονται μικροσωματίδια (MPs), τα οποία είναι στην πραγματικότητα θραύσματα ενεργοποιημένων ή αποπτωτικών κυττάρων, και είναι σημαντικά στην πήξη και την έκφραση του TF συμβάλλοντας στο προθρομβωτικό στάδιο (Εικόνα 3).



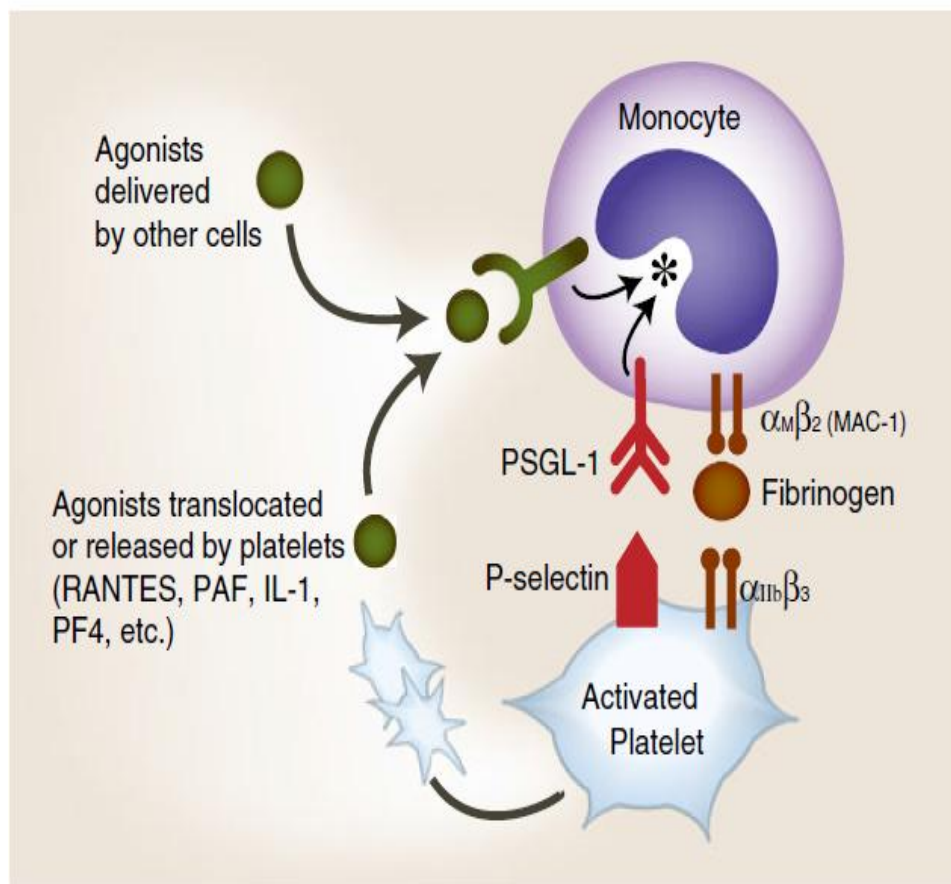
Εικόνα 3 Ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σε κατάσταση φλεγμονής.

Τα αιμοπετάλια μεσολαβούν ρυθμίζοντας τη λειτουργία άλλων αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και ECs. Για παράδειγμα, ενεργοποιημένα αιμοπετάλια εκκρίνουν IL-1β η οποία ενεργοποιεί τα ECs. Η αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων και ECs έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση IL-6 και μονοκυτταρικής χημειοτακτικής πρωτεΐνης 1 (MCP-1) από ECs, καθώς και την έκφραση των μορίων προσκόλλησης E-σελεκτίνη, VCAM-1 και ICAM-1 στην επιφάνεια των ECs. Ακόμα, τα αιμοπετάλια αλληλεπιδρούν με ουδετερόφιλα προσελκύοντας τα στην περιοχή της φλεγμονής ώστε να συμβάλουν στην άμυνα του ξενιστή. Γενικά, η P-σελεκτίνη λειτουργεί ως μια πρωτεΐνη προσκόλλησης που βρίσκεται στην επιφάνεια των αιμοπεταλίων και ευθύνεται για την αλληλεπίδραση τους με τα φλεγμονώδη κύτταρα. Συγκεκριμένα, όταν ενεργοποιηθεί το αιμοπετάλιο η P-σελεκτίνη μεταφέρεται στην επιφάνεια του κυττάρου και λειτουργεί ως υποδοχέας για το φυσιολογικό του συνδέτη, P-selectin glycoprotein ligand (PSGL-1), που εντοπίζεται σε

ουδετερόφιλα, μονοκύτταρα και ECs μεσολαβώντας στην αλληλεπίδραση αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων-ECs (Εικόνα 4). Συνεπώς, η P-σελεκτίνη εξασφαλίζει τις διαδικασίες που οδηγούν στην αύξηση της παραγωγής προφλεγμονωδών κυτταροκινών και χημειοκινών στα ουδετερόφιλα και μονοκύτταρα και της έκφρασης μορίων προσκόλλησης και του TF σε λευκοκυττάρων και ECs(Εικόνα 5).[6-8]



Εικόνα 4 Ενεργοποιημένα ανθρώπινα αιμοπετάλια σχηματίζουν ετεροτυπικά συσσωματώματα με ουδετερόφιλα και άλλα κοκκιοκύτταρα (ηωσινόφιλα, βασεόφιλα), μονοκύτταρα και λεμφοκύτταρα πολλών υποκατηγοριών.

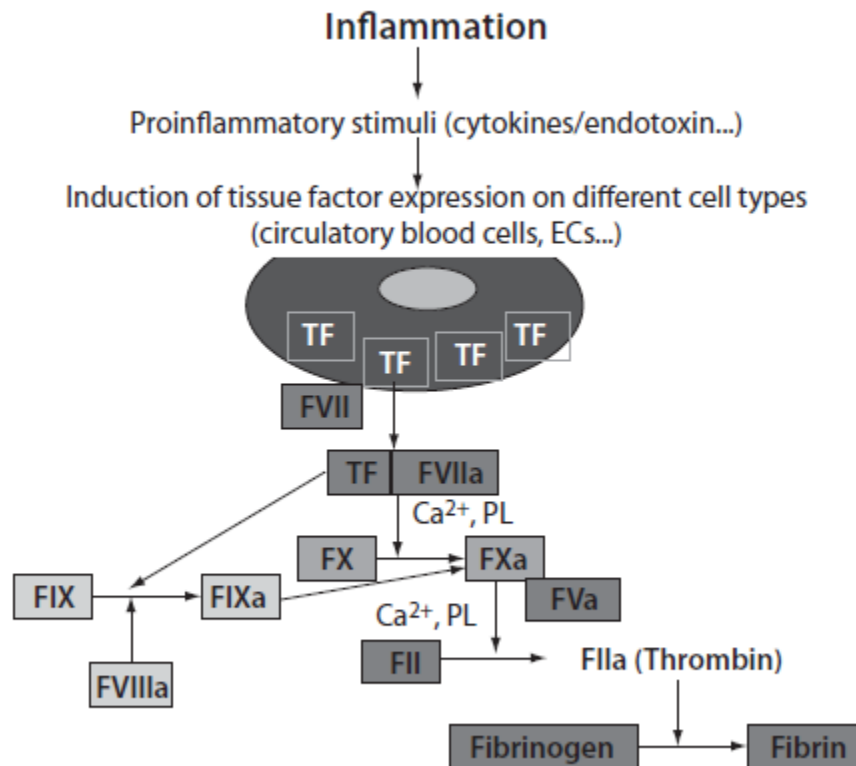


Εικόνα 5 Τα ενεργοποιημένα ανθρώπινα αιμοπετάλια προσκολλώνται σε μονοκύτταρα.

1.1.5 Η ενεργοποίηση των αντιδράσεων της πήξης του πλάσματος σε κατάσταση φλεγμονής.

Σε κατάσταση φλεγμονής οι αντιδράσεις της πήξης του πλάσματος ενεργοποιούνται με τη μεσολάβηση του TF, μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη που εκφράζεται σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, συμπεριλαμβανομένων των κυττάρων που κυκλοφορούν στο αίμα και των Ecs. Ακόμα, εντοπίζεται στα αγγειακά τοιχώματα ώστε να είναι εφικτή η άμεση ενεργοποίηση της πήξης σε περίπτωση ρήξης. Σε αντίθεση με άλλους παράγοντες που επηρεάζουν την πήξη του αίματος, ο TF δεν βρίσκεται σε άμεση επαφή με το αίμα. Ωστόσο, σε περίπτωση ρήξης αγγείου ή λόγω προφλεγμονωδών παραγόντων, όπως κυταροκίνες (TNF-α, IL-1, IL-6) ή ενδοξίνης, ο TF εκφράζεται σε διάφορους κυτταρικούς τύπους συμπεριλαμβανομένων των

λευκοκυττάρων και των ECs. Με αυτό το τρόπο ο TF έρχεται σε επαφή με το αίμα και στη συνέχεια προσδένεται στο FVII και το σύμπλοκο TF-FVIIa με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των αντιδράσεων της πήξης με τη βοήθεια του παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF) αλλά και την παραγωγή θρομβίνης, η οποία μετατρέπει το ινωδογόνο σε ινώδες (Εικόνα 6).



Εικόνα 6 Ενεργοποίηση της πήξης με τη μεσολάβηση του TF σε κατάσταση φλεγμονής.

Είναι γνωστό ότι η θρομβίνη και ο PAF παράγονται από τα κύτταρα του ξενιστή σε κατάσταση φλεγμονής. Η θρομβίνη αποτελεί μια πρωτεΐνη με πολλές φυσιολογικές λειτουργίες καθώς δρα στη προπηκτική φάση και σε διαφορετικά επίπεδα, πέρα από τη μετατροπή ινωδογόνου σε ινώδες, αποτελεί η ίδια έναν ισχυρό ενεργοποιητή των αιμοπεταλίων και εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της πήξης ενεργοποιώντας τους παράγοντες V, VIII, XI και XIII. Σημαντική είναι και η εμπλοκή της θρομβίνης και του PAF σε προφλεγμονώδεις καταστάσεις όπου ενεργοποιούν τα φλεγμονώδη κύτταρα

(λευκοκύτταρα και ECs) με συνέπεια την αύξηση της παραγωγής φλεγμονωδών μεσολαβητών και αυξημένη προσκόλληση λευκοκυττάρων. Τέλος, η θρομβίνη αποτελεί σημαντικό ρυθμιστή της κυτταρικής ενεργοποίησης μέσω της σύνδεσης της με τους ενεργοποιημένους από πρωτεάση υποδοχείς (PARs) που εντοπίζονται σε αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα και Ecs. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης διευκολύνεται με την ύπαρξη κατάλληλου φωσφολιπιδίου. Συγκεκριμένα, οι αντιδράσεις της πήξης συμβαίνουν στην επιφάνεια της μεμβράνης όπου υπάρχουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, υπάρχουν λίγα αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια που εκτίθενται στο αίμα. Ωστόσο, τόσο τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αλλά και τα ECs μεταφέρουν αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια στην επιφάνεια τους εξασφαλίζοντας έτσι την άμεση παραγωγή θρομβίνης και καθιστούν το μηχανισμό της πήξης λιγότερο ευαίσθητο σε αναστολείς πρωτεάσης. [5-7]

1.1.6 Η επίδραση του αιμοστατικού συστήματος στη φλεγμονώδη απόκριση

Έχει αναφερθεί ξανά η αμφίδρομη σχέση που συνδέει το αιμοστατικό σύστημα με τη φλεγμονή και είναι πλέον τεκμηριωμένο ότι το αιμοστατικό σύστημα επηρεάζει σημαντική την απόκριση του οργανισμού σε περίπτωση φλεγμονής. Ο PAF, η θρομβίνη, το FXa και το σύμπλεγμα TF-FVIIa, που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση του αιμοστατικού συστήματος, έχουν τη δυνατότητα να επηρεάζουν άμεσα τα κύτταρα που εμπλέκονται στην φλεγμονώδη απόκριση (αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα και ECs) με συνέπεια την αυξημένη παραγωγή των προφλεγμονωδών μεσολαβητών. Ο βασικός μηχανισμός μέσω του οποίου οι ενεργοποιημένοι παράγοντες πήξης εντείνουν την απόκριση του οργανισμού στη φλεγμονή είναι η σύνδεση τους με τους PARs. Η οικογένεια των υποδοχέων αυτών αποτελείται από 4 μέλη, τους PAR-1,2,3 και PAR-4, και εντοπίζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων όπως ECs, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, ινοβλάστες και κύτταρα λείων μυών. Οι υποδοχείς αυτοί αποτελούν τους συνδέτες του εαυτού τους που σημαίνει ότι όταν ένας ενεργοποιημένος παράγοντας πήξης επιφέρει πρωτεολυτική διάσπαση ενός PAR, ενεργοποιείται αυτόματα ο ίδιος υποδοχέας. Οι συγκεκριμένοι υποδοχείς αφού διασπαστούν πρωτεολυτικά στην περιοχή

του διακυτταρικού αμινοτελικού άκρου τους (N-terminus), εκθέτουν ένα καινούριο άκρο που λειτουργεί ως συνδέτης για τον ίδιο υποδοχέα με αποτέλεσμα τη διαμεμβρανική μεταγωγή σήματος και την επακόλουθη αυξημένη φλεγμονώδη απόκριση. Οι υποδοχείς PAR-1,3 και 4 είναι υποδοχείς θρομβίνης ενώ ο PAR-2 είναι δυνατό να ενεργοποιηθεί μέσω του συμπλέγματος TF-FVIIa ή του FXa. Η σύνδεση ενεργοποιημένου παράγοντα πήξης-PAR έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη φλεγμονώδη απόκριση προκαλώντας τη παραγωγή προφλεγμονωδών μεσολαβητών, όπως κυτταροκίνες, χημειοκίνες, αυξητικοί παράγοντες και μόρια κυτταρικής προσκόλλησης. Συμπερασματικά, οι PARs κατέχουν πολύ σημαντικό ρόλο στη σχέση αιμόστασης και φλεγμονής.

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι και τα αιμοπετάλια συμβάλουν στην ενίσχυση της φλεγμονώδους απόκρισης, ιδιαίτερα σε περίπτωσης χρόνιας φλεγμονής όπως η αθηροσκλήρωση. Ακόμα, το ινωδογόνο καθώς και ινώδες, τα οποία αναφέρθηκαν νωρίτερα, συμμετέχουν στην κυτταρική ενεργοποίηση σε κατάσταση φλεγμονής με την ιδιότητα τους να στρατολογούν και να ενεργοποιούν τα λευκοκύτταρα μέσω της σύνδεσης τους προς τους ειδικούς υποδοχείς, όπως οι Toll-like υποδοχείς (TLR), που εντοπίζονται στην επιφάνεια των φλεγμονωδών κυττάρων. Το ινωδογόνο και το ινώδες διεγείρουν την έκφραση προφλεγμονωδών κυτταροκίνες (TNF- α , IL-1 β) σε μονοκύτταρα και χημειοκινών (IL-8, MCP-1) σε ECs και ινοβλάστες.[5]

1.1.7 IL-6

1.1.7.1 Γενικά

Οι κυτταροκίνες παράγονται από πολλούς διαφορετικούς τύπους κυττάρων και συχνά είναι υπεύθυνες για τη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού ή της διαφοροποίησης τους, ανάλογα με τον τύπο και τη κατάσταση των κυττάρων. Η ιντερλευκίνη IL-6 είναι γνωστή για πολυάριθμες δράσεις με πιο σημαντική τη δράση της στο ανοσοποιητικό σύστημα. Η IL-6 θεωρείται ως επί το πλείστον μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη με πολύ σημαντική αναγεννητική ή αντι-φλεγμονώδη δράση.[9]

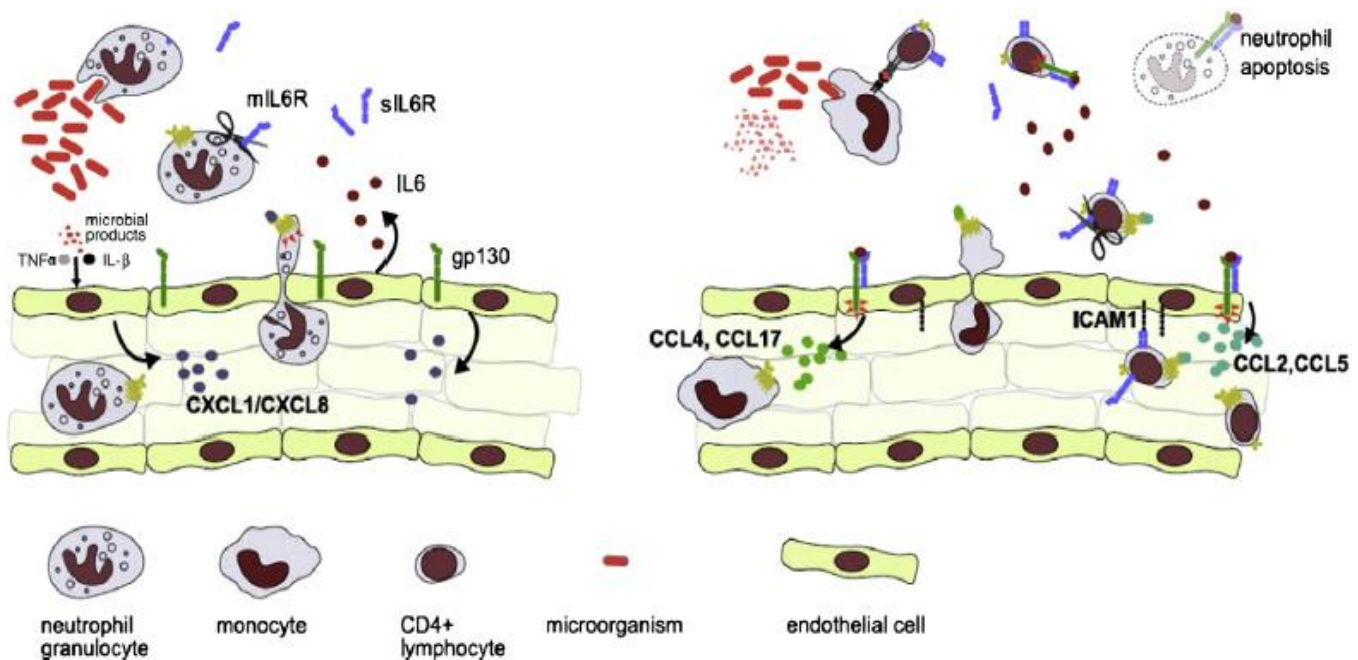
1.1.7.2 IL-6 και ανοσοποιητικό σύστημα

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος στοιχείων που υποδεικνύουν ότι η IL-6 κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη μετάβαση από την έμφυτη στην επίκτητη ανοσία. Η οξεία φλεγμονή χαρακτηρίζεται από μια αρχική διήθηση των ουδετερόφιλων, τα οποία στη συνέχεια αντικαθίστανται από μονοκύτταρα και T-κύτταρα μετά 24 με 48 ώρες προκειμένου να αποφευχθεί αυξημένη βλάβη των ιστών από τη συσσώρευση των πρωτεασών που εκκρίνονται από ουδετερόφιλα και ROS στο σημείο της φλεγμονής. Τα ECs, καθώς και άλλα αγγειακά στοιχεία που ενεργοποιούνται από μικροβιακά προϊόντα, IL-1β ή TNFα, παράγουν διάφορες χημειοκίνες όπως η IL-6, με αποτέλεσμα την προσέλκυση των ουδετερόφιλων στην αρχική φάση. Η πρωτεολυτική διεργασία της IL-6R λόγω της εισβολής των ουδετερόφιλων οδηγεί στη προσέλκυση μονοκυττάρων αντί ουδετερόφιλων κυρίως καταστέλλοντας κυρίως χημειοκίνες που προσελκύουν ουδετερόφιλα προσέλκυση (CXCL1 / GROα, CXCL8 / IL-8, CX3CL1) και ενισχύοντας παράλληλα χημειοκίνες που προσελκύουν μονοκύτταρα (CCL2/MCP-1, CCL8/MCP-2, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2) . Επίσης, μόρια κυτταρικής προσκόλλησης όπως ICAM-1, VCAM-1, και CD62E (E-σελεκτίνη) που βρίσκονται στα ECs, καθώς και η L-σελεκτίνη (CD62L) που βρίσκεται στα λεμφοκύτταρα επηρεάζονται από την IL-6 με αποτέλεσμα την ενίσχυση της μετανάστευσης των λευκοκυττάρων. Η IL-6 φαίνεται να παρεμβαίνει στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα ενισχύοντας την έκφραση του υποδοχέα M-CSF. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι τα στοιχεία που υποδεικνύουν ότι η IL-6 αυξάνει την απόπτωση ουδετερόφιλων ενισχύει τη θεωρία ότι η IL-6 συμβάλλει σημαντικά στη διήθηση των ουδετερόφιλων. Τέλος, εκτός από τον ρόλο της στην προσέλκυση και την προστασία κατά της απόπτωσης των T λεμφοκυττάρων, η IL-6 παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση των B και T κυττάρων. Άλλωστε, ο λόγος που έφερε την IL-6 στο προσκήνιο για περαιτέρω έρευνα ήταν η δράση της ως παράγοντας ενίσχυσης της παραγωγής αντισωμάτων και της ανάπτυξης των νεοπλασμάτων B γενιάς.[10]

1.1.7.3 IL-6 και μεταβολικός έλεγχος

Αρκετές έρευνες παρατήρησαν την εμπλοκή της IL-6 στον έλεγχο του μεταβολισμού. Διαπιστώθηκε έκκριση IL-6 τόσο από τα μυϊκά κύτταρα μετά από

άσκηση, αλλά και από τα λιποκύτταρα των παχύσαρκων ατόμων. Αυτό είχε ως συνέπεια τη συσχέτιση της IL-6 με την ύπαρξη ήπιας φλεγμονής (Εικόνα 7). Έρευνες που έγιναν σε ποντίκια έδειξαν ότι η απουσία της IL-6 οδηγεί σε ινσουλινοαντίσταση και ανοχή στη γλυκόζη. Ακόμα, είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι υπάρχουν ενδείξεις που συνδέουν την αναστολή της σηματοδότησης της IL-6 με εξασθενημένη μεταβολική ομοιόσταση το ανθρώπινου οργανισμού. Συμπερασματικά, φαίνεται η IL-6 να επιδρά στον ηπατικό έλεγχο και να σχετίζεται με την ινσουλινοευαισθησία και την ανοχή στη γλυκόζη.[10]

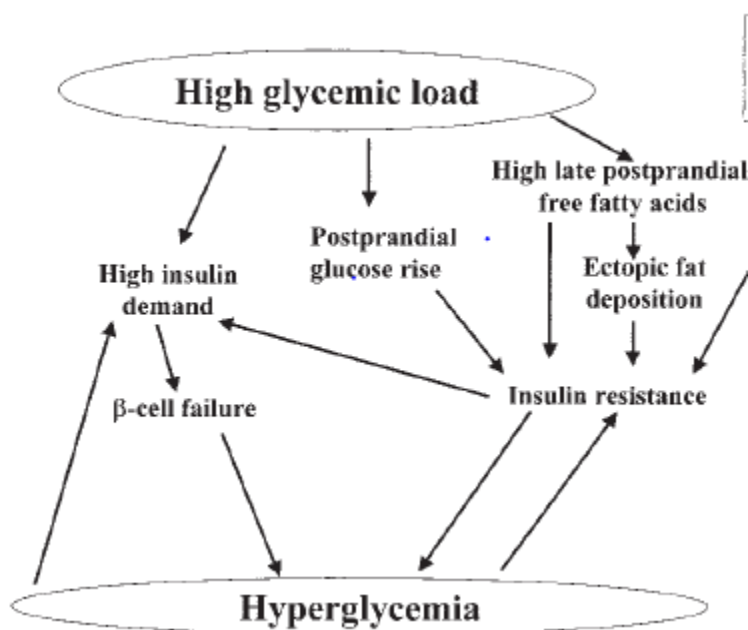


Εικόνα 7 Αριστερά: κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης της φλεγμονής, τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν IL-6, καθώς και μια πληθώρα των χημειοκινών, που οδηγεί στην έλξη των ουδετερόφιλων. Δεξιά: ενδοθηλιακά κύτταρα διεγείρονται από την IL-6, οδηγώντας σε αλλαγή της έκφρασης της χημειοκίνης, με αποτέλεσμα κυρίως στην προσέλκυση μονοκυττάρων και T-λεμφοκύτταρα.

1.2 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και μηχανισμοί αιμόστασης

1.2.1 Ορισμός μεταγευματική υπεργλυκαιμία και η σημασία της

Η διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα είναι πολύ σημαντική και ρυθμίζεται από το ήπαρ με τη βοήθεια ορμονών που εκκρίνονται από τα επινεφρίδια, όπως η ινσουλίνη, η γλυκαγόνη και οι γλυκοκορτικοειδείς ορμόνες. Μετά την κατανάλωση ενός γεύματος είναι αναμενόμενο τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα να αυξάνονται, η κατάσταση αυτή ονομάζεται μεταγευματική υπεργλυκαιμία. Θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και διαταραχή της ρύθμισης της ομοιόστασης της γλυκόζης, της οποίας τα συμπτώματα σχετίζονται με το σακχαρώδη διαβήτη και αποτελούν χαρακτηριστικό παράδειγμα των επιπτώσεων του (Εικόνα 8). Κατά την κατανάλωση ενός γεύματος μετά τα πρώτα 10 λεπτά αυξάνεται η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα, ως αποτέλεσμα της διεργασίας της πέψης των υδατανθράκων, στα 30-60 λεπτά σημειώνεται η μέγιστη τιμή της η οποία και επανέρχεται στα επίπεδα νηστείας 2 ώρες μετά το γεύμα.[11, 12]



Εικόνα 8 Μηχανισμούς που συνδέουν ένα υψηλό γλυκαιμικό φορτίο με την υπεργλυκαιμία και τη πιθανή ανάπτυξη διαβήτη τύπου 2.

Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα μεταγευματικά αίμα έχει ως αποτέλεσμα την διέγερση των β κυττάρων του παγκρέατος για την έκκριση ινσουλίνης, συνεπώς σε περίπτωση υπεργλυκαιμίας παρατηρείται και υπερινσουλιναιμία. Έχει αποδειχθεί ότι η υπεργλυκαιμία ή/και η υπερινσουλιναιμία συνδέονται με την αύξηση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων και φαίνεται να αυξάνουν τα ποσοστά θνησιμότητας ασθενών σε κρίσιμη κατάσταση, γεγονός που καθιστά τη μεταγευματική αυτή κατάσταση πολύ σημαντικό αντικείμενο έρευνας. Ένα έντονο μεταγευματικό υπεργλυκαιμικό και υπερινσουλιναιμικό φορτίο στον οργανισμό είναι ικανό να προκαλέσει οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση του συστήματος πήξης, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και φλεγμονή. Αρκετές έρευνες έχουν ασχοληθεί με τη διερεύνηση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας και έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι, εκτός από την αρνητική επίδραση της υπεργλυκαιμίας στην αντιμικροβιακή άμυνα του οργανισμού, υπάρχουν ενδείξεις που συνδέουν την υπεργλυκαιμία με την υπερενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Υπάρχουν πλέον στοιχεία ότι η υπεργλυκαιμία και/ή η υπερινσουλιναιμία επηρεάζουν και διαμορφώνουν τους μηχανισμούς πήξης του πλάσματος. Συγκεκριμένα, έχουν παρατηρηθεί ανωμαλίες στις πρωτεΐνες του πλάσματος που εμπλέκονται στην πήξη του αίματος, στην ινωδόλυση και στη λειτουργία των αιμοπεταλίων.[13, 14]

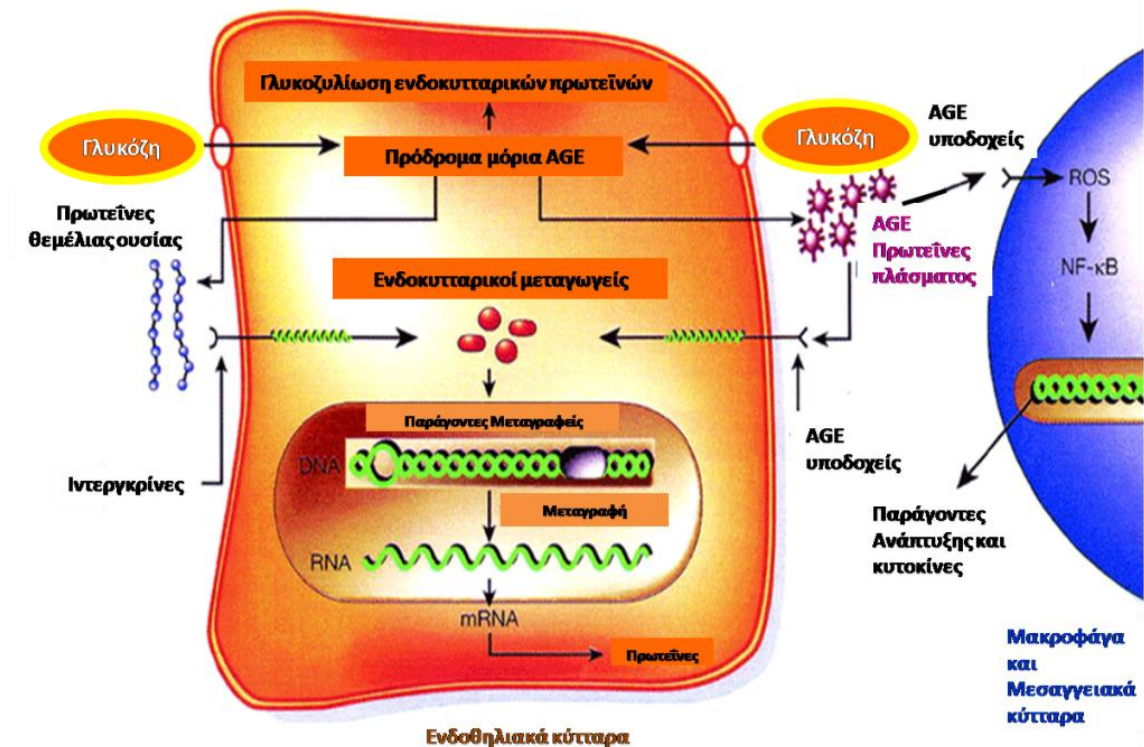
1.2.2 Οι επιπτώσεις της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας

Η υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει σημαντικές βλάβες στον οργανισμό όπως μειωμένη εγκεφαλική ροή του αίματος, ενδοκυτταρική οξέωση και χαμηλά επίπεδα ATP με μηχανισμούς που έχουν παρόμοια δράση σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Σε περίπτωση υπεργλυκαιμίας πλήττεται το αγγειακό σύστημα, τα κύτταρα που καταστρέφονται πρωτίστως είναι αυτά που αδυνατούν να ρυθμίσουν αποτελεσματικά την ενδοκυτταρική συγκέντρωση γλυκόζης (νευρώνες, ενδοθήλιο των τριχοειδών, νεφρικά κύτταρα). Προκαλείται αυξημένη ενεργοποίηση της οδού των πολυολών, ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής κινάσης C, αυξημένο οξειδωτικό στρες, αυξημένη παραγωγή και δράση των τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και αυξημένη ενεργοποίηση της οδού της εξοζαμίνης. Η υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει μεταβολές στα μονοπάτια

μεταγωγής σήματος με αποτέλεσμα κυτταρικές δυσλειτουργίες και βλάβη του αγγειακού ιστού. Επίσης, είναι δυνατή η αναστολή ενδογενών παραγόντων προστασίας που παίζουν σημαντικό ρόλο στη διατήρηση της ομοιοστασίας του αγγειακού συστήματος όπως η ινσουλίνη, ο αυξητικός παράγοντας του αγγειακού ενδοθηλίου, ο αυξητικός παράγοντας που εκκρίνουν τα αιμοπετάλια και η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη C. Συμπερασματικά, είναι φανερό ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία επηρεάζει τον ανθρώπινο οργανισμό σε διαφορετικά επίπεδα και βαθμούς. Θα μπορούσαμε να πούμε ότι τον καθιστά σε μια παθολογική μεταβολικά κατάσταση πλήττοντας τόσο τις ιδιότητες αλλά και τη λειτουργία διαφορετικών κυτταρικών τύπων συμπεριλαμβανομένων του ενδοθηλίου και των αιμοπεταλίων.[15-17]

1.2.3 Ενδοθηλιακή δυσλειτουργία- προϊόντα προχωρημένης γλυκοζυλίωσης

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η ενδοθηλιακή δυσλειτουργία που είναι μία από της επιπτώσεις της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό στους ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 και σχετίζεται άμεσα με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο. Η αύξηση του οξειδωτικού στρες σε συνδυασμό με τα παρατεταμένα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης που παρατηρείται στο περιβάλλον της υπεργλυκαιμίας επιταχύνει τη γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων για την παραγωγή προηγμένων τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs). Τα AGEs συσσωρεύονται στα αγγειακά τοιχώματα και είναι δυνατό να προκαλέσουν άμεσα διαταραχές στη δομή των κυττάρων και τη λειτουργία τους. Οι υποδοχείς για την ενεργοποίηση των AGEs (RAGE) που βρίσκονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα αναστέλλουν τη βιοσύνθεση του NO μειώνοντας τη συνθάση του ενδοθηλιακού νιτρικού οξειδίου (eNOS) και αυξάνοντας την παραγωγή δραστικών μορφών οξυγόνου. Τέλος, η ενεργοποίηση των RAGE επάγει την ενδοθηλιακή έκφραση των μορίων κυτταρικής προσκόλλησης, του ιστικού παράγοντα, των προφλεγμονωδών κυτοκινών και της μονοκυτταρικής χημειοελκικής πρωτεΐνης-1 (Εικόνα 9).[17-19]



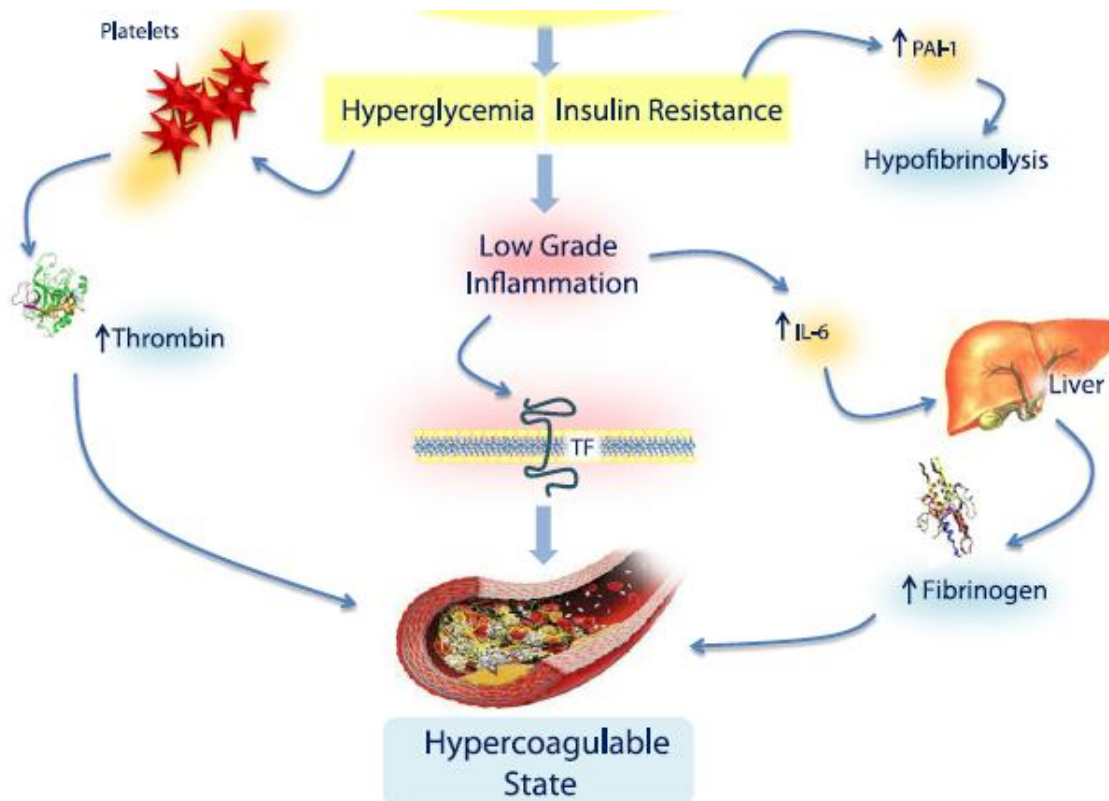
Εικόνα 9 Η υπεργλυκαιμία προκαλεί αυξημένη παραγωγή AGEs. Η σύνδεση των AGEs με τον υποδοχέα RAGE στα μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή κυτοκινών και παραγόντων ανάπτυξης.

1.2.4 Ενεργοποίηση της πήξης

Η υπεργλυκαιμία, όπως και ο σακχαρώδης διαβήτης, σχετίζονται με μεταβολές τόσο στη προ-θρομβωτική αλλά και στην αντι-ινωδολυτική φάση και διάφορα μόρια όπως ο αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI) -1, ο TF και ο vWF είναι δυνατό να λειτουργούν ως δείκτες της ενδοθηλιακής λειτουργίας. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και τα μακροφάγα επηρεάζουν τη διαδικασία της πήξης προκαλώντας αλλαγές στις διεργασίες της λόγω της αυξημένης έκφρασης του PAI-1, του TF, της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και των αντιδράσεων οξείας φάσης που αυξάνουν τα επίπεδα των παραγόντων της πήξης, όπως το ινωδογόνο. Είναι σημαντικό να

αναφέρουμε ότι έρευνες συνδέουν τα ανεβασμένα επίπεδα ινωδογόνου στο πλάσμα με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη.

Συμπερασματικά, σε περίπτωση υπεργλυκαιμίας εκτός από την αύξηση των επιπέδων του TF στην κυκλοφορία, παρατηρείται αυξημένη έκφραση του TF στα μονοκύτταρα. Για τις μεταβολές αυτές υπεύθυνες είναι τόσο η γλυκόζη όσο και η ινσουλίνη που δρουν συνεργιστικά προσφέροντας ένα αθροιστικό αποτέλεσμα. Συνεπώς, τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης προκαλούν ακόμα εντονότερη αύξηση της προπηκτικής δραστηριότητας του TF, που σχετίζεται με την αύξηση του συμπλέγματος θρομβίνης-αντιθρομβίνης (TAT). Γενικά, όλες οι μεταβολές που αναφέρθηκαν παραπάνω αποτελούν τους μηχανισμούς ενεργοποίησης της διαδικασίας της πήξης που κινητοποιεί μια υπεργλυκαιμική κατάσταση (Εικόνα 10).[17, 20]



Εικόνα 10 Μηχανισμοί που οδηγούν στην ενεργοποίηση της διαδικασίας της πήξης σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας και υπερινσουλιναϊμίας.

1.2.5 Ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

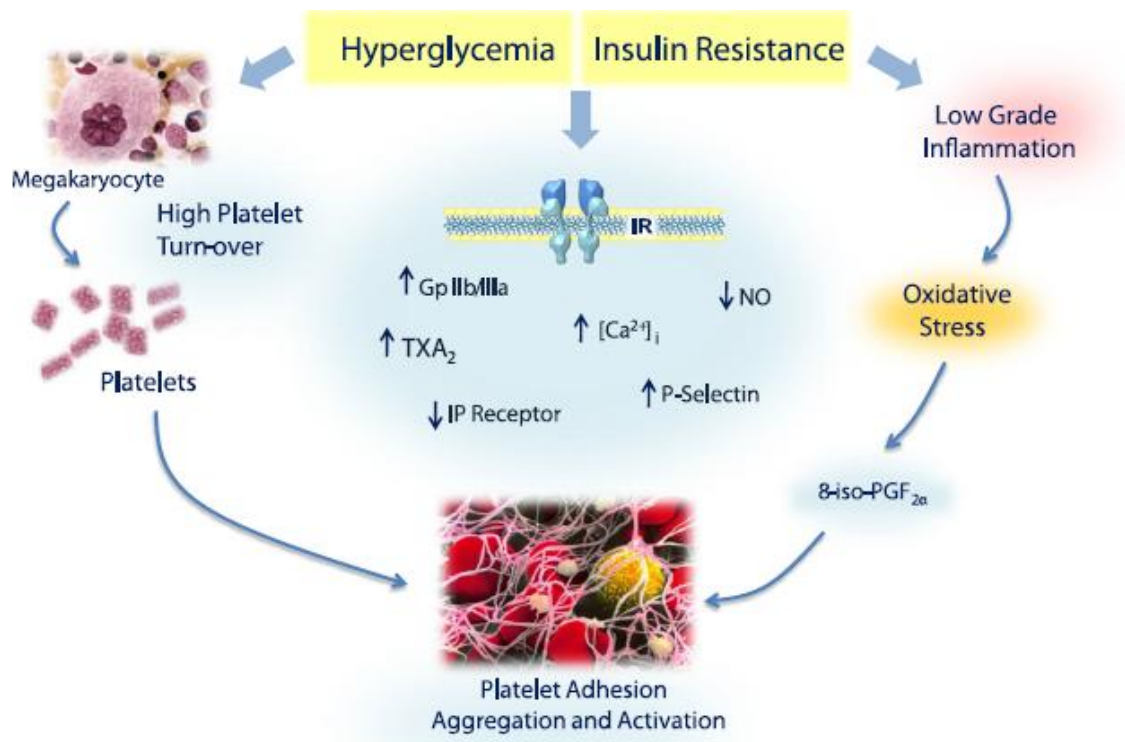
Είναι πλέον αποδεδειγμένο ότι η υπεργλυκαιμία και η ινσουλιναιμία επιφέρουν αλλαγές στη διαδικασία της πήξης. Η αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου από τα μιτοχόνδρια στηρίζει τη σχέση αιτίας-αιτιατού που φαίνεται να συνδέει τα παρατεταμένα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα με τους μηχανισμούς που επιφέρουν επιβλαβείς αλλαγές στον οργανισμό συμπεριλαμβανομένης της αυξημένης παραγωγής ROS με αποτέλεσμα την υπερενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και τη συσσώρευση τους. Ενώ τα επίπεδα γλυκόζης επηρεάζουν άμεσα τα αιμοπετάλια και προκαλούν τη συσσώρευση τους, δεν μπορούμε να πούμε ότι η ινσουλίνη έχει την ίδια επίδραση όταν αναφερόμαστε μόνο σε υπερινσουλιναιμία. Τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται και συσσωρεύονται όταν σημειώνονται ανεβασμένα επίπεδα ινσουλίνης σε συνδυασμό όμως, με ανεβασμένα επίπεδα γλυκόζης. Συνεπώς, η υπεργλυκαιμία και η υπερινσουλιναιμία είναι δύο καταστάσεις που επηρεάζουν συνεργιστικά τα αιμοπετάλια.[21, 22]

Είναι γνωστό, από παλιότερες έρευνες, ότι το NO είναι υπεύθυνο για την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Νεότερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι η υπεργλυκαιμία υπερενεργοποιεί και συναθροίζει τα αιμοπετάλια μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του NO. Επίσης, γνωρίζοντας ότι σε περίπτωση διαταραγμένου γλυκαιμικού ελέγχου αυξάνεται η παραγωγή ελευθέρων ριζών μπορεί να εξηγηθεί ο ακριβής μηχανισμός. Συγκεκριμένα, η ρυθμιστική δράση του NO, όσον αφορά τη συμπεριφορά των αιμοπεταλίων σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας, πλήττεται από δραστικές μορφές οξυγόνου.[23]

Πιο αναλυτικά, το κύριο χαρακτηριστικό των αιμοπεταλίων διαβητικών ασθενών είναι η διαταραχή διάφορων σηματοδοτικών μονοπατιών με αποτέλεσμα έναν υπερδραστήριο φαινότυπο που οδηγεί στην ενισχυμένη προσκόλληση, συσσωμάτωση και ενεργοποίηση τους. Συνεπώς, τα αιμοπετάλια αυτά ανταποκρίνονται πιο συχνά στο παραμικρό ερέθισμα και έτσι καταναλώνονται πιο γρήγορα καταλήγοντας σε επιταχυνόμενη θρομβοποίησης τους. Το ίδιο φαινόμενο σε περιορισμένη ένταση παρατηρείται και σε υγιείς άτομα σε κατάσταση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας. Στην πραγματικότητα, η υπεργλυκαιμία είναι υπεύθυνη για τη δυσλειτουργία της ομοιόστασης του Ca^{2+} στα αιμοπετάλια. Η αυξημένη κινητοποίηση του Ca^{2+} που βρίσκεται στις

ενδοκυτταρικές αποθήκες οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} ενδοκυτταρικά. Επομένως, η επίδραση της υπεργλυκαιμίας στην ενδοαιμοπεταλιακή συγκέντρωση του Ca^{2+} είναι υπεύθυνη για την αυξημένη ευαισθησία των παραγόντων συσσώρευσης των αιμοπεταλίων.

Ένας ακόμα μηχανισμός μέσω του οποίου η υπεργλυκαιμία επηρεάζει τα αιμοπετάλια είναι η δυνατότητα μη ενζυμικής γλυκοζυλίωσης των πρωτεϊνών και των λιπιδίων που βρίσκονται στη μεμβράνη τους, η οποία μεταβάλλει τη δομή και τη διάρθρωση τους. Οι παραπάνω διεργασίες είναι πιθανό να οδηγήσουν σε αυξημένη έκφραση των υποδοχέων που είναι ζωτικής σημασίας για τη λειτουργία των αιμοπεταλίων, όπως η P-σελεκτίνη και ο GPIIb / IIIa, καθιστώντας έτσι τα αιμοπετάλια πολύ πιο ευαίσθητα ως προς τους πιθανούς προσδέτες τους (Εικόνα 11).[17, 24, 25]



Εικόνα 11 Μηχανισμοί ενεργοποίησης αιμοπεταλίων σε κατάσταση υπεργλυκαιμίας και υπερινσουλιναϊμίας.

1.3 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και ενεργοποίηση μηχανισμών φλεγμονής

1.3.1 Γενικά

Η υπεργλυκαιμία αποτελεί ορόσημο για τη νόσο του διαβήτη και παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεια των διαβητικών επιπλοκών, όπως το έμφραγμα του μυοκαρδίου, το εγκεφαλικό επεισόδιο και η περιφερική αγγειακή νόσο. Η φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες έχουν προταθεί ως οι κύριοι μηχανισμοί που διέπουν τις επιπλοκές αυτές. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η οξεία υπεργλυκαιμία, που προκαλείται μετά την κατανάλωση ενός γεύματος, αυξάνει την φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες.[26](Choi2012) Τα στοιχεία δείχνουν ότι η πρόσληψη υψηλών επιπέδων θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, που καθιστούν τον οργανισμό σε κατάσταση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας συνδέεται με τη προ-φλεγμονώδη και οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού.[27]

1.3.2 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και φλεγμονή

Οι αποδείξεις για τις επιβλαβείς επιπτώσεις της οξείας υπεργλυκαιμίας στον ανθρώπινο οργανισμό πληθαίνουν, με τη σημαντικότερη αυτών τη προαγωγή του «καταρράκτη» της φλεγμονής. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξεία υπεργλυκαιμία σχετίζεται με ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης των κυκλοφορούντων κυτταροκινών, όπως η ιντερλευκίνη 6 (IL-6), σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς και όχι μόνο. Ομοίως, έρευνες in vivo σε ζώα έχουν δείξει ότι η οξεία υπεργλυκαιμία αυξάνει την παραγωγή κυτταροκινών και την οξειδωτική απόκριση μέσα σε λίγες ώρες λόγω της δράσης ενδοτοξίνης.[28, 29]

Αρκετές μελέτες έχουν διερευνήσει τις διαφορές στην έκφραση γονιδίων μεταξύ ασθενών με διαβήτη και υγείων ατόμων. Αν και οι περισσότερες από αυτές τις μελέτες επικεντρώθηκαν στις συνέπειες της χρόνιας υπεργλυκαιμίας, τα αποτελέσματα της οξείας υπεργλυκαιμίας συγκρητικά με αυτά της χρόνιας υπεργλυκαιμίας επί της γονιδιακής έκφρασης είναι πιθανό να είναι διαφορετικά. Μάλιστα, ορισμένες μελέτες έχουν αναφερθεί στις επιπτώσεις της οξείας υπεργλυκαιμίας, μετά από χορήγηση γλυκόζης,

στη γονιδιακή έκφραση και τη παραγωγή ROS από τα λευκά αιμοσφαίρια, ιδίως σε σχέση με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Οι μελέτες αυτές καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι τα λευκά αιμοσφαίρια συμβάλλουν στην παθογένεια των διαβητικών επιπλοκών, ενώ οι μεταβολές που προκαλεί η υπεργλυκαιμία στα λευκοκύτταρα του αίματος είναι πιθανώς υπεύθυνες για αυτή τη διαδικασία.

Όπως αναφέραμε νωρίτερα, η βιβλιογραφία κάνει λόγο για το ρόλο που κατέχουν τα λευκοκύτταρα στην παθογένεση της φλεγμονής που σχετίζεται με το σακχαρώδη διαβήτη. Ειδικότερα, η οξεία υπεργλυκαιμία έχει αναφερθεί να εμποδίζει τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης από τα λευκοκύτταρα, αυξάνοντας παράλληλα την απόπτωση των ουδετερόφιλων. Συνεπώς, τα στοιχεία δείχνουν ότι η οξεία, καθώς και η χρόνια, υπεργλυκαιμία είναι δυνατό να προκαλέσουν ένα σύνολο μεταβολών στο ανοσοποιητικό σύστημα με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φλεγμονής και την αναστολή της ανοσίας ταυτόχρονα.[26, 30]

1.3.3 Μηχανισμοί φλεγμονής

1.3.3.1 Κυτταροκίνες

Τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης που παρατηρούνται στο πλάσμα σε κατάσταση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας προκαλούν την αυξημένη παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών. Συγκεκριμένα, σημειώνονται αυξημένα επίπεδα TNF- α , IL-1 β και IL-18. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η ινσουλίνη λειτουργεί ρυθμιστικά με αντιφλεγμονώδη δράση μειώνοντας την παραγωγή των συγκεκριμένων κυτταροκινών με στόχο την εξισορρόπηση των επιπτώσεων που προκαλούν τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης. Ωστόσο, οι μεταβολές που προκαλούν τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να υπερσχύουν της αντιρροπιστικής και αντιφλεγμονώδους δράσης της ινσουλίνης κατά τη διάρκεια οξείας υπεργλυκαιμίας. Έτσι, προκύπτει μια κατάσταση κατά την οποία οι προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες κυριαρχούν κατά τη διάρκεια της πρώιμης φάσης της ανοσοποιητικής απόκρισης του οργανισμού.[31]

1.3.3.2 Φαγοκυττάρωση

Κατά τη διάρκεια υπεργλυκαιμίας, όπως στη περίπτωση μη επαρκώς ελεγχόμενου διαβήτη, η φαγοκυττάρωση έχει θεωρηθεί να επηρεάζεται αρνητικά από τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα. Κλινικές δοκιμές έδειξαν την άμεση συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα ή των επιπέδων γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών στο πλάσμα (π.χ. HbA1c) με τη φαγοκυτταρική ικανότητα των κυττάρων. Η μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα φαίνεται να οφείλεται σε αυξημένα επίπεδα Ca^{2+} ενδοκυτταρικά, καθώς παρατηρείται μια σημαντική και άμεση σχέση μεταξύ Ca^{2+} και του βαθμού της υπεργλυκαιμίας. Ακόμα, για τη μειωμένη φαγοκυτταρική δραστηριότητα ενοχοποιείται η αυξημένη δραστικότητα της πρωτεϊνικής κινάσης C που επιτρέπει την εισροή Ca ενδοκυτταρικά με αποτέλεσμα την καταστροφή της τριφωσφορικής αδενοσίνης που περιέχεται στα κύτταρα και είναι απαραίτητη για τις δομικές αλλαγές τους κατά τη διάρκεια φαγοκυττάρωσης.[32]

1.3.3.3 Απόπτωση ουδετερόφιλων

Η απόπτωση αποτελεί ουσιαστικά μια λεπτή ισορροπία μεταξύ της επιθετικής βιολογικής συμπεριφοράς και της ασφαλούς κατάληξης δυνητικά επιβλαβών κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Διάφορες μελέτες που ασχολήθηκαν με τη χορήγηση διαλυμάτων πλούσια σε γλυκόζη παρατήρησαν αύξηση στην απόπτωση των ουδετερόφιλων. Ωστόσο, τα δεδομένα έδειξαν ότι αυτό οφείλεται στην υψηλή ωσμωτικότητα των διαλυμάτων και όχι στην αυξημένη συγκέντρωση της γλυκόζης. Τέλος, θα μπορούσαμε να ισχυριστούμε ότι η υπεργλυκαιμία συμβάλει στην αύξηση της απόπτωσης των ουδετερόφιλων όχι άμεσα, αλλά στηριζόμενοι στη συσχέτιση αυξημένων επιπέδων γλυκόζης με την υψηλή ωσμωτικότητα.[31, 33]

2. ΣΚΟΠΟΣ

Ένα έντονο μεταγευματικό υπεργλυκαιμικό φορτίο είναι γνωστό ότι συνοδεύεται από φλεγμονή, οξειδωτικό στρες και ενεργοποίηση των μηχανισμών θρόμβωσης. Οι συνθήκες αυτές αποτελούν προδιαθεσικό παράγοντα αθηροσκλήρωσης. Επιπλέον, τα αιμοπετάλια, τα οποία φαίνεται να είναι ενεργοποιημένα υπό αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατόν να αλληλεπιδρούν με το αγγειακό ενδοθήλιο και τα λευκοκύτταρα και να αποτελούν τον ενδιάμεσο σύνδεσμο μεταξύ της φλεγμονής, της θρόμβωσης και της αθηρογένεσης. Δεδομένου ότι ο σύγχρονος Δυτικός τρόπος διατροφής χαρακτηρίζεται από έντονα μεταγευματικά υπεργλυκαιμικά επεισόδια, οι παραπάνω μηχανισμοί θα μπορούσαν να συνεισφέρουν σε καθημερινή βάση στην ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης.

Βάση των παραπάνω η παρούσα εργασία έχει ως ευρύτερο αντικείμενο την διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης σε δείκτες φλεγμονής όπως η IL-6, ο συνολικός αριθμός και η σχετική αναλογία των λευκοκυττάρων καθώς και το ουρικό οξύ. Απώτερος σκοπός είναι να εκτιμηθεί κατά πόσο οξεία υπεργλυκαιμικά επεισόδια μπορούν να επηρεάσουν τη προφλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού και μέσω αυτής τις μεταβολές τις δραστηριότητας των αιμοπεταλίων.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 Επιλογή εθελοντών και σχεδιασμός της μελέτης

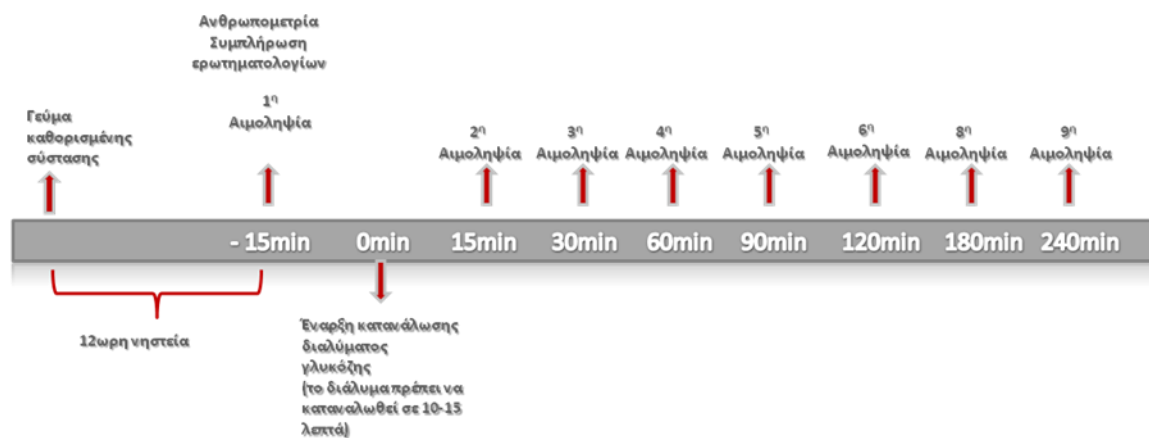
3.1.1 Επιλογή εθελοντών

Επιλέχθησαν 6 φαινομενικά υγιείς εθελοντές. Οι εθελοντές ήταν άνδρες και γυναίκες στο ηλικιακό εύρος 20-40. Για τις γυναίκες η αιμοληψία λάμβανε χώρα τις πρώτες 7-10 ημέρες του κύκλου. Οι εθελοντές είχαν φυσιολογικό Δείκτη Μάζας Σώματος ($\Delta\text{ΜΣ} = 18\text{-}25 \text{ Kg/m}^2$), φυσιολογική αρτηριακή πίεση (Συστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 130 \text{ mmHg}$ και Διαστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 85 \text{ mmHg}$), με επίπεδα γλυκόζης νηστείας $\leq 100 \text{ mg/dl}$, επίπεδα ολικής χοληστερόλης $\leq 200 \text{ mg/dl}$, επίπεδα τριακυλογλυκερολών $\leq 150 \text{ mg/dl}$, περιφέρεια μέσης $\leq 102 \text{ cm}$ και δεν είχαν ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου. Επίσης, οι εθελοντές ήταν μη καπνιστές. Για την στρατολόγηση των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο στρατολόγησης. Επίσης, πριν την είσοδο των εθελοντών στο πρωτόκολλο έγινε βιοχημικός έλεγχος για το αν οι εθελοντές πληρούν τα παραπάνω κριτήρια και συμπλήρωσαν ερωτηματολόγια φυσικής δραστηριότητας και διατροφικών συνηθειών. Οι εθελοντές ήταν είτε μη ενεργά άτομα ή κατ' ελάχιστο ενεργά άτομα σύμφωνα με τη κατάταξη του ερωτηματολογίου IPAQ. Επιπλέον δεν λάμβαναν, για τουλάχιστον 2 μήνες, ασπιρίνη, ορμόνες, συμπληρώματα διατροφής, αντιυπερτασικά και υπολιπιδαιμικά φάρμακα.

Το παρόν ερευνητικό πρωτόκολλο εγκρίθηκε από την επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, ενώ απαραίτητη προϋπόθεση για την συμμετοχή των εθελοντών στην παρούσα μελέτη ήταν η υπογραφή συμφωνητικού εθελοντικής συμμετοχής, όπου αναφέρεται αναλυτικά ο σκοπός της μελέτης και οι υποχρεώσεις του εθελοντή και του ερευνητή.

3.1.2 Σχεδιασμός της Μελέτης

Οι εθελοντές, εφόσον ενημερώθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης και υπέγραψαν το πρωτόκολλο εθελοντικής συμμετοχής, προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο τρεις διαφορετικές μέρες με απόσταση τουλάχιστον μίας εβδομάδας για τους άνδρες και ενός μήνα για τις γυναίκες. Με τυχαία σειρά, ο κάθε εθελοντής, κάθε φορά που ποσήλθε, κατανάλωσε διαλύματα γλυκόζης ίδιας συγκέντρωσης αλλά διαφορετικής συνολικής ποσότητας (75g, 100g και 150g σε 200ml νερό). Το προηγούμενο βράδυ ακολούθησαν συγκεκριμένης σύστασης γεύμα, 600 Kcal για τις γυναίκες και 750Kcal για τους άνδρες, περιεκτικότητας 50% σε υδατάνθρακες, 20% σε πρωτεΐνες και 30% σε λιποειδή (το ακριβές διαιτολόγιο συντάχθηκε και δόθηκε στους εθελοντές από διαιτολόγο) και μετά από 12ωρη νηστεία προσήλθαν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο. Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν ανθρωπομετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) και μέτρηση της αρτηριακής πίεσης. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε αιμοληψία πριν από οποιαδήποτε παρέμβαση με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα και στην συνέχεια οι εθελοντές κατανάλωσαν το έτοιμο διάλυμα γλυκόζης μέσα σε διάστημα 10 λεπτών και ακολούθησαν αιμοληψίες στα 15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 λεπτά μετά από την έναρξη της πρόσληψης του διαλύματος (εικόνα 12). Η αιμοληψίες έγιναν από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό, παρουσία ιατρού.



Εικόνα12 Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της υπεργλυκαιμίας

3.2 Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση εντοιχισμένου αναστημόμετρου σε όρθια στάση, χωρίς παπούτσια και με ακρίβεια 0,5 cm. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν εις διπλούν. Επίσης υπολογίστηκε ο μέσος όρος του βάρους και του ύψους για κάθε εθελοντή, από όπου και στη συνέχεια υπολογίστηκε ο ΔΜΣ ως το πηλίκο του βάρους (σε kg) προς το τετράγωνο του ύψους (σε m). Επιπλέον μετρήθηκε η περιφέρεια μέσης και η περιφέρεια ισχίου, ενώ υπολογίστηκε και το πηλίκο της περιφέρειας μέσης ως προς την περιφέρεια ισχίου.

3.3 Απομόνωση βιολογικών δειγμάτων

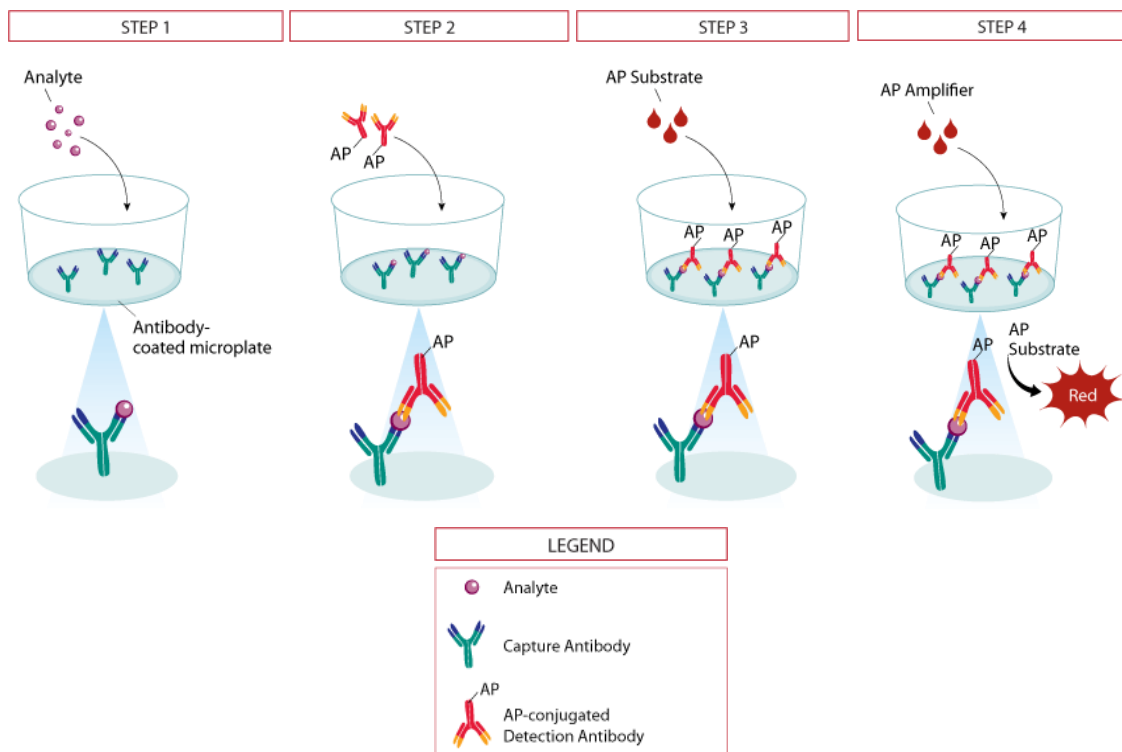
Σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές μετά τη λήψη των γευμάτων, παραλήφθηκε αίμα με φλεβοκαθετήρα το οποίο διαμοιράστηκε σε κατάλληλα σωληνάκια κενού (vacutainers) ανάλογα το είδος και την ποσότητα του βιολογικού δείγματος το οποίο θέλαμε να απομονωθεί και η οποία εξαρτήθηκε από το είδος των βιοχημικών αναλύσεων, οι οποίες θέλαμε να πραγματοποιηθούν σε κάθε χρονική στιγμή. Για την απομόνωση του ορού και του πλάσματος κατάλληλη ποσότητα αίματος μεταφέρθηκε σε vacutainers ορού ή πλάσματος (με αντιπηκτικό EDTA). Το vacutainer ορού παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min και ο ορός παραλήφθηκε με φυγοκέντρηση στα 1500g x 10 min υπό ψύξη. Ο ορός μοιράστηκε σε σωλίνες erpendorfs και αποθηκεύτηκε στους - 80°C.

Το vacutainer με αντιπηκτικό EDTA φυγοκεντρήθηκαν άμεσα στα 1500g x 10 min υπό ψύξη. Το πλάσμα μοιράστηκε σε σωλίνες erpendorfs και αποθηκεύτηκε στους - 80°C.

3.4 Προσδιορισμός IL-6 υψηλής ευαισθησίας σε ορό

Η μέτρηση της IL-6 υψηλής ευαισθησίας έγινε με τη βοήθεια του εμπορικά διαθέσιμου kit Human IL-6 Quantikine HS ELISA Kit της εταιρείας R&D σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή.

Συνοπτικά, ο προσδιορισμού βασίζεται στην τεχνική του ανοσοενζυμικού προσδιορισμού τύπου sandwich. Ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για την IL-6 είναι σταθεροποιημένο σε μικροπλακίδιο υψηλής δεσμευτικής ικανότητας. Πρότυπα διαλύματα και δείγματα που περιέχουν IL-6 προστίθενται στα βοθρία του μικροπλακιδίου και η περιεχόμενη IL-6 δεσμεύεται στο αντίσωμα της. Μετά από έκπλυση των μη δεσμευμένων μορίων, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα, ειδικό για την IL-6, το οποίο είναι συνδεδεμένο με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, προστίθεται στα βοθρία και ακολουθεί επώαση ώστε να συνδεθεί το αντίσωμα την ακινητοποιημένη IL-6. Μετά από έκπλυση του μη συνδεδεμένου αντισώματος ακολουθεί προσθήκη υποστρώματος για το ένζυμο και ενός ενισχυτή του χρώματος και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 490 nm. Παράλληλα, με τα δείγματα η αντίδραση γίνεται και σε πρότυπα διαλύματα συγκεντρώσεων από 10-0,156 pg/ml Λαπό τις απορροφήσεις των οποίων κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με τη βοήθεια της οποίας προσδιορίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων.



Εικόνα13 Σχηματικά η αρχή μεθόδου προσδιορισμού της IL-6 σύμφωνα με το HS Quantakine ELISA της εταιρείας R&D

3.5 Προσδιορισμός ουρικού οξέος σε ορό

Ο προσδιορισμός του ουρικού οξέος έγινε με εμπορικά διαθέσιμο kit της εταιρείας BIOSIS. Παρουσία του ενζύμου ουρικάση το ουρικό οξύ οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ενζύμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ουρικού οξέος στο δείγμα.



3.6 Στατιστική ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάστηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Αν και οι περισσότερες μεταβλητές εμφανίζουν κανονική κατανομή, εξαιτίας του μικρού μεγέθους του δείγματος εφαρμόστηκαν μη παραμετρικές μέθοδοι ανάλυσης. Οι μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD (standard deviation, τυπική απόκλιση) στα διαγράμματα και ως διάμεσος (25^ο-75^ο εκατοστημόριο). Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Spearman. Η αναζήτηση σημαντικών μεταβολών στο χρόνο 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 υπολογίστηκε από το εμβαδόν που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης μεταβολής μίας μετρούμενης παραμέτρου και της νοητής ευθείας παράλληλης στον άξονα x, η οποία ξεκινά από την τιμή της παραμέτρου σε χρόνο 0. Οι συσχετίσεις των iAUC, μεταξύ των

διαφορετικών παρεμβάσεων, έγινε με την ανάλυση Kruskal-Wallis. Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων (p) βασίζονται σε αμφίπλευρους ελέγχους και συγκρίνονται στο επίπεδο σημαντικότητας του 5%. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του λογισμικού στατιστικής SPSS 18 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Οι εθελοντές της μελέτης

Συνολικά, συγκεντρώθηκαν 6 εθελοντές, των οποίων τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά παραθέτονται στον πίνακα που ακολουθεί.

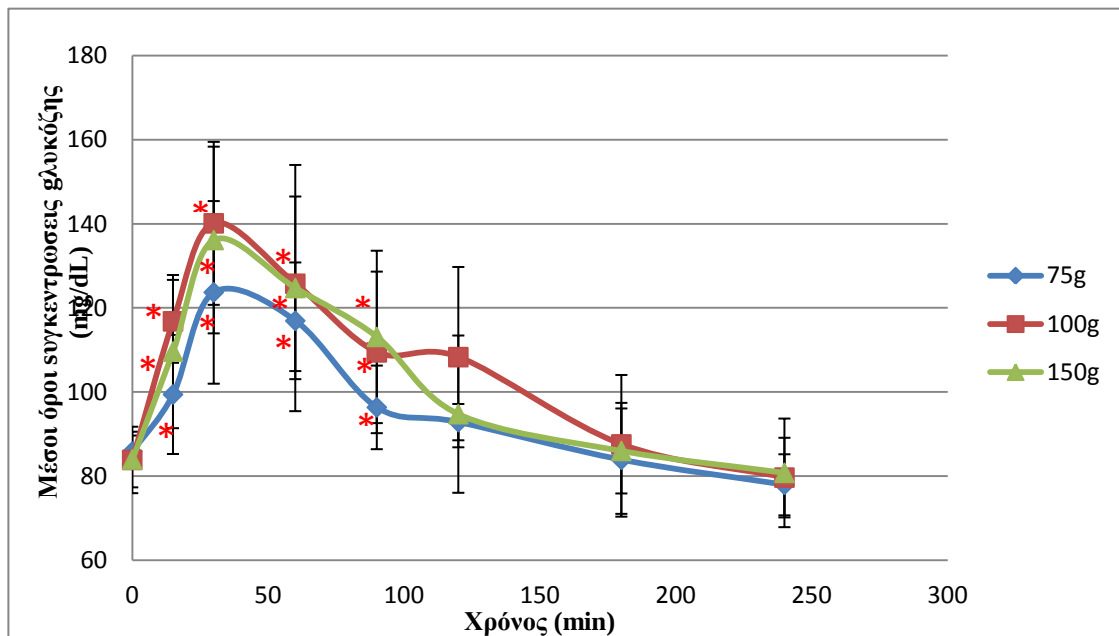
Πίνακας 2 Βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης στις τρεις διαφορετικές παρεμβάσεις

Χαρακτηριστικά	75g	100g	150g	p
Φύλο (γυναίκες)	3	3	3	
Ηλικία	27.5 (25.0-32.2)	27.5 (25.0-32.2)	27.5 (25.0-32.2)	NS
BMI (kg/m ²)	21.4(20.2-24.1)	20.9(19.8-23.8)	21(20.0-24.0)	NS
Διαστολική πίεση (mmHg)	77 (68-81)	68 (60-79)	71 (60-80)	NS
Συστολική πίεση (mmHg)	126 (108-134)	122 (110-126)	117 (103-132)	NS
Αριθμός λευκοκυττάρων (10 ³ /μL)	4.2 (3.7-5.8)	4.8 (3.8-6.3)	4.2 (3.8-5.2)	NS
Αιμοσφαιρίνη (g/dL)	14.6 (13.7-15.8)	15.0 (13.8-16.6)	13.6 (13.2-15.0)	NS
Αριθμός ερυθροκυττάρων (10 ⁶ /μL)	4.6 (4.3-4.9)	4.6 (4.2-5.0)	4.5(4.0-4.6)	NS
Αιματοκρίτης (%)	38.3 (36.4-43.0)	39.6 (35.8-43.2)	36.2 (34.7-38.9)	NS
Αριθμός αιμοπεταλίων (10 ³ /μL)	198 (182-260)	195 (174-214)	192 (160-212)	NS
Μέσος όγκος αιμοπεταλίων (fL)	7.9 (7.4-8.2)	7.9 (7.4-8.3)	8.0 (7.4-8.2)	NS
Γλυκόζη (mg/dl)	85 (82-89)	84 (75-91)	82 (78-90)	NS
Ινσουλίνη (mIU/ml)	7 .0 (3.4-8.0)	6.7 (3.8-8.8)	3.8 (1.7-5.6)	NS
HOMA_IR	1.4 (0.7-1.7)	1.3 (0.8-1.8)	0.8 (0.4-1.1)	NS
Ουρικό οξύ (mg/dL)	3.7 (2.7-4.9)	3.6 (3.0-5.3)	3.186(2.837-4.733)	NS
hsIL6_0 (pg/ml)	1.14 (0.54-2.70)	0.49 (0.33-1.03)	0.71 (0.247-0.18)	NS

Όπως αναμενόταν, βάση και των κριτηριών επιλογής, οι εθελοντές ήταν νέοι, φυσιολογικού BMI, δίχως παθολογικές τιμές αιματολογικών και βιοχημικών δεικτών.

4.2 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις μεταβολές των επιπέδων γλυκόζης

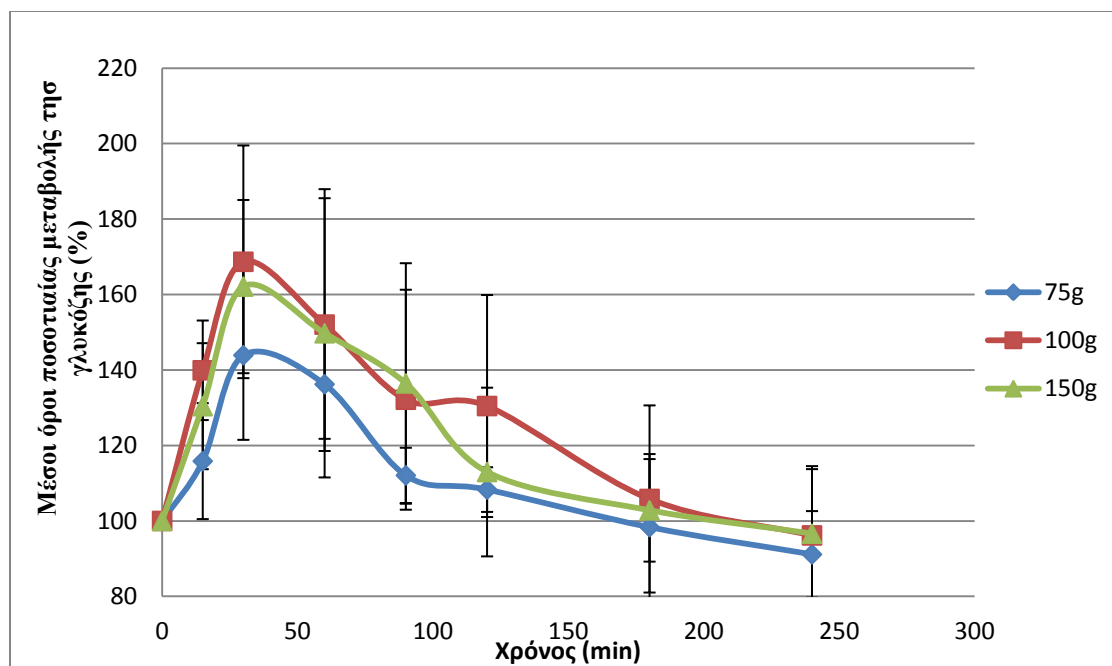
Οι μεταβολές των επιπέδων γλυκόζης, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα Διαγράμματα 1 και 2 αντίστοιχα.



(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 1 Μεταβολή των απολύτων τιμών της γλυκόζης όλων των εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων γλυκόζης ως προς το χρόνο και για τα τρία επίπεδα φόρτισης (75g: $p=0,000$, 100g: $p=0,000$, 150g: $p=0,006$).



Διάγραμμα 2 Ποσοστιαία (%) μεταβολή της γλυκόζης όλων των εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Τέλος, για να συγκρίνουμε κατά πόσο η κάθε παρέμβαση (75g, 100g και 150g γλυκόζης) διαφοροποίησε τις μεταβολές της γλυκόζης υπολογίστηκαν τα “εμβαδά των περιοχών κάτω από τις καμπύλες” (Incremental Areas Under the Curves / iAUCs), με βάση τις απόλυτες τιμές κάθε μέτρησης.

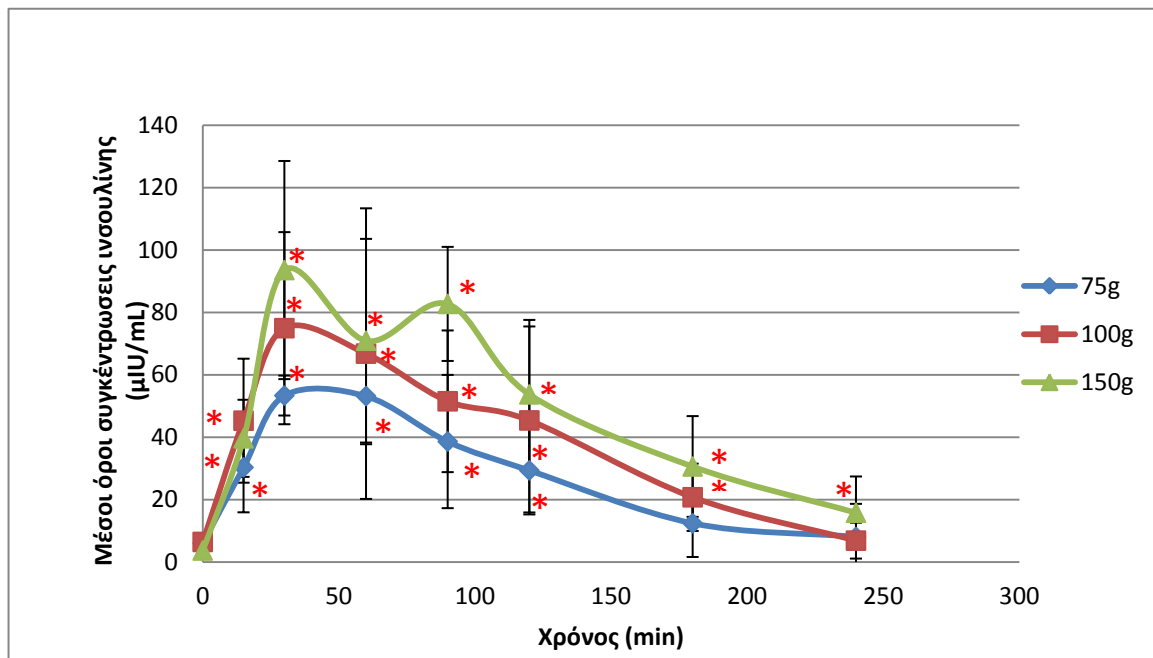
Πίνακας 3 iAUC της γλυκόζης και στις τρεις παρεμβάσεις

	75g	100g	150g	p
AUC γλυκόζης σε mg*min/dL	3504(1549-3729)	6275(2377-8567)	4168(2799-6437)	0,221

Σύμφωνα με την ανάλυση κατά Kruskal-Wallis δεν εμφανίζεται σημαντική διαφοροποίηση στα iAUC της γλυκόζης μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων.

4.3 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις μεταβολές των επιπέδων ινσουλίνης

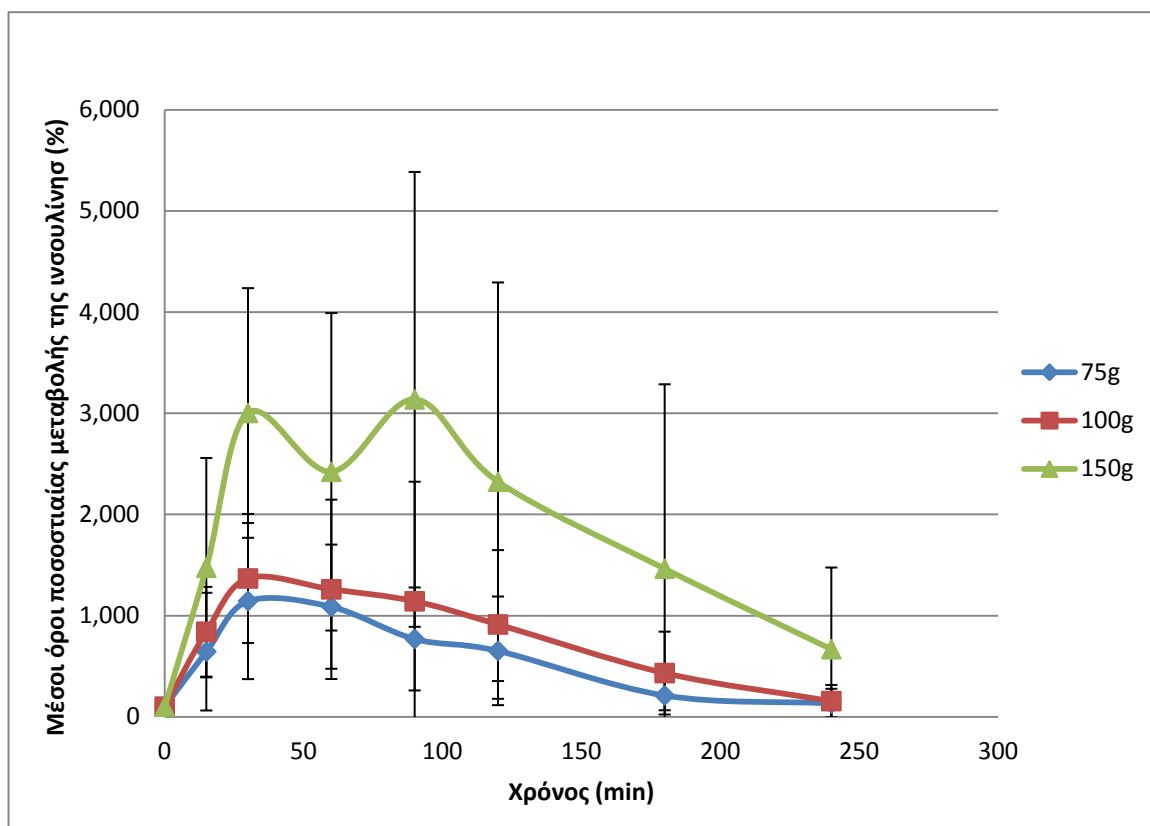
Οι μεταβολές των επιπέδων ινσουλίνης, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα Διαγράμματα 3 και 4 αντίστοιχα.



(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 3 Μεταβολή των απολύτων τιμών της ινσουλίνης όλων των εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων ινσουλίνης ως προς το χρόνο και για τα τρία επίπεδα φόρτισης (75g: $p=0,000$, 100g: $p=0,000$, 150g: $p=0,000$).



Διάγραμμα 4 Ποσοστιαία (%) μεταβολή της ινσουλίνης όλων των εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Τέλος, για να συγκρίνουμε κατά πόσο η κάθε παρέμβαση (75g, 100g και 150g γλυκόζης) διαφοροποίησε τις μεταβολές της ινσουλίνης υπολογίστηκαν τα iAUCs, με βάση τις απόλυτες τιμές κάθε μέτρησης.

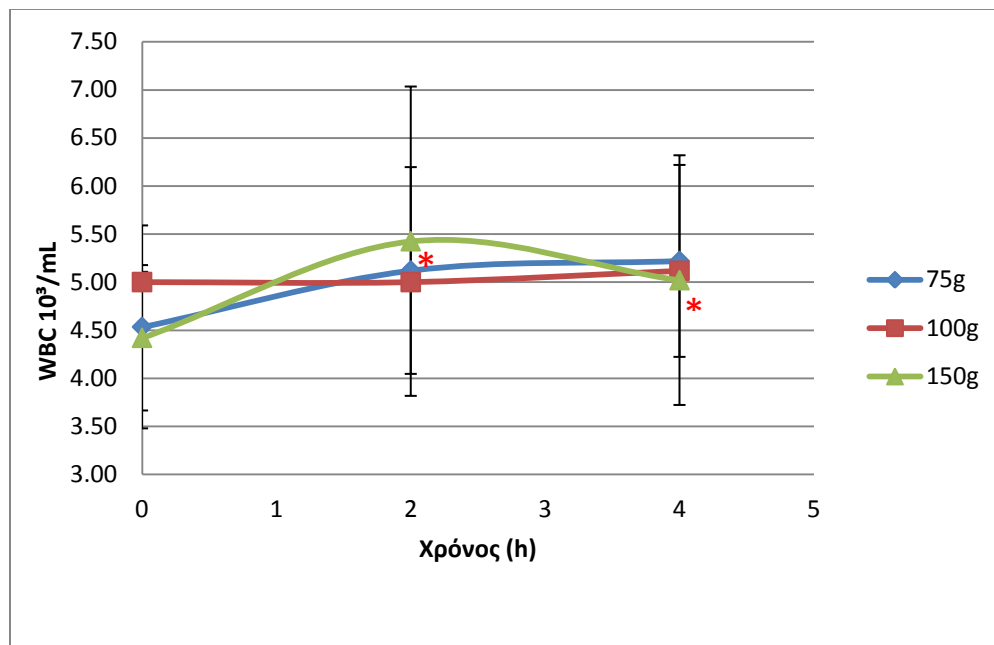
Πίνακας 4 AUC της ινσουλίνης και στις τρεις παρεμβάσεις

	75g	100g	150g	p
iAUC ινσουλίνης σε $\mu\text{IU} \cdot \text{min}/\text{ml}$	5270(3847-7273)	6484(5802-10960)	9939(9357-13837)	0,016

Σύμφωνα με την ανάλυση κατά Kruskal-Wallis υπάρχει σημαντική αύξηση των επιπέδων υπερινσουλιναιμίας με αύξηση των φορτίσεων που εντοπίζεται κυρίως μεταξύ των φορτίσεων των 75g και 150g αντίστοιχα ($p=0,016$).

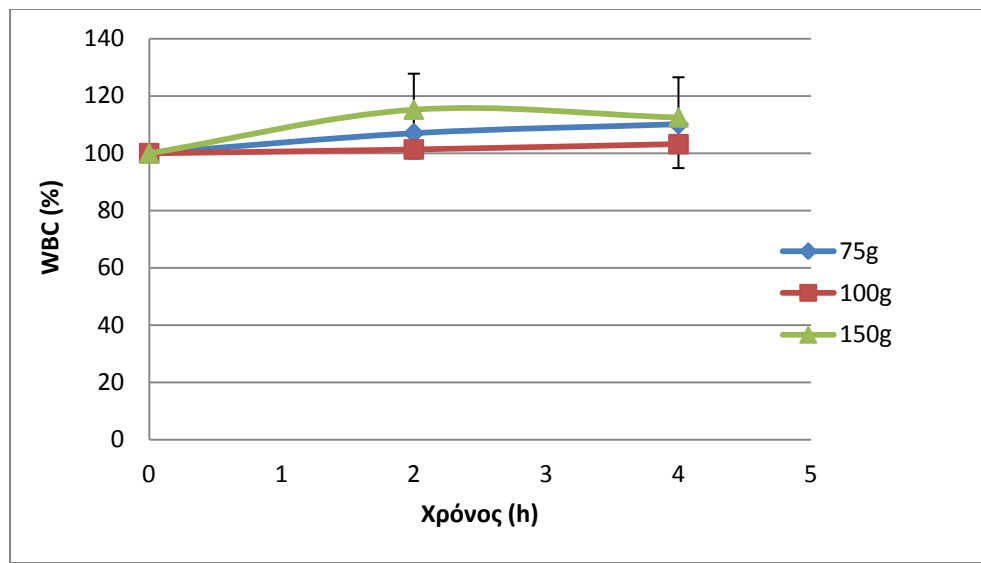
4.4 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις μεταβολές του αριθμού και της σχετικής αναλογίας λευκοκυττάρων

Οι μεταβολές στον αριθμό και τη σχετική αναλογία λευκοκυττάρων, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα σχήματα που ακολουθούν.



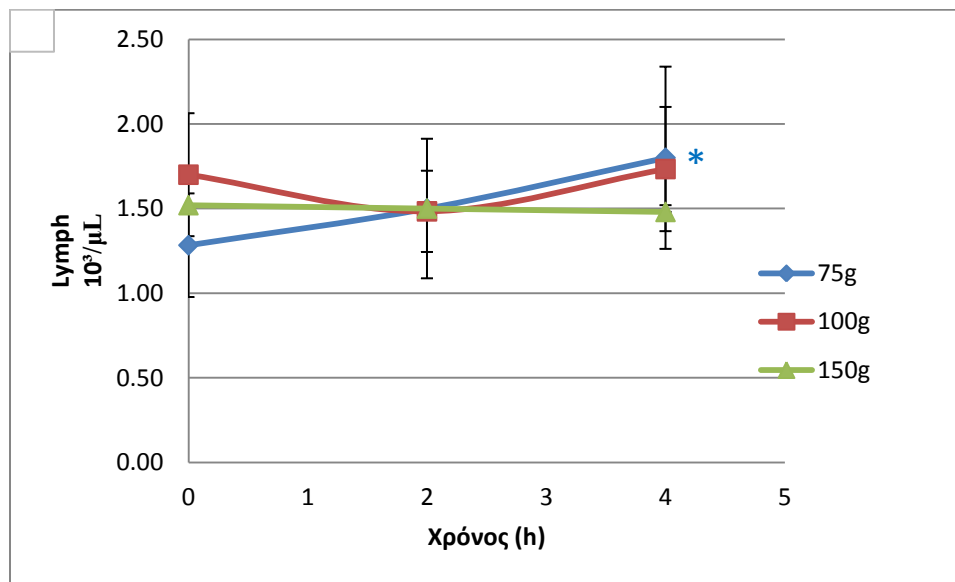
(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 5 Μεταβολή των απόλυτων τιμών των λευκοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



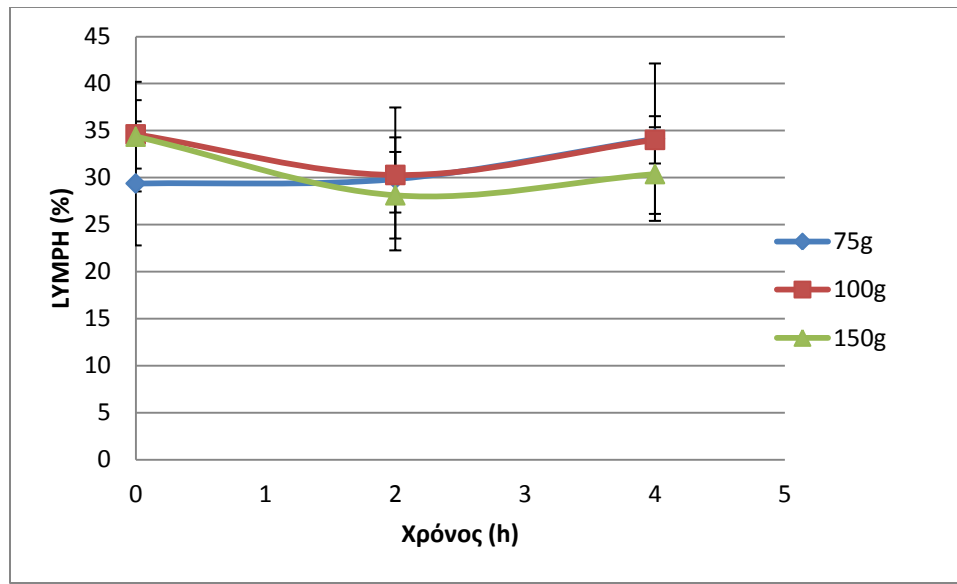
Διάγραμμα 6 Ποσοστιαία (%) μεταβολή των λευκοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό λευκοκυττάρων ως προς το χρόνο σε κανένα από τα τρία επίπεδα φόρτισης.



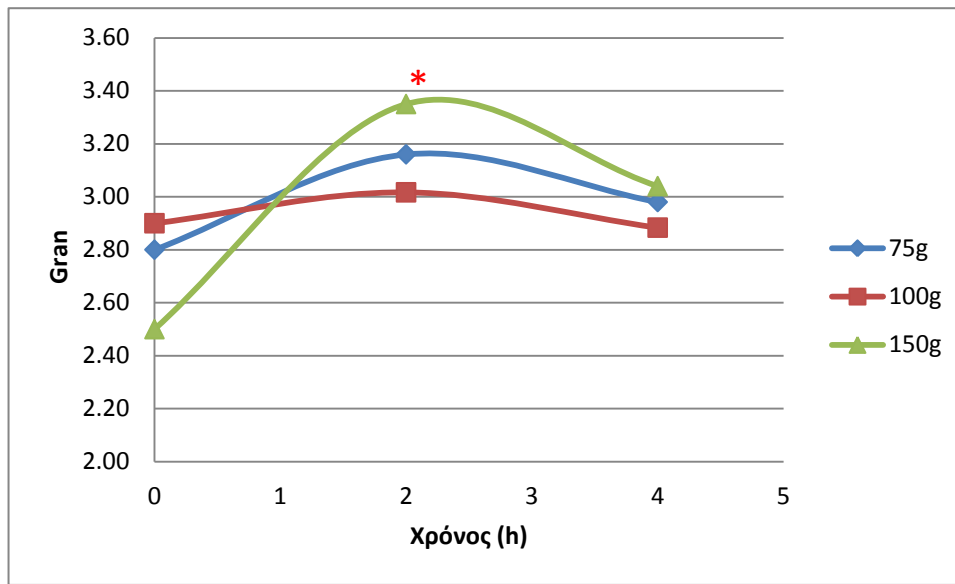
(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 7 Μεταβολή των απόλυτων τιμών των λεμφοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



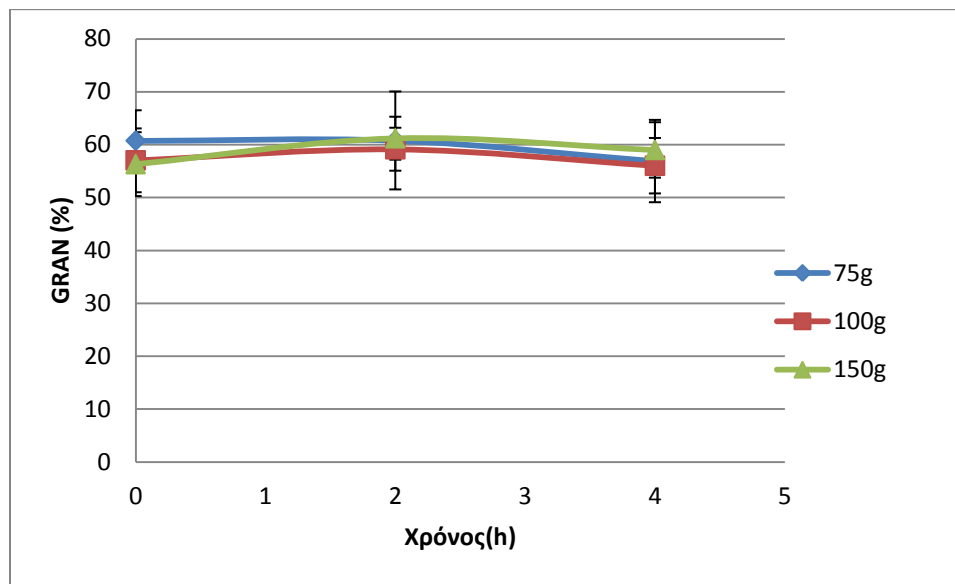
Διάγραμμα 8 Ποσοστιαία (%) μεταβολής των λεμφοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει σημαντική μεταβολή στον αριθμό λεμφοκυττάρων ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 75g γλυκόζης ($p=0,015$) και οριακά σημαντική στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης ($p=0,056$). Η διαφοροποίηση, όσον αφορά τον χρόνο των 75g, εντοπίζεται σε αύξηση των επιπέδων λεμφοκυττάρων στις 4 ώρες μετά τη φόρτιση.



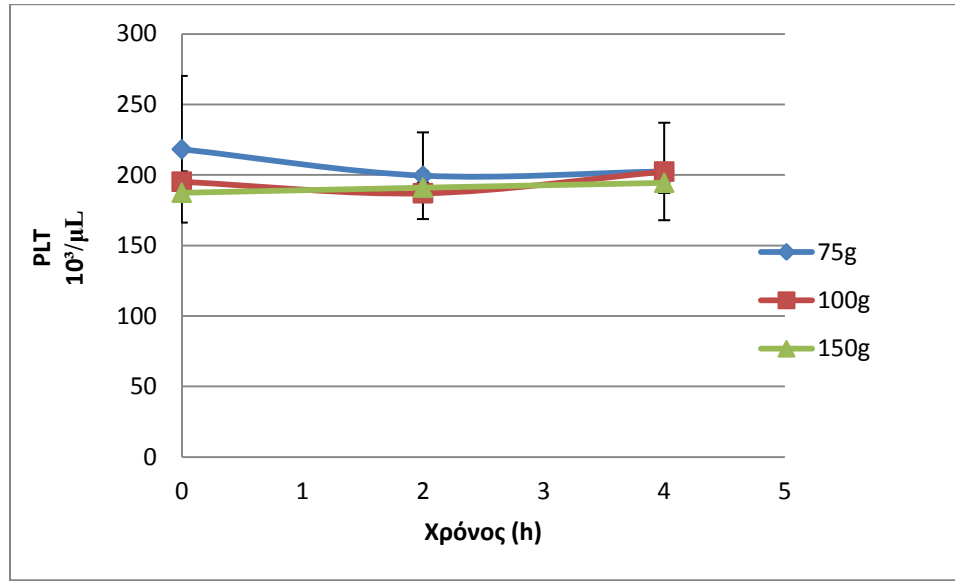
(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 9 Μεταβολή των απόλυτων τιμών των κοκκιοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

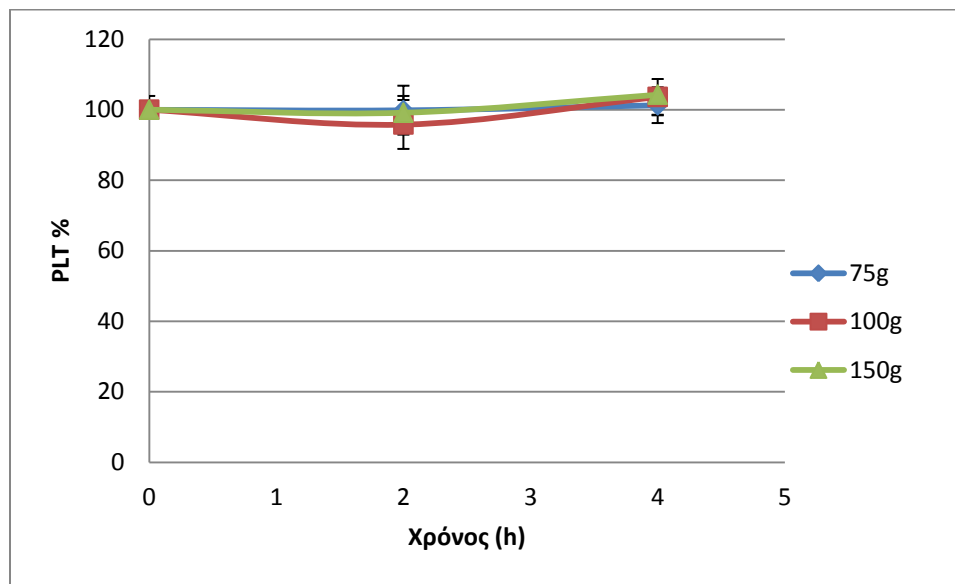


Διάγραμμα 10 Ποσοστιαία (%) μεταβολή των κοκκιοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα κοκκιοκυττάρων ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 150g γλυκόζης ($p=0,050$).

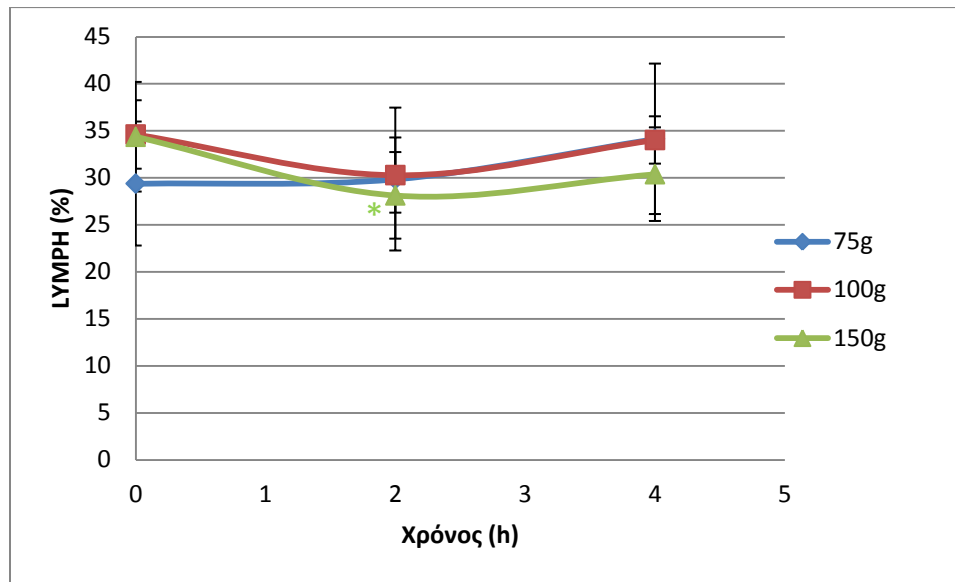


Διάγραμμα 11 Μεταβολή των απόλυτων τιμών των αιμοπεταλίων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



Διάγραμμα 12 Ποσοστιαία (%) μεταβολή των αιμοπεταλίων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

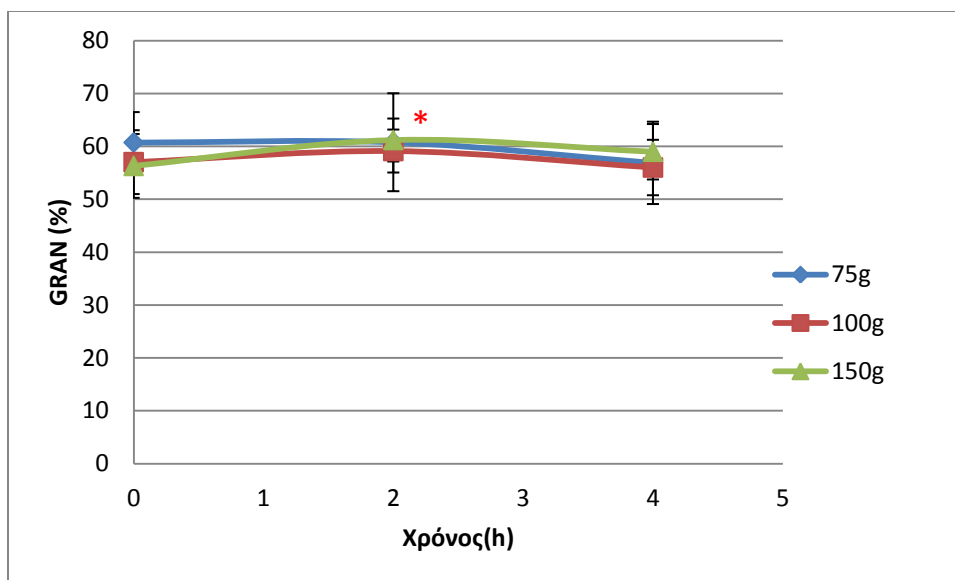
Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει μια οριακά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα αιμοπεταλίων ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης ($p=0,069$).



(* = $p<0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 13 Μεταβολή του ποσοστού των λεμφοκυττάρων στο σύνολο των λευκοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

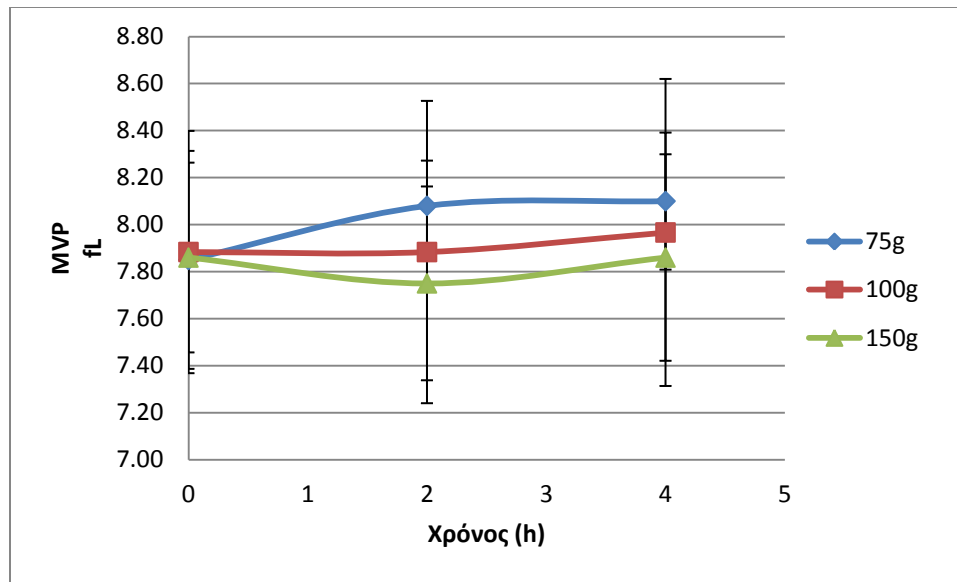
Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχουν οριακά σημαντικές μεταβολές στο ποσοστό λεμφοκυττάρων επί του συνόλου λευκοκυττάρων ως προς τους χρόνους παρέμβασης των 75g γλυκόζης ($p=0,074$) και 150g γλυκόζης ($p=0,057$). Όσον αφορά τα 150g παρατηρείται μια σημαντική μείωση στο ποσοστό λεμφοκυττάρων στο χρόνο των 2h.



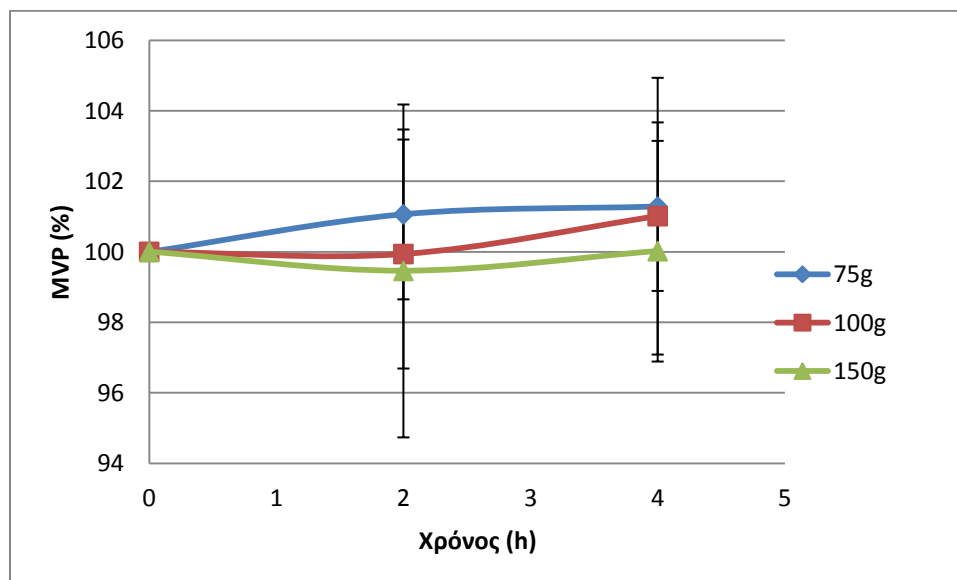
(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 14 Ποσοστιαία (%) μεταβολή του ποσοστού κοκκιοκυττάρων στο σύνολο των λευκοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει οριακά σημαντική μεταβολή στο ποσοστό κοκκιοκυττάρων επί του συνόλου των λευκοκυττάρων ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 75g γλυκόζης ($p=0,074$). Παρατηρείται μια σημαντική αύξηση στο ποσοστό λεμφοκυττάρων στο χρόνο των 2h.



Διάγραμμα 15 Μεταβολή του μέσου όγκου αιμοπεταλίων (MVP) συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



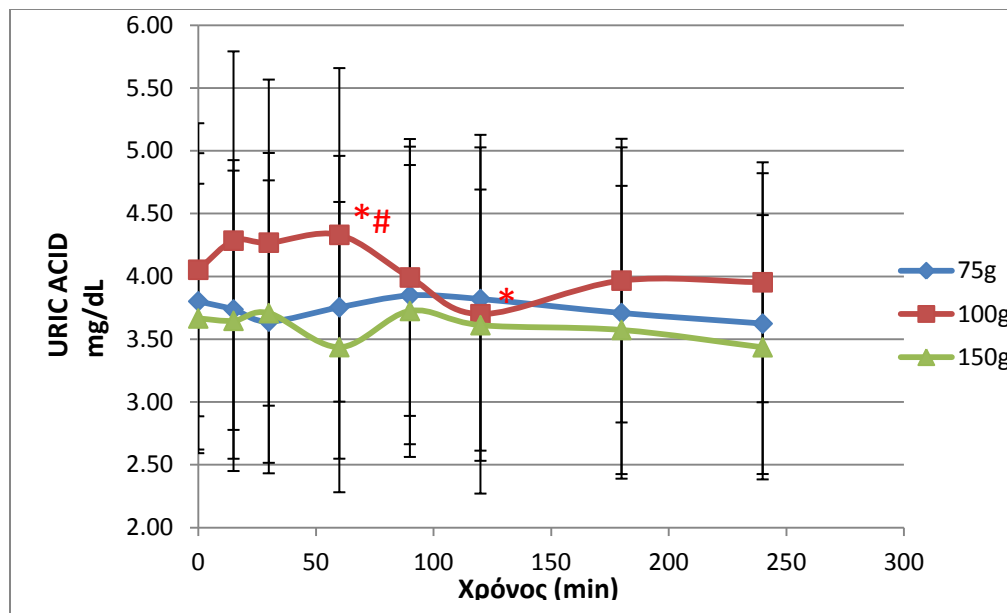
Διάγραμμα 16 Ποσοστιαία (%) μεταβολή του MVP συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στον όγκο των αιμοπεταλίων ως προς το χρόνο σε καμία από τις τρεις παρεμβάσεις.

Τέλος, σε μία προσπάθεια να βρεθεί κατά πόσο οι διαφορετικές φορτίσεις επηρεάζουν τις μεταβολές των παραμέτρων έγινε σύγκριση με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wallis-Kruskal των ποσοστιαίων (%) μεταβολών στους χρόνους 2h και 4h. Παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της παρέμβασης μόνο στις μεταβολές των λεμφοκυττάρων. Συγκεκριμένα, στη χρονική στιγμή 2h βρέθηκαν οριακά σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των παρεμβάσεων των 75g και 100g γλυκόζης ($p=0,052$) και μεταξύ των παρεμβάσεων 75g και 150g γλυκόζης ($p=0,065$). Αντίστοιχα, στη χρονική στιγμή των 4h παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στις μεταβολές των λεμφοκυττάρων μεταξύ των παρεμβάσεων 75g και 100g ($p=0,004$) γλυκόζης και μεταξύ των παρεμβάσεων 75g και 150g γλυκόζης ($p=0,016$). Ουσιαστικά, αυξήσεις των λεμφοκυττάρων παρατηρούνται μόνο στη φόρτιση των 75g, στη φόρτιση των 100g δεν παρατηρείται διαφοροποίηση ενώ στη φόρτιση των 150g παρατηρείται και μία μικρή μείωση στον αριθμό των λεμφοκυττάρων σε σχέση με το χρόνο 0.

4.5 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις μεταβολές των επιπέδων ουρικού οξέως

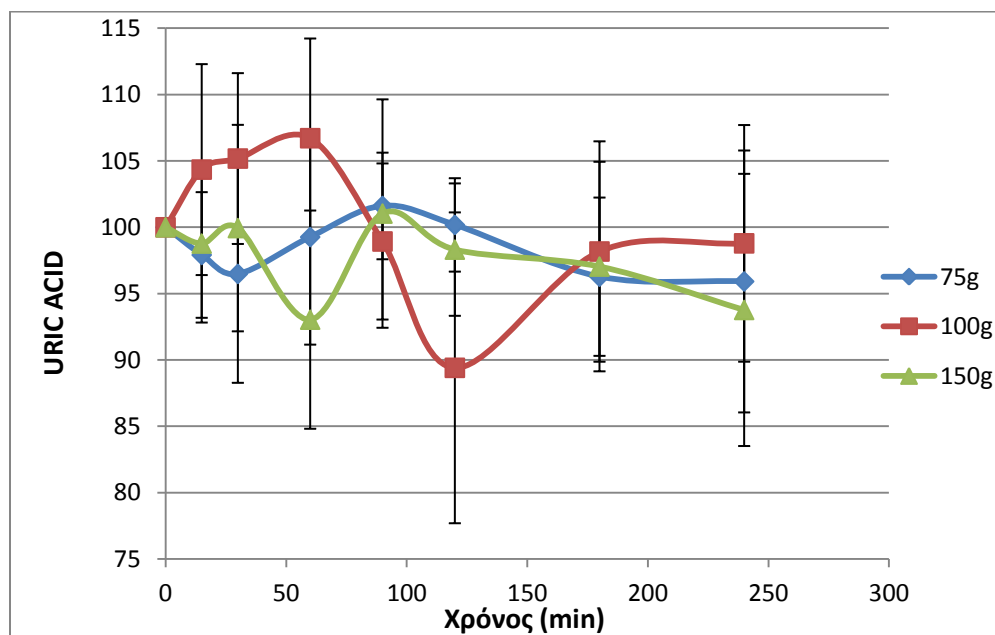
Οι μεταβολές των επιπέδων του ουρικού οξέως, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα σχήματα που ακολουθούν.



(*# = 0,005<p<0,080 σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

(* = p<0,05 σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 17 μεταβολής των απόλυτων τιμών του ουρικού οξέως συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



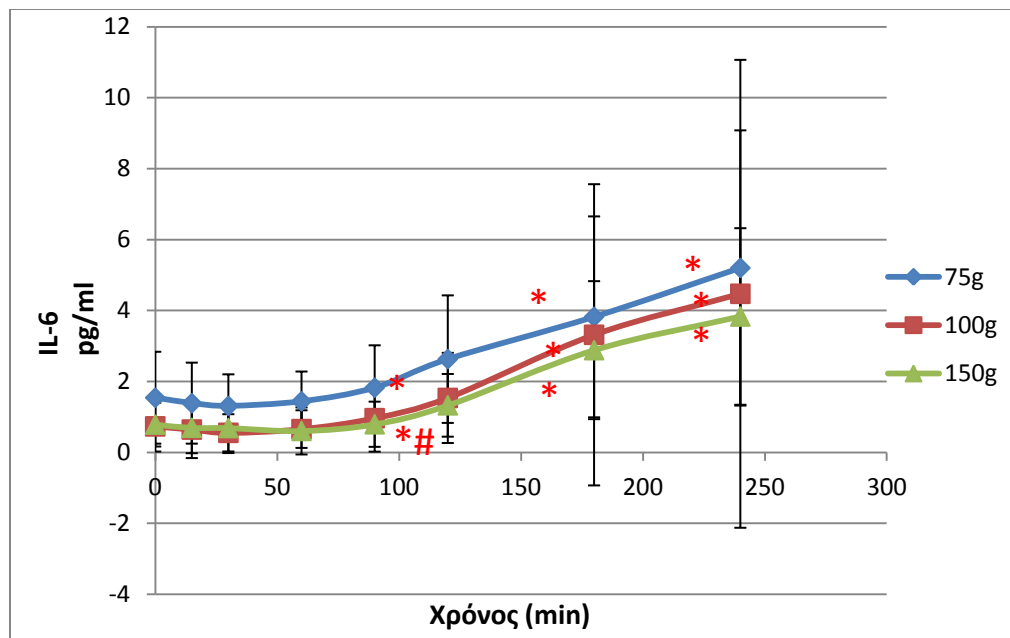
Διάγραμμα 18 Ποσοστιαία (%) μεταβολή του ουρικού οξέως συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα ουρικού οξέως ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης ($p=0,043$). Ουσιαστικά παρατηρείται μία αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος σε μικρούς χρόνους (έως 60 min) και μία μείωση των επιπέδων, 2h μετά τη φόρτιση, σε σχέση με το χρόνο 0.

Τέλος, με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wallis-Kruskal συγκρίναμε τις μεταβολές των επιπέδων του ουρικού οξέως μεταξύ των παρεμβάσεων και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των παρεμβάσεων των 100g και των 150g γλυκόζης ($p=0,016$) και συγκεκριμένα τη χρονική στιγμή 60min ($p=0,039$), όπου η αύξηση του ουρικού οξέος ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στη φόρτιση των 100g.

4.6 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις μεταβολές των επιπέδων IL-6

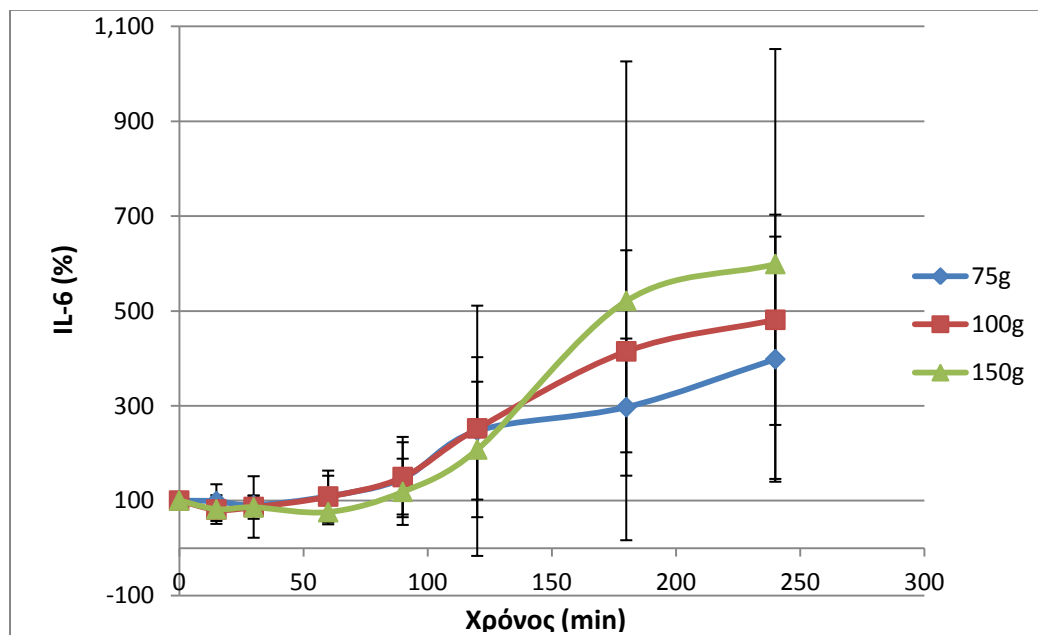
Οι μεταβολές των επιπέδων της IL-6, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα σχήματα που ακολουθούν.



(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

(*# = $0,005 < p < 0,080$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση κατά Wilcoxon)

Διάγραμμα 19 Μεταβολή των απόλυτων τιμών της IL-6 συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



Διάγραμμα 20 Ποσοστιαία (%) μεταβολή της IL-6 συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχουν σημαντικές αυξήσεις στα επίπεδα IL-6 ως προς το χρόνο στις παρεμβάσεις των 75g ($p=0,00$), 100g ($p=0,00$) και 150g γλυκόζης ($p=0,00$).

Τέλος, με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wallis-Kruskal συγκρίναμε τις μεταβολές των επιπέδων IL-6 μεταξύ των παρεμβάσεων και δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των παρεμβάσεων.

4.7 Συσχετίσεις μεταξύ των δεικτών φλεγμονής και άλλων ανθρωπομετρικών, κλινικών και βιοχημικών παραμέτρων πριν την παρέμβαση

Σε μία προσπάθεια να βρεθεί κατά πόσο τα αρχικά επίπεδα των μετρούμενων δεικτών φλεγμονής σχετίζονται με τα αρχικά επίπεδα των ανθρωπομετρικών και βιοχημικών δεικτών των εθελοντών προχωρήσαμε σε ανάλυση συσχετίσεων κατά Spearman. Οι σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 5 Σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του αριθμού λευκοκυττάρων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
BMI	0.828	0.00
DBP_0	0.496	0.051
SBP_0	0.6	0.014
ADP_EC50_0	-0.5	0.04
ADP_2.5_0	0.589	0.027
TRAP_EC50_0	0.523	0.031
TRAP_1_0	-0.688	0.007

Με ADP_EC50 και TRAP_EC50 συμβολίζονται το EC50 του ADP και του TRAP όσον αφορά την ικανότητα τους να προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων. Επίσης, με ADP_2.5 και TRAP_1 συμβολίζονται τα ύψη συσσώρευσης αιμοπεταλίων που προκαλούνται από ADP 2.5 μM και TRAP 1 μM , αντίστοιχα.

Πίνακας 6 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του αριθμού λεμφοκυττάρων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
Age	0.499	0.041
TRAP_1_0	0.53	0.052
hsIL6_0	-0.549	0.022

Πίνακας 7 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του αριθμού κοκκιοκυττάρων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
Heart_Rate_0	0.538	0.032
LYMPHPERC_0	-0.941	0.00
TRAP_1_0	-0.576	0.031
hsIL6_0	0.493	0.045

Πίνακας 8 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του αριθμού αιμοπεταλίων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
BMI	0.596	0.012
DBP_0	0.631	0.009
GPX3_0	0.77	0.001
GPX1LEUK_0	0.585	0.028

Πίνακας 9 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ του όγκου των αιμοπεταλίων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
Age	-0.536	0.027
ADP_EC50_0	-0.556	0.02
ADP_25_0	0.689	0.006
GPX1LEUK_0	-0.786	0.001

Πίνακας 10 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των επιπέδων ουρικού οξέως και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
GPX3_0	-0.696	0.004

Πίνακας 11 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της IL-6 και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman	p
Age	0.547	0.019
BMI	0.54	0.021
DBP_0	0.553	0.021
SBP_0	0.553	0.021
LYMPHPERC_0	-0.549	0.022
GRANPERC_0	0.493	0.045
ADP_2.5_0	0.532	0.041

4.8 Επίδραση των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών στις ποσοστιαίες (%) μεταβολές των δεικτών φλεγμονής μετά τη παρέμβαση

Σε μία προσπάθεια να εκτιμήσουμε κατά πόσο τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εθελοντών επηρεάζουν τις ποσοστιαίες (%) μεταβολές των δεικτών φλεγμονής έγινε ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ των χαρακτηριστικών αυτών και των ποσοστιαίων μεταβολών των δεικτών φλεγμονής. Οι σημαντικές συσχετίσεις φαίνονται στους παρακάτω πίνακες.

Πίνακας 12 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ποσοστιαίας (%) μεταβολής των λευκοκυττάρων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών τις χρονικές στιγμές 2h και 4h

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman WBC_PERC_2	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman WBC_PERC_4	p
Age	0.517	0.049		
TRAP_2_0			-0.652	0.016
GPX3_0	0.641	0.025		
GPX1LEUK_0			0.558	0.047
URIC_0	-0.592	0.043		

Πίνακας 13 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ποσοστιαίας (%) μεταβολής των λεμφοκυττάρων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών τις χρονικές στιγμές 2h και 4h

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman LYMPH_PERC_2	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman LYMPH_PERC_4	p
Heart_Rate_0	0.543	0.045	0.637	0.011
LYMPHPERC_0	-0.656	0.008	-0.549	0.028
GRANPERC_0	0.627	0.012	0.478	0.061
INS_0	0.575	0.04		

Πίνακας 14 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ποσοστιαίας (%) μεταβολής των κοκκιοκυττάρων και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών τις χρονικές στιγμές 2h και 4h.

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman GRAN_PERC_2	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman GRAN_PERC_4	p
TRAP_2_0	-0.795	0.002	-0.765	0.002

Πίνακας 15 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ποσοστιαίας (%) μεταβολής του ουρικού οξέως και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών τις χρονικές στιγμές 60min και 2h

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman URIC_PERC_60	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman URIC_PERC_120	p
PLT_0	0.565	0.035		
GPX1LEUK_0			-0.539	0.038

Πίνακας 16 Στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ της ποσοστιαίας (%) μεταβολής της IL-6 και των βασικών ανθρωπομετρικών, βιοχημικών και κλινικών χαρακτηριστικών των εθελοντών τις χρονικές στιγμές 2h, 180min και 4h

Χαρακτηριστικά	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman hsIL6_PERC_120	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman hsIL6_PERC_180	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman hsIL6_PERC_240	p
BMI	-0.575	0.013				
DBP_0	-0.64	0.006	-0.596	0.012		
SBP_0	-0.607	0.01	-0.518	0.033		
WBC_0	-0.549	0.023				
GLU_0	-0.513	0.051	-0.609	0.01	-0.547	0.035
HOMA_IR	-0.486	0.066	-0.507	0.054	-0.504	0.056

4.9 Αλληλοσυσχετίσεις μεταξύ των μεταβολών των βιοχημικών δεικτών μετά τη παρέμβαση

Με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Spearman συσχετίσαμε τη ποσοστιαία (%) μεταβολή της IL-6 ως προς το χρόνο με τα “εμβαδά των περιοχών κάτω από τις καμπύλες” (Areas Under the Curves / AUCs) της γλυκόζης και της ινσουλίνης αντίστοιχα μετά την παρέμβαση. Οι χρονικές στιγμές που χρησιμοποιήσαμε όσον αφορά τις τιμές της IL-6 προέκυψαν από τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wilcoxon ως στατιστικά σημαντικές.

Πίνακας 17 Συσχετίσεις μεταξύ τις ποσοστιαίας (%) μεταβολής της IL-6 ως προς το χρόνο και των “εμβαδών των περιοχών κάτω από τις καμπύλες” (Areas Under the Curves / AUCs) της γλυκόζης και της ινσουλίνης αντίστοιχα μετά την παρέμβαση

AUC_4H	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman hsIL6_PERC_120	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman hsIL6_PERC_180	p	Συντελεστής συσχέτισης r κατά Spearman hsIL6_PERC_240	p
AUC_4H_GLU	0.746	0.001	0.761	0.001	0.675	0.006
AUC_4H_INS	0.121	0.666	0.229	0.413	0.443	0.098

Παρατηρείται ότι μόνο η μεταγευματική υπεργλυκαιμίας και όχι η μεταγευματική υπερινσουλιναιμία σχετίζεται και μάλιστα πολύ ισχυρά με το ποσοστό αύξησης της IL-6.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η οξεία υπεργλυκαιμία, που προκαλείται μετά την κατανάλωση ενός γεύματος, συνδέεται άμεσα με τη φλεγμονή και το οξειδωτικό στρες. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η πρόσληψη υψηλών επιπέδων θρεπτικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων της γλυκόζης και των λιπαρών οξέων, που καθιστούν τον οργανισμό σε κατάσταση μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας συνδέεται με τη προφλεγμονώδη και οξειδωτική κατάσταση του οργανισμού.[26, 27] Οι αποδείξεις για τις επιβλαβείς επιπτώσεις της οξείας υπεργλυκαιμίας στον ανθρώπινο οργανισμό είναι πολλές, με τη σημαντικότερη αυτών τη προαγωγή του των αντιδράσεων της φλεγμονής. Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι η οξεία υπεργλυκαιμία σχετίζεται με ταχεία αύξηση της συγκέντρωσης των κυκλοφορούντων κυτταροκινών, όπως η IL-6, και την οξειδωτική απόκριση μέσα σε λίγες ώρες.[28, 29]

Στην παρούσα έρευνα έλαβαν μέρος 6 φαινομενικά υγιείς εθελοντές, άνδρες και γυναίκες, μη καπνιστές, με ηλικιακό εύρος 20-40 ετών. Όλοι οι εθελοντές είχαν φυσιολογικό Δείκτη Μάζας Σώματος, φυσιολογική αρτηριακή πίεση, φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης νηστείας, φυσιολογικά επίπεδα ολικής χοληστερόλης, φυσιολογικά επίπεδα τριακυλογλυκερολών, φυσιολογική περιφέρεια μέσης, είχαν καμία ή ελάχιστη φυσική δραστηριότητα (σύμφωνα με το ερωτηματολόγιο IPAQ) και δεν είχαν ιστορικό καρδιαγγειακής νόσου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η απεικόνιση της πορείας των μεταβολών της γλυκόζης των εθελοντών, τόσο για τις απόλυτες τιμές της όσο και για τις ποσοστιαίες, ακολούθησε την κλασική παραβολική καμπύλη μεταβολής γλυκόζης που είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία. Ομοίως, στην απεικόνιση της πορείας των μεταβολών της ινσουλίνης, παρατηρείται η φυσιολογική παραβολική καμπύλη μεταβολής ινσουλίνης που επαληθεύεται αντίστοιχα από τη βιβλιογραφία. Όπως προέκυψε από τις μη παραμετρικές συγκρίσεις των τριών καμπυλών (υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν τα AUC), δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στη γλυκόζη των εθελοντών. Αντιθέτως, βάση των στατιστικών συγκρίσεων των τριών παρεμβάσεων φόρτισης γλυκόζης ως προς τα μεταγευματικά επίπεδα της ινσουλίνης των εθελοντών(υπολογίστηκαν και συγκρίθηκαν τα AUC), παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και συγκεκριμένα μόνο μεταξύ της παρέμβασης της

κατανάλωσης των 75g γλυκόζης συγκριτικά με εκείνη των 150g ($p=0,016$). Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι το πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε δεν κατάφερε, μέσω των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης, να διαφοροποιήσει γλυκαιμικά τις τρεις παρεμβάσεις, αλλά προκάλεσε διαφοροποιήσεις στην υπερινσουλιναιμία.

Αξιολογώντας το παραπάνω συμπέρασμα είναι βέβαιο ότι μπορεί να χαρακτηριστεί αναμενόμενο και δικαιολογημένο. Το γεγονός ότι οι εθελοντές είναι υγιή άτομα και σχετικά νεαρής ηλικίας σημαίνει ότι διαθέτουν εύρυθμους μηχανισμούς μεταβολικής ομοιόστασης που ανταποκρίνονται άμεσα. Συνεπώς, όσο περισσότερη γλυκόζη τους δινόταν να καταναλώσουν, ακολουθούσε αυξημένη παραγωγή ινσουλίνης από το πάγκρεάς τους, με σκοπό τη μείωση των προβλεπόμενων αυξημένων μεταγευματικών επιπέδων γλυκόζης στην κυκλοφορία. Άλλωστε για αυτό και παρατηρείται μία γραμμική τάση αύξησης της μεταγευματικής έκκρισης ινσουλίνης αναλογικά με τη βαρύτητα φόρτισης της κάθε παρέμβασης. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει αναλογική σχέση μεταξύ των φορτίσεων και της μεταβολής της γλυκόζης, γεγονός που οφείλεται στους μηχανισμούς ομοιόστασης που αναφέραμε νωρίτερα και συγκεκριμένα στη δράση της ινσουλίνης.

Στη συνέχεια μετρήθηκαν τα λευκοκύτταρα των εθελοντών, η απόλυτη τιμή τους αλλά και το ποσοστό τους, σε συνάρτηση με το χρόνο σε κάθε παρέμβαση φόρτισης. Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στον αριθμό λευκοκυττάρων ως προς το χρόνο σε κανένα από τα τρία επίπεδα φόρτισης. Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η μη παραμετρική ανάλυση κατά Wilcoxon, που συγκρίνει την απόλυτη τιμή των λευκοκυττάρων κάθε χρονικής στιγμής των παρεμβάσεων με την απόλυτη τιμή πριν από κάθε παρέμβαση (baseline), έδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή στις δύο παρεμβάσεις (75g και 150g). Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των λευκοκυττάρων στη μέση της παρέμβασης ($t=2h$) με φόρτιση 75g γλυκόζης και μείωση στο τέλος της παρέμβασης ($t=4h$) με φόρτιση 150g γλυκόζης. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να εξηγηθούν με βασικές γνώσεις φυσιολογίας. Δεδομένου ότι το πρωτόκολλο περιελάμβανε 8 αιμοληψίες σε κάθε παρέμβαση, ο μυελός των οστών δεν είχε τον απαραίτητο χρόνο κατά τη διάρκεια της παρέμβασης για να αναπληρώσει τον χαμένο όγκο πλάσματος από τις αιμοληψίες με

αποτέλεσμα να αυξάνεται η τιμή των λευκοκυττάρων λόγω μειωμένου όγκου πλάσματος και στη συνέχεια να ακολουθεί μείωση αφού με τη πάροδο του χρόνου ο μυελός των οστών επανέφερε τις φυσιολογικές τιμές.

Κάνοντας μια ανασκόπηση στη βιβλιογραφία όσον αφορά τον αριθμό των λευκοκυττάρων κατά τη διάρκεια δοκιμασίας ανοχή γλυκόζης (OGTT) παρατηρούμε ότι υπάρχει πλήθος ερευνών που επιλέγουν να μελετήσουν τις επιπτώσεις μιας παρέμβασης συγκεκριμένης ποσότητας γλυκόζης (συνήθως 75g) σε εθελοντές που κατατάσσονται σε διαφορετικές ομάδες σύμφωνα με το γλυκαιμικό τους προφίλ, δηλαδή σε φυσιολογικούς, πάσχοντες από διαβήτη, ινσουλινοαντίσταση ή σε προ-διαβητικό στάδιο. Ωστόσο, οι έρευνες αυτές μας προσφέρουν γνώσεις για την επίδραση του γλυκαιμικού φορτίου στον αριθμό των λευκοκυττάρων συγκρίνοντας το φυσιολογικό με το παθολογικό. Ο αριθμός των λευκοκυττάρων φαίνεται να αυξάνεται κατά τη διάρκεια υπεργλυκαιμίας στους εθελοντές που χαρακτηρίζονται από παθολογικό γλυκαιμικό προφίλ, ενώ οι υπόλοιποι εθελοντές φαίνεται να έχουν μικρή ή καμία αύξηση.[34, 35] Οι έρευνες των Boucher et al και των Targher et al μελέτησαν πληθυσμούς με φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης μετά από παρέμβαση φόρτισης με 75g γλυκόζης. Τα αποτελέσματα και των δύο ερευνών έδειξαν ότι σε κάποιους εθελοντές ο αριθμός λευκοκυττάρων αυξήθηκε, ωστόσο τη μεταβολή αυτή την απέδωσαν σε αυξημένους δείκτες των εθελοντών όπως BMI, αρτηριακή πίεση, χοληστερόλη, τριακυλογλυκερόλες κτλ, ακόμα και στην ύπαρξη μεταβολικού συνδρόμου σε κάποιες περιπτώσεις.[36, 37] Συμπερασματικά, η βιβλιογραφία έρχεται να στηρίξει το γεγονός ότι οι παρεμβάσεις δεν πρόκαλεσαν κάποια μεταβολή στον αριθμό των λευκοκυττάρων και αυτό οφείλεται στα χαρακτηριστικά των εθελοντών που τους καθιστούν φυσιολογικούς.

Εκτός από τα λευκοκύτταρα μελετήθηκαν σε αυτή την έρευνα τα λεμφοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα (απόλυτες και ποσοστιαίες τιμές), καθώς και οι σχετικοί πληθυσμοί τους στο σύνολο των λευκοκυττάρων. Τα αποτελέσματα έδειξαν, σύμφωνα με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman, στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό των λεμφοκυττάρων ως προς το χρόνο στις παρεμβάσεις των 75g γλυκόζης ($p=0,015$) και των 100g γλυκόζης ($p=0,056$) και στατιστικά σημαντική αύξηση στον αριθμό κοκκιοκυττάρων ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 150g γλυκόζης ($p=0,050$). Όσον αφορά τα ποσοστά των λεμφοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων

αντίστοιχα στο σύνολο των λευκοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση, σύμφωνα με την ίδια ανάλυση, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των λεμφοκυττάρων στις παρεμβάσεις των 75g γλυκόζης ($p=0,074$) και των 150g γλυκόζης ($p=0,057$) και επίσης στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των κοκκιοκυττάρων στη παρέμβαση των 75g γλυκόζης ($p=0,074$). Αξίζει να σημειωθεί ότι κοιτάζοντας το διαγράμμα που απεικονίζει τις ποσοστιαίες μεταβολές του ποσοστού των λεμφοκυττάρων στο σύνολο των λευκοκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση με το αντίστοιχο των κοκκιοκυττάρων βλέπουμε την ίδια εικόνα αλλά αντίστροφα. Όλα τα παραπάνω αποτελέσματα είναι αναμενόμενα αφού τα λεμφοκύτταρα και τα κοκκιοκύτταρα αποτελούν υποπληθυσμούς των λευκοκυττάρων και συνεπώς σχετίζονται μεταξύ τους αντίστροφα.

Προχωρώντας στην έρευνα μας, αναλύθηκε η πορεία των αιμοπεταλίων, ως απόλυτες και ποσοστιαίες τιμές, αλλά και ο όγκος των αιμοπεταλίων σε συνάρτηση με το χρόνο και στις τρεις παρεμβάσεις. Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει οριακά στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα αιμοπεταλίων ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης ($p=0,069$), ενώ ο όγκος των αιμοπεταλίων δεν σημείωσε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή ως προς το χρόνο σε καμία από τις παρεμβάσεις. Στη βιβλιογραφία οι έρευνες που μελέτησαν την επίδραση της υπεργλυκαιμίας (μέσω OGTT) στα αιμοπετάλια και τον όγκο τους αναφέρουν θετική συσχέτιση του όγκου αιμοπεταλίων με της τιμές γλυκόζης μετά από 1h. Στις έρευνες των Shimodaira M et al. 2014 και των Coban E et al. 2007 όπου σύγκριναν την επίδραση OGTT (75g γλυκόζης) στον όγκο αιμοπεταλίων εθελοντών νορμογλυκαιμικού προφίλ και εθελοντών με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη φάνηκε μικρότερη αύξηση του όγκου των αιμοπεταλίων στη πρώτη ομάδα η οποία παρατηρήθηκε 1h μετά τη χορήγηση γλυκόζης.[38, 39] Κοιτάζοντας συνολικά τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας και τα δεδομένα που υπάρχουν στη βιβλιογραφία παρατηρούμε ότι η υπεργλυκαιμία επηρεάζει τα αιμοπετάλια, ωστόσο στο δικό μας πρωτόκολλο η κάθε παρέμβαση στο σύνολο της δεν κατάφερε να επιφέρει κάποια μεταβολή αφού η τελευταία αιμοληψία έγινε στις 4h. Το χρονικό περιθώριο των 4h φαίνεται να είναι αρκετό για να λειτουργήσει ο μηχανισμός μεταβολικής ομοιόστασης επαναφέροντας τα επίπεδα γλυκόζης στα αρχικά φυσιολογικά επίπεδα (baseline) κατά συνέπεια και των αιμοπεταλίων.[40]

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της υπεργλυκαιμίας στα επίπεδα του ουρικού οξέος, σε απόλυτες και ποσοστιαίες τιμές, που αποτελεί μαζί με την IL-6 τους δύο δείκτες στη μελέτη των οποίων επικεντρώθηκε η έρευνα αυτή. Το ουρικό οξύ είναι μια ετεροκυκλική χημική ένωση, αποτελεί παράγωγο της πουρίνης και σχηματίζεται στον οργανισμό. Το ουρικό οξύ συγκεντρώνει αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς θεωρείται δείκτης φλεγμονής, σχετίζεται με τον κίνδυνο καρδιαγγειακής νόσου, το μεταβολικό σύνδρομο, τη στεφανιαία νόσο, τη παθογένεια της υπέρτασης και της αθηροσκλήρωσης.[41, 42] Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Wilcoxon έδειξε αύξηση του ουρικού οξέος τη χρονική στιγμή 60min ($p=0,080$) και μείωση τη χρονική στιγμή 120min ($p=0,044$) σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης. Ακόμα, η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα ουρικού οξέως ως προς το χρόνο στη παρέμβαση των 100g γλυκόζης ($p=0,043$) και τέλος, με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wallis-Kruskal συγκρίναμε τις μεταβολές των επιπέδων του ουρικού οξέως μεταξύ των παρεμβάσεων και παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή μεταξύ των παρεμβάσεων των 100g και των 150g γλυκόζης ($p=0,016$) και συγκεκριμένα τη χρονική στιγμή 60min ($p=0,039$). Συνολικά, φάνηκε ότι η φόρτιση γλυκόζης επέφερε αυξομειώσεις, αν και όχι πάντα στατιστικές σημαντικές, στα επίπεδα του ουρικού οξέος με πιο έντονη και στατιστικά σημαντική τη παρέμβαση που χρησιμοποιήθηκαν τα 100g γλυκόζης. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η φόρτιση γλυκόζης προκαλεί την παραγωγή ουρικού οξέος, ωστόσο η αύξηση των επιπέδων του ουρικού οξέος είναι μεγαλύτερη σε εθελοντές που έχουν διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη, βρίσκονται σε προ-διαβητικό στάδιο ή πάσχουν από διαβήτη.[43] Στη παρούσα έρευνα παρατηρήθηκε ότι το ουρικό οξύ επανέρχεται στα αρχικά του επίπεδα κι αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι με το πέρασμα του χρόνου και τη δράση της ινσουλίνης το επίπεδο υπεργλυκαιμίας μειώνεται με τη γλυκόζη να επανέρχεται στις τιμές προ παρέμβασης, όπως αναλύσαμε και νωρίτερα.

Η IL-6 είναι ο δεύτερος δείκτης στη μελέτη του οποίου επικεντρώθηκε η έρευνα αυτή, είναι γνωστή για πολυάριθμες δράσεις με πιο σημαντική τη δράση της στο ανοσοποιητικό σύστημα και θεωρείται ως επί το πλείστον μια προ-φλεγμονώδης κυτταροκίνη με πολύ σημαντική αναγεννητική ή αντι-φλεγμονώδη δράση. Η IL-6

κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο κατά τη μετάβαση από την έμφυτη στην επίκτητη ανοσία. Συγκεκριμένα, παρεμβαίνει στη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων σε μακροφάγα, αυξάνει την απόπτωση ουδετερόφιλων, συμβάλλει στη προσέλκυση και τη προστασία κατά της απόπτωσης των T λεμφοκυττάρων και τέλος, παίζει κρίσιμο ρόλο στη διαφοροποίηση των B και T κυττάρων.[9, 10] Η μη παραμετρική ανάλυση κατά Wilcoxon έδειξε αύξηση της IL-6 τις χρονικές στιγμές 120min, 180min και 240min και στις τρεις παρεμβάσεις. Ακόμα, η μη παραμετρική ανάλυση κατά Friedman έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα επίπεδα της IL-6 ως προς το χρόνο και στις τρεις παρεμβάσεις γλυκόζης ($p=0,00$) και τέλος, με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wallis-Kruskal συγκρίναμε τις μεταβολές των επιπέδων της IL-6 μεταξύ των παρεμβάσεων και δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μεταβολή. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φαίνεται ότι η IL-6 αυξάνεται στο χρόνο ανεξαρτήτως φόρτισης γλυκόζης, συνεπώς η μεταγευματική υπεργλυκαιμία καθιστά τον οργανισμό σε κατάσταση υποκλινικής φλεγμονής. Το συμπέρασμα αυτό στηρίζουν και άλλες έρευνες συνδέοντας την υπεργλυκαιμία με αυξημένα επίπεδα κυτοκινών και ειδικότερα αναφέρουν ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία, η οποία θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και παροδική, προκαλεί μεγαλύτερη αύξηση κυτοκινών, όπως η IL-6, σε σύγκριση με τη παρατεταμένη υπεργλυκαιμία.[44, 45]

Στα πλαίσια αύξησης της χρησιμότητας και της λειτουργικότητας των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν στατιστικές συσχετίσεις κατά Spearman, κατά τις οποίες μελετήθηκε ο βαθμός συσχέτισης της τιμής των λευκοκυττάρων, των λεμφοκυττάρων και των κοκκιοκυττάρων αντίστοιχα, για τη χρονική στιγμή μηδέν (baseline) κάθε παρέμβασης με όλους τους υπόλοιπους βιολογικούς δείκτες και ανθρωπομετρικές μετρήσεις που έγιναν. Φάνηκε ότι τα λευκοκύτταρα, αλλά και οι πληθυσμοί τους, συσχετίζονται θετικά με ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά όπως το BMI, η ηλικία και η αρτηριακή πίεση, αλλά και με δείκτες ενεργοποίησης ή ευαισθησίας των αιμοπεταλίων θα μπορούσαμε να τους χαρακτηρίσουμε, όπως ADP_EC50_0, ADP_2.5_0, TRAP_EC50_0, TRAP_1_0. Οι συσχετίσεις αυτές είναι αναμενόμενες αφού όσο αυξάνονται οι τιμές των χαρακτηριστικών και των δεικτών που αναφέραμε υπάρχει σύνδεση με υποκλινική φλεγμονή.

Προχωρώντας στους δύο δείκτες στη μελέτη των οποίων επικεντρώθηκε η έρευνα αυτή, όσον αφορά τον όγκο του ουρικού οξέος φάνηκε αρνητική συσχέτιση με τη GPX3_0. Όσον αφορά την IL-6 σημειώθηκαν θετικές συσχετίσεις την ηλικία, το BMI, τη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, το ADP_2.5_0, το ποσοστό των κοκκιοκυττάρων και αντίστοιχα αρνητική συσχέτιση με το ποσοστό των λεμφοκυττάρων. Οι συσχετίσεις της IL-6 οφείλονται στην άμεση σχέση της με τη φλεγμονή, οπότε είναι λογικό να υπάρχει αύξηση της IL-6 όταν υπάρχει αύξηση των δεικτών που οδηγούν στην υποκλινική φλεγμονή.

Με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wilcoxon καταλήξαμε στις χρονικές στιγμές που σημειώνεται στατιστικά σημαντική μεταβολή και στη συνέχεια συσχετίσαμε τις ποσοστιαίες (%) μεταβολές των δεικτών φλεγμονής με τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εθελοντών. Στις συσχετίσεις των ποσοστιαίων μεταβολών των λευκοκυττάρων και των υποπληθυσμών τους βλέπουμε την ίδια εικόνα με τις αντίστοιχες συσχετίσεις τους για τη χρονική στιγμή 0 (baseline). Ακόμα, σημειώθηκε θετική συσχέτιση του ουρικού οξέος με τα αιμοπετάλια τη χρονική στιγμή 60min, που οφείλεται στην ύπαρξη φλεγμονής, και αρνητική συσχέτιση με τη GPX1LEUK_0, που πιθανώς οφείλεται στο γεγονός ότι η CPX1 αποτελεί δυνητικά αντιοξειδωτικό παράγοντα. Στη περίπτωση της IL-6 έχουμε αρνητική συσχέτιση της ποσοστιαίας μεταβολής της τη χρονική στιγμή 120min με το BMI, τη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, τα λευκοκύτταρα, τη γλυκόζη και το HOMA-IR, τη χρονική στιγμή 180min έχουμε αρνητική συσχέτιση με τη συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, τη γλυκόζη και το HOMA-IR και τη χρονική στιγμή 240min επίσης αρνητική συσχέτιση με τη γλυκόζη και το HOMA-IR. Οι συσχετίσεις αυτές δείχνουν μειωμένη αύξηση της IL-6 όταν οι δείκτες που αναφέρθηκαν είναι αυξημένοι που οφείλεται στο γεγονός ότι όταν έχουμε αυξημένο BMI, γλυκόζη, HOMA-IR κτλ ο οργανισμός βρίσκεται ήδη σε υποκλινική φλεγμονή, συνεπώς έχουμε άλλη αρχική τιμή (baseline) IL-6 άρα και η αύξηση της προβλέπεται μικρότερη.

Συνοψίζοντας όλα τα αποτελέσματα και καταλήγοντας στη βασική συσχέτιση της παρούσας έρευνας καταλήξαμε και στο βασικό συμπέρασμα. Συγκεκριμένα, με τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Spearman συσχετίσαμε τη ποσοστιαίας (%) μεταβολή της IL-6 ως προς το χρόνο με τα “εμβαδά των περιοχών κάτω από τις καμπύλες” (Areas

Under the Curves / AUCs) της γλυκόζης και της ινσουλίνης αντίστοιχα μετά την παρέμβαση. Οι χρονικές στιγμές που χρησιμοποιήσαμε, 120min, 180min και 240min, όσον αφορά τις τιμές της IL-6 προέκυψαν από τη μη παραμετρική ανάλυση κατά Wilcoxon ως στατιστικά σημαντικές. Και στις τρεις χρονικές στιγμές η ποσοστιαία μεταβολή της IL-6 παρουσιάζει θετική συσχέτιση με το AUC της γλυκόζης, ενώ δεν υπάρχει καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση της με το AUC της ινσουλίνης σε καμία χρονική στιγμή. Ουσιαστικά, οι συχετίσεις αυτές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η υπεργλυκαιμία επάγει έκκριση IL-6 αλλά όχι η υπερινσουλοναιμία

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Jurk, K. and B.E. Kehrel, *[Pathophysiology and biochemistry of platelets]*. Internist (Berl), 2010. **51**(9): p. 1086, 1088-92, 1094.
2. Senturk, T., *Platelet function in inflammatory diseases: insights from clinical studies*. Inflamm Allergy Drug Targets, 2010. **9**(5): p. 355-63.
3. Hofmann, F.B., *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 210. 2012.
4. Aksu, K., A. Donmez, and G. Keser, *Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management*. Curr Pharm Des, 2012. **18**(11): p. 1478-93.
5. Margetic, S., *Inflammation and haemostasis*. Biochem Med (Zagreb), 2012. **22**(1): p. 49-62.
6. Smith, T.L. and A.S. Weyrich, *Platelets as central mediators of systemic inflammatory responses*. Thromb Res, 2011. **127**(5): p. 391-4.
7. Vieira-de-Abreu, A., et al., *Platelets: versatile effector cells in hemostasis, inflammation, and the immune continuum*. Semin Immunopathol, 2012. **34**(1): p. 5-30.
8. Jenne, C.N., R. Urrutia, and P. Kubes, *Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity*. Int J Lab Hematol, 2013. **35**(3): p. 254-61.
9. Carey, A.L., et al., *Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2006. **55**(10): p. 2688-97.
10. Scheller, J., et al., *The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(5): p. 878-88.
11. Riccardi, G., A.A. Rivellese, and R. Giacco, *Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(1): p. 269S-274S.
12. Gropper SS, S.J., Groff JL, ed. *Διατροφή και Μεταβολισμός*. 2007, Επιστημονική επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Συντώσης Λάμπρος.
13. Schuerholz, T., et al., *Acute short-term hyperglycemia impairs platelet receptor expression even in healthy adults in vitro*. Med Sci Monit, 2008. **14**(12): p. BR294-8.
14. Vaidyula, V.R., G. Boden, and A.K. Rao, *Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects*. Platelets, 2006. **17**(8): p. 577-85.
15. Brealey, D. and M. Singer, *Hyperglycemia in critical illness: a review*. J Diabetes Sci Technol, 2009. **3**(6): p. 1250-60.
16. Kitada, M., et al., *Molecular mechanisms of diabetic vascular complications*. J Diabetes Investig, 2010. **1**(3): p. 77-89.
17. Vazzana, N., et al., *Diabetes mellitus and thrombosis*. Thromb Res, 2012. **129**(3): p. 371-7.
18. Basta, G., A.M. Schmidt, and R. De Caterina, *Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes*. Cardiovasc Res, 2004. **63**(4): p. 582-92.
19. Gawlowski, T., et al., *Advanced glycation end products strongly activate platelets*. Eur J Nutr, 2009. **48**(8): p. 475-81.
20. Tousoulis, D., et al., *Diabetes mellitus-associated vascular impairment: novel circulating biomarkers and therapeutic approaches*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(8): p. 667-76.

21. Rao, A.K., et al., *Alterations in insulin-signaling and coagulation pathways in platelets during hyperglycemia-hyperinsulinemia in healthy non-diabetic subject*. Thromb Res, 2014. **134**(3): p. 704-10.
22. Yamagishi, S.I., et al., *Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1491-4.
23. Sakamoto, T., et al., *Rapid change of platelet aggregability in acute hyperglycemia. Detection by a novel laser-light scattering method*. Thromb Haemost, 2000. **83**(3): p. 475-9.
24. Ferreiro, J.L., J.A. Gomez-Hospital, and D.J. Angiolillo, *Platelet abnormalities in diabetes mellitus*. Diab Vasc Dis Res, 2010. **7**(4): p. 251-9.
25. Morel, O., et al., *Diabetes and the platelet: toward new therapeutic paradigms for diabetic atherothrombosis*. Atherosclerosis, 2010. **212**(2): p. 367-76.
26. Choi, H.J., et al., *Human transcriptome analysis of acute responses to glucose ingestion reveals the role of leukocytes in hyperglycemia-induced inflammation*. Physiol Genomics, 2012. **44**(24): p. 1179-87.
27. Chaudhuri, A. and G.E. Umpierrez, *Oxidative stress and inflammation in hyperglycemic crises and resolution with insulin: implications for the acute and chronic complications of hyperglycemia*. J Diabetes Complications, 2012. **26**(4): p. 257-8.
28. Volpe, C.M., et al., *The production of nitric oxide, IL-6, and TNF-alpha in palmitate-stimulated PBMCs is enhanced through hyperglycemia in diabetes*. Oxid Med Cell Longev, 2014. **2014**: p. 479587.
29. Yoneyama, S., et al., *The manner of the inflammation-boosting effect caused by acute hyperglycemia secondary to overfeeding and the effects of insulin therapy in a rat model of sepsis*. J Surg Res, 2013. **185**(1): p. 380-7.
30. Ceriello, A., et al., *Glucagon-like peptide 1 reduces endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress induced by both hyperglycemia and hypoglycemia in type 1 diabetes*. Diabetes Care, 2013. **36**(8): p. 2346-50.
31. Turina, M., D.E. Fry, and H.C. Polk, Jr., *Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects*. Crit Care Med, 2005. **33**(7): p. 1624-33.
32. Alexiewicz, J.M., et al., *Polymorphonuclear leukocytes in non-insulin-dependent diabetes mellitus: abnormalities in metabolism and function*. Ann Intern Med, 1995. **123**(12): p. 919-24.
33. Turina, M., et al., *Effects of hyperglycemia, hyperinsulinemia, and hyperosmolarity on neutrophil apoptosis*. Surg Infect (Larchmt), 2006. **7**(2): p. 111-21.
34. Gokulakrishnan, K., et al., *Association of leukocyte count with varying degrees of glucose intolerance in Asian Indians: the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-26)*. Metab Syndr Relat Disord, 2009. **7**(3): p. 205-10.
35. Ohshita, K., et al., *Elevated white blood cell count in subjects with impaired glucose tolerance*. Diabetes Care, 2004. **27**(2): p. 491-6.
36. Boucher, A.A., et al., *Leukocyte count and cardiometabolic risk among healthy participants with parental type 2 diabetes: the Pathobiology of Prediabetes in a Biracial Cohort study*. Ethn Dis, 2012. **22**(4): p. 445-50.
37. Targher, G., et al., *The white blood cell count: its relationship to plasma insulin and other cardiovascular risk factors in healthy male individuals*. J Intern Med, 1996. **239**(5): p. 435-41.
38. Coban, E., S. Kucuktag, and S. Basyigit, *Platelet activation in subjects with impaired glucose tolerance*. Platelets, 2007. **18**(8): p. 591-4.

39. Shimodaira, M., et al., *Correlation between mean platelet volume and blood glucose levels after oral glucose loading in normoglycemic and prediabetic Japanese subjects*. J Diabetes Investig, 2014. **5**(1): p. 66-71.
40. Carleo, R., et al., *[Effects of oral glucose load on blood lipids and on platelet function]*. Boll Soc Ital Biol Sper, 1980. **56**(9): p. 853-9.
41. Coutinho Tde, A., et al., *Associations of serum uric acid with markers of inflammation, metabolic syndrome, and subclinical coronary atherosclerosis*. Am J Hypertens, 2007. **20**(1): p. 83-9.
42. Kanellis, J. and D.H. Kang, *Uric acid as a mediator of endothelial dysfunction, inflammation, and vascular disease*. Semin Nephrol, 2005. **25**(1): p. 39-42.
43. Costa, A., et al., *Uric acid concentration in subjects at risk of type 2 diabetes mellitus: relationship to components of the metabolic syndrome*. Metabolism, 2002. **51**(3): p. 372-5.
44. Cardellini, M., et al., *Plasma interleukin-6 levels are increased in subjects with impaired glucose tolerance but not in those with impaired fasting glucose in a cohort of Italian Caucasians*. Diabetes Metab Res Rev, 2007. **23**(2): p. 141-5.
45. Esposito, K., et al., *Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress*. Circulation, 2002. **106**(16): p. 2067-72.