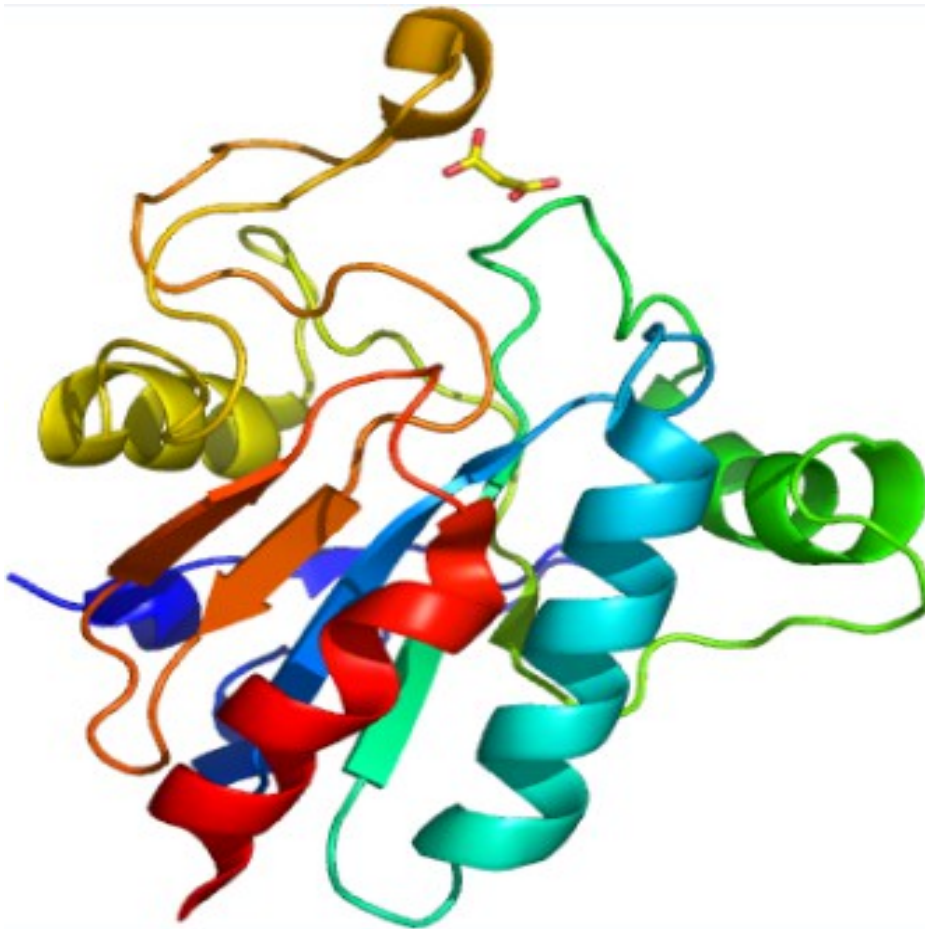


ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΛΕΥΚΟΚΥΤΤΑΡΑ ΚΑΙ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ ΥΓΙΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟ ΜΕΤΑΓΕΥΜΑΤΙΚΟ ΣΤΑΔΙΟ”



Φοιτητής: Αλέξανδρος Καραγιάννης

Επιβλέπων Καθηγητής: Τζώρτζης Νομικός

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

2013-2014

Περιεχόμενα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	4
1.1 : Μεταγευματική Κατάσταση.....	4
1.1.1 : Εισαγωγικά.....	4
1.1.2 : Υδατάνθρακες.....	5
1.1.3 : Λίπη.....	8
1.1.4 : Πρωτεΐνες.....	12
1.2 : Οξειδωτικό Στρες.....	14
1.2.1 : Βασικές Έννοιες και Μηχανισμοί.....	14
1.2.2 : Είδη Ελευθέρων Ριζών.....	15
1.2.3 : Συνέπειες των Ελευθέρων Ριζών.....	17
1.2.4 : Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί.....	19
1.3 : Λευκοκύτταρα και Αιμοπετάλια.....	27
1.3.1 : Εισαγωγή.....	27
1.3.2 : Λευκοκύτταρα (Φυσιολογία και Δράσεις).....	28
1.3.2.1 : Εισαγωγή.....	28
1.3.2.2 : Τα Λευκοκύτταρα των μη ειδικών μηχανισμών άμυνας.....	29
1.3.2.3 : Τα Λευκοκύτταρα των ειδικών μηχανισμών άμυνας.....	33
1.3.2.3.1 : Τα Β και τα Τ λεμφοκύτταρα.....	34
1.3.2.3.2 : Τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα.....	39
1.3.2.3.3 : Τα ρυθμιστικά Τ-λεμφοκύτταρα.....	41
1.3.2.3.1 : Τα κύτταρα φυσικοί φονείς.....	41
1.3.3 : Αιμοπετάλια (Φυσιολογία και Δράσεις).....	43
1.3.3.1 : Ο μηχανισμός της αιμόστασης.....	44
1.4 : Οξειδωτικού Στρες σε Λευκοκύτταρα και τα Αιμοπετάλια.....	49
1.4.1 : Οξειδωτικό Στρες και Λευκοκύτταρα.....	49
1.4.1.1 : Γενικές πληροφορίες για το ρόλο των ελευθέρων ριζών στη λειτουργία των λευκοκυττάρων και τις αλληλεπιδράσεις αυτών.....	49
1.4.1.2 : Γενικά για μερικά ενδογενή αντιοξειδωτικά και τη σχέση τους με τα λευκοκύτταρα.....	50
1.4.1.3 : Ένα παράδειγμα για τη σημασία της διατήρησης της ισορροπίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα.....	51
1.4.1.4 : Λειτουργίες μακροφάγων και ελεύθερες ρίζες.....	52
1.4.1.5 : Τ-λεμφοκύτταρα και οξειδωτικό στρες.....	54
1.4.1.6 : Η σημασία την διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος.....	62
1.4.2 : Οξειδωτικό Στρες και Αιμοπετάλια.....	63
1.5 : Επίδραση Μεταγευματικής Κατάστασης στις Δράσεις Λευκοκυττάρων και Αιμοπεταλίων.....	66
1.5.1 : Μεταγευματική Κατάσταση και Λευκοκύτταρα.....	66
1.5.1.1 : Υπερλιπιδαιμία και Λευκοκύτταρα.....	66
1.5.1.2 : Υπεργλυκαιμία και Λευκοκύτταρα.....	71
1.5.2 : Μεταγευματική Κατάσταση και Αιμοπετάλια.....	71
1.5.2.1 : Υπερλιπιδαιμία και Αιμοπετάλια.....	71
1.5.2.2 : Υπεργλυκαιμία και Αιμοπετάλια.....	72
1.5.3 : Επίλογος Υποκεφαλαίου.....	73
1.6 : Επίδραση Μεταγευματικής Κατάστασης στο Οξειδωτικό Στρες.....	74
1.6.1 : Εισαγωγικά.....	74
1.6.2 : Μεταγευματική (υπερ)λιπιδαιμία και οξειδωτικό στρες.....	75
1.6.3 : Μεταγευματική (υπερ)γλυκαιμία και οξειδωτικό στρες.....	76
1.6.4 : Ειδικότεροι μεταγευματικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με οξειδωτικό στρες (AGEs και ALEs).....	77
1.6.5 : Κατασταλτικοί παράγοντες του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες.....	78
1.6.6 : Ενδοκυττάριοι μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού στρες κατά τη μεταγευματική	

κατάσταση.....	80
1.6.7 : Επίλογος Υποκεφαλαίου.....	82
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΣΚΟΠΟΣ.....	84
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	85
3.1 : Επιλογή Εθελοντών.....	85
3.2 : Σχεδιασμός της Μελέτης για το πρωτόκολλο της υπεργλυκαιμίας.....	86
3.3 : Ανθρωπομετρία.....	87
3.4 : Απομόνωση και Επεξεργασία Βιολογικών Δειγμάτων.....	87
3.4.1 : Συνολική Περιγραφή.....	87
3.4.2 : Απομόνωση πλάσματος και ορού.....	88
3.4.3 : Απομόνωση λευκοκυττάρων.....	88
3.4.5 : Συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια.....	89
3.4.5.1 : Η Πειραματική Μέθοδος.....	89
3.4.5.2 : Τα Πειραματικά Στάδια.....	91
3.4.6 : Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford.....	92
3.4.6.1 : Αρχή μεθόδου.....	92
3.4.6.2 : Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια.....	92
3.4.6.3 : Αναλυτική πορεία.....	93
3.4.6.4 : Υπολογισμοί.....	93
3.4.7 : Προσδιορισμός Δραστικότητας της Υπεροξειδάσης της Γλουταθειόνης σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων.....	94
3.4.7.1 : Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια.....	94
3.4.7.2 : Αντίδραση.....	95
3.4.7.3 : Αναλυτική Πορεία.....	95
3.4.7.4 : Υπολογισμοί.....	96
3.5 : Στατιστική Ανάλυση.....	96
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	97
4.1 : Εισαγωγή.....	97
4.2 : Οι εθελοντές της μελέτης.....	97
4.3 : Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης.....	98
4.4 : Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις δραστικότητες GPX1 λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων.....	103
4.4.1 : Διαγράμματα Μεταβολής της Δραστικότητας της GPX1 των Λευκοκυττάρων σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση.....	103
4.4.2 : Διαγράμματα Μεταβολής της Δραστικότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση.....	106
4.5 : Συσχετίσεις.....	109
4.5.1: Βασικές Συσχετίσεις.....	109
4.5.2: Περαιτέρω Συσχετίσεις.....	112
4.5.3: Ειδικές Συσχετίσεις (Παλινδρομήσεις).....	113
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	114
5.1 : Επίδραση της φόρτισης γλυκόζης στις μεταβολές γλυκόζης - ινσουλίνης.....	114
5.2 : Σχολιασμός Αποτελεσμάτων Διαγραμμάτων της GPX των Λευκοκυττάρων.....	115
5.3 : Σχολιασμός Αποτελεσμάτων Διαγραμμάτων της GPX των Αιμοπεταλίων.....	117
5.4 : Σχολιασμός Αποτελεσμάτων των Συσχετίσεων.....	118
5.4.1 : Σχολιασμοί Συσχετίσεων Δραστικότητας GPX1 των Λευκοκυττάρων των Εθελοντών σε χρόνο μηδέν.....	118
5.4.2 : Σχολιασμοί Συσχετίσεων Δραστικότητας GPX1 των Αιμοπεταλίων των Εθελοντών σε χρόνο μηδέν.....	120
5.5 : Δεδομένα Άλλων Μελετών.....	121
5.6 : Επίλογος Κεφαλαίου.....	126
Βιβλιογραφία.....	127

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 : Μεταγευματική Κατάσταση

1.1.1 : Εισαγωγικά

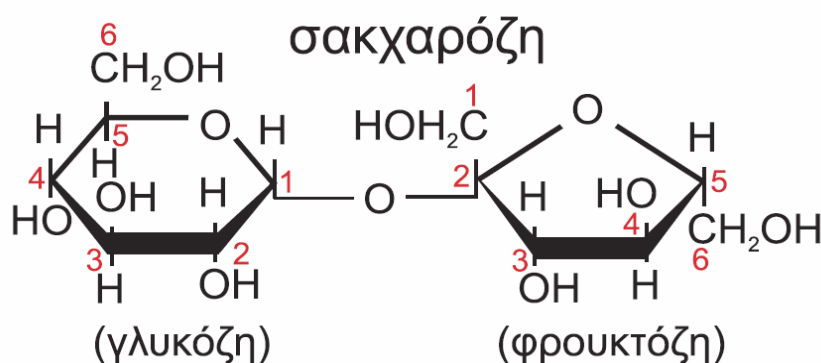
Μεταγευματική κατάσταση ορίζεται ως η χρονική περίοδος μετά από την κατανάλωση ενός γεύματος κατά την οποία ο ανθρώπινος οργανισμός επεξεργάζεται και διαχειρίζεται τα θρεπτικά συστατικά που προσέλαβε μέσω της τροφής. Η μεταγευματική κατάσταση μπορεί να διαρκέσει από 3-4 έως 6-8 ώρες από την κατανάλωση του τελευταίου γεύματος ανάλογα την ιδιοσυγκρασία του κάθε οργανισμού και τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά του γεύματος. Ο προσδιορισμός της χρονική περιόδου της μεταγευματικής κατάστασης καθορίζεται από το κατά πόσο ακόμη μπορούν να ανιχνευθούν αυξημένες (των φυσιολογικών) συγκεντρώσεις θρεπτικών συστατικών στο αίμα του υγιούς ατόμου, μετά την κατανάλωση ενός γεύματος, όσο και από τις συγκεντρώσεις μεταβολιτών στο αίμα που χαρακτηρίζουν την κατάσταση νηστείας (= επιτυγχάνεται με μηδενική κατανάλωση τροφής για ~8 ώρες), όπως κετονικά οξέα ή σχετικά μειωμένα επίπεδα θρεπτικών συστατικών. [1]

Τα θρεπτικά συστατικά με τα οποία τροφοδοτείται ο ανθρώπινος οργανισμός, κατά τη μεταγευματική κατάσταση, ταξινομούνται σε δύο κύριες κατηγορίες: τα μακροθρεπτικά και τα μικροθρεπτικά. Τα μακροθρεπτικά είναι οι υδατάνθρακες, τα λίπη και οι πρωτεΐνες, ενώ τα μικροθρεπτικά απαρτίζουν οι βιταμίνες, τα μέταλλα / μεταλλικά ιόντα και τα ιχνοστοιχεία. [1]

Στη συνέχεια, θα περιγραφούν οι διαδικασίες μεταβολικής διαχείρισης των μακροθρεπτικών συστατικών κατά τη μεταγευματική κατάσταση, καθώς αυτά αποτελούν ένα από τα βασικά αντικείμενα μελέτης αυτής της πτυχιακής και όχι τα μικροθρεπτικά συστατικά. Η σειρά παρουσίασής τους που θα ακολουθηθεί είναι: υδατάνθρακες, λίπη, πρωτεΐνες.

1.1.2 : Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι οργανικές ενώσεις του άνθρακα που, όσον αφορά τα τρόφιμα, απαντώνται είτε σε μικρού μεγέθους μόνο- και δι- σακχαρίτες είτε σε μεγαλύτερου μεγέθους πολυσακχαρίτες. Οι μονοσακχαρίτες είναι κυκλοποιημένες αλδεΐδες ή κετόνες με 5 ή 6 άτομα άνθρακα. Οι τρεις βασικοί μονοσακχαρίτες που συναντώνται στη φύση είναι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη. Όταν δύο εκ των παραπάνω μονοσακχαριτών δημιουργήσουν έναν ομοιοπολικό δεσμό, ονόματι γλυκοζιτικό δεσμό, σχηματίζουν ένα δισακχαρίτη. Αυτοί οι δεσμοί, ανάλογα τη στερεοχημική διάταξη που θα διαμορφωθεί στο τελικό μόριο, διαχωρίζονται σε α- και β- γλυκοζιτικούς δεσμούς. Οι πιο κοινά απαντώμενοι δισακχαρίτες στη φύση είναι η σακχαρόζη (γλυκόζη + φρουκτόζη) (που είναι η κοινή ζάχαρη), η μαλτόζη (γλυκόζη + γλυκόζη) (που απαντάται στη βύνη του κριθαριού) και η λακτόζη (γλυκόζη + γαλακτόζη) (που βρίσκεται στο γάλα). Στην περίπτωση που οι παραπάνω δισακχαρίτες σχηματίσουν ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ τους, δημιουργώντας μεγαλύτερες μακρομοριακές αλυσίδες, συντελούν στη δημιουργία των πολυσακχαριτών. Μερικοί ενδεικτικοί πολυσακχαρίτες είναι χαρακτηριστικά η κυτταρίνη (κύριο συστατικό των τοιχωμάτων των φυτικών κυττάρων) και το άμυλο (αποθηκευτικός πολυσακχαρίτης των φυτών). [2]

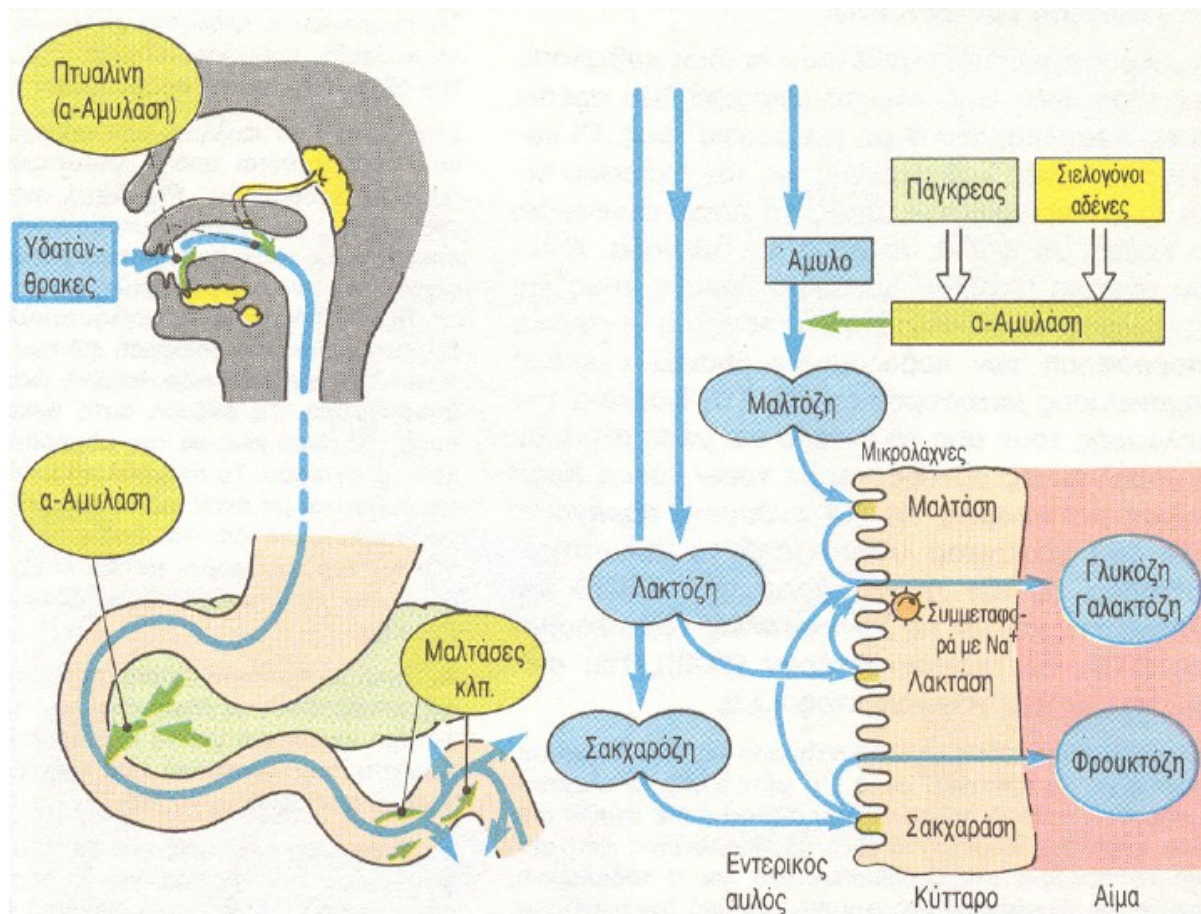


(**Εικόνα 1.1:** Το μόριο της σακχαρόζης αποτελούμενο από ένα μόριο γλυκόζης και ένα μόριο φρουκτόζης ενωμένα με ένα γλυκοζιτικό δεσμό [2])

Όσον αφορά την πέψη, την απορρόφηση και τη διαχείριση των υδατανθράκων από τον ανθρώπινο οργανισμό, αυτές αποτελούνται από πολλαπλά στάδια, διαδικασίες και μηχανισμούς. [1]

Η πέψη των υδατανθράκων ξεκινάει από το στόμα, όπου το σάλιο που περιέχει το ένζυμο α-αμυλάση, αξιοποιείται για τη μερική υδρόλυση των δεσμών των καταναλισκομένων υδατανθράκων. Στη συνέχεια, μικρό ρόλο, αλλά υπολογίσιμο, διαδραματίζει το υδροχλωρικό οξύ του στομάχου που “χαλαρώνει” τους δεσμούς των όποιων πολυσακχαριτών υπάρχουν στο γεύμα που καταναλώθηκε. Ωστόσο, η πέψη των υδατανθράκων ουσιαστικά λαμβάνει χώρα και ολοκληρώνεται κατά μήκος του λεπτού εντέρου, από όπου διέρχεται σε επόμενο στάδιο η τροφή. [1]

Στο λεπτό έντερο και συγκεκριμένα στις πολυπλήθεις λάχνες που βρίσκονται διάσπαρτες σε όλο το μήκος του, εδράζονται ένζυμα που έχουν την ικανότητα να υδrolύουν τους γλυκοζιτικούς δεσμούς των υδατανθράκων, μετατρέποντάς τους σε μονοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν να περάσουν εύκολα πλέον από τις στενές διόδους των διαφόρων εξειδικευμένων σε αυτούς υποδοχέων των επιθηλιακών κυττάρων του λεπτού εντέρου στην αιματική κυκλοφορία. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται γλυκοζιδάσες και, αν και πολύ χρήσιμα, διέπονται από κάποιους περιορισμούς. Μπορούν να υδrolύσουν υδατάνθρακες που έχουν δημιουργηθεί από την ένωση σακχάρων με α-γλυκοζιτικό δεσμό και όχι με β-γλυκοζιτικό δεσμό. Για όσους υδατάνθρακες που περιέχουν β-γλυκοζιτικούς δεσμούς, δεν μπορεί να ολοκληρωθεί η πέψη τους, ώστε να απορροφηθούν από τα εντεροκύτταρα και έτσι συνεχίζουν την πορεία τους μέχρι και το παχύ έντερο, όπου εκεί τα συμβιωτικά βακτήρια που κατοικούν, μπορούν να διασπάσουν μερικώς αυτούς τους υδατάνθρακες σε ένα βαθμό, χωρίς όμως και πάλι να τους καταμήσουν πλήρως. Εν κατακλείδι, ό,τι περισσεύει από τους από τους “άπεπτους” υδατάνθρακες αποβάλλεται από τον οργανισμό μέσω των κοπράνων. Αυτοί οι υδατάνθρακες είναι εκείνοι που ονομάζονται φυτικές ίνες. [1]



(**Εικόνα 1.2:** Η πορεία πέψης και απορρόφησης των υδατανθράκων [3])

Επανεστιάζοντας, στους μονοσακχαρίτες που απορροφήθηκαν από τα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου και που πέρασαν τελικά στην αιματική κυκλοφορία, θα ακολουθήσει ανάλυση της επικείμενης διαχείρισής τους από τον οργανισμό. Οι μονοσοσακχαρίτες αυτοί, αφού περάσουν στο αίμα, κατευθύνονται μέσω της πυλαίας φλέβας στο όργανο μεταβολικό διαχειριστή του ανθρώπινου οργανισμού, το ήπαρ, όπου μετατρέπονται όλοι σε γλυκόζη. Από εκεί, η γλυκόζη έχει αδρά, τρεις διαφορετικές πιθανές μεταβολικές οδούς που μπορεί να ακολουθήσει. Η πρώτη είναι να διοχετευθεί στο υπόλοιπο σώμα, μέσω του αίματος και να να τροφοδοτήσει τους με ενέργεια όποια κύτταρα και ιστούς τη χρειάζονται. Η δεύτερη είναι να αποθηκευτεί με τη μορφή ενός αποθηκευτικού πολυσακχαρίτη, του γλυκογόνου, στο ήπαρ για μετέπειτα χρήση. Η τρίτη είναι να μετασχηματιστεί σε γλυκερόλη, μόριο απαραίτητο για τη σύνθεση τριακυλογλυκερών, γνωστών και ως τριγλυκεριδίων, αναφορά στις οποίες θα γίνει στο κομμάτι των λιπών. Συνήθως, επιτελούνται και τα τρία μεταβολικά μονοπάτια σε διαφορετικό ποσοστό, ανάλογα τις ανάγκες του κάθε οργανισμού, με το πρώτο μονοπάτι / οδό να υπερτερεί. [1]

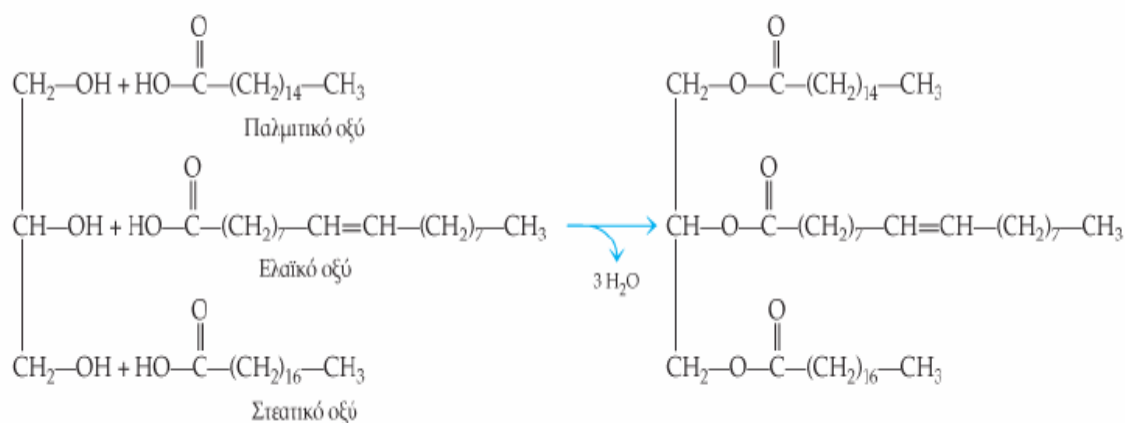
Όσον αφορά το πρώτο μονοπάτι, η γλυκόζη που πλέον κυκλοφορεί στο αίμα δεν μπορεί να εισέλθει και άρα να αξιοποιηθεί από τα διάφορα κύτταρα των ιστών του σώματος κατευθείαν, αλλά παραμένει στο αίμα σε υψηλά επίπεδα μέχρι να εκκριθεί η βασική ορμόνη διαχείρισής της από τον οργανισμό, η ινσουλίνη. Η ινσουλίνη είναι μία ορμόνη που εκκρίνεται από το όργανο πάγκρεας ως απόκριση των υψηλών επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Ο ρόλος που διαδραματίζει η ινσουλίνη είναι ότι ενεργοποιεί τα διάφορα κύτταρα του σώματος, ώστε αυτά να μπορέσουν να είναι σε θέση να επιτρέψουν στη γλυκόζη να εισέλθει εντός τους, μέσω ειδικών για αυτήν υποδοχέων μεταφοράς. Χάρης σε αυτόν το μηχανισμό, τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μειώνονται σταδιακά, ενώ παράλληλα η συγκέντρωσή της εντός των διαφόρων κυττάρων-καταναλωτών αυξάνεται. Η όλη διαδικασία διαρκεί περίπου 2 ώρες για ένα φυσιολογικό άτομο. Η ενδοκυτταρικά εισαχθείσα γλυκόζη αξιοποιείται, κατά βάση, ως ενεργειακό καύσιμο για τη διεκπεραίωση των διαφόρων μεταβολικών διεργασιών της εκάστοτε ομάδας κυττάρων. [1]

Όσον αφορά το δεύτερο μονοπάτι, σε περίπτωση που ενεργειακές απαιτήσεις των κυττάρων του οργανισμού δεν μπορούν να καλυφθούν είτε λόγω έλλειψης γλυκόζης είτε λόγω αυξημένων αναγκών, κινητοποιείται η έκκριση της ορμόνης γλυκαγόνης, η οποία πυροδοτεί μηχανισμούς που ενεργοποιούν διάφορα ένζυμα στο ήπαρ, τα οποία κατατέμνουν το γλυκογόνο προς μόρια γλυκόζης, με σκοπό αυτά στη συνέχεια να τροφοδοτήσουν τελικά τους διαφόρους ιστούς με ενέργεια. [1]

1.1.3 : Λίπη

Τα λίπη (ή λιποειδή) είναι και αυτά οργανικές ενώσεις με κύριο δομικό μόριο τον άνθρακα. Βιοχημικά ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες με κυριότερες εξ' αυτών τα λιπαρά οξέα, τις τριακυλογλυκερόλες, τα φωσφολιποειδή, τους κηρούς, τα στεροειδή λίπη και τα τερπενοειδή. Σχετικά με τα τρόφιμα, τα λίπη συναντώνται σε αυτά, στο σύνολό τους, με τη μορφή τριακυλογλυκερολών, δηλαδή μορίων που αποτελούνται από ένα σκελετό γλυκερόλης (=προπανό-1,2,3-τριόλη) ενωμένο με τρία λιπαρά οξέα (όχι απαραίτητα ίδια). Τα λιπαρά οξέα με τη σειρά τους κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: α) τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, δηλαδή αυτά που περιέχουν μονάχα απλούς δεσμούς μεταξύ ατόμων άνθρακα στο μόριό τους, β) τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, δηλαδή αυτά που περιέχουν μόνο ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ατόμων άνθρακα στο μόριό τους και γ) τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, δηλαδή αυτά που περιέχουν παραπάνω από ένα διπλό δεσμό μεταξύ ατόμων άνθρακα στο μόριό τους. Από αυτά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα απαντώνται

κατά κόρον στα ζωικής προέλευσης τρόφιμα, ενώ τα υπόλοιπα σε φυτικής προέλευσης τρόφιμα. Αξίζει να αναφερθεί ότι υπάρχει και μία επιπλέον κατηγορία λιπαρών οξέων που συναντάται σε πολύ μικρό βαθμό στη φύση, σε σχέση με τις υπόλοιπες. Αυτή είναι τα *trans*-λιπαρά οξέα που ουσιαστικά είναι μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία στερεοχημικά προσομοιάζουν τη δομή των κορεσμένων λιπαρών οξέων. Από τις υπόλοιπες βιοχημικές κατηγορίες των λιπών, η μόνη για την οποία είναι ανάγκη να γίνει αναφορά είναι τα τερπενοειδή, στα οποία ανήκουν η χοληστερόλη και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες. [2]



(**Εικόνα 1.3:** Η σύνδεση του παλμιτικού, του ελαϊκού και του στεατικού οξέος προς σχηματισμό μίας τριακυλογλυκερόλης [1])

Αναφορικά με την πέψη, την απορρόφηση και τη διαχείριση των λιπών από τον ανθρώπινο οργανισμό, όπως και στους υδατάνθρακες, εκτελούνται πολύπλοκες διαδικασίες πολλαπλών σταδίων. [1]

Η πέψη των λιπών ξεκινάει και γίνεται ουσιαστικά στο τμήμα του δωδεκαδακτύλου, στο αρχικό κομμάτι του λεπτού εντέρου. Όταν ο οργανισμός αντιληφθεί με διάφορες ορμόνες, π.χ. χολοκυστοκίνη, και νευρικά σήματα, ότι πραγματοποιείται διέλευση λιπών στο συγκεκριμένο σημείο του αυλού του εντέρου, τότε δίνεται η εντολή στη χοληδόχο κύστη, που βρίσκεται δίπλα στο ήπαρ, να να εκκρίνει τη χολή. Η χολή περιέχει χολικά άλατα, ενώσεις οι οποίες βοηθούν στη γαλακτοματοποίηση των λιπών (δηλαδή της ομογενοποίησης των λιπών στο υδατικό περιβάλλον του εντέρου). Παράλληλα, δίνεται σήμα στο πάγκρεας να εκκρίνει τα παγκρεατικά ένζυμα και τα διττανθρακικά ιόντα. Τα διττανθρακικά ιόντα βοηθούν στην εξουδετέρωση του όξινου pH των επερχομένων γαστρικών υγρών. Από τα εκκρινόμενα ένζυμα, τα παγκρεατικά λιπολυτικά ένζυμα, ονόματι

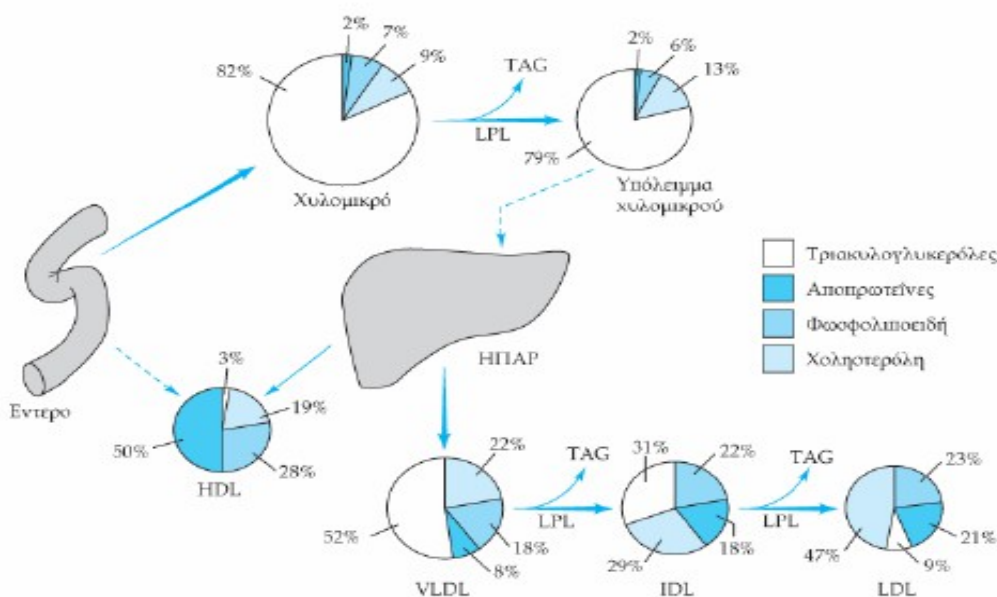
λιπάσες, είναι εκείνα τα οποία συντελούν στην πέψη των λιπών υδρολύοντας τις τριακυλογλυκερόλες σε μόρια γλυκερόλης και μόρια λιπαρών οξέων. Σε παράλληλο στάδιο, τα λίπη σχηματίζουν σφαιρίδια λίπους, τα μικκύλια, τα οποία, λόγω της αυξημένης τους διαλυτότητας, σπάζουν σε μικρότερα, τα οποία μπορούν να απορροφηθούν σχετικά εύκολα από τα επικείμενα εντεροκύτταρα, κατά τη διέλευση του χυλού από το μεσαίο τμήμα του λεπτού εντέρου, τη νήστιδα. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα στεροειδή λίπη, όπως η χοληστερόλη, δεν κατατέμνονται και απορροφώνται στο τελευταίο τμήμα του λεπτού εντέρου, τον ειλέο, όπου γίνεται επαναπρόσληψη των χολικών αλάτων. [1]

Αφού απορροφηθούν τα λιπαρά οξέα, εστεροποιούνται, εντός των εντεροκυττάρων, ξανά σε τριακυλογλυκερόλες και έπειτα “ενσωματώνονται” στις λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες είναι μεταφορείς των λιπών στην κυκλοφορία. Οι πρώτες λιποπρωτεΐνες υπεύθυνες για τα διαιτητικά λίπη, είναι τα χυλομικρά, τα οποία είναι πλούσια σε τριακυλογλυκερόλες. Στη συνέχεια, τα χυλομικρά περνάνε από τα εντεροκύτταρα στη λέμφο και διαμέσου αυτής στο αίμα. Από εκεί συνεχίζουν την πορεία τους, με τελικό σκοπό την τροφοδότηση των διαφόρων κυττάρων των ιστών του σώματος με λίπος, για να αναπληρωθούν οι κυτταρικές ενεργειακές αποθήκες λίπους και γενικά για ενεργειακή τόνωση των κυττάρων. Όσο ολοκληρώνεται η διαδικασία, τα χυλομικρά αδειάζουν σιγά σιγά από το φορτίο τους, με αποτέλεσμα να μετατραπούν πλέον σε υπολείμματα χυλομικρών. Τα υπολείμματα χυλομικρών μέσω της αιματικής κυκλοφορίας, καταλήγουν στο ήπαρ, όπου αποικοδομούνται. Μικρό μέρος του περιεχομένου τους εναποτίθεται στο ήπαρ και το υπόλοιπο μεταφέρεται σε μία νέας μορφής λιποπρωτεΐνη, τη VLDL (Very Low Density Lipoprotein = λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας). Από αυτό το σημείο, ο ρόλος της μεταφοράς των υπολοίπων λιπών, ξανά προς τους ιστούς, μεταλαμβάνεται στις VLDLs, οι οποίες διοχετεύονται στην κυκλοφορία ανατροφοδοτώντας τον οργανισμό με μεταγευματικό λίπος. [1]

Όταν πάλι το λιποειδικό περιεχόμενό τους μειώνεται κατά τη διανομή του λίπους, μετατρέπονται βαθμιαία σε IDLs (Intermediate Density Lipoproteins = λιποπρωτεΐνες μέσης πυκνότητας) και τελικά σε LDLs (Low Density Lipoproteins = λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας), μέχρι να επιστρέψουν στον τελικό προορισμό τους που είναι για ακόμη μία φορά το ήπαρ. Όσο η διαδικασία διανομής και απομάκρυνσης του μεταγευματικού λίπους ολοκληρώνεται, μειώνεται σταδιακά ο αριθμός των ανιχνεύσιμων κυκλοφορούντων στο αίμα VLDLs, μέχρι να μην μπορούν να εντοπιστούν στο αίμα. Αυτή η διαδικασία είναι που συντελεί στην ολοκλήρωση της μεταβολικής διαχείρισης των λιπών της τροφής μεταγευματικά. Σημειώνεται πως η τρίτη μεταβολική πορεία της γλυκόζης που

αναφέρθηκε στην ενότητα των υδατανθράκων, η οποία ήταν η σύνθεση γλυκερόλης, συνδράμει στη σύνθεση τριακυλογλυκερών κατά τη φάση της φόρτωσης των συντιθέμενων μεταγευματικών VLDLs με τριακυλογλυκερόλες από τα υπολειμμάτων χυλομικρών που κατέληξαν στο ήπαρ. Μάλιστα, αυτό το βιοχημικό παρακλάδι του μεταβολισμού των υδατανθράκων είναι που καταδεικνύει ότι οι μεταβολικές οδοί των μακροθρεπτικών συστατικών συνδέονται με εναλλακτικούς λειτουργικούς ελιγμούς του ηπατικού μεταβολισμού. [1]

Είναι απαραίτητο να τονισθεί ότι τα επίπεδα των LDL, στο αίμα, δεν εκμηδενίζονται, αλλά ελαττώνονται σταδιακά μέχρι να φτάσουν σε μία τιμή ισορροπίας νηστείας πλέον. Άλλωστε, η LDL είναι η υπεύθυνη λιποπρωτεΐνη για τη μεταφορά λίπους από το ήπαρ στους ιστούς κατά την κατάσταση της νηστείας. Αντιρροπιστικό “αντίζηλο” της LDL αποτελεί η λιποπρωτεΐνη HDL (High Density Lipoprotein = λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας), της οποίας ο ρόλος είναι να μεταφέρει λίπος από τους περιφερικούς ιστούς πίσω στο ήπαρ, διατηρώντας μία λιποειδική ισορροπία στον οργανισμό ως προς την ποσότητα του αιματικά κυκλοφορούντος λίπους. Ωστόσο, HDLs εμφανίζονται να συντίθεται και μεταγευματικά, κατά το στάδιο απόσυρσης των υπολειμμάτων χυλομικρών προς το ήπαρ για το σχηματισμό των VLDLs, υποδεικνύοντας πως οι HDLs λειτουργούν ως ένας ομοιοστατικός προστάτης έναντι της αυξημένης τάσης εναπόθεσης λίπους κατά τη μεταγευματική απομάκρυνσή του προς τους ιστούς. Τέλος, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χοληστερόλη και οι λιποδιαλυτές βιταμίνες που απορροφήθηκαν ακολουθούν την ίδια πορεία με τις τριακυλογλυκερόλες που περιγράφηκε παραπάνω. [1]



(**Εικόνα 1.4:** Οι οδοί μετατροπής των λιποπρωτεϊνών που σχηματίζονται από εξωγενείς πηγές (εντερική

απορρόφηση) και από ενδογενή σχηματισμό (σύνθεση στο ήπαρ). Αν και μικρά ποσά HDL συνθέτονται μέσα στα κύτταρα του λεπτού εντέρου, η κύρια περιοχή σύνθεσής τους είναι το ήπαρ. Το σχετικό μέγεθος των σωματιδίων των λιποπρωτεϊνών παρουσιάζεται μαζί με την κατά προσέγγιση σύστασή τους. Συντομογραφίες: TAG: τριακυλογλυκερόλες, LPL: λιποπρωτεϊνική λιπάση. [1])

Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, τα λίπη που προσέλαβε ο οργανισμός χρησιμοποιούνται είτε ως ενεργειακό καύσιμο είτε ως αποθήκη ενέργειας είτε ως συστατικό των μεμβρανών των κυττάρων είτε ως αντιδρώντα σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες του ανθρωπίνου οργανισμού. [1]

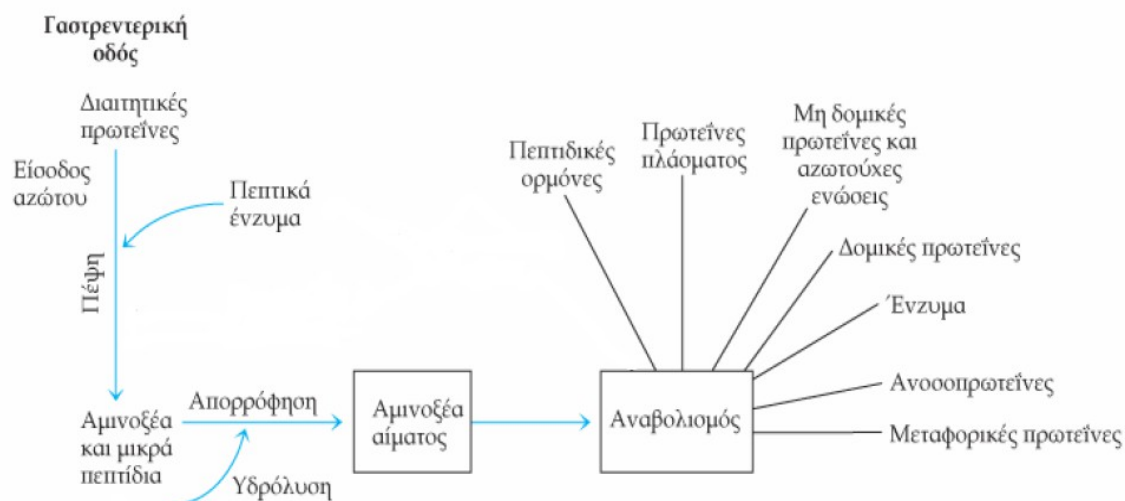
1.1.4 : Πρωτεΐνες

Στα τρόφιμα, συναντάται τεράστια ποικιλία πρωτεϊνών τόσο ανά τρόφιμο όσο και εντός ενός τροφίμου, στις περισσότερες των περιπτώσεων. Μπορούν να εντοπιστούν πρωτεΐνες όλων των κατηγοριών και όλων των επιπέδων δομικής ταξινόμησης. [1]

Όσον αφορά την πέψη, την απορρόφηση και τη διαχείριση των πρωτεϊνών από τον ανθρώπινο οργανισμό, αυτές χαρακτηρίζονται από υψηλή πολυπλοκότητα, καθώς κάθε αμινοξύ συνδέεται με το δικό του ξεχωριστό μεταβολικό μονοπάτι βιοχημικής διαχείρισής του. Ωστόσο, θα περιγραφεί το σφαιρικότερο πλαίσιο των παραπάνω διαδικασιών που ακολουθούνται από τον ανθρώπινο οργανισμό. [1]

Η πέψη των πρωτεϊνών διεκπεραιώνεται σε δύο επίπεδα. Σε πρώτο επίπεδο, εκτελείται στο στόμαχο, όπου το υδροχλωρικό οξύ, δημιουργώντας συνθήκες χαμηλού pH, “μετουσιώνει” τις πρωτεΐνες που καταναλώθηκαν, δηλαδή τους καταστρέφει σε μεγάλο βαθμό την τριτοταγή δομή τους (και άρα και την τεταρτοταγή και πεμπτοταγή δομή, όποτε αυτές υφίστανται). Στη συνέχεια, οι πρωτεΐνες διοχετεύονται στο δωδεκαδάκτυλο του λεπτού εντέρου. Εκεί ολοκληρώνεται η πέψη των πρωτεϊνών, όπου παράλληλα σε δεύτερο επίπεδο, κινητοποιούνται ορμονικοί και νευρικοί μηχανισμοί που έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την απελευθέρωση παγκρεατικών ενζύμων και διττανθρακικών ιόντων. Όπως αναφέρθηκε και στο κομμάτι των λιπών, τα διττανθρακικά ιόντα βοηθούν στην εξουδετέρωση του χαμηλού pH των γαστρικών υγρών, ενώ τα παγκρεατικά ένζυμα είναι εκείνα που συντελούν στην τελική πέψη των πρωτεϊνών, κατατέμνοντας τις πρωτεΐνες σε βαθμό / επίπεδο αμινοξέων και δι- ή τρι- πεπτιδίων. Επακολούθως, τα μικρού μεγέθους θραύσματα των πρωτεϊνών απορροφώνται από τα εντεροκύτταρα κατά μήκος του αυλού του λεπτού εντέρου, κατά τη διέλευσή τους από την περιοχή της νήστιδας, μέσω ειδικών για αυτά υποδοχέων που βρίσκονται στη μεμβράνη των εντεροκυττάρων. Έπειτα, τα

αμινοξέα και τα πεπτίδια μεταφέρονται μέσω της πυλαίας φλέβας από τα εντεροκύτταρα στο ήπαρ. Το ήπαρ εκτελεί καθήκοντα “τροχονόμου”, αφού από όσα αμινοξέα και πεπτίδια λαμβάνει επιλέγει τι ποσοστό αυτών θα διοχετευτούν στην αιματική κυκλοφορία με τι ρυθμό. Από το ήπαρ, λοιπόν, ανάλογα τς ανάγκες του οργανισμού, ελεύθερα αμινοξέα και πεπτίδια αποστέλλονται σε όλο το υπόλοιπο σώμα για να χρησιμοποιηθούν όπου χρειάζονται. Τα αμινοξέα και πεπτίδια που παραμένουν στο ήπαρ, χρησιμοποιούνται για τη σύνθεση απαραίτητων πρωτεϊνών διαφόρων ειδών και λειτουργιών. [1]



(**Εικόνα 1.5:** Η χρησιμοποίηση των αμινοξέων στον αναβολισμό [1])

Τα αμινοξέα στον ανθρώπινο οργανισμό χρησιμοποιούνται βασικά ως δομικά συστατικά για τη σύνθεση απαραίτητων ενδογενών πρωτεϊνών του σώματος. Βέβαια, ένα ποσοστό τους χρησιμοποιείται και για την παραγωγή ενέργειας, όποτε αυτό είναι απαραίτητο. Εδώ αξίζει να σημειωθεί ότι ο ανθρώπινος μεταβολισμός έχει τη δυνατότητα να κατασκευάζει μόρια γλυκόζης από συγκεκριμένα είδη αμινοξέων, γνωστά ως κετογονικά αμινοξέα, σε καταστάσεις έντονης έλλειψης γλυκόζης, κάτι που για άλλη μια φορά αναδεικνύει τον επιχιασμό των μακροθρεπτικών μεταβολικών οδών του σώματος. [1]

1.2 : Οξειδωτικό Στρες

1.2.1 : Βασικές Έννοιες και Μηχανισμοί

Αρχικά για να οριστεί ο όρος οξειδωτικό στρες, είναι αναγκαίο να κατανοηθεί η σημασία του όρου ελεύθερη ρίζα. Η ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο ή ένα μόριο που έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Το ή τα ασύζευκτα αυτά ηλεκτρόνια εντοπίζονται στην εξωτερική στιβάδα του ατόμου ή ενός ατόμου του μορίου. Ως αποτέλεσμα, το άτομο ή το μόριο αυτό εμφανίζει πολύ υψηλή δραστικότητα, καθώς λόγω θερμοδυναμικής αστάθειας τείνει να αποσπάσει ηλεκτρόνια από οποιοδήποτε διαθέσιμο γειτονικό μόριο υπάρχει, ώστε να ολοκληρώσει ζεύγος ηλεκτρονίων και να σταθεροποιηθεί. Ωστόσο, αν συμβεί κάτι τέτοιο, το άτομο ή το μόριο δότης ηλεκτρονίων προς την ασταθή αυτή ελεύθερη ρίζα συνήθως μετατρέπεται και αυτό σε ελεύθερη ρίζα, το οποίο με τη σειρά του μπορεί να μετατρέψει και άλλα μόρια σε ελεύθερες ρίζες, δημιουργώντας έτσι μία αλυσίδα αλληπάλληλων χημικών αντιδράσεων διαιωνισμού του ελλειματικού αρχικού φορτίου και της θερμοδυναμικής αστάθειας σε πολύ περισσότερα μόρια. Οι αντιδράσεις αυτές σταματούν όταν οι ελεύθερες ρίζες γίνουν τόσες πολλές που πλέον αντιδρούν μεταξύ τους εξουδετερώνοντας η μία την άλλη ή όταν βρεθεί ένα μόριο σταθεροποιητής φορτίου, όπως ένα αντιοξειδωτικό μόριο που σταματά τον καταρράκτη παραγωγής ελευθέρων ριζών. [4]

Στον ανθρώπινο οργανισμό, λόγω της ατέλειας των αποδόσεων διαφόρων μεταβολικών αντιδράσεων που εμπλέκεται το οξυγόνο και παράγωγες αυτού δραστικές ουσίες όπως και λόγω παρουσίας διαφόρων πιθανών προοξειδωτικών μορίων και μηχανισμών παραγωγής ελευθέρων ριζών, παρατηρείται καθημερινή παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ωστόσο, ο ανθρώπινος οργανισμός έχει διαφόρους προστατευτικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς με τους οποίους προστατεύεται από την παραγωγή ελευθέρων ριζών. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο ρόλος των ελευθέρων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό, αν και αναπόφευκτος, δεν είναι καθαρά βλαβερός, αλλά μάλιστα ουκ ολίγες φορές και χρήσιμος για διάφορες διαδικασίες αποικοδόμησης μορίων ή για την αντιμετώπιση παθογόνων μικροβιακών εισβολών. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι η δραστικότητα των ελευθέρων ριζών αποτελεί “δίκοπο μαχαίρι” για τον ανθρώπινο οργανισμό, αφού όσο μπορεί να τον βλάψει άλλο τόσο του είναι απαραίτητη για τη διεκπεραίωση ζωτικών λειτουργιών. Επομένως, το όλο σύστημα είναι καλό να επίσκεται σε μία δυναμική ισορροπία διατήρησης αυτών των λεπτών ισορροπιών μεταξύ κόστους και οφέλους. Στην περίπτωση που αυτή η ισορροπία αδυνατεί να διατηρηθεί και το σύστημα

κλίνει προς την κατάσταση που ο ρυθμός παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό εξουδετέρωσής τους, τότε αυτή η κατάσταση του οργανισμού χαρακτηρίζεται ως κατάσταση οξειδωτικού στρες και μπορεί να αποβεί επιζήμια για τον οργανισμό όταν αυτή διατηρείται για παρατεταμένες χρονικές περιόδους. [4]

1.2.2 : Είδη Ελευθέρων Ριζών

Ενεργές μορφές οξυγόνου		Ενεργές μορφές αζώτου	
Ρίζες	Μη ρίζες	Ρίζες	Μη ρίζες
Ρίζα υπερυπεροξειδίου $O_2^{\cdot -}$	Όζον O_3	Μονοξείδιο του αζώτου $NO^{\cdot}$	Νιτρώδες οξύ HNO_2
Ρίζα υδροξυλίου $OH^{\cdot}$	Μονήρες Οξυγόνο 1O_2	Διοξειδίο του αζώτου $NO_2^{\cdot}$	Υπεροξυνιτρίδιο $ONNO_2^{\cdot -}$
Ρίζα υδροϋπεροξειδίου $HO_2^{\cdot}$	Υποχλωριώδες οξύ $HOCl$		Αλκυλοϋπεροξυνιτρίδιο
Ρίζα αλκοξειδίου $LO^{\cdot}$ ή $RO^{\cdot}$	Υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2		$LOONO^{\cdot}$
Ρίζα υπεροξειδίου $LO_2^{\cdot}$ ή $RO_2^{\cdot}$			

(**Εικόνα 1.6:** Τα είδη των ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου [4])

Οι ελεύθερες ρίζες που παρατηρούνται στον ανθρώπινο οργανισμό είναι κατά βάσει ρίζες που περιέχουν οξυγόνο (π.χ. ρίζα υπερυπεροξειδίου ($O_2^{\cdot -}$), ρίζα υδροξυλίου ($OH^{\cdot}$), ρίζα υδροϋπεροξειδίου ($HO_2^{\cdot}$), ρίζα αλκοξειδίου ($LO^{\cdot}$ ή $RO^{\cdot}$), ρίζα υπεροξειδίου ($LOO^{\cdot}$ ή $ROO^{\cdot}$)) ή άζωτο (μονοξείδιο του αζώτου ($NO^{\cdot}$), διοξειδίο του αζώτου ($NO_2^{\cdot}$)). Συμπληρωματικά, στον ανθρώπινο οργανισμό παρατηρούνται και διάφορες δραστικές ουσίες που περιέχουν οξυγόνο (π.χ. υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), μονήρες οξυγόνο (1O_2), υποχλωριώδες οξύ ($HOCl$), όζον (O_3)) ή άζωτο (π.χ. νιτρώδες οξύ (HNO_2), υπεροξυνιτρίδιο ($ONNO_2^{\cdot -}$), αλκυλοϋπεροξυνιτρίδιο ($LOONO^{\cdot}$)), οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Το σύνολο αυτών των ενώσεων ονομάζεται ενεργές μορφές οξυγόνου (στην περίπτωση που περιέχουν οξυγόνο) και ενεργές μορφές αζώτου (στην περίπτωση που περιέχουν άζωτο). Αυτές μπορούν να σχηματιστούν στον ανθρώπινο οργανισμό, όταν αυτός εκτεθεί σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τοξικές χημικές ουσίες, ρύπους, υψηλής συχνότητας ακτινοβολία, φάρμακα, μεταλλαξογόνες ουσίες, κατά τη διάρκεια διαφόρων μεταβολικών οδών, όπως εκείνη της αναπνευστικής αλυσίδας ή της αποικοδόμησης μορίων στα υπεροξυσωμάτια των κυττάρων ή κατά την καταπολέμηση μικροοργανισμών από τα λευκοκύτταρα του οργανισμού και άλλων διαδικασιών που αναφέρονται παρακάτω. [4]

Πιο συγκεκριμένα, η ρίζα υπερυπεροξειδίου σχηματίζεται από αντιδράσεις του οξυγόνου με κατεχολαμίνες ή από αντιδράσεις αυτοξειδωσης και διαρροή ηλεκτρονίων κατά την αναπνευστική αλυσίδα ή από τις αντιδράσεις υδροξυλίωσης του κυτοχρώματος P450 στο ήπαρ ή κατά τη φαγοκυττάρωση μικροοργανισμών από τα ενεργοποιημένα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα και τα μονοκύτταρα που τις χρησιμοποιούν για την παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου εναντίον των εισβολέων, καθώς και για χημειοτακτισμό περισσοτέρων λευκοκυττάρων σε σημεία φλεγμονής κατά την ανοσολογική απόκριση. [4]

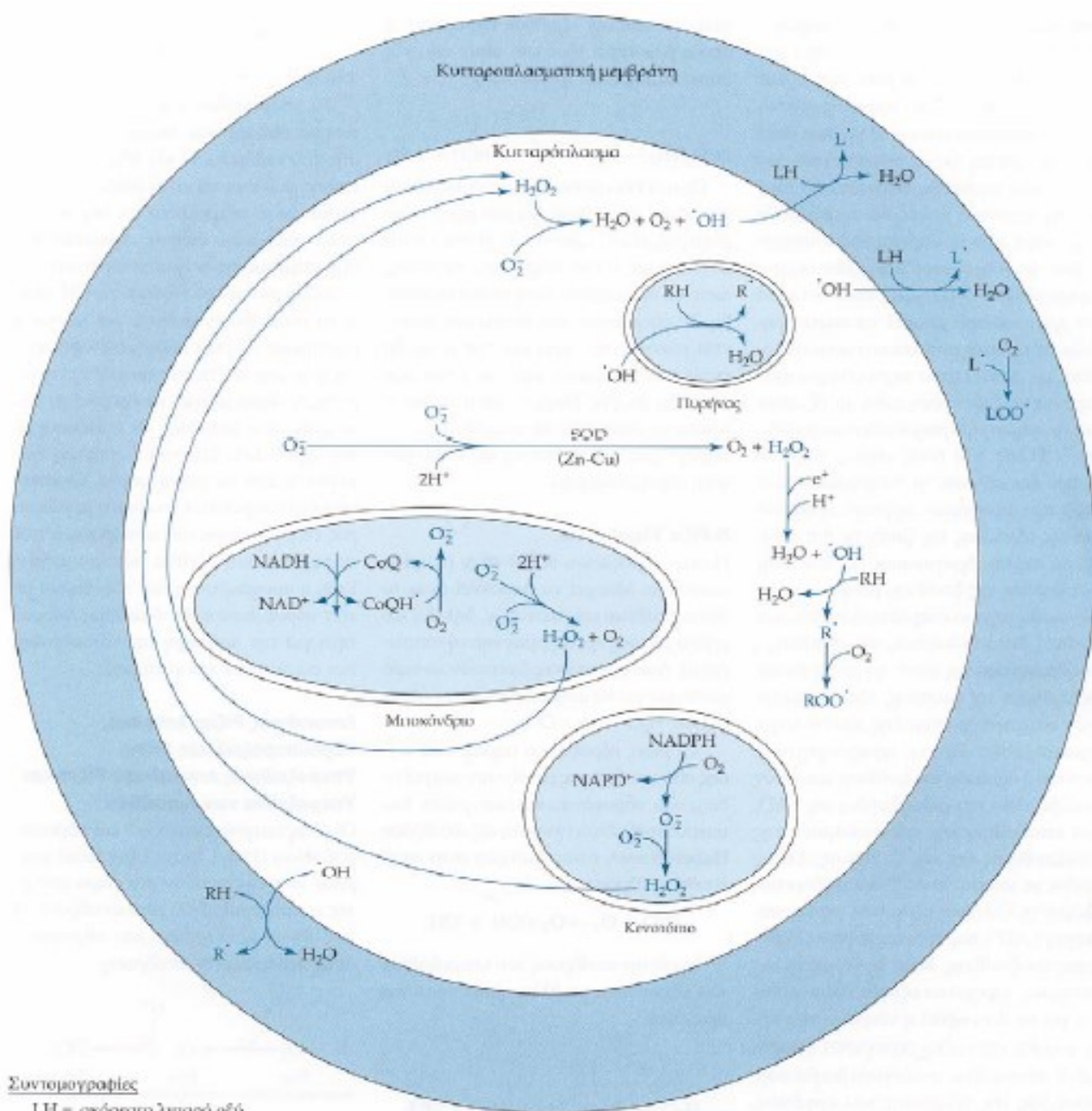
Επιπλέον, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή ελευθέρων ριζών, παράγεται από τη δράση του ενζύμου της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, η οποία εξουδετερώνει ρίζες υπερυπεροξειδίου χρησιμοποιώντας ψευδάργυρο και χαλκό (η κυτταροπλασματική μορφή της) ή μαγγάνιο (η μιτοχονδριακή μορφή της). Υπεροξείδιο του υδρογόνου παράγεται και από την αντίδραση εξουδετέρωσης ριζών υπερυπεροξειδίων από το ασκορβικό οξύ, όπως και κατά την αποικοδόμηση μορίων (π.χ. λιπαρών οξέων μακράς αλύσου) στα υπεροξυσωματίδια των κυττάρων, αλλά και σε καταστάσεις ισχαιμίας και τραυμάτων. [4]

Ακόμη, η πολύ δραστική ρίζα υδροξυλίου μπορεί να σχηματιστεί από αντιδράσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου με ρίζες υπερυπεροξειδίου ή μέταλλα μεταπτώσεως, όπως ο δισθενής σίδηρος ή ο μονοσθενής χαλκός, στη σπάνια περίπτωση που αυτά βρεθούν ελεύθερα εντός του οργανισμού και όχι συνδεδεμένα σε προστατευτικές πρωτεΐνες. [4]

Επιπροσθέτως, οι ρίζες υπεροξειδίων μπορούν να σχηματιστούν κατά τις αντιδράσεις ριζών υπερυπεροξειδίου ή ριζών υδροξυλίου με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των φωσφολιποειδών των κυτταρικών μεμβρανών ή άλλων οργανικών μορίων και από αντιδράσεις μεταξύ των τελευταίων με αυτές. Τέλος, το μονήρες οξυγόνο μπορεί να παραχθεί από την υπεροξείδωση λιποειδών των μεμβρανών, τις αντιδράσεις εξουδετέρωσης μικροοργανισμών από τα λευκοκύτταρα και μέσω φωτοχημικών αντιδράσεων με την εμπλοκή της υπεριώδους ακτινοβολίας. [4]

1.2.3 : Συνέπειες των Ελευθέρων Ριζών

Η αυξημένη παραγωγή όλων αυτών των ειδών των ελευθέρων ριζών, αν δε μετριαστεί μέσω των διαφόρων προστατευτικών μηχανισμών που διαθέτει ο ανθρώπινος οργανισμός, μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε διάφορα κρίσιμα χημικά μόρια του οργανισμού καθώς και σε ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή τέτοιων ριζών. Τέτοια μόρια που πιθανά να προσβληθούν από την ανεξέλεγκτη τάση συλλογής ηλεκτρονίων από τις θερμοδυναμικά πολύ ασταθείς ελεύθερες ρίζες είναι για χαρακτηριστικά τα νουκλεϊκά οξέα του DNA στον πυρήνα των κυττάρων, γεγονός που αν δεν επιδιορθωθεί εγκαίρως από τα αρμόδια επιδιορθωτικά ένζυμα, μπορεί να οδηγήσει σε μεταλλάξεις του γενετικού υλικού που πιθανώς να οδηγήσουν ακόμα και σε καρκινικές καταστάσεις. Άλλο σύνηθες μόριο τελικός στόχος των διαφόρων ελευθέρων ριζών είναι τα αμινοξέα ποικίλων πρωτεϊνών που αν διαταραχθεί έμμεσα η αρχιτεκτονική των μεταξύ τους δεσμών, μπορεί να συντελέσει σε πιθανή παρουσία μεταβολών στη δευτεροταγή και άρα και στην τριτοταγή δομή της αποτελούμενης από αυτά πρωτεΐνης, με συνέπεια η πρωτεΐνη αυτή να μην είναι κατά πάσα πιθανότητα κατά το βέλτιστον λειτουργική και επομένως να επηρεαστεί αρνητικά η επιτυχής διεκπεραίωση σημαντικών λειτουργιών του οργανισμού. Τέλος, ένα άλλο πολύ κοινό μόριο που τείνει να “δέχεται συχνά επίθεση” από τις ελεύθερες ρίζες είναι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της διπλοστιβάδας φωσφολιποειδών των διαφόρων κυτταρικών μεμβρανών του σώματος. Η υποβάθμιση που μπορεί να υποστούν τα λιποειδή της κυτταροπλασματικής μεμβράνης ενός κυττάρου μπορεί να οδηγήσει σε διαταραχή της λειτουργικότητας της μεμβράνης, όσον αφορά τη διαμεταφορά ουσιών κυρίως, αλλά και σε ταχύτερη αποικοδόμηση των λιποειδών σε προχωρημένες καταστάσεις και σε δεύτερο επίπεδο σε πιθανή ρήξη της μεμβράνης. Μάλιστα, η καταστροφή της λειτουργικότητας των κυτταρικών μεμβρανών από ελεύθερες ρίζες είναι και εκείνη που φαίνεται να εμπλέκεται σε παθοφυσιολογικά μονοπάτια που σχετίζονται με ποικίλες νόσους, όπως για παράδειγμα η οξείδωση των LDL στη διαδικασία ανάπτυξης καρδιαγγειακών νοσημάτων. [4]



Συντομογραφίες

- LH = εκδόξετο λιπαρό οξύ
- L[•] = λιποειδική ρίζα με κεντρικό άτομο τον άνθρακα
- RH = οργανικό, μη λιποειδικό μόριο (π.χ., αμινοξύ, νουκλεϊκό οξύ)
- O₂^{•-} = ρίζα υπεροξειδίου
- OH = ρίζα υδροξυλίου
- R[•] = οργανική, μη λιποειδική ρίζα με κεντρικό άτομο τον άνθρακα
- H₂O₂ = υπεροξείδιο του υδρογόνου
- ROO[•] = μη λιποειδική ρίζα υπεροξειδίου
- LOO[•] = ρίζα υπεροξειδίου

(Εικόνα 1.7: Σχηματισμός ενεργών μορφών οξυγόνου [4])

1.2.4 : Αντιοξειδωτικοί Μηχανισμοί

Συμπερασματικά, λοιπόν, είναι προφανές ότι η εύρυθμη λειτουργία των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του ανθρώπινου οργανισμού είναι μεγίστης σημασίας για την προστασία αυτού από τη διαβρωτική δραστικότητα της αυξημένης παραγωγής ελευθέρων ριζών σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Τέτοιοι μηχανισμοί είναι κατά βάση ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα του οργανισμού στα οποία συμμετέχουν ένζυμα και πολλαπλά αντιοξειδωτικά θρεπτικά συστατικά προερχόμενα από τη διατροφή όπως βιταμίνες και ιχνοστοιχεία που χρησιμεύουν στην αντιμετώπιση των ελευθέρων ριζών. [4]

Αναλυτικότερα, τα μόρια που σχετίζονται με τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του οργανισμού είναι διάφορα ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, η δισμουτάση του υπεροξειδίου, η καταλάση, η μυελοϋπεροξειδάση και το συνένζυμο Q ή αλλιώς ουβικινόνη, ενώ παράλληλα υπάρχουν και αντιοξειδωτικά μόρια, όπως διάφορες πρωτεϊνικές θειόλες (π.χ. γλουταθειόνη, λιποϊκό οξύ, μεταλλοθειονίνη, θειορεδοξίνη) και το ουρικό οξύ. Όσον αφορά, τα εξωγενή αντιοξειδωτικά του οργανισμού που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής, αυτά είναι το ασκορβικό οξύ (γνωστό και ως βιταμίνη C), τα καροτενοειδή (όπως το β-καροτένιο και το λυκοπένιο), η βιταμίνη E (δηλαδή οι τοκοφερόλες α,β,γ,δ) και κάποια μέταλλα μεταπτώσεως, τα οποία δρουν είτε ως συμπαραγόντες μερικών από τα προαναφερθέντα ένζυμα είτε από μόνα τους ως αναγωγικά μόρια. [4]

Συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αποτελεί το πλέον πολυχρησιμοποιούμενο ενδογενές αντιοξειδωτικό ένζυμο εντός του ανθρώπινου οργανισμού. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια όλων των κυττάρων του σώματος, αλλά και στο πλάσμα. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί σελήνιο ως συμπάροντα και μάλιστα η ενεργότητά του εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα σεληνίου στον οργανισμό. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης χρησιμοποιεί ως βασικό της υπόστρωμα την ανηγμένη μορφή του τριπεπτιδίου-θειόλης, γλουταθειόνη, την οποία οξειδώνει αποσπώντας από αυτήν ηλεκτρονικό φορτίο με τη μορφή ιόντων υδρογόνου (δηλαδή αναγωγικών ισοδυνάμων) και δίδοντάς το σε μία ελεύθερη ρίζα εξουδετερώνοντάς τη. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αξιοποιείται κυρίως για την απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου εντός των κυττάρων και παράλληλα για την αναγωγή ριζών υπεροξειδίου σε μεβράνες, καθώς μπορεί να δράσει τόσο σε υδρόφιλο, όσο και σε λιπόφιλο περιβάλλον. [4]

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου είναι το κατ' εξοχήν ένζυμο που εξουδετερώνει ταχέως ρίζες υπερυπεροξειδίου προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Εντοπίζεται τόσο σε εξωκυττάριο περιβάλλον (όπως για παράδειγμα στις αρτηρίες), όσο και σε ενδοκυττάριο όπου εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και τα μιτοχόνδρια. Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται από την παρουσία μεταλλικών ιόντων. Η εξωκυτάρια και η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου απαιτούν ως συμπαραγόντες ψευδάργυρο και χαλκό, ενώ η μιτοχονδριακή απαιτεί μαγγάνιο, γεγονός που καθιστά αυτά τα μεταλλικά ιόντα απαραίτητα για τη βέλτιστη λειτουργικότητα του ενζύμου. [4]

Η καταλάση είναι και αυτή ένα από τα χαρακτηριστικότερα αντιοξειδωτικά ένζυμα του οργανισμού με ειδίκευση στην ταχεία εξουδετέρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, η οποία εδράζεται στα υπεροξυσωμάτια των κυττάρων του σώματος. Τα υπεροξυσωματια είναι υποκυτταρικά οργανίδια υπεύθυνα για την οξείδωση λιπαρών οξέων μακράς αλύσου και διαφόρων άλλων μορίων του κυττάρου προς αποικοδόμηση. Για το σκοπό αυτό, στα υπεροξυσωμάτια παρατηρείται αυξημένη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ως εκ τούτου, η καταλάση χρησιμοποιείται στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται στα υπεροξυσωμάτια. Η καταλάση ανιχνεύεται σε μικρές συγκεντρώσεις και στο κυτταρόπλασμα, στα μιτοχόνδρια και στα μικροσώματα των κυττάρων. Ακόμη, υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου εντοπίζονται στα ουδετερόφιλα και σε άλλα λευκά αιμοσφαίρια, ώστε να έχουν τη δυνατότητα προστασίας τους έναντι του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγουν τα ίδια για την καταπολέμηση των ξένων μικροοργανισμών που εισβάλλουν στο σώμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι η καταλάση απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου για να λειτουργήσει σε αντίθεση με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης που λειτουργεί και σε μικρότερες συγκεντρώσεις υπεροξειδίου του υδρογόνου, σύγκριση που καθιστά την καταλάση λιγότερο ευαίσθητο ένζυμο από την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Τέλος, σημειωτέον είναι ότι η καταλάση είναι και αυτή μεταλλοένζυμο και χρησιμοποιεί σίδηρο ως συμπαραγόντα. [4]

Η μυελοϋπεροξειδάση δεν είναι ένα αμιγώς αντιοξειδωτικό ένζυμο, αλλά έμμεσα θα μπορούσε να θεωρηθεί. Ο ρόλος της μυελοϋπεροξειδάσης είναι να μετατρέπει το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από τα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα σε υποχλωριώδες οξύ, το οποίο δρα ως τοξικός παράγοντας εναντίον μικροοργανισμών εισβολέων. Επομένως, θα μπορούσε να θεωρηθεί ότι αφού βοηθά στην απομάκρυνση του υπεροξειδίου του υδρογόνου από τα λευκοκύτταρα, είναι και αυτή έμμεσα ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο του οργανισμού που μεταποιεί μία μορφή ενεργού οξυγόνου προς όφελος του οργανισμού. Η μυελοϋπεροξειδάση χρησιμοποιεί ως συμπαραγόντα αιμικό σίδηρο. [4]

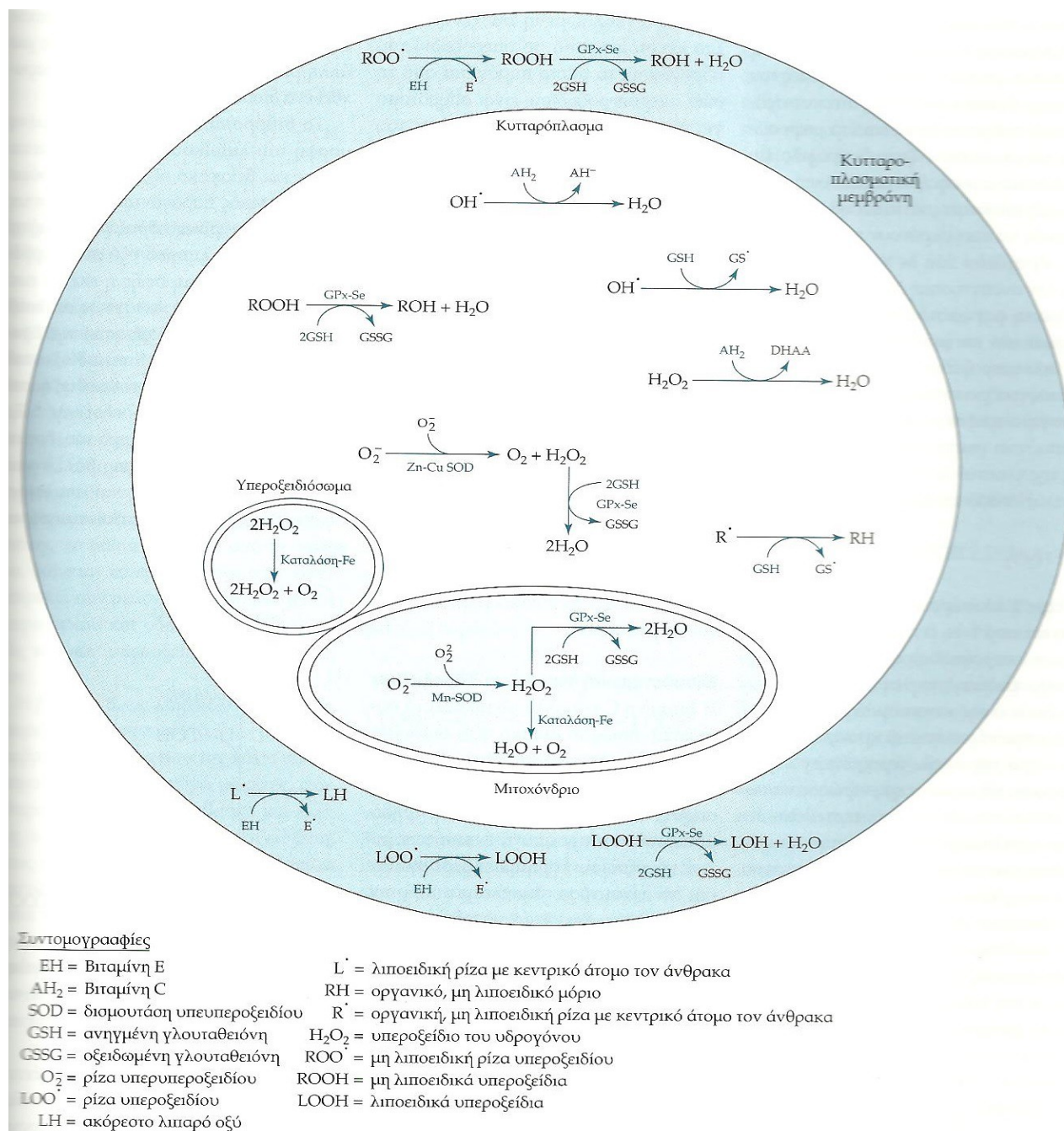
Το συνένζυμο Q ή αλλιώς ουβικινόνη, είναι ένα ένζυμο που χρησιμοποιείται κατά βάση για την αναγέννηση του ATP κατά την αναπνευστική αλυσίδα στα μιτοχόνδρια. Ωστόσο, διέπεται και από παράλληλες δράσεις όπως η εξουδετέρωση ριζών υδροξυλίου και η πιθανή προστασία των λιποπρωτεϊνών από υπεροξειδικές ρίζες σε συνεργασία με τη βιταμίνη E. [4]

Σχετικά με τις αντιοξειδωτικές πρωτεΐνες που περιέχουν σουλφιδρυλικές ομάδες, η γλουταθειόνη αποτελεί την πιο χαρακτηριστική. Η γλουταθειόνη χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα στις αντιδράσεις της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης που αναλύθηκε προηγουμένως και μπορεί να δράσει αυτόνομα εναντίον των ριζών υδροξυλίου προς σχηματισμό νερού. Με τον ίδιο μηχανισμό λειτουργεί και το λιποϊκό οξύ εναντίον των ριζών υδροξυλίου (υπό μορφή δεϋδρολιποϊκού οξέος, δηλαδή της ανηγμένης του μορφής). Παρομοίως, η μεταλλοθειονίνη φαίνεται να έχει και αυτή την ικανότητα να εκκαθαρίζει ρίζες υδροξυλίου. [4]

Σχετικά με το ουρικό οξύ, διαφαίνεται να διαδραματίζει και αυτό συνεργιστικό ρόλο σε διάφορες αντιοξειδωτικές διεργασίες του οργανισμού, όπως την επαγωγή της ενεργότητας της δισμουτάσης του υπεροξειδίου. Ταυτόχρονα, παρατηρείται ότι έχει την ικανότητα να εξουδετερώνει ρίζες υδροξυλίου. [4]

Όσον αφορά τα εξωγενή αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής, το πιο σημαντικό ίσως μπορεί να θεωρηθεί η βιταμίνη C ή αλλιώς ασκορβικό οξύ, καθώς έχει σημαντική πολλαπλή δράση εναντίον των περισσότερων ειδών ελευθέρων ριζών. Συγκεκριμένα, ως υδατοδιαλυτή ουσία μπορεί να ενεργήσει στο αίμα ή το κυτταρόπλασμα των διαφόρων κυττάρων του οργανισμού και να εξουδετερώσει τις ρίζες υπερωξειδίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, τις ρίζες υδροξυλίου και το μονήρες μοριακό οξυγόνο. Τα καρτενοειδή φαίνεται να έχουν αποτελεσματική αντιοξειδωτική δράση κατά των ριζών υπεροξειδίου προστατεύοντας τα λιποειδή των μεμβρανών των κυττάρων, αλλά και κατά του μονήρους μοριακού οξυγόνου, η οποία οφείλεται στα συστήματα συζευγμένων διπλών δεσμών στη δομή τους που τους δίνουν την ικανότητα να απορροφούν ενέργεια από το μονήρες μοριακό οξυγόνο, χωρίς κάποια δική τους χημική μετατροπή και μετά να απελευθερώνουν αυτήν την ενέργεια στο περιβάλλον υπό τη μορφή θερμότητας. Η βιταμίνη E αποτελεί το βασικότερο αντιοξειδωτικό κατά των ριζών υπεροξειδίων που σχηματίζονται στις κυτταρικές μεμβράνες. Η βιταμίνη E ως λιποδιαλυτό μόριο μπορεί να εισχωρήσει άμεσα εντός των διαφόρων μεμβρανών και να προφυλάξει τα τριγύρω λιποειδή από την υπεροξειδωσή τους, καθώς και να διακόψει τυχόν αλυσιδωτές

αντιδράσεις ελευθέρων ριζών τοπικά. Η βιταμίνη Ε σε αντίθεση με τα καροτενοειδή θεωρείται ότι λειτουργεί σε μεγαλύτερη έκταση και κατά βάση στην επιφάνεια του κυττάρου και όχι τόσο στο εσωτερικό του. Τέλος, τα διάφορα μέταλλα μεταπτώσεως αναφέρονται κατά γενική ομολογία στα μέταλλα συμπάροντες των προαναφερθέντων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Βέβαια, δε λείπουν και από εδώ οι εξαιρέσεις, αφού έχει παρατηρηθεί ότι το μαγγάνιο μπορεί να δράσει από μόνο του προστατευτικά υπέρ των λιποειδών των μεμβρανών εξουδετερώνει ρίζες υπεροξειδίων. [4]

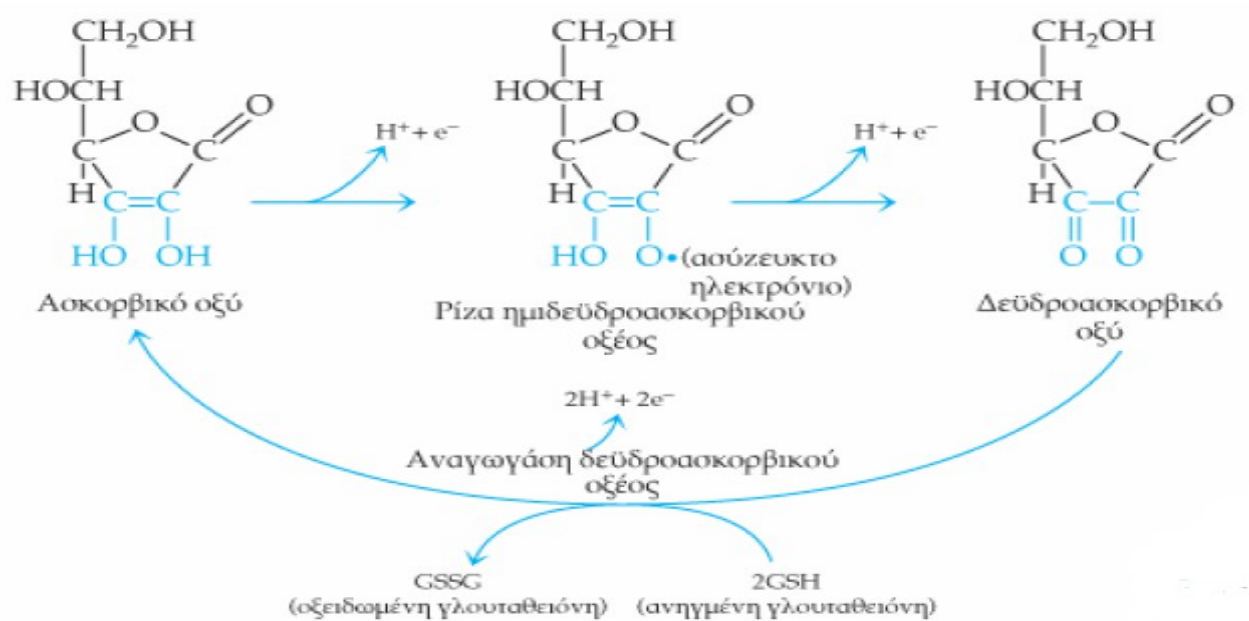


(**Εικόνα 1.8:** Η δράση επιλεγμένων αντιοξειδωτικών θρεπτικών συστατικών στην πρόληψη της κυτταρικής βλάβης [4])

Όλοι αυτοί οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί προφύλαξης του οργανισμού από τον κίνδυνο των αυξημένων ελευθέρων ριζών καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες των παραπάνω αντιοξειδωτικών μορίων, τα οποία οξειδώνονται στην προσπάθεια του οργανισμού να διατηρήσει τις ισορροπίες σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Ευτυχώς, το σώμα έχει οργανώσει συστήματα μερικής αναγέννησης των χρησιμοποιημένων αντιοξειδωτικών, ώστε να μπορούν να χρησιμοποιούνται για περισσότερες από μία φορές. Για παράδειγμα, η οξειδωμένη γλουταθειόνη μπορεί να ανακυκλωθεί μέσω του ενζύμου αναγωγάση της γλουταθειόνης, η οποία χρησιμοποιεί NADPH για να φορτίσει τη γλουταθειόνη με αναγωγικά ισοδύναμα και να τη μετατρέψει ξανά στην ενεργή ανηγμένη της μορφή. Στην αναγέννηση της γλουταθειόνης πιθανότατα φαίνεται να εμπλέκεται εναλλακτικά και το δεϋδρολιποϊκό οξύ (δηλαδή η ανηγμένη μορφή του λιποϊκού οξέος). Σε σύστημα επαναχρησιμοποίησης υπόκειται και η ουβικινόνη, η οποία αναγεννιέται μέσω πολλαπλών οδών, όπως αυτή της χρήσης του δεϋδρολιποϊκού οξέος ή της χρήσης της θειορεδοξίνης. Με τη σειρά της η οξειδωμένη θειορεδοξίνη που χρησιμοποιείται για την αναγωγή της ουβικινόνης, “επαναφορτίζεται” μέσω της αντίδρασής της με NADPH με τη διαμεσολάβηση του ενζύμου αναγωγάση της θειορεδοξίνης. [4]

Ομοίως, έχουν παρατηρηθεί μηχανισμοί αναγέννησης και των διαιτητικών αντιοξειδωτικών, όπως η αναγέννηση της βιταμίνης C από αντιδράσεις αναγωγής της με ουσίες όπως το NADPH, τη γλουταθειόνη, το ανηγμένο λιποϊκό οξύ, τη θειορεδοξίνη ακόμη και την ίδια τη βιταμίνη C. Αρκετοί αναγεννητικοί μηχανισμοί παρατηρούνται και στην επαναχρησιμοποίηση της βιταμίνης E μέσω αλληλεπιδράσεων της με τη βιταμίνη C, την ουβικινόνη και τη γλουταθειόνη κατά τις οποίες επαναφέρεται στην ανηγμένη της μορφή.[4]

Επομένως, για άλλη μία φορά συμπεραίνουμε την πολύτιμη παρουσία των αντιοξειδωτικών στον ανθρώπινο οργανισμό, ο οποίος έχει φροντίσει να μπορεί να ανακυκλώνει τους φρουρούς της άμυνάς του με πολλαπλούς τρόπους, ώστε να “χαλιναγωγεί” το διπλό ρόλο των ελευθέρων ριζών προς το πλέον λειτουργικό όφελος των μεταβολικών διεργασιών του. Είναι χαρακτηριστικό το ότι εκτιμάται πως λιγότερα από εννέα μόρια βιταμίνης E χρειάζονται για την προστασία περίπου χιλίων με δύο χιλιάδων ακόρεστων λιπαρών οξέων στα φωσφολιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών. Ωστόσο, επειδή όλες αυτές οι αντιδράσεις ανακύκλωσης δεν έχουν απόδοση 100%, σε βάθος χρόνου το πλήθος των διαθέσιμων αντιοξειδωτικών μειώνεται· για αυτό και κρίνεται απαραίτητη η πρόσληψη νέων από τη διατροφή και η παραγωγή καινούριων μέσω στοιχείων που παρέχονται από τη διατροφή. [4]



(**Εικόνα 1.9:** Αναγέννηση της βιταμίνης C από τη γλουταθειόνη. Η αντίδραση μπορεί να πραγματοποιηθεί και αντίστροφα. [4])

1.3 : Λευκοκύτταρα και Αιμοπετάλια

1.3.1 : Εισαγωγή

Το αίμα αποτελεί το βασικό μέσο μεταφοράς ουσιών και επικοινωνίας μεταξύ των διαφόρων διαμερισμάτων του ανθρώπινου οργανισμού. Ουσιαστικά, αποτελείται από έμμορφα συστατικά, δηλαδή κύτταρα, που αιωρούνται μέσα σε ένα υγρό, ονόματι πλάσμα. Τα κύτταρα του αίματος περιλαμβάνουν τα ερυθροκύτταρα, τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Το μεγαλύτερο ποσοστό αποτελούν τα ερυθροκύτταρα, τα οποία λειτουργούν ως εφοδιαστικοί μεταφορείς οξυγόνου προς τους ιστούς του σώματος και παράλληλα ως εκκαθαριστές του διοξειδίου του άνθρακα που παράγεται κατά τις μεταβολικές διεργασίες των κυττάρων του οργανισμού. Τα λευκοκύτταρα συμβάλλουν στην άμυνα του ανθρώπινου οργανισμού προστατεύοντάς τον από τις μολύνσεις των μικροοργανισμών και τον καρκίνο. Τέλος, τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της πήξης του αίματος. Σε αυτό το κεφάλαιο θα περιγραφούν, σε βασικό επίπεδο, η φυσιολογία και οι μηχανισμοί δράσης των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων υπό φυσιολογικές συνθήκες στον ανθρώπινο οργανισμό. [5]

Ερυθροκύτταρα	Λευκοκύτταρα					Αιμοπετάλια
	Πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα			Μονοκύτταρα	Λεμφοκύτταρα	
	Ουδετερόφιλα	Ηωσινόφιλα	Βασεόφιλα			
						

(**Εικόνα 1.10:** Τύποι κυττάρων φυσιολογικού αίματος [5])

1.3.2 : Λευκοκύτταρα (Φυσιολογία και Δράσεις)

1.3.2.1 : Εισαγωγή

Τα λευκοκύτταρα ανήκουν σε μία ευρύτερη κατηγορία κυττάρων του σώματος που ονομάζονται κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος. Αυτή η μεγάλη ομάδα κυττάρων αναλαμβάνει διαδικασίες σχετικές με το συντονισμό και τη διεκπεραίωση των λειτουργιών της άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού προστατεύοντάς τον από ξένα κύτταρα (π.χ. μικροοργανισμούς) ή ξένες ουσίες. Ο όρος λευκοκύτταρα αναφέρεται κατά βάση στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που μπορούν να εντοπιστούν να κυκλοφορούν στο αίμα. Στα λευκοκύτταρα ανήκουν τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα (δηλαδή τα ουδετερόφιλα, τα ηωσινόφιλα και τα βασεόφιλα), τα μονοκύτταρα και τα λεμφοκύτταρα (δηλαδή τα Β λεμφοκύτταρα, τα Τ λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς). Εκτός των λευκοκυττάρων, στη μεγάλη ομάδα των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος κατηγοριοποιούνται και άλλα είδη κυττάρων, όπως τα μακροφάγα (που στην ουσία αποτελούν τα μεταναστευμένα στους ιστούς τροποποιημένα μονοκύτταρα), τα μακροφαγοκυτταρικά κύτταρα (που δεν είναι μακροφάγα αλλά ασκούν λειτουργίες μακροφάγων, όπως τα μικρογλοία στο νευρικό σύστημα) και τα μαστοκύτταρα που βρίσκονται διασκορπισμένα στο συνδετικό ιστό κάτω από επιθηλιακές επιφάνειες του σώματος και δρουν τοπικά απελευθερώνοντας κοκκία με διάφορους χημικούς μεσολαβητές που εμπλέκονται σε διαδικασίες φλεγμονής, όπως η ισταμίνη. [5]

Επικεντρώνοντας στα λευκοκύτταρα, πριν περιγραφούν οι λειτουργίες των επιμέρους σειρών, κρίνεται αναγκαίο να αναφερθεί η διαφοροποίηση των μηχανισμών άμυνας του ανθρώπινου σώματος σε μηχανισμούς μη ειδικής και ειδικής άμυνας. Οι μηχανισμοί μη ειδικής άμυνας προστατεύουν τον οργανισμό από ξένες ουσίες ή ξένα κύτταρα χωρίς να έχουν προσδιορίσει την ταυτότητά τους. Βέβαια, ο οργανισμός έχει την ικανότητα να αναγνωρίζει γενικά χαρακτηριστικά επάνω σε ξένα προς αυτών σώματα, όπως π.χ. συγκεκριμένες μεμβρανικές πρωτεΐνες και λιποειδή που φέρει κάθε βακτηριακό κύτταρο, ώστε να διαφοροποιεί τους εισβολείς από τα δικά του κύτταρα. Από την άλλη, οι μηχανισμοί ειδικής άμυνας βασίζονται στην εξειδικευμένη αναγνώριση ξένων για τον οργανισμό ουσιών και κυττάρων με τελικό σκοπό την αποτελεσματική καταστροφή και απομάκρυνσή τους από το σώμα. Από τα λευκοκύτταρα, τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα εμπλέκονται κυρίως σε μηχανισμούς μη ειδικής άμυνας, ενώ τα λεμφοκύτταρα σχετίζονται κατά βάση με τους μηχανισμούς ειδικής άμυνας. Τα

μονοκύτταρα συμμετέχουν τόσο στους μηχανισμούς μη ειδικής, όσο και στους μηχανισμούς ειδικής άμυνας. Αξίζει να αναφερθεί ότι στην ουσία, τα λευκοκύτταρα συνεργάζονται μεταξύ τους για να φέρουν εις πέρας την αποστολή τους να προστατεύουν τον ανθρώπινο οργανισμό. Για αυτό το σκοπό, εκκρίνουν μεταξύ τους ποικίλα πρωτεϊνικά μηνυματοφόρα μόρια με αυτοκρινείς ή και παρακρινείς δράσεις (και πιο σπάνια ενδοκρινείς δράσεις) που ονομάζονται κυτταροκίνες ή κυτοκίνες και χαρακτηρίζονται από πολύ μεγάλη περιπλοκότητα όσον αφορά τις δράσεις τους και τις αλληλεπιδράσεις τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού. [5]

1.3.2.2 : Τα Λευκοκύτταρα των μη ειδικών μηχανισμών άμυνας

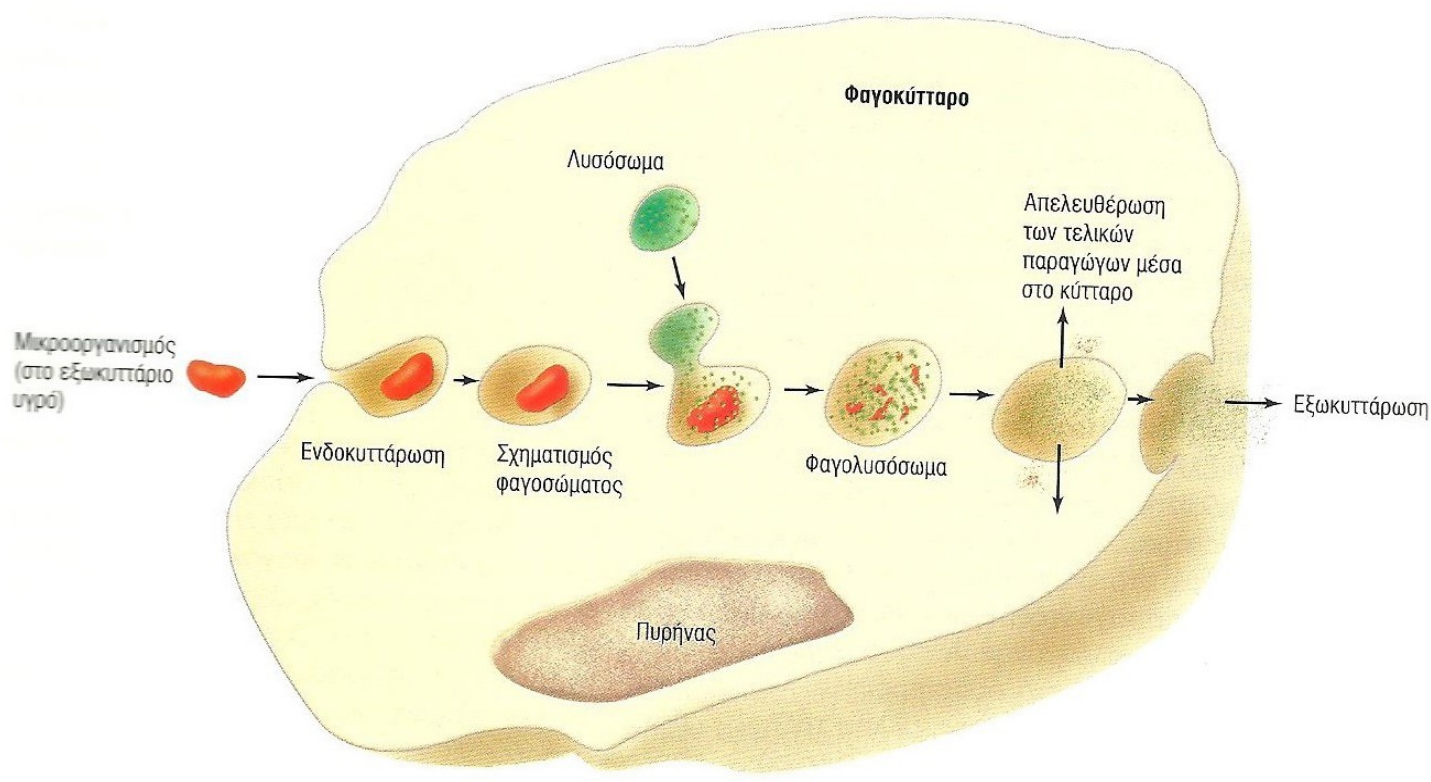
Στη συνέχεια θα περιγραφούν οι δράσεις των λευκοκυττάρων που συμμετέχουν ουσιαστικά στους μη ειδικούς μηχανισμούς άμυνας. Όσον αφορά τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα, οφείλει να σημειωθεί ότι ανάλογα το είδος τους διαφοροποιούνται και ως προς τις λειτουργίες τους. Συγκεκριμένα, τα ουδετερόφιλα εξειδικεύονται στη φαγοκυττάρωση ξένων μικροοργανισμών ή ουσιών, ενώ παράλληλα έχουν την ικανότητα να απελευθερώνουν χημικές ουσίες που εμπλέκονται σε διαδικασίες φλεγμονής προκαλώντας αγγειοδιαστολή, χημειοταξία άλλων κυττάρων προς το σημείο μίας μόλυνσης, κλπ. Ακόμη, έχουν την ικανότητα της διαπίδυσης, δηλαδή της ικανότητας να διαπερνούν το τοίχωμα των αιμοφόρων αγγείων προς το μεσοκυττάριο χώρο ενός ιστού, στον οποίο έχει σημειωθεί εντοπισμός ενός ξένου κυττάρου ή ουσίας. Σε αυτό το σημείο, αναγκαίο κρίνεται να προσδιοριστεί ότι φλεγμονή ορίζεται ως η εντοπισμένη απόκριση του σώματος σε μία μόλυνση ή ένα τραυματισμό, η οποία χαρακτηρίζεται από ερυθρότητα, τοπική άνοδο της αύξησης της θερμοκρασίας στην περιοχή, οίδημα (δηλαδή πρήξιμο) και πόνο και η οποία υπόκειται σε μηχανισμούς ομοιόστασης. [5]

Η δεύτερη κατηγορία πολυμορφοπύρρηνων κοκκιοκυττάρων, τα ηωσινόφιλα, είναι κύτταρα που εξειδικεύονται στην καταστροφή πολυκυττάρων παρασίτων. Επιπλέον, συμμετέχουν σε αντιδράσεις υπερευαισθησίας, δηλαδή αντιδράσεις του οργανισμού σχετιζόμενες με καταστάσεις αλλεργίας, μίας μη φυσιολογικής υπερδιεγερμένης απόκρισης του οργανισμού σε περιβαλλοντικούς παράγοντες. [5]

Τα βασεόφιλα, η τρίτη κατηγορία, χαρακτηρίζονται από λειτουργίες παρόμοιες με αυτές των μαστοκυττάρων που αναφέρθηκαν παραπάνω, μόνο που οι δράσεις τους εκτελούνται στο αιμά και όχι στους ιστούς όπως των μαστοκυττάρων. Όλα τα πολυμορφοπύρρηνα κοκκιοκύτταρα, παράγονται στο μυελό των οστών. [5]

Τα μονοκύτταρα παράγονται και αυτά στο μυελό των οστών και χαρακτηρίζονται από πληθώρα λειτουργιών. Η πιο σημαντική εξ' αυτών είναι η φαγοκυττάρωση, δηλαδή η διαδικασία εξολόθρευσης ενός ξένου κυττάρου ή ουσίας προς τον οργανισμό, μέσω ενδοκυττάρωσης και πέψης αυτού του ξένου παράγοντα από το μονοκύτταρο. Για την αναγνώριση ενός μικροοργανισμού από ένα μονοκύτταρο, σημαντικό ρόλο παίζουν χαρακτηριστικά αναγνωριστικά οργανικά μόρια πάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του ξένου κυττάρου που το σηματοδοτούν ως ξένο απέναντι στο μονοκύτταρο, έλκοντας το με σκοπό να το φαγοκυτταρώσει. Πολλές φορές, η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης μπορεί να αρχίσει μόνο με την επαφή του μονοκυττάρου με το ξένο κύτταρο. Ωστόσο, κάποιες φορές λόγω περιορισμών, όπως για παράδειγμα λόγω της παρουσίας παχιάς, ζελατινώδους κάψας σε αρκετά βακτηριακά κύτταρα, η επαφή δεν αρκεί για να πυροδοτηθεί η διαδικασία της φαγοκυττάρωσης. Σε αυτήν την περίπτωση, την κατάσταση υποβοηθούν “μόρια-συνδέσμοι” ονόματι οψωνίνες που συνδράμουν στην επιτυχή έναρξη της όλης διαδικασίας. Μερικά τέτοια μόρια με λειτουργία οψωνίνης είναι η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και το C3b κλάσμα των πρωτεϊνών του συμπληρώματος. Κατά τη διαδικασία της φαγοκυττάρωσης, το ξένο κύτταρο ή ουσία ενδοκυτταρώνεται εντός του μονοκυττάρου με αποτέλεσμα να σχηματιστεί ένα καψίδιο γνωστό ως φαγόσωμα. Αυτό το καψίδιο στη συνέχεια συγχωνεύεται με ένα λυσόσωμα του μονοκυττάρου που περιέχει υδρολυτικά ένζυμα σε αφθονία και σχηματίζεται ένα φαγολυσόσωμα, μέσα στο οποίο ο εγκολπωματωμένος ξένος παράγοντας κατατέμενεται εντελώς με τη σύμμαχη συμβολή ουσιών, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Τελικά, ένα μέρος των προϊόντων αποικοδόμησης του ξένου παράγοντα χρησιμοποιείται από το ίδιο το μονοκύτταρο, ενώ το υπόλοιπο αποβάλλεται στον περιβάλλοντα χώρο μέσω εξωκυττάρωσης. Ωστόσο, η φαγοκυττάρωση δεν είναι ο μόνος τρόπος με τον οποίο μπορεί ένα μονοκύτταρο να εξουδετερώσει τους εχθρούς του οργανισμού. Τα μονοκύτταρα μπορούν να εξαπολύσουν ισχυρές αντιμικροβιακές και τοξικές ουσίες, όπως το υποχλωριώδες οξύ, έναντι των ξένων προς τον οργανισμό κυτταρικών παραγόντων καταστρέφοντάς τους χωρίς φαγοκυττάρωση. Αυτές οι ουσίες μπορούν να βλάψουν και τους γύρω υγιείς ιστούς, αλλά συνήθως η απελευθέρωσή τους γίνεται σε πολύ στενή απόσταση μεταξύ του μονοκυττάρου και του ξένου κυτταρικού παράγοντα, ούτως ώστε να μετριασθούν οι όποιες αρνητικές παράπλευρες συνέπειες. Επιπλέον, εκτός αυτών των ουσιών, τα μονοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες που να προσελκύσουν άλλα κύτταρα του ανοσοποιητικού σε σημεία φλεγμονής, να μεταφέρουν μηνύματα ενεργοποίησης σε κατηγορίες των λεμφοκυττάρων, να μεταφέρουν μηνύματα για αυξημένη παραγωγή

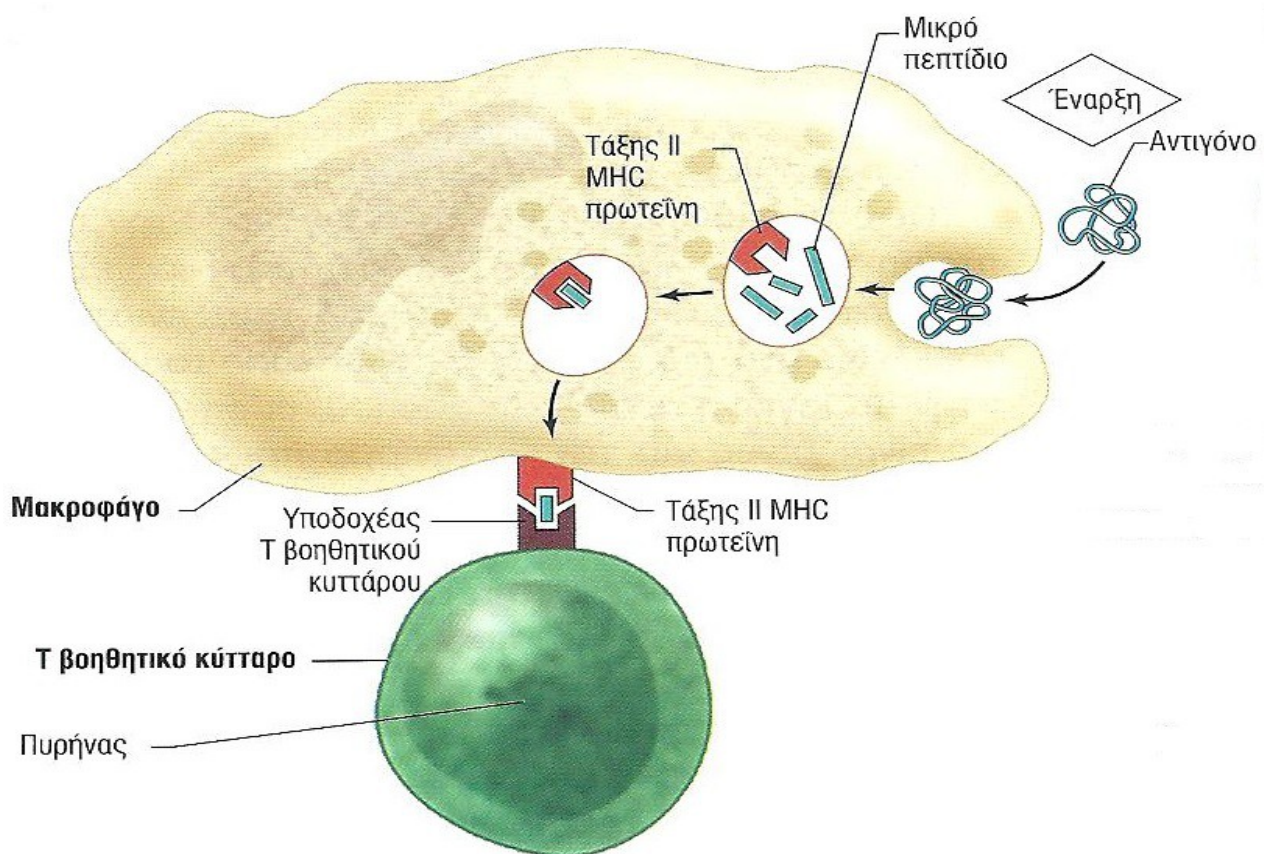
περισσότερων ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων στο μυελό των οστών και άλλες ουσίες που σχετίζονται με τη ρύθμιση των λειτουργιών κυττάρων που εμπλέκονται σε διαδικασίες φλεγμονής αλλά και την τροποποίηση της διαπερατότητας και των λειτουργιών γειτονικών επιθηλιακών κυττάρων των γύρω αγγείων. Οι ρυθμιστικές αυτές κυτταροκίνες μπορούν να παραχθούν τόσο σε καταστάσεις φλεγμονής, όσο και σε καταστάσεις γενικευμένων συστηματικών αποκρίσεων σε φλεγμονή ή τραύμα. [5]



(**Εικόνα 1.11:** Φαγοκυττάρωση και ενδοκυττάρια καταστροφή ενός μικροοργανισμού. Αφού έχει λάβει χώρα η καταστροφή σ' ένα φαγολυσόσωμα, τα τελικά προϊόντα απελευθερώνονται στο εξωκυττάριο υγρό με εξωκυττάρωση ή χρησιμοποιούνται από το ίδιο το κύτταρο για το μεταβολισμό του [5])

Τέλος, τα μονοκύτταρα μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα. Ως αντιγόνο ορίζεται κάθε ουσία που έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει ανοσολογική απόκριση στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα αντιγόνα όλα είναι εκείνα τα χαρακτηριστικά μόρια προς τον οργανισμό που μπορούν να αναγνωριστούν ως ξένα και να χρησιμοποιηθούν για να μπορέσει ο οργανισμός να ξεχωρίσει τα “δικά” του μόρια και ουσίες από τα “μη-δικά” του. Αντιγόνο για παράδειγμα μπορεί να είναι μία μικροβιακή τοξίνη ή μία γλυκοπρωτεΐνη στην επιφάνεια ενός μικροοργανισμού που σημαίνει την ξενική του ιδιότητα συγκριτικά με τα χημικά μόρια του ίδιου του ανθρώπινου οργανισμού. Ένα μονοκύτταρο, λοιπόν, μπορεί να χρησιμοποιήσει κομμάτια μίας ουσίας ή ενός

μικροοργανισμού που φαγοκυττάρωσε και να τα εκθέσει στην κυτταροπλασματική του μεμβράνη επάνω σε μία ειδικά αναγνωρίσιμη από τα T-λεμφοκύτταρα (των οποίων οι λειτουργίες θα αναλυθούν παρακάτω) πρωτεΐνη, το μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex), και έτσι να διοχετεύσει με πληροφορίες, για ένα εισβάλλον στον οργανισμό αντιγόνο ενός ξένου παράγοντα, τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που σχετίζονται με την ειδική άμυνα του οργανισμού, γεφυρώνοντας τους μηχανισμούς της μη-ειδικής άμυνας με εκείνους της ειδικής για περαιτέρω και πιο αποτελεσματική αντιμετώπιση ξένων παραγόντων που ίσως να απαιτήσουν εξόχως εξειδικευμένα οργανωμένα επίθεση από τον οργανισμό για την αντιμετώπισή τους. Γενικά, όσες λειτουργίες αναφέρθηκαν για τα μονοκύτταρα δεν εντοπίζονται μεμονωμένα σε αυτά, αλλά μπορούν να παρατηρηθούν και σε άλλα φαγοκύτταρα όπως τα μακροφάγα. [5]



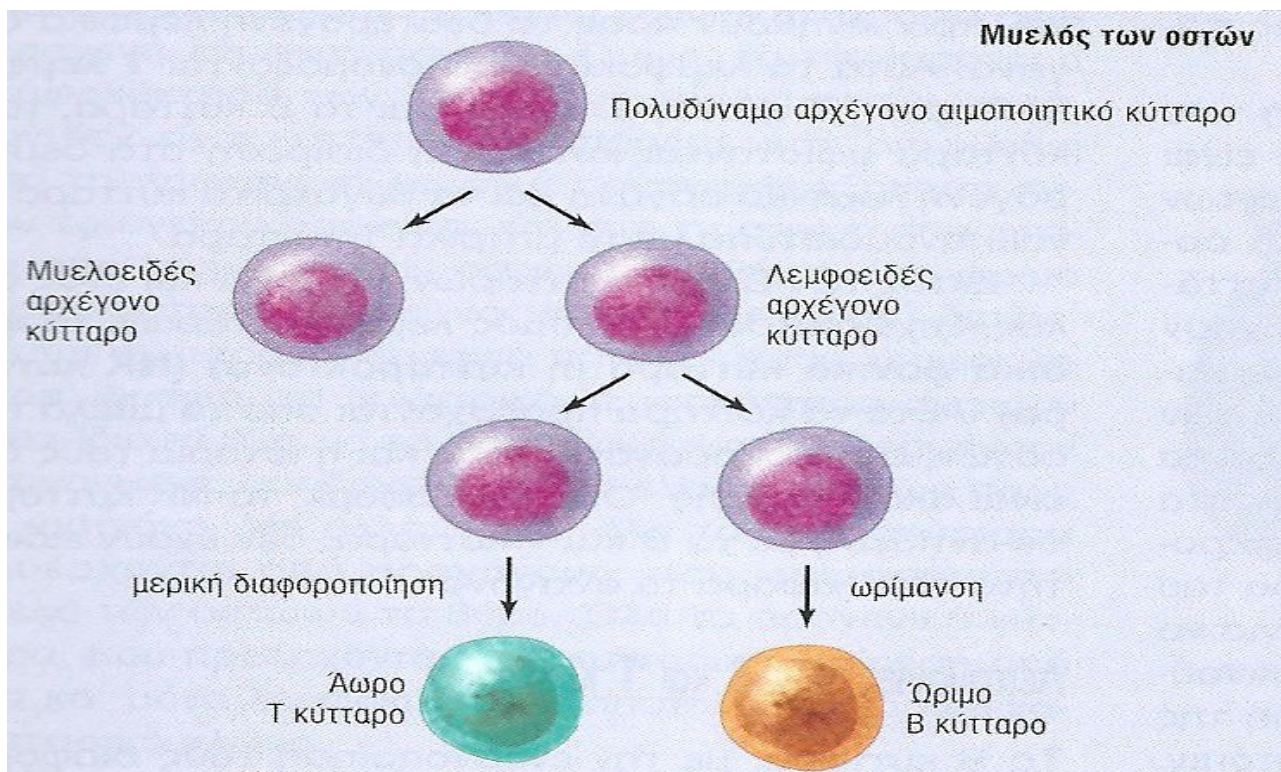
(**Εικόνα 1.12:** Αλληλουχία γεγονότων, κατά τα οποία το αντιγόνο υφίσταται επεξεργασία και παρουσιάζεται σε ένα βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο από ένα μακροφάγο [5])

1.3.2.3 : Τα Λευκοκύτταρα των ειδικών μηχανισμών άμυνας

Σε επόμενο επίπεδο θα αναλυθούν οι φυσιολογικές λειτουργίες των λεμφοκυττάρων. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν τα Β-λεμφοκύτταρα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικοί φονείς. Στην κατηγορία αυτή κατηγοριοποιούνται και τα πλασματοκύτταρα που προέρχονται από ενεργοποιημένα Β-λεμφοκύτταρα κατά τη διάρκεια ανοσολογικών αποκρίσεων. Ωστόσο, τα πλασματοκύτταρα, αν και ανήκουν στην κατηγορία των λεμφοκυττάρων, δεν ανήκουν στην ευρύτερη ομάδα των λευκοκυττάρων, γιατί δεν κυκλοφορούν στο αίμα, αλλά εδράζονται σε λεμφικούς ιστούς. Βέβαια, δεν πρόκειται να μην περιγραφούν σε αυτήν την ενότητα, καθώς αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι των λειτουργιών των λεμφοκυττάρων, χωρίς την περιγραφή των οποίων δε θα ήταν πλήρως κατανοητή η συνολική λειτουργία των ειδικών μηχανισμών άμυνας στα πλαίσια που εξετάζονται. Ακόμη, αξίζει να σημειωθεί ότι τα Τ-λεμφοκύτταρα αποτελούνται από τρεις υποκατηγορίες κυττάρων, τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα, τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα και τα κατασταλτικά Τ-λεμφοκύτταρα, των οποίων οι ρόλοι θα αναλυθούν στη συνέχεια. Μία τελευταία, αποσαφήνιση χρειάζεται να γίνει και σχετικά με τα κύτταρα φυσικούς φονείς. Αν και ανήκουν στα λεμφοκύτταρα, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες σειρές κυττάρων των λεμφοκυττάρων, δεν ανήκουν τόσο στα κύτταρα των ειδικών μηχανισμών άμυνας, όσο στα κύτταρα των μη-ειδικών μηχανισμών άμυνας, καθώς δε λειτουργούν σύμφωνα με τους εξειδικευμένους μηχανισμούς αναγνώρισης που διέπουν τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα. [5]

Όλες οι σειρές των λεμφοκυττάρων προέρχονται από διαφοροποιήσεις αρχέγονων πολυδύναμων αιμοποιητικών κυττάρων στο μυελό των οστών. Από εκεί, δύο βασικές σειρές νεοσυντιθέμενων κυττάρων: τα άωρα Τ-κύτταρα και τα άωρα Β-κύτταρα θα αποτελέσουν τους προγόνους των Τ και Β-λεμφοκυττάρων αντίστοιχα. Τα άωρα Β-κύτταρα ωριμάζουν σε Β-λεμφοκύτταρα στο μυελό των οστών. Τα άωρα Τ-κύτταρα μεταναστεύουν στο δεύτερο κύριο λεμφικό όργανο μετά το μυελό των οστών, το θύμο αδένι που βρίσκεται στο ανώτερο τμήμα του θώρακα. Εκεί, ωριμάζουν στις τελικές μορφές των Τ-λεμφοκυττάρων και έπειτα διοχετεύονται στα διάφορα δευτερογενή λεμφικά όργανα του σώματος, όπως το σπλήνι, τις αμυγδαλές και τους λεμφαδένες, τα οποία θα αποτελέσουν παράλληλη έδρα και ορμηρητήριό τους κατά την “ενήλικη” ζωή τους από όπου θα μπορούν να επικοινωνούν με το υπόλοιπο σώμα, μέσω ενός ενδιάμεσου συστήματος αγγείων, των λεμφαγγείων, τα οποία επικοινωνούν και με το σύστημα των αιμοφόρων αγγείων. Στα δευτερογενή λεμφικά όργανα, μαζί με τα Τ-λεμφοκύτταρα, “μετακομίζουν” και τα Β-λεμφοκύτταρα μετά το πέρας της ωρίμανσής τους στο μυελό των οστών. Οι διαδικασίες

διαφοροποίησης και ωρίμανσης των κυττάρων φυσικών φονέων δεν αναφέρθηκαν, διότι δεν είναι ξεκάθαρες. Στη συνέχεια, θα γίνει προσπάθεια τμηματικής περιγραφής των ιδιοτήτων κάθε είδους λεμφοκυττάρων, αλλά επειδή οι λειτουργίες τους αλληλοεπικαλύπτονται πολλές φορές ίσως να αναφερθούν λειτουργίες ενός είδους λεμφοκυττάρου κατά την περιγραφή ενός άλλου χάριν κατανόησης των λειτουργιών και των δύο. [5]



(**Εικόνα 1.13:** Η προέλευση των B- και T-λεμφοκυττάρων [5])

1.3.2.3.1 : Τα B και τα T λεμφοκύτταρα

Αρχίζοντας, λοιπόν, με τις ιδιότητες των B-λεμφοκυττάρων, οφείλει να τονιστεί ότι αυτά τα κύτταρα σχετίζονται άμεσα με την παραγωγή αντισωμάτων σε καταστάσεις ενεργοποίησης των μηχανισμών ειδικής άμυνας του σώματος, όταν η μη-ειδική δεν αρκεί για την ολοκληρωτική αντιμετώπιση του εισβολέα. Τα αντισώματα που αναφέρθηκαν είναι ειδικά πρωτεϊνικά μόρια που αναγνωρίζουν ένα συγκεκριμένο αντιγόνο και παίζουν καθοριστικό τελεστικό ρόλο στην ολοκλήρωση διαδικασιών του ανοσοποιητικού συστήματος, όπως η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών του συμπληρώματος, της φαγοκυττάρωσης, κ.ά.. [5]

Γενικά, τα B-λεμφοκύτταρα είναι εκείνα τα κύτταρα που ξεκινούν ανοσολογικές αντιδράσεις στον οργανισμό που διαμεσολαβούνται από αντισώματα, συνδέοντας ειδικά

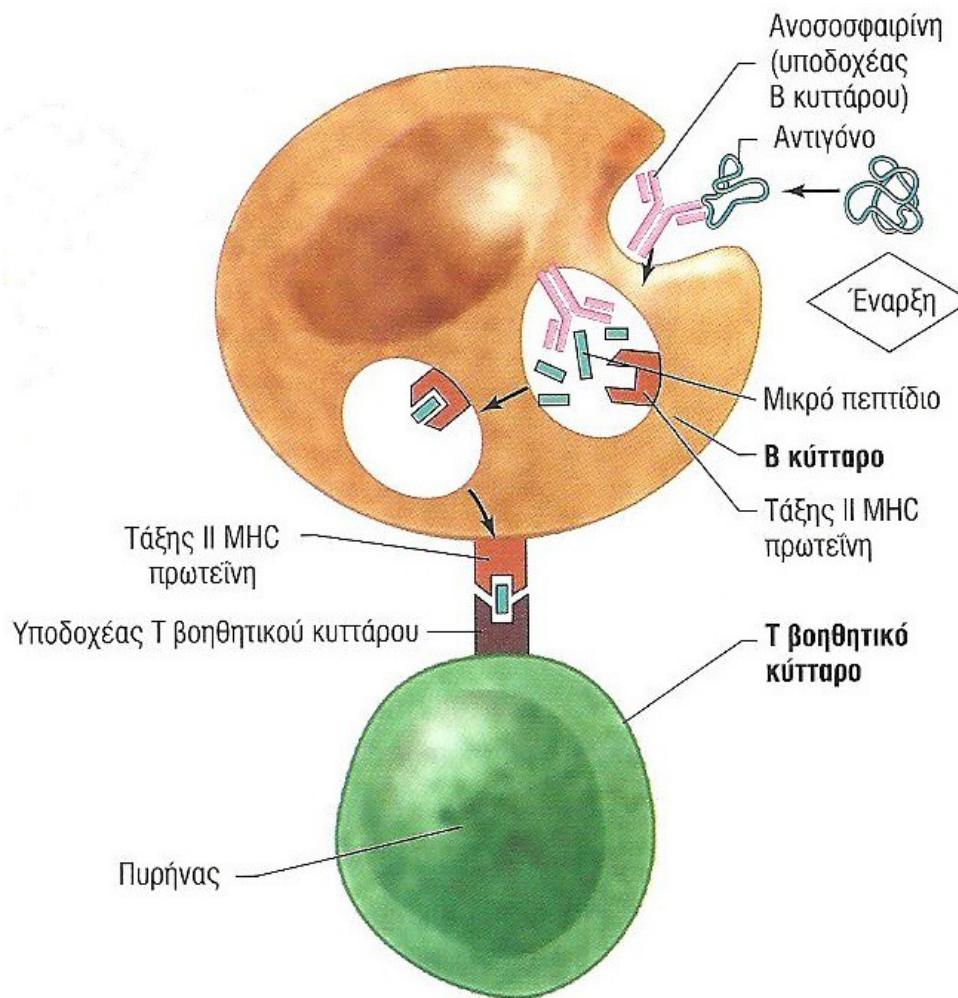
αντιγόνα που προκάλεσαν μία ανοσολογική απόκριση στο σώμα, επάνω σε ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη τους, τις ανοσοσφαιρίνες. Οι ανοσοσφαιρίνες είναι ουσιαστικά ίδιες πρωτεΐνες με τα αντισώματα, απλώς συνηθίζεται οι ελεύθερες ανοσοσφαιρίνες να ονομάζονται αντισώματα. Επομένως, όταν ένα Β-λεμφοκύτταρο έρθει σε επαφή με ένα αντιγόνο ενός ξένου προς τον οργανισμό παράγοντα, δεσμεύει το αντιγόνο αυτό στους ειδικούς υποδοχείς-ανοσοσφαιρίνες που προαναφέρθηκαν, επάνω στην κυτταροπλασματική μεμβράνη του. Ο οργανισμός διαθέτει έναν υπερβολικά μεγάλο αριθμό από Β-λεμφοκύτταρα, το καθένα με ένα διαφορετικό τύπο υποδοχέα-ανοσοσφαιρίνη συμπληρωματικό προς έναν τύπο αντιγόνου. Έτσι, βάσει πιθανοτήτων είναι σχεδόν απίθανο με τόσα Β-λεμφοκύτταρα με μεγάλη ποικιλία υποδοχέων, να μη βρεθεί κάποιο με ικανοποιητική συμπληρωματικότητα ως προς ένα αντιγόνο που εισήλθε στον οργανισμό. Ένα Β-λεμφοκύτταρο που έχει δεσμεύσει ένα αντιγόνο, λειτουργεί ως αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο (όπως και αντίστοιχα λειτουργούσε ένα μονοκύτταρο ή ένα μακροφάγο που αναφέρθηκε πιο πριν), αφού μπορεί να ενδοκυτταρώσει ένα αντιγόνο και να εκθέσει στη συνέχεια τμήματα του αντιγόνου πάνω σε έναν υποδοχέα τύπου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, επάνω στη μεμβράνη του. Σε αυτή την φάση, τα τμήματα του αντιγόνου που εκθέτονται μπορούν να γίνουν αντιληπτά και αναγνωρίσιμα από ένα βοηθητικό Τ-λεμφοκύτταρο. Τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα στην ουσία αποτελούν τους συντονιστές της ειδικής άμυνας του οργανισμού. Ένα βοηθητικό Τ-λεμφοκύτταρο, μπορεί να αναγνωρίσει ένα κατατετμημένο αντιγόνο, όταν αυτό εκτίθεται σε έναν υποδοχέα τύπου μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας, επάνω σε μία μεμβράνη είτε ενός Β-λεμφοκυττάρου είτε ενός μονοκυττάρου ή ενός μακροφάγου. Όταν το βοηθητικό Τ-λεμφοκύτταρο συνδεθεί, μέσω ενός δικού του ειδικού υποδοχέα, με τον υποδοχέα ενός αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου που φέρει ένα κομμάτι αντιγόνου, τότε αυτό ενεργοποιείται μέσω της σύνδεσής του αυτής και της σύνδεσης με άλλους παρακείμενους υποδοχείς στην μεμβράνη του αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, αλλά και μέσω εκκρινόμενων ουσιών από το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο. Το ενεργοποιημένο από το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο βοηθητικό Τ-λεμφοκύτταρο πολλαπλασιάζεται ταχέως και είναι πλέον ικανό να ενεργοποιήσει με τη σειρά του τα υπόλοιπα λεμφοκύτταρα και να προχωρήσει το σύνολο των διαδικασιών της ειδικής άμυνας για την τελική καταπολέμηση του εισβάλλοντος στον οργανισμό ξένου παράγοντα. Στην περίπτωση που ενεργοποιήσει το Β-λεμφοκύτταρο που προκάλεσε την ενεργοποίησή του, τότε το ενεργοποιημένο βοηθητικό Τ-λεμφοκύτταρο μετατρέπει το Β-λεμφοκύτταρο σε ενεργοποιημένο Β-λεμφοκύτταρο. Το ενεργοποιημένο Β-λεμφοκύτταρο με τη σειρά του πολλαπλασιάζεται και

αυτό, δημιουργώντας πολλά πλασματοκύτταρα και λίγα Β-κύτταρα μνήμης. [5]

Τα πλασματοκύτταρα είναι διαφοροποιημένα Β-λεμφοκύτταρα που έχουν την ικανότητα να παράγουν μαζικά αυξημένες ποσότητες αντισωμάτων ειδικών ως προς το αντιγόνο που προκάλεσε τον καταρράκτη ενεργοποιήσεων του αρχικού Β-λεμφοκυττάρου και να τα διοχετεύουν στην κυκλοφορία του αίματος από όπου μπορούν να πάνε να συνδεθούν στο συγκεκριμένο αντιγόνο “μαρκάροντας” αυτό και συνάμα και το κύτταρο ή την ουσία που φέρει, κάνοντάς το εύκολο στόχο των φαγοκυττάρων, των κυτταροτοξικών Τ-λεμφοκυττάρων και των κυττάρων φυσικών φονέων, τα οποία μπορούν να το εξουδετερώσουν αυτό και τους όμοιούς του με αποτελεσματικότητα, ταχύτητα και ακρίβεια. Παράλληλα, ο ξένος παράγοντας καθίσταται πιο επιρρεπής στις δράσεις των πρωτεϊνών του συμπληρώματος του πλάσματος που αποτελούν πρωτεΐνες με ελκτικές ιδιότητες προς τα φαγοκύτταρα και έχουν κυτταροκαταστροφικές ιδιότητες. [5]

Τα Β-κύτταρα μνήμης που παράχθηκαν θα αποθηκευτούν, ώστε σε δεύτερη μελλοντική έκθεση του οργανισμού στο αντιγόνο του ξένου παράγοντα να πραγματοποιηθεί προετοιμασμένη και οργανωμένη άμεση και πιο γρήγορη παραγωγή ακόμη μεγαλύτερου αριθμού ειδικών προς το συγκεκριμένο αντιγόνο αντισωμάτων για την πλήρη και ολοκληρωτική καταστροφή του εισβολέα. [5]

Όλα αυτά εν κατακλείδι, συνοψίζουν τόσο τις λειτουργίες των Β-λεμφοκυττάρων, όσο και των αλληλεπιδράσεών τους, αλλά και του γενικότερου ρόλου που διαδραματίζουν στους μηχανισμούς ειδικής άμυνας. Στη συνέχεια, θα γίνει περιγραφή των λειτουργιών των Τ-λεμφοκυττάρων με προσπάθεια ελαχιστοποίησης των λειτουργιών που αλληλεπικαλύπτονται με τα μονοπάτια εκείνων των Β-λεμφοκυττάρων που μόλις αναλύθηκαν. [5]



(**Εικόνα 1.14:** Τα τρία γεγονότα που απαιτούνται για την ενεργοποίηση των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων: 1) η παρουσίαση του αντιγόνου, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μία πρωτεΐνη μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τάξης II, σε ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο· 2) η σύνδεση των επικουρικών πρωτεϊνών που ταιριάζουν μεταξύ τους και που βρίσκονται στις μεμβράνες των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και των βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων και 3) η έκκριση κυτταροκινών από τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, ιντερλευκίνης 1 (IL-1) και TNF, οι οποίες δρουν στο βοηθητικό T-λεμφοκύτταρο. [5])

Τα T-λεμφοκύτταρα όπως είχε αναφερθεί και προηγουμένως χωρίζονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες. Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα και τα κατασταλτικά T-λεμφοκύτταρα. [5]

Τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα παίζουν το ρόλο του συντονιστή των διαδικασιών της ειδικής άμυνας. Συγκεκριμένα, όπως αναλύθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα είναι εκείνα που θα συνδεθούν με κομμάτια του αντιγόνου που προκάλεσε την δραστηριοποίηση των ανοσοποιητικών μηχανισμών του σώματος και που βρίσκεται εκτεθειμένο στην επιφάνεια κάποιου αντιγονοπαρουσιαστικού κυττάρου, είτε

αυτό είναι κάποιο μονοκύτταρο ή μακροφάγο είτε κάποιο Β-λεμφοκύτταρο και στη συνέχεια θα ενεργοποιηθούν από αυτήν τους τη σύνδεση και θα πολλαπλασιαστούν, με τελικό σκοπό να εκκρίνουν διάφορα είδη κυτταροκινών που θα επηρεάσουν άλλα κύτταρα που συμμετέχουν ενεργά στην εξειδικευμένη καταπολέμηση του ξένου εισβολέα στον οργανισμό. Οι κυτταροκίνες αυτές είναι κυρίως ιντερλευκίνη-2 (IL-2) και μπορούν να δράσουν ως διεγερτικά μόρια ενεργοποιητές για παράδειγμα των Β-λεμφοκυττάρων που προκάλεσαν την ενεργοποίηση των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα τα Β-κύτταρα αυτά να διαφοροποιηθούν σε πλασματοκύτταρα και Β-κύτταρα μνήμης, των οποίων ο ρόλος περιγράφηκε πιο πριν. Ακόμη, οι κυτταροκίνες αυτές μπορούν να ενεργοποιήσουν τα φαγοκύτταρα που προκάλεσαν την ενεργοποίηση των βοηθητικών Τ-λεμφοκυττάρων, που μάλιστα αν πρόκειται για μακροφάγα, αυτά τα ενεργοποιημένα μακροφάγα έχουν ενισχυμένη ικανότητα φαγοκυττάρωσης σε τέτοιο επίπεδο που μπορούν να φαγοκυττάρωνουν ακόμα και μεγάλα ευκαρυωτικά κύτταρα του οργανισμού, όταν αυτά έχουν προσβληθεί από κάποιον ιό ή ενδοκυτταρικό βακτήριο ή έχουν μετατραπεί σε ξένα καρκινικά κύτταρα και απαιτείται να εξαλειφθούν άμεσα από τους μηχανισμούς άμυνας για την ασφάλεια του οργανισμού. Επιπλέον, οι συγκεκριμένες κυτταροκίνες μπορούν να επηρεάσουν τα κυτταροτοξικά Τ-λεμφοκύτταρα και τα κύτταρα φυσικούς φονείς επάγοντας τις λειτουργίες τους ενεργοποιώντας τα. [5]

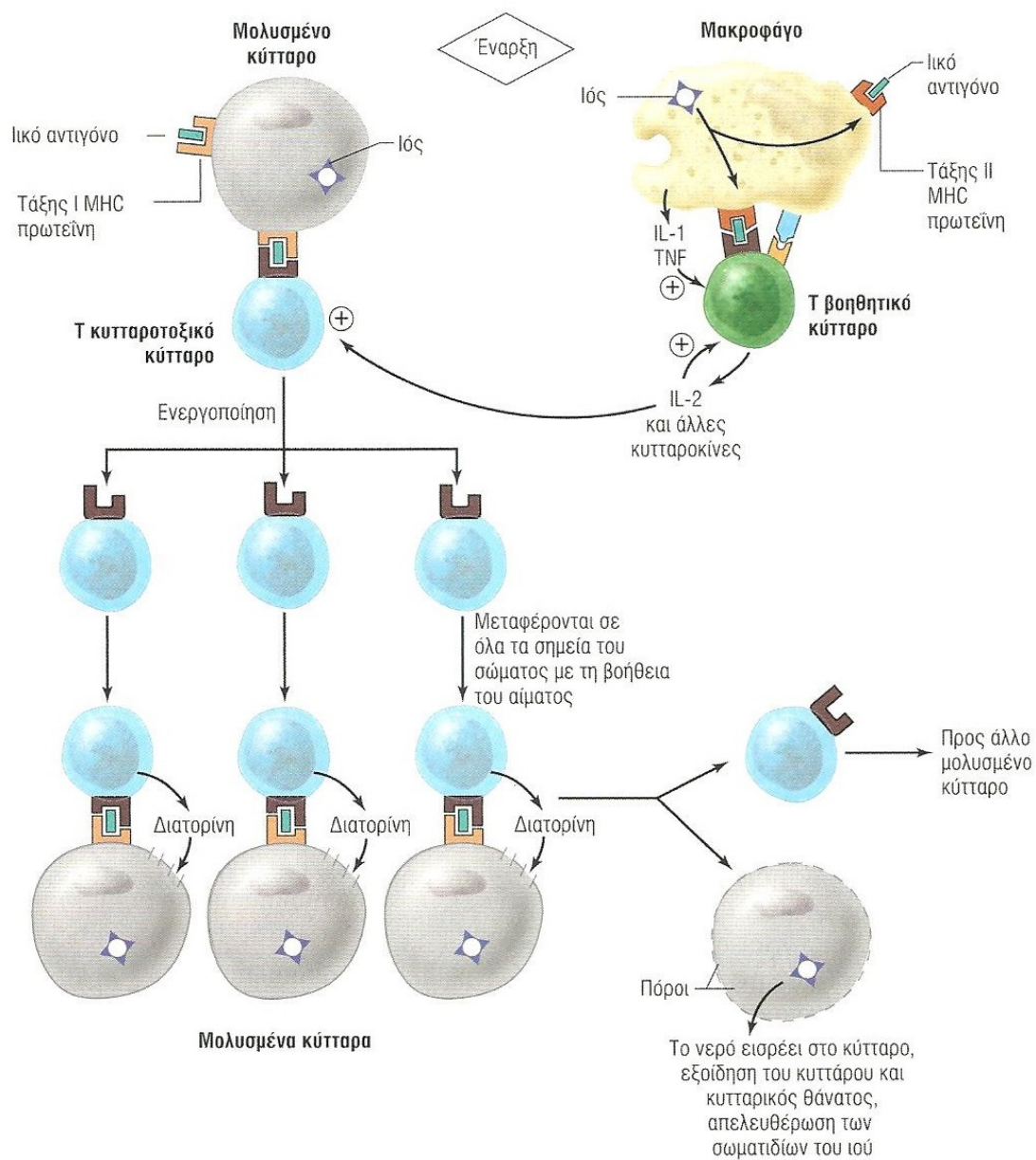
Ο ρόλος των Τ-λεμφοκυτταρων για την επιτυχή και εύρυθμη λειτουργία των ανοσοποιητικών μηχανισμών είναι μεγίστης σημασίας, καθώς χωρίς τη διαμεσολάβησή τους δεν μπορούν να ξεκινήσουν βασικά μονοπάτια-κλειδιά των διαδικασιών της ειδικής άμυνας, όπως η έκκριση εξειδικευμένων αντισωμάτων και η εξειδικευμένη φαγοκυττάρωση και καταστροφή ενός ξένου παράγοντα. Για αυτό το λόγο και τα άτομα που πάσχουν από τον ιό που προκαλεί το σύνδρομο επίκτητης ανοσοανεπάρκειας (A.I.D.S) που προσβάλλει τα βοηθητικά Τ-λεμφοκύτταρα, έχουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσης από ευρύ φάσμα μικροοργανισμών και αυξημένη θνητότητα. [5]

1.3.2.3.2 : Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα

Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα αποτελούν μία υποομάδα των T-λεμφοκυττάρων με βασική λειτουργία την καταστροφή κυττάρων που φέρουν στη μεμβράνη τους κάποιο αντιγόνο. Τέτοια κύτταρα μπορεί να είναι κύτταρα του οργανισμού μολυσμένα από κάποιον ιό, καρκινικά κύτταρα ή ξένα κύτταρα μοσχεύματος. [5]

Τα κυτταροτοξικά κύτταρα χαρακτηρίζονται από εξειδίκευση του στόχου τους. Συνδέονται με το αντιγόνο ενός κυττάρου-στόχου μόνο όταν το αντιγόνο αυτό έχει πρώτα αναγνωριστεί από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα μέσω αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων και έχουν εκκριθεί οι κατάλληλες κυτταροκίνες που θα ενεργοποιήσουν τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα για να πάνε να εντοπίσουν και να καταστρέψουν τα σεσημασμένα πλέον κύτταρα προς απαλοιφή. Τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα ανιχνεύουν τα κύτταρα-στόχους με τη χρήση ειδικών υποδοχέων που φέρουν, με τους οποίους αναγνωρίζουν το αντιγόνο που εκκίνησε τον καταρράκτη μηνυμάτων ενεργοποίησής τους. [5]

Η εξουδετέρωση ενός κυττάρου-στόχου γίνεται με τη σύνδεση του κυτταροτοξικού T-λεμφοκυττάρου επάνω στο κύτταρο-στόχο και την επακόλουθη απελευθέρωση κοκκίων γεμάτα με τις πρωτεΐνες περφορίνες, στο στενό χώρο μεταξύ των δύο κυττάρων. Τα κοκκία συντήκονται με τη μεμβράνη του κυττάρου-στόχου και στη συνέχεια οι περφορίνες έχουν την ιδιότητα να σχηματίζουν πόρους στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, με συνέπεια την απότομη εισροή νερού και ηλεκτρολυτών εντός του κυττάρου-στόχου και τελικά το θάνατό του. [5]



(**Εικόνα 1.15:** Περίληψη των γεγονότων κατά την εξόντωση των μολυσμένων από ιούς κυττάρων από κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα. Οι ιοί που απελευθερώνονται μπορούν στη συνέχεια να φαγοκυτταρωθούν. Η αλληλουχία των γεγονότων θα ήταν παρόμοια, αν το κύτταρο που προκαλεί την ανοσολογική απόκριση ήταν ένα καρκινικό κύτταρο, αντί ενός κυττάρου μολυσμένο από ιό. [5])

1.3.2.3.3 : Τα ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα

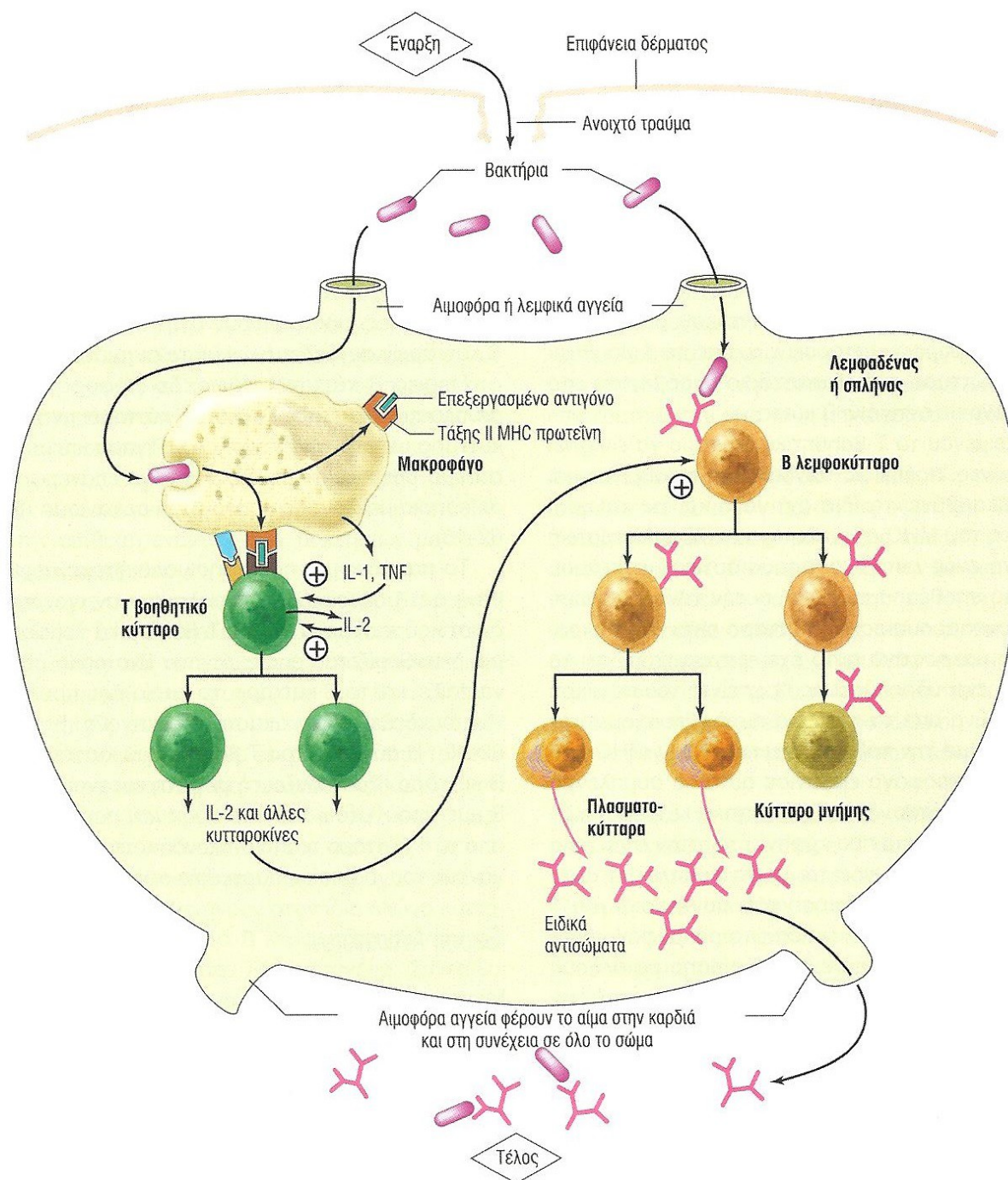
Τα κατασταλτικά/ρυθμιστικά T-λεμφοκύτταρα, διαδραματίζουν το ρόλο του εξομοιωτή/εξομαλυντή. Μπορούν να μειώνουν την ισχύ και να σταματούν τα μονοπάτια λειτουργίας των μηχανισμών της ειδικής άμυνας του οργανισμού, ολοκληρώνοντας τη διαδικασία της ανοσολογικής απόκρισης, μετά την επιτυχή εξόντωση του όποιου εισβολέα, μέσω της έκκρισης διαφόρων μηνυματοφόρων ρυθμιστικών ουσιών. [5]

1.3.2.3.1 : Τα κύτταρα φυσικοί φονείς

Ολοκληρώνοντας τις λειτουργίες των λεμφοκυττάρων, ακολουθεί η περιγραφή των κυττάρων φυσικών φονέων. Τα κύτταρα φυσικοί φονείς μοιάζουν ως προς τις δράσεις τους με τα κυτταροτοξικά T-λεμφοκύτταρα, καθώς είναι και αυτά ικανά να εξοντώσουν κύτταρα προσβεβλημένα από ιούς, καρκινικά κύτταρα ή ξένα κύτταρα ενός μοσχεύματος, αφού συνδεθούν με αυτά και ανοίξουν πόρους διαρροής νερού και ηλεκτρολυτών. [5]

Ωστόσο, σε αντίθεση με τα T κυτταροτοξικά κύτταρα, τα κύτταρα φυσικοί φονείς δεν απαιτούν την κινητοποίηση μηχανισμών πρωτεϊνικής αναγνώρισης αντιγόνων και ενεργοποίησης, μέσω κυτταροκινών από τα βοηθητικά T-λεμφοκύτταρα, για να εκτελέσουν τα καθήκοντά τους. Μπορούν να δρουν ανεξάρτητα, γρήγορα και μη ειδικά εναντίον εχθρικών, προβληματικών και ξένων κυττάρων προτού τεθούν σε εφαρμογή οι μηχανισμοί ειδικής άμυνας του οργανισμού. Ο ακριβής τρόπος αναγνώρισης και οι πλήρεις μηχανισμοί δράσης των κυττάρων φυσικών φονέων παραμένουν άγνωστα προς το παρόν. [5]

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η εξόντωση των όποιων κυττάρων-στόχων των κυττάρων φυσικών φονέων μπορεί να ενισχυθεί και να διευκολυνθεί από την έκκριση αντισωμάτων των πλασματοκυττάρων και από την έκκριση των κυτταροκινών των ενεργοποιημένων βοηθητικών T-λεμφοκυττάρων καθιστώντας τις λειτουργίες όχι παντελώς ανεξάρτητες από εκείνες των μηχανισμών της ειδικής άμυνας του σώματος. [5]



(**Εικόνα 1.16:** Περίληψη των γεγονότων δια των οποίων μία βακτηριακή μόλυνση οδηγεί στη σύνθεση αντισωμάτων στα περιφερικά λεμφοκυτταρικά όργανα. Τα εκκρινόμενα αντισώματα ταξιδεύουν μέσω του αίματος στο σημείο της μόλυνσης, όπου συνδέονται με τα βακτήρια του τύπου που προκάλεσε την ανοσολογική απόκριση. [5])

1.3.3 : Αιμοπετάλια (Φυσιολογία και Δράσεις):

Τα αιμοπετάλια αποτελούν άχρωμα θραύσματα κυττάρων και παίζουν καθοριστικό ρόλο στους μηχανισμούς της αιμόστασης, μετά από κάποιον αγγειακό τραυματισμό. Προέρχονται από απόσπασση τμημάτων του κυτταροπλάσματος των μεγακαρυοκυττάρων, περιτριγυρισμένων από κυτταροπλασματική μεμβράνη. Τα μεγακαρυοκύτταρα είναι μία σειρά κυττάρων που παράγεται στο μυελό των οστών από τα αρχέγονα πολυδύναμα αιμοποιητικά κύτταρα και χρησιμοποιείται για την παραγωγή αιμοπεταλίων. Αν και θραύσματα, τα αιμοπετάλια εμφανίζουν μεταβολικές λειτουργίες, όχι τόσο ζωτικών λειτουργιών, όσο εξειδικευμένων λειτουργιών σχετικά με το ρόλο τους που ενεργοποιούνται υπό κατάλληλες συνθήκες που θα αναλυθούν παρακάτω. [5]

Αναφέρθηκε ότι η χρησιμότητα των αιμοπεταλίων σχετίζεται με τους μηχανισμούς της αιμόστασης. Η αιμόσταση είναι ένα σύνολο διεργασιών που επιτελούνται από τον ανθρώπινο οργανισμό, με σκοπό τη διακοπή της αιμοραγίας ενός τραυματισμένου αγγείου. Οι διεργασίες αυτές μπορούν να ομαδοποιηθούν χονδρικά σε τέσσερις επιμέρους μηχανισμούς που όλοι μαζί συντελούν στην αιμόσταση και οι οποίοι είναι: α) η αύξηση της πίεσης του ιστού επάνω στο τοίχωμα του τραυματισμένου αγγείου, β) η συστολή των λείων μυϊκών ινών των τοιχωμάτων του τραυματισμένου αγγείου, γ) η προσκόλληση, η ενεργοποίηση και η συσώρευση των αιμοπεταλίων στο σημείο του ρήγματος του τραυματισμένου αγγείου, με τελικό σκοπό τη δημιουργία “στεγανωτικού” αιμοπεταλιακού βύσματος (το οποίο είναι πιο κοινά γνωστό ως θρόμβος) και δ) η ενεργοποίηση και ολοκλήρωση των μηχανισμών πήξης του αίματος μέσω διαδικασιών εμπλοκής των παραγόντων πήξης (που είναι πρωτεΐνες του πλάσματος) του αίματος προς σχηματισμό πηγματος αδιάλυτου ινώδους στην περιοχή. Σε αυτό το υποκεφάλαιο θα γίνει εστίαση στην περιγραφή των δράσεων των αιμοπεταλίων στην αιμόσταση και όχι των υπολοίπων μηχανισμών, αφού αυτές σχετίζονται ουσιαστικά με το θέμα αυτής της πτυχιακής μελέτης. [5]

1.3.3.1 : Ο μηχανισμός της αιμόστασης

Όσον αφορά, λοιπόν, τους αιμοπεταλιακούς μηχανισμούς που σχετίζονται με την αιμόσταση είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι για να πραγματοποιηθούν πρέπει πρώτα τα αιμοπετάλια να ενεργοποιηθούν. Για να ενεργοποιηθούν τα αιμοπετάλια απαιτείται η προσκόλλησή τους σε ειδική επιφάνεια. Το ρόλο αυτής της ειδικής επιφάνειας παίζει το τραυματισμένο υποενδοθηλίο ενός αγγείου. Τα αιμοπετάλια δεν προσκολλώνται στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του ενδοθηλίου ενός αγγείου. Ωστόσο, εάν το τοίχωμα ενός αγγείου υποστεί ρήξη για παράδειγμα, τότε τα υποκείμενα μόρια του κολλαγόνου του περιβάλλοντος συνδετικού ιστού έρχονται στην επιφάνεια και τότε τα αιμοπετάλια, λόγω ηλεκτροχημικών έλξεων, τείνουν να προσκολληθούν στα μόρια αυτά του ελεύθερα προβαλλομένου κολλαγόνου. Η προσκόλληση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο, η οποία διεκπεραιώνεται με τη χρήση ειδικών υποδοχέων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων, μπορεί να γίνει είτε με άμεσο τρόπο είτε με έμμεσο. Ο έμμεσος τρόπος γίνεται μέσω της διαμεσολάβησης μία κυκλοφορούσας, στο πλάσμα του αίματος, πρωτεΐνης ονόματι παράγοντας von Willebrand. Αυτή η πρωτεΐνη-διαμεσολαβητής, η οποία εκκρίνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων, συνδέεται με το εκτεθειμένο κολλαγόνο, αλλάζει τη δομή της και έτσι εμφανίζει αυξημένη συγγένεια σύνδεσης με τα αιμοπετάλια, έλκοντάς τα τελικά στο σημείο του αγγειακού τραυματισμού. Με αυτόν το τρόπο ενισχύεται τόσο η συγκέντρωση των αιμοπεταλίων στο σημείο του τραυματισμένου αγγείου, όσο η σύνδεση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο, αφού ο παράγοντας von Willebrand λειτουργεί και ως γεφυροποιός-σύνδεσμος μεταξύ του κολλαγόνου και των αιμοπεταλίων. Η προσκόλληση αυτή των αιμοπεταλίων ενισχύεται και από άλλα χημικά μόρια όπως η θρομβίνη, η θρομβοξάνη A_2 , η διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), η επινεφρίνη, η σεροτονίνη και ο παράγοντας ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (PAF), μερικών εκ των οποίων οι λειτουργίες θα περιγραφούν παρακάτω. [5]

Μετά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων μέσω των ειδικών υποδοχέων τους στο εκτεθειμένο κολλαγόνο, ξεκινάει ένας καταρράκτης χημικών ενδοκυτταρικών αντιδράσεων και μηνυμάτων στα συνδεδεμένα αιμοπετάλια. Αυτή η αλυσίδα αντιδράσεων που σχετίζεται με αντιδράσεις που οδηγούν τελικά σε έντονη παραγωγή διακυλογλυκερολών και αυξημένες συγκεντρώσεις ιόντων ασβεστίου εντός των αιμοπεταλίων, ονομάζεται διαδικασία ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Αυτή η διαδικασία έχει πολλαπλά αποτελέσματα, όπως αλλαγές στο σχήμα των αιμοπεταλίων, επαγωγή παραγωγής

ουσιών, όπως η θρομβοξάνη A_2 , έκκριση κοκκίων και συστολή των αιμοπεταλίων που συνολικά θα συντελέσουν στη δημιουργία του ινώδους αιμοπεταλιακού βύσματος, το οποίο θα ολοκληρώσει τη διεργασία της αιμόστασης. Τα κοκκία που εκκρίνονται από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια περιέχουν ADP, σεροτονίνη και άλλους παράγοντες που δρουν άμεσα στα νεοεισερχόμενα στο σημείο αιμοπετάλια ενεργοποιώντας τα ταχέως, χωρίς να χρειαστεί να προσκολληθούν σε κολλαγόνο, συνδράμοντας έτσι στην ενίσχυση της ενεργοποίησης αλλά και της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην περιοχή και παράλληλα επιταχύνοντας το μηχανισμό τελικού σχηματισμού του αιμοπεταλιακού βύσματος. [5]

Η θρομβοξάνη A_2 αποτελεί μέλος μίας οικογένειας μορίων που ονομάζονται εικοσανοειδή, τα οποία συμμετέχουν σε διαδικασίες φλεγμονής και παράγονται από το αραχιδονικό οξύ. Η θρομβοξάνη A_2 συγκεκριμένα παράγεται ταχέως από τα πρώτα μόλις προσκολλημένα αιμοπετάλια και συμβάλλει στην ενεργοποίηση των καινούριων αιμοπεταλίων που καταφθάνουν στο σημείο του τραύματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια πέραν των άλλων έχουν αυξημένη τάση να συσσωρεύονται επάνω από τα υπόλοιπα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια του στοιβαγμένου στο σημείο σωρού και εκφράζουν τον υποδοχέα για το ινωδογόνο. [5]

Το ινωδογόνο είναι μία πρωτεΐνη του πλάσματος που παράγεται από το ήπαρ και παίζει καθοριστικό ρόλο στην αιμόσταση σχηματίζοντας, μέσω τροποποιήσεων στις οποίες υπόκειται, το πρωτεϊνικό πολυμερές δίκτυο του αδιάλυτου ινώδους που συγκρατεί το αιμοπεταλιακό βύσμα, σταθεροποιώντας το, ενώ σχηματίζεται σταδιακά στην περιοχή του αγγειακού τραύματος. Εκτός αυτού του βασικού του ρόλου, το ινωδογόνο λειτουργεί και ως συνδετικό μόριο μεταξύ των συναθροιζόμενων αιμοπεταλίων, σχηματίζοντας γέφυρες μεταξύ τους, ομοίως με τον προειπωμένο παράγοντα von Willebrand. [5]

Επιπλέον, η θρομβίνη (ένα ένζυμο του πλάσματος που προέρχεται από την τροποποίηση του προενζύμου του πλάσματος, προθρομβίνη, μέσω αλληλεπιδράσεων των μονοπατιών των μηχανισμών της αιμόστασης), είναι και αυτή υπεύθυνη για τη διέγερση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Σημειωτέον είναι ότι η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τη θρομβίνη προκαλεί την έκθεση ειδικών υποδοχέων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων, οι οποίοι δεσμεύουν ορισμένους από τους παράγοντες πήξης συμβάλλοντας στη διεκπεραίωση διαδικασιών της αιμόστασης. [5]

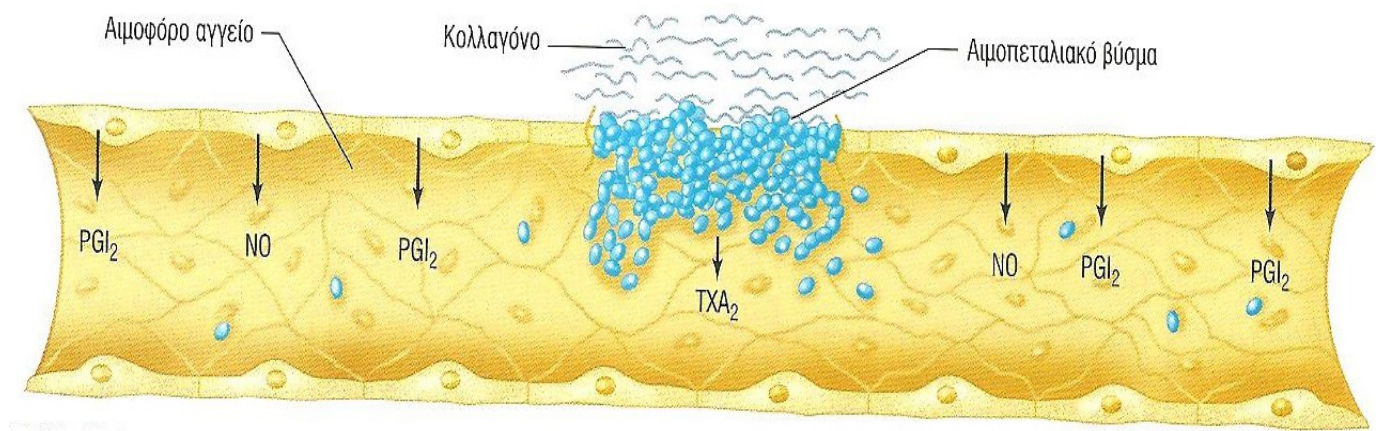
Ένας άλλος μηχανισμός που συνεργάζονται τα αιμοπετάλια με τους παράγοντες πήξης, είναι εκείνος που σχετίζεται με τον αιμοπεταλιακό παράγοντα 3 (PT3). Ο παράγοντας αυτός αποτελείται από ένα σύνολο ορισμένων αρνητικά φορτισμένων

φωσφολιποειδών της μεμβράνης των αιμοπεταλίων. Αυτά τα φωσφολιποειδή χρησιμοποιούν ιόντα ασβεστίου ως γέφυρα σύνδεσής τους με παράγοντες πήξης, με απώτερο στόχο το σχηματισμό ενζυμικών συμπλεγμάτων. Τα συμπλέγματα αυτά, με τη παράλληλη συμμετοχή συμπαραγόντων πήξης, λειτουργούν ως εξειδικευμένοι επιταχυντές διαφόρων αντιδράσεων της αιμόστασης και δημιουργούν ένα προστατευτικό περίβλημα που προστατεύει τις διάφορες αυτές αντιδράσεις από τυχόντα ανασταλτικά μόρια και περιορίζει την έκταση του φαινομένου της πήξης στο σημείο του τραυματισμού του αγγείου. [5]

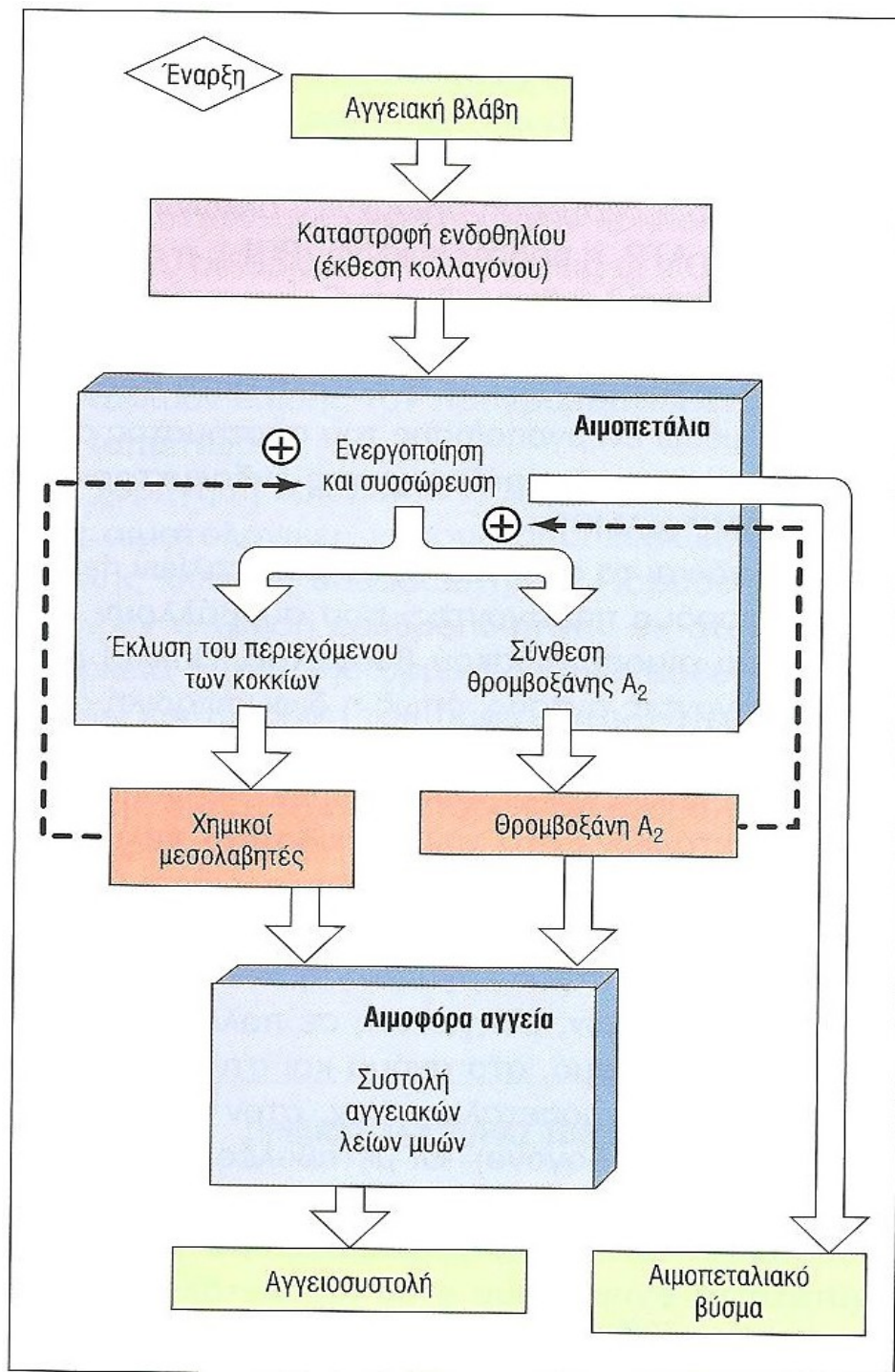
Η “στεγανότητα” του αιμοπεταλιακού βύσματος που δημιουργείται από τη συνεργασία όλων αυτών των ουσιών και των μηχανισμών, βελτιστοποιείται από την ιδιότητα των αιμοπεταλίων να προκαλούν συρρίκνωση του δικτύου του ινώδους μέσω της συστολής τους. Τα αιμοπετάλια περιέχουν μεγάλες, αναλογικά με το μέγεθός τους, ποσότητες ακτίνης και μυοσίνης. Όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιηθούν, συνδυαστικά με την αύξηση των ενδοκυττάρων ιόντων ασβεστίου, πραγματοποιείται συστολή τους με αποτέλεσμα το “τράβηγμα” των ινών του πλέγματος του ινώδους στο οποίο είναι “γαντζωμένα” και “παγιδευμένα” με σχετικά σταθερούς ομοιοπολικούς δεσμούς. Έτσι, προκαλείται συρρίκνωση του ινώδους πλέγματος και αισθητή ενίσχυση της στεγανωτικής σταθερότητας του αιμοπεταλιακού βύσματος για την πλήρη ανακοπή της αιμορραγίας του αγγείου. Με την ανάπτυξη του συμπαγούς πλέον αιμοπεταλιακού βύσματος, τα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγειακού τοιχώματος διεγείρονται και συστέλλονται τοπικά ελαττώνοντας την πίεση και τη ροή του αίματος του αγγείου, γεγονός που είναι εν μέρει απόρροια της θρομβοξάνης A_2 και άλλων ουσιών των εκκριτικών κοκκίων των ενεργοποιηθέντων αιμοπεταλίων. [5]

Σε αυτό το σημείο οφείλεται να αναφερθεί ότι ο οργανισμός έχει προνοήσει για την ύπαρξη ανασταλτικών μηχανισμών που περιορίζουν την έκταση των παραπάνω φαινομένων μόνο στο σημείο που εντοπίστηκε η βλάβη. Συγκεκριμένα, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μπορεί να κατασταλεί, όταν στους υποδοχείς τους δεσμευτούν ανασταλτικές ουσίες προσκόλλησης και συσώρευσής τους, όπως η τριφωσφορική αδενοσίνη (ATP), η προστακυκλίνη ή αλλιώς προσταγλαδίνη I_2 (PGI_2), η αδενοσίνη και οι προσταγλαδίνες D_2 και E_1 . Ειδικότερα, η προστακυκλίνη συντίθεται και απελευθερώνεται συνεχώς από τα υγιή, μη-κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα των αγγείων εμποδίζοντας τη συσώρευση των αιμοπεταλίων. Παράλληλα, τα υγιή και μη κατεστραμμένα ενδοθηλιακά κύτταρα απελευθερώνουν και μονοξειδίο του αζώτου, το οποίο αν και είναι γνωστό κατά βάση για την αγγειοδιασταλτική του δράση, έχει την επιπρόσθετη ικανότητα

να αναστέλλει την προσκόλληση, την ενεργοποίηση, όπως και τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων. [5]



(**Εικόνα 1.18:** Η προστακυκλίνη (PGI₂) και το μονοξείδιο του αζώτου (NO) που παράγονται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αναστέλλουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και έτσι εμποδίζουν την επέκταση του αιμοπεταλιακού βύσματος μακριά από τη θέση της βλάβης. TXA₂ : Θρομβοξανή A₂ [5])



(**Εικόνα 1.17:** Αλληλουχία γεγονότων που οδηγούν στο σχηματισμό ενός αιμοπεταλιακού βύσματος και σε αγγειοσυστολή μετά από βλάβη του τοιχώματος ενός αιμοφόρου αγγείου [5])

1.4 : Οξειδωτικού Στρες σε Λευκοκύτταρα και τα Αιμοπετάλια

1.4.1 : Οξειδωτικό Στρες και Λευκοκύτταρα

1.4.1.1 : Γενικές πληροφορίες για το ρόλο των ελευθέρων ριζών στη λειτουργία των λευκοκυττάρων και τις αλληλεπιδράσεις αυτών

Στα κύτταρα γενικώς και επομένως και στα λευκοκύτταρα η βασική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών είναι τα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα οι διαρροές ηλεκτρονίων που παρατηρούνται φυσιολογικά κατά τις αντιδράσεις ατελούς απόδοσης της αναπνευστικής αλυσίδας. Φυσικά, ο ρυθμός παραγωγής ελευθέρων ριζών επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες, όπως γονίδια, εξωτερικά ερεθίσματα και την ηλικία κάθε κυττάρου. [6]

Άλλες πηγές ελευθέρων ριζών στα λευκοκύτταρα είναι διάφορες οξειδάσες, όπως για παράδειγμα η οξειδάση του NADPH στα μακροφάγα. Γενικότερα, τα περισσότερα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εκτελούν καθήκοντα φαγοκυττάρωσης ξένων παραγόντων και χρησιμοποιούν ενδογενή μονοπάτια παραγωγής ελευθέρων ριζών για να καταστρέψουν τους εισβολείς. [6]

Λόγω αυτού, αυτά τα κύτταρα διαθέτουν ενδογενείς μηχανισμούς αντιοξειδωτικών που τα προστατεύουν από την απειλή υπέρμετρων ζημιών που πιθανά να υποστούν από την οξείδωση μεμβρανών οργανιδίων τους ή ζωτικών πρωτεϊνών ή από την ενεργοποίηση αποπτωτικών γονιδίων. Σαφώς, πάντοτε πρέπει να διατηρείται μία ομοιοστατική ισορροπία. Για παράδειγμα, ένα μόριο που λειτουργεί και ως αντιοξειδωτικό, εναντίον του τραυματισμού από ελεύθερες ρίζες είναι το μονοξειδίο του αζώτου ($\text{NO}^\bullet$). Αν και ευεργετικό σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε σημεία φλεγμονής, όπου παρατηρείται μεγάλη παραγωγή ριζών υπεροξειδίου ($\text{O}_2^{\bullet-}$), μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή υπεροξυνιτρικής ρίζας (ONOO^-). Μέσα από αυτή τη διαδικασία, φαίνεται μάλιστα και η αλληλεπίδραση που μπορεί να έχουν οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου με αυτές του αζώτου, μετασχηματίζοντας μορφές ριζών σε άλλες επηρεάζοντας την ποικιλία και τις ιδιότητες των ελευθέρων σε μία φλεγμονώδη απόκριση του οργανισμού ενάντια σε ένα παθογόνο μικροοργανισμό για παράδειγμα. Αυτό δείχνει την πλαστική ποικιλία των αμυντικών όπλων του οργανισμού ενάντια σε πιθανούς εισβολείς, αλλά ταυτόχρονα αφήνει να φανεί και η πολυπλοκότητα των μηχανισμών του οργανισμού για να αντιμετωπίσει τις παρενέργειες των ισχυρών αυτών δραστικών μορίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τέτοιες αλληλεπιδράσεις περιορίζονται

εντός του φαγοσωμάτιου ενός φαγοκυττάρου για αυτονόητους λόγους προστασίας των γύρω ιστών από τις ελεύθερες ρίζες που παράγονται από το φαγοκύτταρο εναντίον του αντιγόνου. [6]

Οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν την παραγωγή κυτταροκινών και την ενεργοποίηση γονιδίων στα λευκοκύτταρα, οι οποίοι δύο παράγοντες αλληλεπιδρούν επηρεάζοντας τελικά το μέγεθος της ενεργοποίησης μίας φλεγμονώδους αντίδρασης και τη σειρά των ειδών των κυττάρων που θα επιστρατευτούν για τη διεκπεραίωσή της. [6]

Τα αντιοξειδωτικά λειτουργούν όπως τα ζεύγη συζυγών οξέων-βάσεων στα ρυθμιστικά διαλύματα. Μπορούν να διατηρούν σχετικά σταθερό το οξειδοαναγωγικό δυναμικό ενός λευκοκυττάρου, εντός κάποιων ορίων συγκέντρωσης των ελευθέρων ριζών που παράγονται δυναμικά και συνεχώς. Ο οργανισμός σαφέστατα και μπορεί να επηρεάσει την κατάσταση, όταν αυτή τείνει να ξεφύγει παράγοντας λίγα περισσότερα αντιοξειδωτικά, αλλά και αυτό έχει τα όριά του. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντική μία ισχυρά αλώβητη διατήρηση οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης των κυττάρων του οργανισμού και δει των λευκοκυττάρων που διαχειρίζονται καταστάσεις οξειδωτικού στρες για να επιτελέσουν επιτυχώς τις εκτελεστικές τους λειτουργίες. [6]

1.4.1.2 : Γενικά για μερικά ενδογενή αντιοξειδωτικά και τη σχέση τους με τα λευκοκύτταρα

Η γλουταθειόνη εντοπίζεται σε όλα τα κύτταρα κάθε θηλαστικού και συγκεκριμένα στο κυτταρόπλασμα, τον πυρήνα, τα μιτοχόνδρια και άλλα οργανίδια με διαφορετική όμως αντιοξειδωτική ισχύ. Τα χρησιμοποιημένα μόρια γλουταθειόνης κατατέμνονται από αποικοδομητικά ένζυμα και ως συνέπεια παράγονται μόρια κυστεΐνης στο εξωκυτταρικό περιβάλλον, τα οποία και αυτά λειτουργούν ως αντιοξειδωτικά μόρια τύπου θειολών / δισουλφιδίων. [6]

Η θειορεδοξίνη πέρα από αντιοξειδωτικό ρόλο έχει και το ρόλο χημειοκτακτικού παράγοντα για τα μονοκύτταρα, τα πολυμορφοπύρηνα και τα Τ-κύτταρα, όταν βρίσκεται στο εξωκυττάριο περιβάλλον. [6]

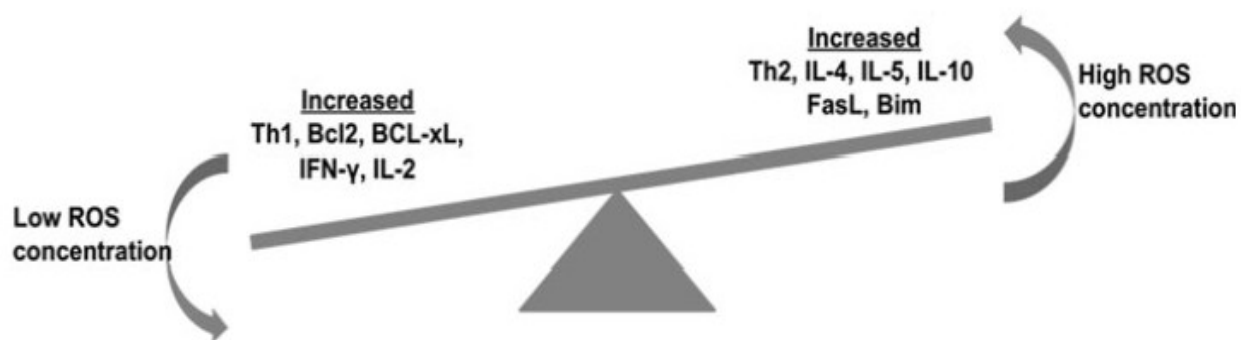
Η νεοπτερίνη αποτελεί ένα μόριο συμπαράγοντα πολλών μονοξυγενασών μονοκυττάρων μακροφάγων, παράγωγα μόρια της οποίας έχουν αντιοξειδωτικό ρόλο. Συμπληρωματικά, η νεοπτερίνη έχει βρεθεί ότι συνδράμει στο μονοπάτι παραγωγής των τοξικών ενώσεων χλωρίου που χρησιμοποιούν τα ουδετερόφιλα για να εξουδετερώσουν τους εχθρούς τους. [6]

1.4.1.3 : Ένα παράδειγμα για τη σημασία της διατήρησης της ισορροπίας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών σχετικά με το ανοσοποιητικό σύστημα

Ένα παράδειγμα, για το πόσο χρήσιμοι είναι οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί του σώματος για την επιτυχή διεξαγωγή μίας ανοσολογικής απόκρισης σε ένα αντιγόνο, είναι αυτό που θα αναλυθεί παρακάτω. Για να ενεργοποιηθεί ένα T-βοηθητικό κύτταρο σε μία ανοσολογική απόκριση, πρέπει να συνδεθεί με ένα αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο που έχει “συλλάβει” το αντιγόνο που έχει εισβάλει στον οργανισμό. Για την ενεργοποίηση αυτή, πέραν από την προσκόλληση των κυττάρων, απαιτείται και η έκκριση κυτταροκινών που θα ολοκληρώσει την επικοινωνία των δύο κυττάρων. Για να εκκριθούν αυτές οι κυτταροκίνες, απαιτείται η ύπαρξη μικροπεριβάλλοντος αναγωγικού δυναμικού στη σύναψη των κυττάρων. Αυτό επιτυγχάνεται με την παραγωγή και την έκκριση μορίων αντιοξειδωτικής κυστεΐνης από το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο στη σχισμή επικοινωνίας των δύο κυττάρων. Οι κυτταροκίνες που εκλύονται από το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο, τελικά, ενεργοποιούν το T-βοηθητικό κύτταρο και επάγουν μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής υπεροξειδίου του υδρογόνου που είναι απαραίτητο για την παραγωγή της κυτταροκίνης IL-2 (ιντελευκίνης 2) και την ενεργοποίηση άλλων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και γονιδίων, καθώς ένα ελαφριού οξειδωτικού δυναμικού ενδοπεριβάλλον χρειάζεται για τη διευκόλυνση της επιτυχούς ολοκλήρωσης της ενεργοποίησης του T-βοηθητικού λεμφοκυττάρου. Ωστόσο, παρατεταμένη παρουσία ενός οξειδωτικού περιβάλλοντος μπορεί να σημάνει απόπτωση για το T-κύτταρο. Συνεπώς, είναι πολύ σημαντική η διασφάλιση της παρουσίας ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών που θα εξισορροπούν την κατάσταση, όπως η ανηγμένη γλουταθειόνη. [6]

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η ροπή του οξειδοαναγωγικού δυναμικού εντός ενός T-βοηθητικού λεμφοκυττάρου συντελεί στην τελική ωρίμανσή του και διαφοροποίησή του σε Th-1 ή Th-2. Τα Th-1 είναι τα κλασικά βοηθητικά T-κύτταρα συνδεδεμένα με τη βασική οδό αντιμετώπισης ενός εισβολέα σε μία ανοσολογική απόκριση, ενώ τα Th-2 συνδέονται με καταστάσεις αλλεργίας. Έρευνες *in vitro* σε κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος έχουν δείξει ότι ενεργοποιημένα βοηθητικά T-κύτταρα που ωριμάζουν σε ένα σχετικά οξειδωτικό περιβάλλον τείνουν να διαφοροποιηθούν προς Th-1, ενώ εκείνα που ωριμάζουν σε ένα αναγωγικό περιβάλλον, το οποίο επιτυγχάνεται με τη χορήγηση περίσσειας αντιοξειδωτικών μορίων, εάν ολοκληρωθεί η ωρίμανσή τους, τείνουν να διαφοροποιηθούν προς Th-2. Η τελευταία παρατήρηση χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς υποδεικνύει το διττό λειτουργικό ρόλο του αντιοξειδωτικού οπλοστασίου του οργανισμού και πως όχι μόνο το οξειδωτικό στρες μπορεί να είναι επιζήμιο για τον οργανισμό, αλλά και

το “αντιοξειδωτικό στρες”. [6]



(**Εικόνα 1.19:** Η ρύθμιση της κλίσης της ανοσολογικής ισορροπίας μεταξύ των Th-1 και Th-2, από τις ενεργές μορφές οξυγόνου. Αυξημένες συγκεντρώσεις των ενεργών μορφών οξυγόνου μειώνουν τον αριθμό των Th-1 κυττάρων και αυξάνουν τον αριθμό των Th-2 κυττάρων. Παράλληλα, επηρεάζεται η έκφραση προαποπτωτικών (FasL, Bim) και αντιαποπτωτικών γονιδίων (Bcl2, BCL-xL) και η έκκριση διαφόρων κυτταροκινών (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN-γ). [7])

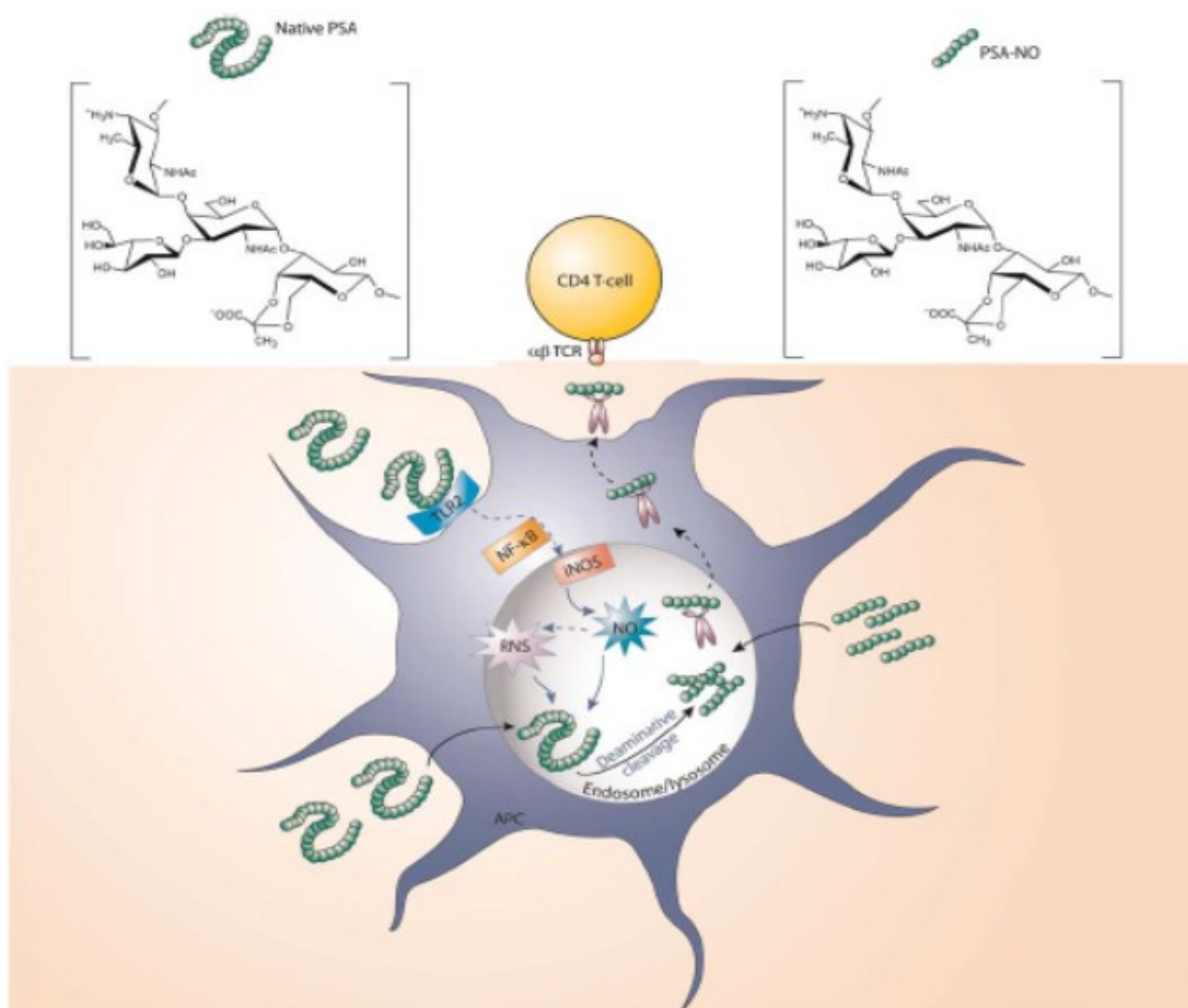
1.4.1.4 : Λειτουργίες μακροφάγων και ελεύθερες ρίζες

Οι πρωτεΐνες και οι πολυσακχαρίτες των βακτηρίων ενεργοποιούν μονοπάτια παραγωγής ενεργών μορφών αζώτου, όταν έρθουν σε επαφή με υποδοχείς κυττάρων της άμυνας του ανθρώπινου οργανισμού. Στην ουσία, τα βακτήρια εισβολείς λειτουργούν ως το εναρκτήριο ερέθισμα των κυττάρων της άμυνας. Αυτές οι ενεργές μορφές αζώτου επάγουν και τη σύνθεση κυτταροκινών που είναι υπεύθυνες για την τελική υποθαλαμική εντολή του πυρετού. Κάποιες φορές, υπερβολικό και μη-καλά-ελεγχόμενο οξειδωτικό στρες στους ιστούς οδηγεί σε υπέρμετρη ενεργοποίηση αρκετών μακροφάγων με αποτέλεσμα να καταστρέφουν “τυφλωμένα” από την πολλή διέγερση και υγιείς ιστούς, αντί να επιτεθούν μόνο στο μικροοργανισμό. Και η καταστροφή αυτή κάνει ακόμα περισσότερες ρίζες να βγαίνουν από τα κατεστραμμένα κύτταρα, τα οποία αδυνατούν να διατηρήσουν την ομοιότητα του φυσικού τους οξειδωτικού στρες σε φυσιολογικά επίπεδα και να προστατευθούν από τις ρίζες των μιτοχονδρίων τους. Για αυτό και όταν δίνονται ουσίες που εξουδετερώνουν άμεσα ελεύθερες ρίζες στο διάβα τους μαζί με λιποπολυσακχαρίτες από μικροοργανισμούς σε ποντίκια, παρατηρείται μείωση του αναμενόμενου πυρετού. [8]

Ακόμη, τα μακροφάγα, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα και άλλες υποκατηγορίες τους χρησιμοποιούν ελεύθερες ρίζες, όχι μόνο ως μεσολαβητές μηνυμάτων για την παραγωγή κυτταροκινών σχετικές με τον πυρετό και τη διακυτταρική επικοινωνία, αλλά και για να διασπάσουν τα ξένα βακτηριακά κύτταρα που φαγοκυτταρώνουν, εκκρίνοντας

παράλληλα αντιμικροβιακές ουσίες που σχετίζονται με ελεύθερες ρίζες. [9]

Οι ελεύθερες ρίζες σε συνδυασμό με τις ουσίες που εκκρίνονται από τα μακροφάγα και άλλα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα, στα διάφορα σημεία της φλεγμονής, και τις μεταβολές στα ηλεκτροχημικά δυναμικά οξειδοαναγωγής του άμεσου σε επαφή με τα T-κύτταρα κυτταρικού περιβάλλοντος, οδηγούν στη διέγερση και ενεργοποίηση των υποδοχέων των μεμβρανών των T-κυττάρων, με αποτέλεσμα την παραγωγή δευτέρων μηνυμάτων που μέσω μονοπατιών κινάσων, επηρεάζουν την ενεργοποίηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων που επηρεάζουν την παραγωγή ουσιών, το επίπεδο λειτουργίας των μιτοχονδρίων (και άρα και της ενδογενούς παραγωγής ελευθέρων ριζών) και γενικότερα άλλων κυτταρικών λειτουργιών που παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση, τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων. [8]



(**Εικόνα 1.20:** Φαγοκυττάρωση ενός πολυσακχαρίτη του τοιχώματος ενός βακτηριακού κυττάρου από ένα δενδριτικό κύτταρο (είδος μακροφάγου) και την παρουσίαση θραύσματος του πολυσακχαρίτη στη μεμβράνη του για την ενεργοποίηση ενός T-βοηθητικού κυττάρου [9])

1.4.1.5 : T-λεμφοκύτταρα και οξειδωτικό στρες

Διαφοροποίηση των T-κυττάρων και της λειτουργίας τους ανάλογα το οξειδωτικό πρσνές

Διαφοροποιήσεις στην ένταση του εξωγενούς και ενδογενούς οξειδωτικού στρες επηρεάζει τα T-κύτταρα κάνοντάς τα να διεγείρονται και να πολλαπλασιάζονται. Μάλιστα, ανάλογα το μέγεθος του ερεθίσματος από τις ελεύθερες ρίζες, δημιουργείται διαφορετικό δυναμικό στις μεμβράνες τους που συντελεί στην εκκίνηση διαφορετικών μονοπατιών έκκρισης ποικίλων κυτταροκινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, η αυτοκρινής και η παρακρινής δράση των κυτταροκινών να έχει μία συνισταμένη επίδραση στα T-κύτταρα, τα οποία τελικά διαφοροποιούνται σε περαιτέρω κυτταρικές σειρές, μέσω ειδικών ενδοκυτταρικών μονοπατιών. Έτσι, καταλήγουν να γίνουν ενεργά κύτταρα ειδοποιητές εισβολέων (Th1) ή κύτταρα μνήμης ή βοηθητικά κύτταρα τύπου 2 (Th2) ή αν ενεργοποιηθούν πολύ να πεθάνουν. Τα T-κύτταρα οδεύουν προς το θάνατό τους είτε “αυτοκτονώντας” με απόπτωση είτε με νέκρωση, αν το οξειδωτικό τους στρες φτάσει σε κρίσιμα επίπεδα. [7]

Επιπροσθέτως, όσο πιο αυξημένη και παρατεταμένη είναι η οξειδωαναγωγική επίδραση του περιβάλλοντος, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ενεργοποίηση του T-κυττάρου. Αν παρατηρηθεί χαμηλή ενεργοποίηση σε συνδυασμό με συγκεκριμένο συνδυασμό κυτταροκινών, τότε ένα T-κύτταρο μπορεί να παραμείνει ανενεργό, λόγω χαμηλού δυναμικού. Ωστόσο, υπάρχει και η δυνατότητα, στην περίπτωση που παρατηρείται μία ήπια οξειδωτική διέγερση στο T-κύτταρο και ο συνδυασμός κυτταροκινών είναι κατάλληλος, να διαφοροποιηθεί σε T-κύτταρο μνήμης. Τα κύτταρα μνήμης για να αντέξουν στο χρόνο έχουν αυξημένες συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικών, τα οποία τα συνθέτουν τα ίδια. Τα πλήρως ενεργοποιημένα T-κύτταρα και δεν έχουν πολλά αντιοξειδωτικά, γιατί λόγω της πλήρους ενεργοποίησής τους έχουν αυξημένο οξειδωτικό στρες που ως κατάσταση, επιτάσσει τα αντιοξειδωτικά τους να καταναλώνονται. [7]

Τα κύτταρα μνήμης διατηρούνται σε κατάσταση “οξειδωτικής νάρκης” (λόγω των υψηλών αντιοξειδωτικών τους) και αν υπάρξει δεύτερη έκθεση σε αντιγόνο, επειδή έχουν κρατήσει την αρχική τους διέγερση σε μία “χρονικά παγωμένη” κατάσταση, μόλις δεχθούν το ερέθισμα, δε χρειάζονται να ξαναξεκινήσουν όλο το μονοπάτι της ενεργοποίησής τους από την αρχή, για να ξαναφτάσουν σε προδιεγερμένη κατάσταση, αλλά είναι σε ετοιμότητα και μόλις η περίπτωση το απαιτεί, ολοκληρώνουν την ωρίμανσή τους προς ενεργοποιημένα T-κύτταρα. Μετά την επιτέλεση του έργου τους, πεθαίνουν με απόπτωση ή τα σκοτώνει ο ίδιος ο οργανισμός, ως μη χρήσιμα, ναρκώνοντάς τα με ουσίες που εκκρίνονται από τα ρυθμιστικά T-κύτταρα και αφήνοντας τα μακροφάγα στη συνέχεια να ολοκληρώσουν τη

διαδικασία, μέσω της φαγοκυττάρωσης. Ο οργανισμός, φυσικά, δεν είναι αδαής, μα σοφός και φροντίζει να φτιάχνει “φρέσκα” κύτταρα στη δεύτερη έκθεση σε ένα αντιγόνο στο παρασκήνιο, σε παράλληλο χρόνο με την ανάλωση των παλιών T-κυττάρων, για να είναι έτοιμος την επόμενη φορά. [7]

Διαφορετική συγκέντρωση, ένταση και ποιότητα ελευθέρων ριζών αναγκάζει τα T-κύτταρα να παράγουν διαφορετικό πλήθος, διαφορετική ποιότητα και διαφορετικής ισχύος κυτταροκίνες. Τα ενεργοποιημένα T-κύτταρα είναι ευαισθητοποιημένα στο οξειδωτικό στρες, όπως προαναφέρθηκε και αυτό τα καθιστά να είναι μεν αποτελεσματικά στα καθήκοντά τους (καθώς στην διεγερμένη τους μορφή παράγουν αρκετές χρήσιμες ουσίες και είναι μεταβολικά πιο ενεργά), αλλά έτσι είναι και πιο εύκολο να πεθάνουν κατά τη διεκπεραίωση των εργασιών τους. Αυτό συμβαίνει, γιατί χάριν του να είναι ικανά να αντιμετωπίσουν τους εισβολείς, π.χ. τους παθογόνους μικροοργανισμούς, αποδυναμώνουν την άμυνά τους, εξαντλώντας τα προστατευτικά αντιοξειδωτικά τους αποθέματά καθιστώντας τα πιο επιρρεπή σε βλάβες. Εν αντιθέσει, τα κύτταρα μνήμης που δεν είναι χρήσιμα στον οργανισμό άμεσα, τον συμφέρει να τα αφήνει σε μία νύθρα κατάσταση, εμπλουτίζοντάς τα με αντιοξειδωτικά για να τα προφυλάσσει από την ενεργοποίηση αλλά και τη φθορά, μέχρι να έρθει η κατάλληλη ώρα (και όντως τα κύτταρα μνήμης έχουν πολλά αντιοξειδωτικά και μάλιστα πιο πολλά από όταν ήταν αδιαφοροποίητα T-κύτταρα). [7]

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι, ανά λειτουργική ομάδα T-κυττάρων, υπάρχουν πάμπολλες υποκατηγορίες με διαφοροποιημένους υποδοχείς αναγνώρισης αντιγόνων. Αυτό είναι κάτι που οφείλεται στο ότι ο οργανισμός παράγει T-κύτταρα με τυχαίο συνδυασμό και είδος υποδοχέων για να έχει αυξημένες πιθανότητες να πετύχει να είναι συμπληρωματικά με το τυχαίο αντιγόνο που θα εισέλθει ανά πάσα στιγμή στο σώμα. [7]

Σε κοντινής εμβέλειας περιβάλλοντα χώρο με πολύ αυξημένη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών, εντοπίζονται πιθανότατα πολλά ενεργοποιημένα και “επιθετικά” T-κύτταρα, εργαλείο χρήσιμο για την αντιμετώπιση καταστάσεων όπως ο καρκίνος ή μάλλον καλύτερα τοπικών τυχαίων μικρών καθημερινών νεοπλασιών, κατάσταση στην οποία είναι απαραίτητο να παρευρίσκεται επαρκής αριθμός ενεργοποιημένων T-κυττάρων στην περιοχή για να βοηθήσουν στην καταστροφή των επικίνδυνων αυτών κυττάρων. Βέβαια, δεν είναι T-κύτταρα που είναι τόσο διεγερμένα, όσο τα T-κύτταρα σε μία περιοχή που παρατηρείται εισβολή παθογόνου και όπου υπάρχει έντονη δραστηριότητα ενεργοποίησης και διεργασιών λευκοκυτταρικών σειρών για την άμεση και ραγδαία προστασία του οργανισμού. [7]

Αρκετές φορές, τελικός στόχος των ελεύθερων ριζών είναι η επαγωγή γονιδίων και των μεταφραστικών παραγόντων τους, οι οποίοι ελέγχουν την ένταση της έκφρασης των γονιδίων για την παραγωγή ουσιών και αντιοξειδωτικών, τα οποία θα καθορίσουν την τελική μοίρα του κυττάρου. Επιπλέον, στα κύτταρα που έχουν ενεργοποιηθεί με ακόμη πιο μεγάλη διέγερση (που είναι προορισμένα να αποσταλούν για άμεση και πλήρη ωρίμανση προς ολοκληρωτική καταπολέμηση ενός μολυσματικού παράγοντα), επάγονται γονίδια που αυξάνουν τον ρυθμό λειτουργίας και τη δραστηριότητα των μιτοχονδρίων τους, για ακόμα μεγαλύτερη αύξηση των επιπέδων του οξειδωτικού τους στρες. Γονίδια και μεταφραστικοί παράγοντες ελέγχουν τη βιοενεργητική σταθερότητα και το οξειδωναγωγικό δυναμικό ενεργοποίησης των T-κυττάρων. [7]

Τα ρυθμιστικά T-κύτταρα έχουν την πιο πολύ αντιοξειδωτική χωρητικότητα όλων των T-κυτταρικών σειρών, καθώς έχουν και πολλά επιφανειομεμβρανικά θειολικά αντιοξειδωτικά και πολλά ενδογενή, γεγονός που δείχνει ότι ο οργανισμός να μην ενισχύει όσο μπορεί την ενεργοποίηση των επιτόπου δυνητικά επιθετικών T-κυττάρων, αλλά ενισχύει ακόμα περισσότερο την ανθεκτικότητα και την επιβίωση των καταστολέων τους, ώστε να μη βγει τίποτε εκτός ελέγχου. [7]

Μηχανισμοί ρύθμισης μεταγραφικών παραγόντων που σχετίζονται με τη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και τη λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων

Ο NF-κB (nuclear factor κB) (πυρηνικός παράγοντας κB) είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται σε διαδικασίες ενδογενούς παραγωγής ελευθέρων ριζών εντός του T-κυττάρου, επηρεάζοντας έτσι μονοπάτια κυτταρικής απόπτωσης και παράλληλα την παραγωγή διαφόρων κυτταροκινών. Έχει δειχθεί ότι αυξημένη ενεργότητα του παράγοντα αυτού συντελεί στην αυξημένη απόπτωση των T-κυττάρων και το αντίστροφο. [7]

Η p53 είναι ίσως μία από τις πιο σημαντικές ογκοπροστατευτικές πρωτεΐνες του κυττάρου. Έχει τη δυνατότητα να περιορίζει τη ζημιά που προκαλείται στο DNA από την υπέρμετρη παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ο τρόπος με τους οποίους καταφέρει να επιτύχει την παραπάνω λειτουργία είναι δύο και θα παρατεθούν παρακάτω. Η p53 ενεργοποιείται έντονα σε περιπτώσεις που εντοπίζονται αυξημένες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών στο T-κύτταρο και μπορεί είτε να ενισχύσει την έκφραση “αντιοξειδωτικών” γονιδίων, όπως εκείνων που είναι απαραίτητα για την παραγωγή της GPX, είτε σε προχωρημένες καταστάσεις να μεγεθύνει την ισχύ βιοχημικών μηνυμάτων που σχετίζονται με την

απόπτωση του T-κυττάρου, ώστε να μη διαιωνισθεί ή όποια τυχόν βλάβη συμβεί ανακάμπτοντας έτσι τον πολλαπλασιασμό ενός επίφοβου T-κυττάρου οδηγώντας το στον κυτταρικό θάνατο. Ακόμη, έχει βρεθεί ότι η p53 μπορεί να ενισχύσει την παραγωγή της μιτοχονδριακής δισμουτάσης του υπεροξειδίου, με αποτέλεσμα να επηρεάζει μέσω της ρύθμισης των επιπέδων ελευθέρων ριζών και τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων. [7]

Αξίζει να αναφερθεί ότι ενώ έχουν ερευνηθεί πολύ οι μηχανισμοί και ο ρόλος των ελευθέρων ριζών, όπως αυτές χρησιμοποιούνται από τα φαγοκύτταρα στο ανθρώπινο οργανισμό, δεν υπάρχουν πολλά δεδομένα για το πώς οι ελεύθερες ρίζες χρησιμοποιούνται και ρυθμίζουν τα B- και T- κύτταρα. [7]

Ο πικρυνωτός μεταγραφικός παράγοντας τάξης O (forkhead transcription factor of class O) είναι ένας ακόμη μεταγραφικός παράγοντας που η ενεργοποίησή του ενισχύει την έκφραση γονιδίων που επάγουν την παραγωγή δισμουτάσης του υπεροξειδίου και καταλάσης στα T-κύτταρα, με αποτέλεσμα να αξιοποιείται έμμεσα στην αύξηση της αντοχής των T-κυττάρων σε ελεύθερες ρίζες και στην αναστολή της κατάληξής τους σε διαδικασίες κυτταρικού θανάτου. Μάλιστα, έχει βρεθεί ότι αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας παρατηρείται πιο έντονα ενεργοποιημένος στα T-κύτταρα μνήμης και στα ρυθμιστικά T-κύτταρα σε σχέση με τα ενεργοποιημένα T-βοηθητικά και τα T-κυτταροτοξικά, δεδομένο που υποδεικνύει την επιλεκτική στρατηγική του οργανισμού να προσδίδει μεγαλύτερο πλεονέκτημα επιβίωσης στους μηχανισμούς άμυνας και καταστολής του ανοσοποιητικού συστήματος παρά στους εκτελεστικούς, σε βάθος χρόνου. [7]

Ο Nrf2 (Nuclear factor erythroid-2-related factor 2) είναι ένας άλλος μεταγραφικός παράγοντας που επηρεάζει τη μετάφραση πολλών αντιοξειδωτικών ενζύμων στο T-κύτταρο. Αν και δεν έχει την ισχύ των προηγούμενων μεταγραφικών παραγόντων που αναφέρθηκαν, το εύρος της δράσης του τον καθιστά σημαντικό ρυθμιστή της έναρξης της φλεγμονώδους απόκρισης και της παραγωγής διαφόρων προφλεγμονωδών κυτταροκινών και ενζύμων. Για παράδειγμα, έχει δείχθει ότι δενδριτικά κύτταρα (είδος εγκατεστημένων μονοκυττάρων σε κοιλότητες του σώματος) που εμφανίζουν δυσλειτουργία στην έκφρασή του, είναι πιο επιρρεπή στο οξειδωτικό στρες, με συνέπεια να ενισχύονται διαδικασίες που σχετίζονται με την υπερενεργοποίηση των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος από διάφορους ξένους παράγοντες, γεγονός που οδηγεί σε παρέκκλιση της ανοσολογικής απόκρισης προς καταστάσεις αλλεργικών αντιδράσεων. Επιπλέον, έχει φανεί ότι η μείωση της δραστηριότητας και της ενεργοποίησής του συντελεί στη μειωμένη ικανότητα ενεργοποίησης των βοηθητικών T-κυττάρων κατά το γήρας. [7]

Κινάσες που σχετίζονται με τη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και τη λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων

Η JNK (c-Jun N-terminal kinase) είναι μία κινάση της οποίας η φωσφορυλίωση ενεργοποιείται από την παρουσία ενεργών μορφών οξυγόνου και αζώτου και είναι υπεύθυνη για να κατευθύνει τα κύτταρα σε απόπτωση, προστατεύοντας τον οργανισμό από τη διαιώνιση πιθανών βλαβών στο DNA, “σκοτώνοντας” τα κύτταρα πριν αυτά προλάβουν να πολλαπλασιαστούν. Έχει παρατηρηθεί ότι παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση και ιδίως στη διαφοροποίηση των T-κυττάρων, καθώς βάσει πειραματικών δεδομένων, αν εμποδιστεί η δράση της δεν παρατηρείται η επιτυχής ολοκλήρωση των προαναφερθέντων διαδικασιών. [7]

Παρόμοια με την JNK, λειτουργεί και η ERK (Extracellular signal-regulated kinase), η οποία αποτελεί μία κινάση που παίζει σημαντικό ρόλο και αυτή στην ενεργοποίηση και τη διαφοροποίηση των T-κυττάρων κατά την ανοσολογική απόκριση και η δράση της οποίας επάγεται από οξειδωτικά μόρια, όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου. [7]

Η MAPK αποτελεί ακόμη μία κινάση που παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του προσδόκιμου επιβίωσης των T-κυττάρων. Μπορεί να ενεργοποιηθεί από διάφορα ερεθίσματα κυτταρικού τραυματισμού (π.χ. βλάβη στο DNA), οξειδωτικό στρες ή κυτταροκίνες. Η ενεργοποίησή της οδηγεί το κύτταρο σε απόπτωση, μέσω αυξημένης παραγωγής οξειδωτικών μορίων που τελικά το καταστρέφουν. Ακόμη, η MAPK είναι απαραίτητη για την παραγωγή ιντερλευκίνης-γ (βασική ουσία επαγωγέας παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μακροφάγα) από τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα. [7]

Ενδογενείς και εξωγενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί που σχετίζονται με τη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες και τη λειτουργίας των T-λεμφοκυττάρων

Ο οργανισμός για να διατηρεί την εύρυθμη λειτουργία της οξειδοαναγωγικής του ομοιόστασης διαθέτει μία πληθώρα αντιοξειδωτικών μορίων με ποικίλες λειτουργίες που προστατεύουν τα κύτταρά του από τις συνέπειες του οξειδωτικού στρες μέσω της λεπτής ρύθμισης των επιπέδων ελευθέρων ριζών στο κύτταρο, με τέτοιο τρόπο, ώστε να διατηρείται η ισορροπία μεταξύ επαγωγής των ωφέλιμων κυτταρικών διαδικασιών και μηνυμάτων και των διαβρωτικών αυτοκαταταστροφικών επιδράσεων αυτών των τόσο ενεργών οξειδωτικών μορίων. [7]

Η SOD (δισμουτάση του υπεροξειδίου) είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο που ο κύριός του ρόλος είναι να προστατεύει τα συστατικά των μιτοχονδρίων και τις μεμβράνες τους από τις ρίζες ανιόντων υπεροξειδίου που παράγονται φυσιολογικά κατά τη διαδικασία της αναπνευστικής αλυσίδας σε μικρό ποσοστό. Η ικανότητά της SOD να μετατρέπει τις πολύ δραστικές αυτές ρίζες στο λιγότερο δραστικό υπεροξείδιο του υδρογόνου συμβάλλει όχι μόνο στην προστασία και την ακεραιότητα της λειτουργίας των μιτοχονδρίων και συνάμα του κυττάρου, αλλά και στη ρύθμιση της ανθεκτικότητας ενός κυττάρου στον κυτταρικό θάνατο. Όσον αφορά συγκεκριμένα τα T-κύτταρα, η SOD διαφυλάσσει την εύρυθμη λειτουργία τους ως προστάτες του οργανισμού προστατεύοντάς τα από βλάβες που μπορεί να τους προκαλέσουν τέτοιου είδους ρίζες, αφού βάσει πειραματικών δεδομένων T-κύτταρα με δυσλειτουργική SOD αδυνατούν να διεκπεραιώσουν με επιτυχία τις ανοσολογικές τους δράσεις. [7]

Η GPX (υπεροξειδάση της γλουταθειόνης) είναι και αυτή ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο του οποίου η αντιοξειδωτική ικανότητα έγκειται στη δυνατότητά του να εξουδετερώνει μόρια παραγόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου και έτσι να προστατεύει τα κύτταρα από τις πιθανές οξειδωτικές βλάβες που μπορεί να τους προκληθούν από αυτό. Σχετικά με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού, η GPX χρήζει υψίστης σημασίας, καθώς πέραν του ότι προστατεύει τα κύτταρα αυτά από το υπεροξείδιο του υδρογόνου που εντοπίζεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα φαγοκύτταρα για παράδειγμα, παίζει και σημαντικό ρόλο και στη ρύθμιση της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων. Το τελευταίο στηρίζεται στο γεγονός ότι το υπεροξείδιο του υδρογόνου όπως και άλλα οξειδωτικά μόρια μπορούν να κινητοποιήσουν μονοπάτια ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού των T-κυττάρων, όταν η συγκέντρωσή τους φτάσει σε συγκεκριμένα επίπεδα, αλλά και να τα καταστρέφουν, όταν αυτή η συγκέντρωση αυξηθεί υπέρμετρα. Επομένως, η GPX

λειτουργεί πέρα από προστάτης και ως ρυθμιστής της λειτουργίας των T-κυττάρων. [7]

Βέβαια ο οργανισμός εκτός από τη GPX κατέχει και ένα άλλο ακόμη πιο δραστικό ένζυμο στο οπλοστάσιό του για να προστατεύει τα κύτταρα του ανοσοποιητικού από την επικίνδυνων επιπέδων παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αυτό το ένζυμο είναι η καταλάση και εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα. [7]

Αντιστρόφως, αλλά με παρόμοιας φύσης τρόπο, ένα άλλο ένζυμο η NOX (οξειδάση του NADPH) ρυθμίζει τη λειτουργία των T-κυττάρων μέσω της παραγωγής ελευθέρων ριζών. Έχει φανεί ότι T-κύτταρα που εμφανίζουν αναστολή σε αυτό το ένζυμο αδυνατούν να ενεργοποιηθούν επαρκώς από τις απαραίτητες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών που απαιτούνται ως έναυσμα για να αρχίσει η ανοσολογική απόκριση. [7]

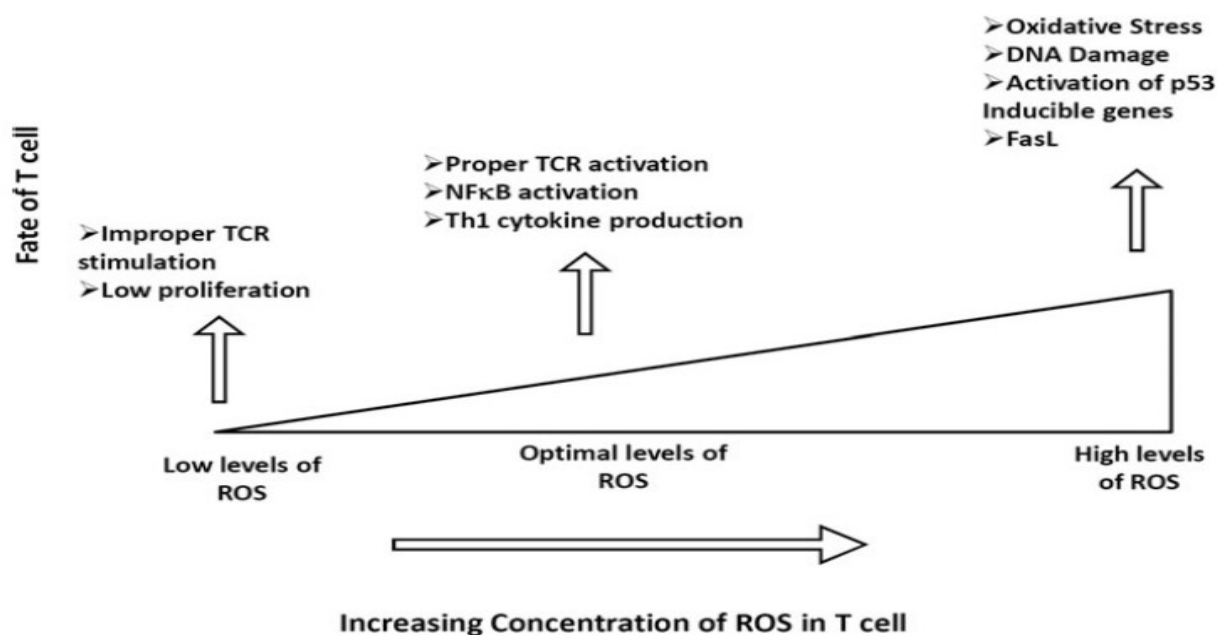
Η γλουταθειόνη, μία θειόλη που χρησιμοποιεί ο οργανισμός ως αντιοξειδωτικό μόριο φαίνεται να διαδραματίζει επίσης σημαντικό ρόλο στην αντιοξειδωτική ρύθμιση των ομοιοστατικών μηχανισμών της άμυνας. Έχει παρατηρηθεί ότι ερεθίσματα που ενεργοποιούν αποπτωτικά κυτταρικά μονοπάτια, οδηγούν σε μείωση της ενδογενούς συγκέντρωσης γλουταθειόνης στα κύτταρα, με τελικό αποτέλεσμα τη μειωμένη αντιρρόπηση των ποσοτήτων των ελευθέρων ριζών και τελικά το θάνατο του κυττάρου. Επομένως, σε μία σειρά κυττάρων όπως τα T-κύτταρα που η ενεργοποίηση των λειτουργιών τους σχετίζεται άμεσα με την ευαισθησία τους στις ελεύθερες ρίζες, η λεπτή ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού τους δυναμικού από την γλουταθειόνη αποτελεί πολύ σημαντικό παράγοντα για τη διασφάλιση της ομαλής τους λειτουργίας, αλλά και της προστασίας τους. Άλλωστε, κατά το γήρας ή σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπως στο διαβήτη τύπου II που παρατηρείται μειωμένη συχνότητα παραγωγής γλουταθειόνης, παρατηρείται και αυξημένη ευαισθησία των κυττάρων του ανοσοποιητικού στη δραστικότητα των ελευθέρων ριζών. Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι οι σειρές των κυττάρων του ανοσοποιητικού που προορίζονται για να διαρκέσουν για μεγάλα χρονικά διαστήματα, όπως τα κύτταρα μνήμης, εμφανίζουν αυξημένες συγκεντρώσεις γλουταθειόνης σε σύγκριση με άλλα συγγενικά κύτταρα, όπως τα κυτταροτοξικά T-κύτταρα που προορίζονται για βραχυπρόθεσμων φάσεων χρήσεις. [7]

Με παρεμφερή λογική με τη γλουταθειόνη λειτουργεί και η Trx (θειορεδοξίνη) που είναι μία πρωτεΐνη που χρησιμοποιεί κυστεΐνη για να εξουδετερώσει μόρια υπεροξειδίου του υδρογόνου. Όπως και η γλουταθειόνη, έτσι και η Trx φαίνεται να επηρεάζει το βαθμό αντοχής και ανοχής των λευκοκυττάρων στο οξειδωτικό stress και άρα ρυθμίζει την τάση ενεργοποίησης και πολλαπλασιασμού τους σε καταστάσεις φλεγμονής. [7]

Όλες αυτές οι αντιοξειδωτικές ουσίες του οργανισμού, αν και υπάρχουν μηχανισμοί που τις “ανακυκλώνουν”, πολλές φορές δεν φτάνουν από μόνες τους ή χρειάζονται βοήθεια και παράλληλη ενίσχυση από εξωγενή αντιοξειδωτικά που μπορούν να προσληφθούν μέσω της διατροφής, όπως κάποιες βιταμίνες που θα αναλυθούν παρακάτω. Οι βιταμίνες όχι μόνο μπορούν να διατηρήσουν μία εύρυθμη ανοσολογική λειτουργία, αλλά και να την ενδυναμώσουν σημαντικά. Για παράδειγμα, τα β-καροτένια, πρόδρομα μόρια της βιταμίνης A, έχουν τη δυνατότητα να ενισχύσουν την παραγωγή ιντερλευκίνης-2 και ιντερφερόνης-γ. Οι βιταμίνες A και D βοηθούν στο χημειοτακτισμό λευκοκυττάρων στο έντερο και το δέρμα αντίστοιχα. Αυτή η δράση επιτυγχάνεται μέσω επαγόμενης παραγωγής υποδοχέων στα δενδριτικά κύτταρα που εδράζονται στους προαναφερθέντες ιστούς, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί με αντίστοιχους άλλων λευκοκυττάρων έλκωντάς τα στην περιοχή σε καταστάσεις φλεγμονής. Ακόμη, η έλλειψη βιταμίνης D έχει συνδεθεί με μείωση του πληθυσμού των ρυθμιστικών T-κυττάρων υποδηλώνοντας πιθανή σύνδεση της μακροχρόνιας έλλειψης με αυτοάνοσες καταστάσεις. Επιπλέον, η βιταμίνη C, ή αλλιώς και ασκορβικό οξύ, συσχετίζεται με αυξημένη παραγωγή κυτταροκινών και διαφοροποίηση των T-κυττάρων σε Th1. Επιπροσθέτως, η βιταμίνη E φαίνεται να ενισχύει την παραγωγή ιντερλευκίνης-2 και τον πολλαπλασιασμό των διεγερμένων λεμφοκυττάρων, ενώ παράλληλα προστατεύει τις μεμβράνες των λευκοκυττάρων από την πιθανή οξειδωσή τους από ελεύθερες ρίζες. [7]

1.4.1.6 : Η σημασία την διατήρησης της οξειδοαναγωγικής ισορροπίας του ανοσοποιητικού συστήματος

Σημαντικό είναι να κρατηθεί μία ισορροπία μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μορίων ενός λευκοκυττάρου. Συγκεκριμένα για τα T-λεμφοκύτταρα, για παράδειγμα, υπό φυσιολογικές συνθήκες ενεργοποίησής τους εμπεριέχουν χαμηλές προς μέτριες συγκεντρώσεις ελευθέρων ριζών. Στην περίπτωση που παρατηρηθεί μεγάλη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών, λόγω εξωτερικών παραγόντων (ρύποι, ακτινοβολία, κ.ά.) ή εσωτερικών (π.χ. εκτεταμένες αντιδράσεις φλεγμονής), προάγονται μηχανισμοί που συντελούν σε υπερενεργοποίηση του κυττάρου ή και ακόμα σε απόπτωση ή και νέκρωση σε ακραίες καταστάσεις. Από την άλλη, αν η συγκέντρωση των ελευθέρων ριζών είναι πάρα πολύ μικρή, τότε δε θα υπάρχει αρκετό οξειδωτικό δυναμικό ενεργοποίησής τους, όταν είναι αναγκαίο. Για αυτό το λόγο και έχει προνοηθεί η ύπαρξη όλων αυτών των ρυθμιστικών μηχανισμών που αναφέρθηκαν πιο πριν, ώστε να ρυθμίζεται πολύ λεπτά η ισορροπία συγκέντρωσης του δίκτοπου ρόλου των δραστικότητας μορίων των ελευθέρων ριζών στα λεμφοκύτταρα και τα λευκοκύτταρα γενικότερα. [7]



(**Εικόνα 1.21:** Συγκεντρωτική σχηματική αναπαράσταση του τρόπου με τον οποίο το μέγεθος της συγκέντρωσης των ελευθέρων μορφών οξυγόνου επηρεάζει τις λειτουργίες των T-λεμφοκυττάρων [7])

1.4.2 : Οξειδωτικό Στρες και Αιμοπετάλια

Όπως για με τα λευκοκύτταρα, έτσι για με τα αιμοπετάλια η ένταση του οξειδωτικού στρες που επικρατεί στο εξωκυττάριο αλλά και στο ενδοκυττάριο περιβάλλον τους, διαδραματίζει το σημαντικό ρόλο ενός “ενισχυτή” των λειτουργιών τους. Άλλωστε, σε καταστάσεις τραυματισμού ή φλεγμονής, δηλαδή καταστάσεων που επάγουν διαδικασίες οξειδωτικού περιβάλλοντος, όπως και σε νόσους σαν τα καρδιαγγειακά, ο διαβήτης, η παχυσαρκία και η υπέρταση, έχει παρατηρηθεί αυξημένη τάση συγκόλλησης και ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, καθώς και η έντονη αλληλεπίδρασή τους με τα κύτταρα του αγγειακού επιθηλίου και τα λευκοκύτταρα. [10]

Αναφέρθηκε πιο πριν ότι τα αιμοπετάλια είναι επιρρεπή τόσο σε οξειδωτικό στρες του εξωτερικού τους περιβάλλοντος, όσο και σε οξειδωτικό στρες του εσωτερικού τους περιβάλλοντος. Το οξειδωτικό στρες του εξωτερικού τους περιβάλλοντος επάγεται κυρίως από διαδικασίες φλεγμονής υπό φυσιολογικές συνθήκες και μεταλλαξογόνους παράγοντες, όπως η υπεριώδης ακτινοβολία [10]. Ωστόσο, το εσωτερικό τους οξειδωτικό στρες δημιουργείται από τα ίδια τα αιμοπετάλια και συγκεκριμένα μέσω διαρροών της αναπνευστικής τους αλυσίδας στα μιτοχόνδριά τους και μέσω ενζύμων, όπως είναι η οξειδάση της ξανθίνης [11] και η οξειδάση του NADPH που αποτελεί βασικό παραγωγό οξειδωτικών μορίων για τα αιμοπετάλια και ειδικά ριζών υπεροξειδίου (O_2^-) [10]. Τέτοιου τύπου διεργασίες πυροδοτούνται από ερεθίσματα του εξωτερικού περιβάλλοντος των αιμοπεταλίων, όπως ουσίες φλεγμονής, αλληλεπιδράσεις τους με άλλα κύτταρα (π.χ. λευκοκύτταρα) και ουσίες (π.χ. οξειδωμένα κυκλοφορούντα μόρια, όπως οξειδωμένες λιποπρωτεΐνες) και διάφορα άλλα μόρια μεσολαβητές, τα οποία με πρόσδεσή τους σε κατάλληλα διαμορφωμένους ειδικούς υποδοχείς στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων μπορούν να ξεκινήσουν έναν καταρράκτη δεύτερων μηνυμάτων που πολλαπλασιάζουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια και από τα ενζυμικά συστήματα παραγωγής ελευθέρων ριζών, με τελικό αποτέλεσμα την ταχεία και έντονη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων προς σχηματισμό θρόμβου. Μάλιστα, τα μόρια που ενεργούν στους ειδικούς υποδοχείς των αιμοπεταλίων ενεργοποιώντας τα, αναφέρονται και ως αγωνιστές της θρομβίνης, γιατί διατελούν παρόμοια λειτουργία με αυτήν. Επιστρέφοντας στο εσωτερικό περιβάλλον των αιμοπεταλίων, αξίζει να αναφερθεί ότι τα υποστηρικτικά προϊόντα διατηρητές αυτής της ενδογενούς πορείας εγκατάστασης οξειδωτικού στρες στα αιμοπετάλια, είναι ενεργές μορφές οξυγόνου, όπως η ρίζα υπεροξειδίου (O_2^-) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και ενεργές μορφές αζώτου, όπως το μονοξείδιο του

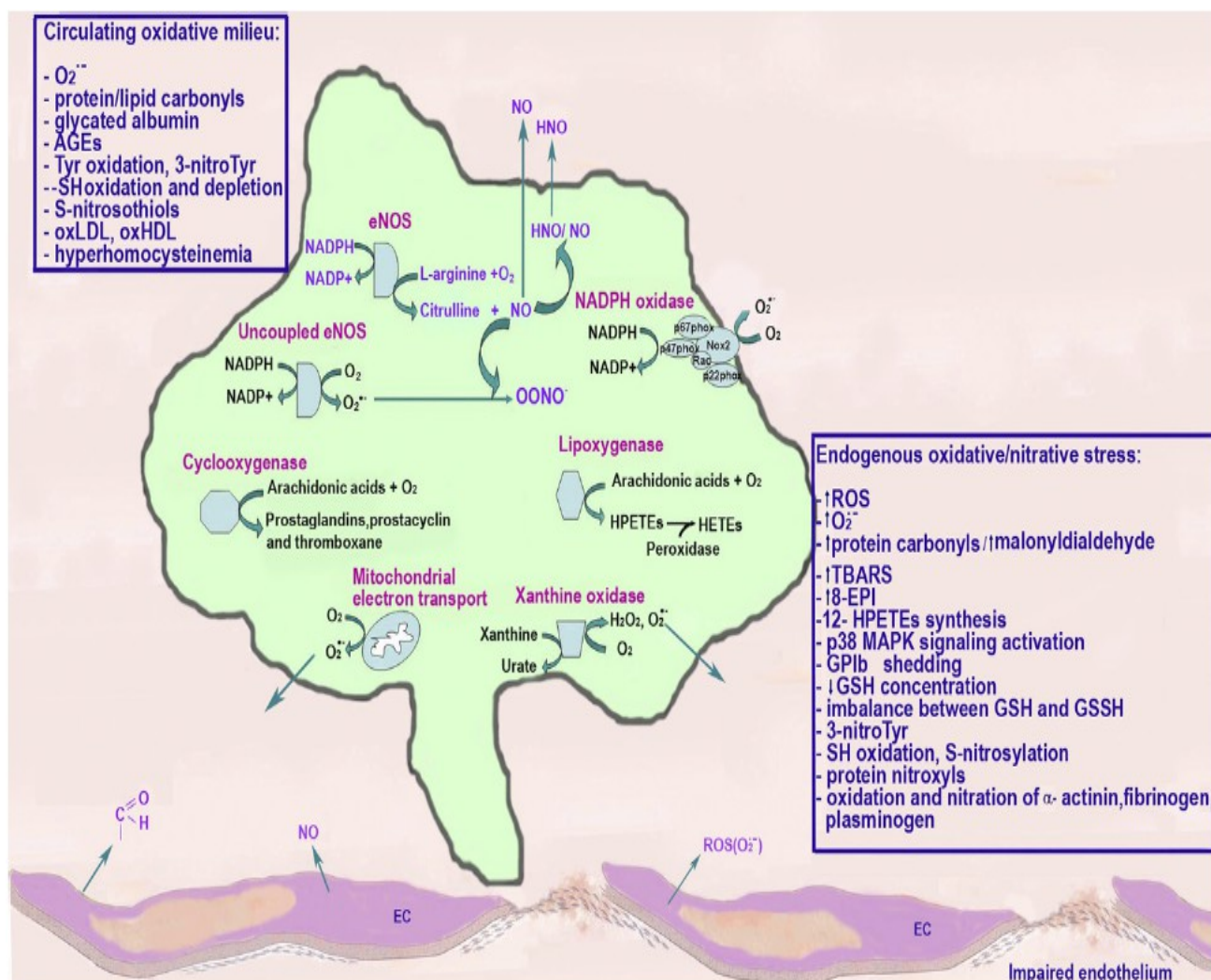
αζώτου (NO), το νιτροξύλιο (HNO) και το υπεροξυνιτρίδιο (ONOO⁻), τα οποία λειτουργούν ως οξειδωτικά μόρια. [10]

Στο σημείο αυτό είναι απαραίτητο να αναφερθεί η έμμεση αυτοκρινής και η έμμεση παρακρινής δράση των ελευθέρων ριζών. Η παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα αιμοπετάλια και η επιρροή εξωγενών οξειδωτικών παραγόντων οδηγούν σε παραγωγή άλλων ουσιών από τα αιμοπετάλια με αυτοκρινή δράση, για μεγαλύτερη και πιο έντονη ενεργοποίησή τους και ακόμη μεγαλύτερη παραγωγή ελευθέρων ριζών, ενώ παράλληλα εκκρίνουν και ουσίες με προσυσσωρευτικές δράσεις και ουσίες που προσελκύουν περισσότερα αιμοπετάλια τριγύρω τους, φαινόμενα που διακρίνονται ιδιαίτερα σε καταστάσεις έντονου οξειδωτικού στρες, όπως αυτές ενός τραυματισμού. [11]

Στον αντίποδα της διέγερσης των αιμοπεταλίων από το οξειδωτικό στρες τοποθετούνται οι αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί τους και του περιβάλλοντός τους, που καταστέλλουν την ενεργοποίησή τους. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να είναι ενδογενείς ή εξωγενείς του περιβάλλοντός τους και λειτουργούν ανασταλτικά στη συσσώρευση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Στους ενδογενείς ανήκουν οι μικρού μοριακού βάρους θειόλες που διαθέτουν τα αιμοπετάλια στο κυτταρόπλασμα και την κυτταροπλασματική του μεμβράνη, όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη, και αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθείονης και η καταλάση. Στους εξωγενείς μηχανισμούς κατατάσσονται και πάλι αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθείονης, τα οποία όμως κυκλοφορούν στο αίμα και παράλληλα και αντιοξειδωτικά της διατροφής, όπως οι βιταμίνες E και C και διάφορα φαινολικά συστατικά που όλα συντελούν στη σταθεροποίηση των ασύζευκτων ηλεκτρονίων των ελευθέρων ριζών, με αποτέλεσμα την εξουδετέρωσή τους και άρα τη ρυθμιζόμενη καταστολή της διέγερσης των αιμοπεταλίων από τα οξειδωτικά μόρια. Αν και τα παραπάνω μόρια είναι εκείνα που κατά κόρον εξομαλύνουν την οξειδωτική τάση του εξωγενούς περιβάλλοντος σε καταστάσεις ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, αναφέρονται και διάφορα άλλα μόρια με κατασταλτικές αιμοπεταλιακές δράσεις, όπως για παράδειγμα η αδιπονεκτίνη και η L-καρνιτίνη, μειώνοντας τις επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στα αιμοπετάλια. [10]

Όπως διαφαίνεται, οξειδωτικά και αντιοξειδωτικά μόρια πρέπει να συνεργάζονται και να συνυπάρχουν σε αρμονία μεταξύ τους, ώστε να επιτυγχάνεται ελεγχόμενη και φυσιολογική λειτουργία των αιμοπεταλίων στον οργανισμό, ανάλογα τις περιστάσεις, αφού παρεκτροπή της ισορροπίας προς τη μία ή την άλλη κατεύθυνση θα οδηγούσε σε υπερενεργοποίηση ή υπεραπενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καιροφυλαχτώντας

κινδύνους για τη διατήρηση της ομοιόστασης του οργανισμού και συνάμα της ασφαλούς διατήρησής του στη ζωή. Χαρακτηριστικά, σημειωτέα κρίνεται η δράση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) που αν και λειτουργεί ως διεγέρτης της δράσεις των αιμοπεταλίων, σε υψηλές συγκεντρώσεις εμπλέκεται σε διαδικασίες που σχετίζονται με την απόπτωση των αιμοπεταλίων. Επομένως, είναι σαφές πόσο σημαντική είναι η διατήρηση μίας ωφέλιμης οξειδοαναγωγικής ισορροπίας σε τέτοιες καταστάσεις. [10]



(**Εικόνα 1.22:** Συγκεντρωτική αναπαράσταση διαφόρων μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων παραγόντων του εξωτερικού και του εσωτερικού περιβάλλοντος των αιμοπεταλίων που εμπλέκονται με μηχανισμούς οξειδωτικού στρες σε αυτά [10])

1.5 : Επίδραση Μεταγευματικής Κατάστασης στις Δράσεις Λευκοκυττάρων και Αιμοπεταλίων

1.5.1 : Μεταγευματική Κατάσταση και Λευκοκύτταρα

Η μεταγευματική κατάσταση χαρακτηρίζεται από πληθώρα διακινούμενων στο αίμα ουσιών που προέρχονται από την τροφή. Πολλές φορές, αυτές οι ουσίες έχουν περισσότερες δράσεις από απλά να τροφοδοτούν τον οργανισμό με ενεργειακά υποστρώματα και δομικά υλικά. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο θα εξεταστούν οι αλληλεπιδράσεις των μορίων που εισέρχονται μεταγευματικά στο ανθρώπινο σώμα και των μορίων μεταφορέων-καθοδηγητών τους αναφορικά με τα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα δεδομένα που παρατίθενται επικεντρώνονται σε καταστάσεις που παρατηρήθηκαν μόνο σε υγιή άτομα.

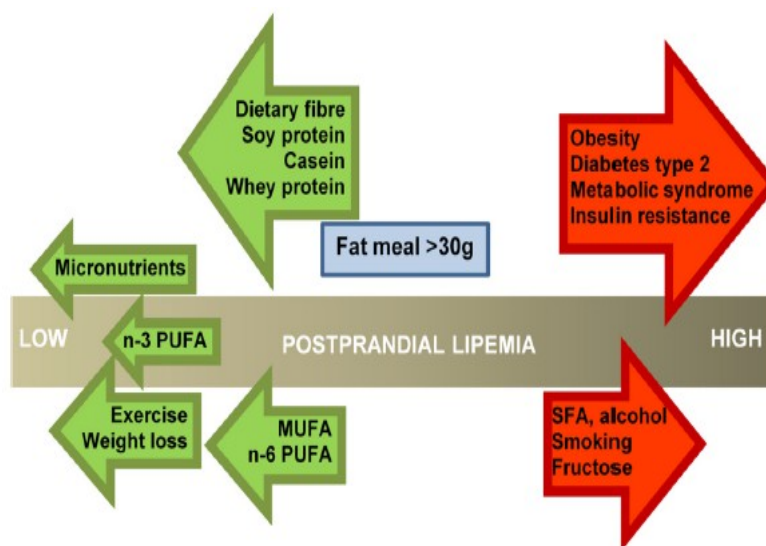
1.5.1.1 : Υπερλιπιδαιμία και Λευκοκύτταρα

Έχει φανεί ότι μια μεταγευματική κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μεταγευματική υπερλιπιδαιμία, κάτι που συνήθως παρατηρείται μετά από την κατανάλωση ενός πλούσιου σε λίπος γεύματος, συνδέεται με αυξημένα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριακυλογλυκερόλες στο περιφερικό αίμα. Κατά συνέπεια, αυτή η αυξημένη κυκλοφορούσα ποσότητα λιποπρωτεϊνών έχει δείχθει ότι προκαλεί αύξηση σε δείκτες ενεργοποίησης λευκοκυττάρων. Μάλιστα, επιστημονικά δεδομένα υποστηρίζουν πως οι λιποπρωτεΐνες αυτές έχουν τη δυνατότητα να επάγουν μία ελαφρά προ-οξειδωτική ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και πιο συγκεκριμένα των μονοκυττάρων, των ουδετερόφιλων και των αγγειακών μακροφάγων, κάτι που υποδηλώνεται από την αυξημένη παραγωγή και έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα προαναφερθέντα κύτταρα. Τέτοιες λιποπρωτεΐνες με δυνητικά προφλεγμονώδη δράση κατά τη μεταγευματική υπερλιπιδαιμία είναι: τα χυλομικρά, τα υπολείμματα χυλομικρών και οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) που κυριαρχούν κατά το μεταγευματικό στάδιο, ως οι κύριοι διακινητές μεταγευματικών τριακυλολυκερολών. Συμπληρωματικά, έχει παρατηρηθεί ότι αυτές οι παραπάνω λιποπρωτεΐνες έχουν τη δυνατότητα να συνδέονται με κατάλληλους συμπληρωματικούς υποδοχείς στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων, με τελικό αποτέλεσμα τη μεταφορά λιπαρών οξέων από αυτές προς τα παραπάνω κύτταρα. Αυτός ο λιποειδικός εμπλουτισμός των συγκεκριμένων λευκοκυττάρων τα κινητοποιεί να παράγουν

προφλεγμονώδεις κυτταροκίνες που προσελκύουν περισσότερα παρόμοια κύτταρα τριγύρω τους και αυξάνουν το ενδοκυττάριο οξειδωτικό τους στρες ενεργοποιώντας τα. Ωστόσο, πρέπει να τονισθεί ότι αυτό είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται σε μικρή κλίμακα στον οργανισμό μετά την κατανάλωση ενός λιπαρού γεύματος και η βαρύτητα της έντασής του εξαρτάται διάφορους παράγοντες, όπως το πλήθος των κυκλοφορουσών λιποπρωτεϊνών και τη διάρκεια παραμονής τους στο αίμα, ώστε να υπάρχουν αυξημένες πιθανότητες να έρθουν σε επαφή με τα λευκοκύτταρα. [12]

Συμπληρωματικά, πέραν των όσων αναφέρθηκαν σημαντικό ρόλο παίζει και ο βαθμός απομάκρυνσης αυτών των λιποπρωτεϊνών από το αίμα, καθώς έχει παρατηρηθεί αυξημένη εμφάνιση της μεταγευματικής αυτής “φλεγμονώδους απόκρισης” σε άτομα με διαταραγμένο ή μειωμένο, κατά βάση, ρυθμό εκκαθάρισης, όπως τα άτομα που πάσχουν από χρόνιες υπερλιπιδαιμίες, τα οποία φαίνεται να μην είναι ικανά να κατεβάσουν τόσο εύκολα τα επίπεδα των μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών, όσο τα υγιή άτομα με το πέρας του χρόνου. [13]

Φυσικά, αυτό δε σημαίνει καθόλου ότι τα υγιή άτομα απαλάσσονται από την παρουσία αυτού του φαινομένου ήπιας λευκοκυτταρικής ενεργοποίησης. Όπως αναφέρθηκε και πιο πριν, σημαντικό ρόλο στη βαρύτητα του φαινομένου διαδραματίζουν το μέγεθος και η διάρκεια παραμονής αυτών των λιποπρωτεϊνών στο αίμα. Αναφέρεται ότι ένα γεύμα με παραπάνω από 30g λίπους έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει ένα τέτοιο φαινόμενο σε υγιή άτομα και αν το λίπος είναι ακόμη περισσότερο, το μέγεθος των λιποπρωτεϊνών αυξάνεται και ο ρυθμός εκκαθάρισής τους από το αίμα μειώνεται. Αρκεί να αναλογιστεί κανείς ότι στις δυτικές χώρες ο μέσος άνθρωπος καταναλώνει 20-40g λίπους ανά γεύμα και ότι τα γεύματα είναι συνήθως 3-4 ανά μέρα, για να γίνει αντιληπτό ότι βρίσκεται πιθανότατα σε μεταγευματική λιπιδαιμία περίπου καθ' όλη τη διάρκεια της ημέρας. Όμως, δεν είναι καθοριστικό μόνο αυτό. Πολύ βασικός παράγοντας είναι κατά κόρον η ποιότητα των λιποπρωτεϊνών, δηλαδή η κατάσταση οξειδωσής τους και το είδος των λιπαρών οξέων από τα οποία αποτελείται η πλειοψηφία των τριακυλογλυκερολών τους. [13]



(**Εικόνα 1.23:** Παράγοντες που επηρεάζουν τη μεταγευματική (υπερ)λιπαιμία [13])

Έχει παρατηρηθεί ότι η κατανάλωση οξειδωμένου λίπους από την τροφή, λόγω υψηλής θερμικής επεξεργασίας του μαγειρέματός του, έχει ως συνέπεια τη δημιουργία μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών με αυξημένο οξειδωμένο περιεχόμενο και συνάμα αυξημένο οξειδωτικό χαρακτήρα. Αυτού του είδους οι λιποπρωτεΐνες έχουν αυξημένες πιθανότητες να πυροδοτήσουν ισχυρότερο προφλεγμονώδες μήνυμα ενεργοποίησης στα κυκλοφορούντα λευκοκύτταρα, όταν τύχει να συνδεθούν μεταξύ τους. Παρομοίως, το είδος της πλειοψηφίας των λιπαρών οξέων που καταναλώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών, επηρεάζει και αυτό τη δύναμη της προφλεγμονώδους δραστηριότητά τους. Ένα γεύμα πλούσιο σε κορεσμένα λιπαρά οξέα έχει μεγαλύτερες πιθανότητες να δημιουργήσει λιποπρωτεΐνες που θα επιφέρουν οξειδωτική ενεργοποίηση της φλεγμονώδους δραστηριότητας των λευκοκυττάρων. Αντιθέτως, τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα έχουν μικρότερη προφλεγμονώδη ισχύ από τα κορεσμένα και σε ακόμα καλύτερη θέση συγκαταλέγονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα φυτικής προέλευσης. Όμως, εκείνα που εμφανίζουν τη μικρότερη δυνατή ανοσολογική ενεργοποίηση σε τελικό στάδιο είναι τα πολυακόρεστα ω-3 λιπαρά οξέα που προέρχονται από τα ψάρια. [13]

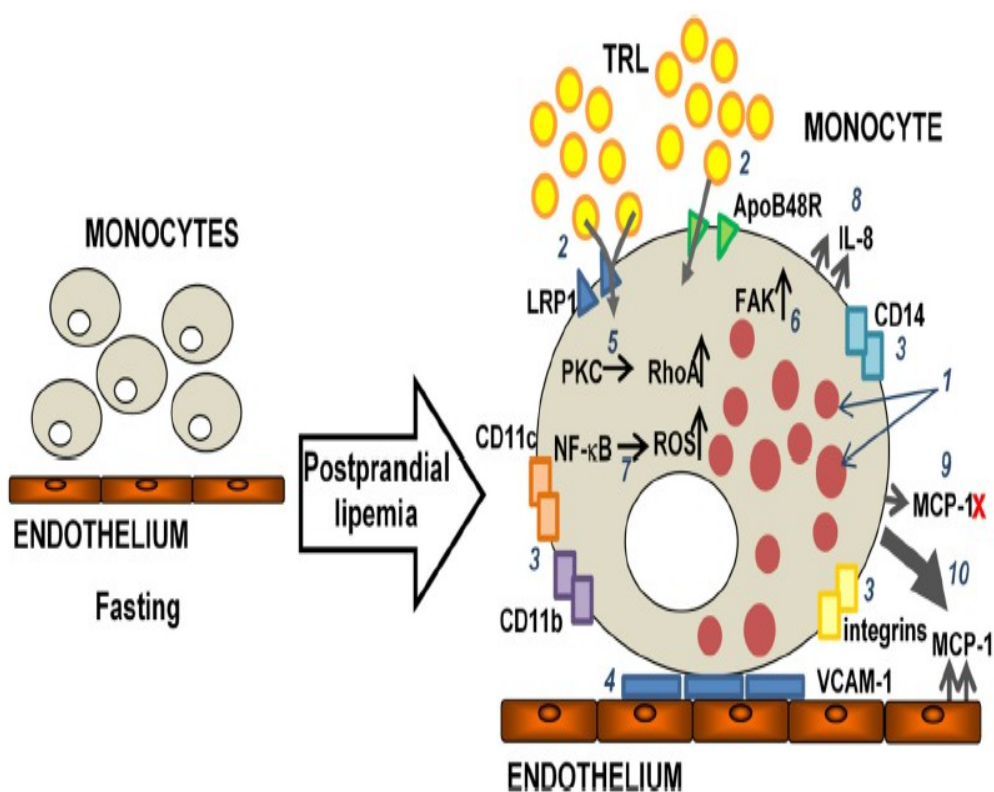
Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι πέραν του προφίλ των λιπαρών οξέων της διατροφής, το αποτέλεσμα επηρεάζεται και από άλλα συστατικά, όπως οι λιποδιαλυτές αντιοξειδωτικές βιταμίνες και τα φαινολικά συστατικά των τροφών που, όταν περάσουν εντός του οργανισμού και ενσωματωθούν στις μεταγευματικές λιποπρωτεΐνες, λόγω της αντιοξειδωτικής τους δράσης, κατευνάζουν την ενεργοποίηση και το οξειδωτικό στρες

ενεργοποίησης των (αναφερθέντων) λευκοκυττάρων, μειώνοντας την ενεργοποίησή τους [13]. Πέραν αυτού όμως, έχει εξετασθεί ότι παράλληλη κατανάλωση και μη-λιποδιαλυτών βιταμινών, όπως της βιταμίνης C, είναι ικανή να μειώσει τα αποτελέσματα του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες στα λευκοκύτταρα [14]. Στον αντίποδα, βρίσκεται το αλκοόλ, αφού η κατανάλωσή τους έχει φανεί να αυξάνει τη μεταγευματική ενεργοποίηση των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων. Επομένως, είναι κατανοητό ότι η ένταση της τελικής ισχύος της μεταγευματικής προφλεγμονώδους αντίδρασης, εξαρτάται από ένα πολυποίκιλο σύνολο παραγόντων [13].

Όσον αφορά το ίδιο το φαινόμενο, έχει σημειωθεί ότι στο μέγιστο σημείο των τιμών της μεταγευματικής υπερλιπιδαιμίας, μετά από ένα λιπαρό γεύμα, έχουν ανιχνευθεί αυξημένη παραγωγή παραγόντων επικοινωνίας των λευκοκυττάρων, όπως κυτταροκίνες (π.χ. IL-8, TNF- α , IL-6), αυξημένη έκφραση υποδοχέων επικοινωνίας με άλλες ουσίες και κύτταρα, καθώς και αύξηση στην παραγωγή ελευθέρων ριζών από τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα του ενδοθηλίου των αγγείων, λόγω της αύξησης του οξειδωτικού στρες που οφείλεται στην ενεργοποίησή τους από τη σύνδεσή τους με τις λιποπρωτεΐνες. Τα μονοπάτια παραγωγής κυτταροκινών φαίνεται να ρυθμίζονται από την προηγηθείσα ενεργοποίηση μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο Nf- κ B, η ERK, η p38 MAPK και η JNK (που αναφέρθηκαν σε προηγούμενο κομμάτι της πτυχιακής). Μάλιστα, όσο περισσότερο λίπος έχουν συσσωρεύσει τα μονοκύτταρα και τα μακροφάγα από τις λιποπρωτεΐνες, τόσο πιο έντονη φαίνεται να είναι και η ενεργοποίησή τους. Αντιστρόφως, μείωση του συσσωρευμένου λίπους, ελαττώνει την ενεργοποίηση. Φαίνεται ότι η περίσσεια λίπους παγιδεύεται στα λυσοσώματα των μονοκυττάρων και των μακροφάγων και δεν μπορεί να μεταβολιστεί με επαρκή ρυθμό, ώστε να απομακρυνθεί γρήγορα. Επιπροσθέτως, το μέγεθος της συσσώρευσης λίπους, εντός αυτών των κυττάρων, το επηρεάζει επίσης η ποιότητα του λιπαρών οξέων των τριακυλογλυκερολών των μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών, με τη ίδια σειρά κατάταξης που αναφέρθηκε πιο πριν, δηλαδή κορεσμένα, μονοακόρεστα, φυτικά πολυακόρεστα, ω -3 πολυακόρεστα, με φθίνουσα σειρά δραστηριότητας [13].

Σε αυτό το σημείο, είναι αναγκαίο να αναφερθεί ότι δεν είναι πάντοτε τόσο απλό να καθοριστεί η τελική αύξηση ή μείωση της διέγερσης των λευκοκυττάρων από τις μεταγευματικές λιποπρωτεΐνες. Πολλές μελέτες παραθέτουν αντικρουόμενα δεδομένα για το ποιοι παράγοντες ελαττώνουν τη διέγερση κάθε λευκοκυτταρικής σειράς που αναφέρθηκε (μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, μακροφάγα ενδοθηλίου των αγγείων). Για παράδειγμα, ενώ υπάρχει συμφωνία αρκετών μελετών για το ότι οι παράγοντες που

προαναφέρθηκαν επηρεάζουν με τους τρόπους που αναφέρθηκαν τα μονοκύτταρα, σχετικά με τα μακροφάγα, από πολλές μελέτες εξάγεται το συμπέρασμα ότι δεν επηρεάζονται από τις αλλαγές στα χαρακτηριστικά των μεταγευματικών λιπορωτεϊνών ή ακόμα και ότι κάποιες φορές καταστέλλεται ο ρόλος τους, θολώνοντας έτσι περισσότερο το “τοπίο”. Αυτό μπορεί να οφείλεται και στο ότι στην περίπτωση υγιών ατόμων, η μεταγευματική προφλεγμονώδης απόκριση πραγματοποιείται σε πολύ μικρό βαθμό, καθιστώντας τη δύσκολα ανιχνεύσιμη και εξετάσιμη, καθώς πολλές φορές οι διαφορές μεταξύ της κατάστασης νηστείας και της μεταγευματικής κατάστασης δε διαφέρουν, ούτε ουσιαστικά κλινικά ούτε στατιστικά, σε αντίθεση με τις περιπτώσεις υπερλιπιδαιμικών ή διαβητικών ατόμων που παρατηρούνται σημαντικές διαφορές μεταξύ της ομάδας ελέγχου και παρέμβασης [13].



(**Εικόνα 1.24:** Ενεργοποίηση των μονοκυττάρων από τις μεταγευματικές λιποπρωτεΐνες πλούσιες σε τριακυλογλυκερόλες (TRL) [13])

1.5.1.2 : Υπεργλυκαιμία και Λευκοκύτταρα

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι παρόμοια επίδραση επαγωγής οξειδωτικού στρες και ενεργοποίησης των μονοκυττάρων και των ουδετερόφιλων, παρατηρείται και στην κατάσταση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, όταν αυτή προκαλείται μετά από ένα πλούσιο σε υδατάνθρακες γεύμα. Ωστόσο, δε φαίνεται να εμφανίζεται ίδιου μεγέθους και έντασης ενεργοποίηση των συγκεκριμένων λευκοκυττάρων, όπως στη μεταγευματική υπερλιπιδαιμία. Χαρακτηριστικά αναφέρεται ότι οι προφλεγμωνώδης ουσίες και οι ουσίες προσκόλλησης που εκκρίνουν τα παραπάνω λευκοκύτταρα, όταν ενεργοποιηθούν κατά τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία, μπορούν να ανιχνευθούν μόνο κατά τη στιγμή που τα επίπεδα γλυκόζης φτάνουν στη μέγιστη τιμή τους στον οργανισμό, ενώ κατά τη μεταγευματική υπερλιπιδαιμία μπορούν να ανιχνευθούν σχεδόν καθ' όλη τη μεταγευματική περίοδο, αφότου αρχίσουν να κυκλοφορούν οι λιποπρωτεΐνες στο αίμα. [14]

1.5.2 : Μεταγευματική Κατάσταση και Αιμοπετάλια

1.5.2.1 : Υπερλιπιδαιμία και Αιμοπετάλια

Όπως και με τα λευκοκύτταρα, έτσι και με τα αιμοπετάλια, παρατηρείται αύξηση στη δραστικότητα και τις λειτουργίες τους κατά τη μεταγευματική υπερλιπιδαιμία. Η λειτουργική αυτή αύξηση μπορεί, όπως και με τα λευκοκύτταρα, να μην είναι τέτοιου μεγέθους όπως σε μία αισθητή φλεγμονή ή τραύμα ή σχετική νόσο, αλλά είναι υπολογίσιμα ανιχνεύσιμη και για αυτό αξίζει να μελετηθεί. [15]

Αναλυτικότερα, έχει παρουσιαστεί ότι η μεταγευματική λιποπρωτεΐνη VLDL, η λιπορωτεΐνη LDL και ιδίως τα οξειδωμένα παράγωγά τους, ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια της αιματικής κυκλοφορίας, αυξάνοντας την τάση τους για θρόμβωση. Έχει παρατηρηθεί ότι τα αιμοπετάλια φέρουν ειδικούς υποδοχείς για τις παραπάνω λιποπρωτεΐνες, οι οποίοι τα βοηθούν να έρθουν σε επαφή με αυτές και μέσω της δημιουργίας δεύτερων μηνυμάτων που πυροδοτούνται από την επαφή, τα αιμοπετάλια υφίστανται αργή και ήπια ενεργοποίηση, μέσω της αύξησης της ενδοκυττάριας παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδριά τους. Ως τελικό αποτέλεσμα, γίνονται πιο ευαίσθητα σε παράγοντες πήξης και μόρια αγωνιστές της θρομβίνης, αλλά και τα ίδια παράγουν ουσίες (κυτταροκίνες και συγκολλητίνες/σελεκτίνες) που μπορούν να επηρεάσουν ακόμα περισσότερα αιμοπετάλια και λευκοκύτταρα. Τα τελευταία, λόγω της ίδιας ενεργοποίησης που μπορούν να υποστούν

από τις μεταγευματικές λιποπρωτεΐνες, όπως αναφέρθηκε πιο πριν, είναι ικανά να εκκρίνουν ουσίες που να επηρεάσουν τη διέγερση και τη σύνδεσή τους με τα γύρω αιμοπετάλια, δημιουργώντας έτσι μία συνεργιστική αμφίδρομη σχέση. Οι οξειδωμένες μορφές των λιποπρωτεϊνών δημιουργούν πιο ραγδαία και απότομη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όταν έρθουν σε επαφή μαζί τους, και είναι ικανές να τα κάνουν να συσσωρεύονται πιο εύκολα και να μεταβάλλουν το σχήμα τους. Ανασταλτικό παράγοντα σε όλη αυτή τη διαδικασία, αποτελεί η μη-μεταγευματική λιποπρωτεΐνη HDL, η οποία φαίνεται να εξομαλύνει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που δημιουργήθηκε από τις VLDL και LDL, όταν συνδεθεί μαζί τους μέσω υποδοχέων στη μεμβράνη των αιμοπεταλίων. Εδώ αξίζει να αναφερθεί ότι αν τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια είναι αρκετά, υπάρχει περίπτωση να οξειδώσουν κάποια μόρια LDL, λόγω των μικρών ποσοτήτων ελευθέρων ριζών που παράγουν με τη βοήθεια της οξειδάσης του NADPH στο γύρω εξωκυττάριο περιβάλλον τους [15]. Το τελευταίο εύρημα έχει παρατηρηθεί κυρίως σε υπερχοληστερολαιμικά άτομα, αλλά και σε υγιή σε μικρότερο βαθμό. Τέλος, είναι απαραίτητο να αναφερθεί ότι δεν είναι ξεκάθαρο, εάν άλλα είδη λιποπρωτεϊνών (χυλομικρά, υπολείμματα χυλομικρών, IDL) έχουν παρόμοιες σχέσεις αλληλεπιδράσεων με τα αιμοπετάλια, όπως οι VLDL και LDL. [16,17]

Σύμφωνα με κάποιες έρευνες και μερικά άλλα συστατικά της τροφής μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων μεταγευματικά. Για παράδειγμα οι πολυφαινόλες διαφόρων τροφών ίσως να διαφαίνεται να έχουν κατασταλτική επίδραση στη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων μεταγευματικά, αν και τα ευρήματα των ερευνών δίστανται αρκετά και δεν είναι ξεκάθαρα. [18]

1.5.2.2 : Υπεργλυκαιμία και Αιμοπετάλια

Ομοιότητες ως προς τους μηχανισμούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων με τη μεταγευματική υπερλιπιδαιμία παρουσιάζει και η μεταγευματική υπεργλυκαιμία. Έχει αναφερθεί ότι σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας σε υγιή άτομα παρατηρείται αυξημένη έκφραση διαφόρων υποδοχέων στην επιφάνεια της κυτταροπλασματικής μεμβράνης των αιμοπεταλίων τους, αυξάνοντας την ευαισθησία των αιμοπεταλίων σε μόρια αγωνιστές θρομβωτικών παραγόντων. [19]

Δεδομένα in vitro, ενισχύουν το παραπάνω εύρημα, καθώς αιμοπετάλια που εκτέθηκαν σε περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης σε γλυκόζη εμφάνισαν αυξημένη μιτοχονδριακή παραγωγή ελευθέρων ριζών, αυξημένη ευαισθησία ενεργοποίησης, όταν

εκθέτονταν σε κολλαγόνο και αυξημένη ικανότητα συσσώρευσης. [20]

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι εκτός των υπολοίπων υποδοχέων στα αιμοπετάλια, έχουν ανακαλυφθεί και υποδοχείς ινσουλίνης. Οι υποδοχείς αυτοί ασκούν κατασταλτική δράση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, όταν συνδεθούν με τη μεταγευματική ορμόνη ρύθμισης της γλυκόζης και παράλληλα μειώνουν τη μεταγευματικά αυξημένη τάση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Συν των άλλων, έχουν τη δυνατότητα να επάγουν την παραγωγή του αγγειοδιασταλτικού μονοξειδίου του αζώτου από τα αιμοπετάλια. Δυστυχώς, αν και οι δράσεις αυτών των υποδοχέων είναι εμφανείς σε *in vitro* πειράματα, όταν μαζί με την αύξηση της ινσουλίνης συνυπάρχει και αύξηση γλυκόζης, όπως συμβαίνει φυσιολογικά κατά τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία, υποδεικνύεται ότι τελικά επικρατούν οι ενεργοποιητικές προθρομβωτικές επιδράσεις της υπεργλυκαιμίας στα αιμοπετάλια έναντι των αντιθρομβωτικών των υποδοχέων ινσουλίνης. Βέβαια, ίσως η παρασκηνιακή λειτουργία των υποδοχέων ινσουλίνης να επηρεάζει την τελική συνιστώσα της έντασης του φαινομένου, λειτουργώντας ως ένα “αφανές φρένο ασφαλείας”. [21]

Ολοκληρώνοντας, θα ήταν καλό να αναφερθεί επίσης ότι ενδογενή συστήματα αντιοξειδωτικών μηχανισμών, όπως η δράση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου, φαίνεται να εξασθενούν την ολοκληρωμένη ενεργοποίηση, έκφραση υποδοχέων και παραγωγή μηνυματοφόρων ουσιών των αιμοπεταλίων, κατά τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία που έχει προκληθεί από ένα πλούσιο σε υδατάνθρακες γεύμα. [22]

1.5.3 : Επίλογος Υποκεφαλαίου

Συμπερασματικά, λοιπόν, γίνεται αντιληπτό ότι οι μεταγευματικές ουσίες που εισέρχονται στον οργανισμό μέσω της τροφής, μπορούν να επηρεάσουν τις λειτουργίες τόσο των λευκοκυττάρων όσο και των αιμοπεταλίων σε πολλά επίπεδα και ποικιλοτρόπως. Από την άλλη, είναι συνετό να συνειδητοποιηθεί ότι δεν υπάρχουν πολλά επιστημονικά δεδομένα που να ρίχνουν επαρκείς καντέλες φωτός στους μηχανισμούς που διέπουν αυτό το τόσο μικρής και ευαίσθητης κλίμακας πολυσύνθετο βιολογικό φαινόμενο. Παράγοντες όπως το είδος των συστατικών ενός γεύματος, η χρονική περίοδος για τον πλήρη μεταβολισμό του, η ώρα της ημέρας ή και ακόμα πιο ειδικοί όπως οι αλληλεπιδράσεις όλων αυτών των κυτταροκινών και κυττάρων του ανοσοποιητικού μεταξύ τους είναι ακόμη πειστικά ανεξερεύνητοι και η περαιτέρω διελεύκυσή τους θα προσέδιδε ουκ ολίγες νέες αισιοδοξίας στο συγκεκριμένο τομέα της μεταβολικής βιοχημείας.

1.6 : Επίδραση Μεταγευματικής Κατάστασης στο Οξειδωτικό Στρες

1.6.1 : Εισαγωγικά

Σε αυτό το υποκεφάλαιο της πτυχιακής μελέτης, θα παρατεθούν δεδομένα σχετικά με το πώς επηρεάζει η μεταγευματική κατάσταση τους μηχανισμούς παραγωγής οξειδωτικού στρες, αναφορικά με υγιή άτομα. Είναι σημαντικό να κατανοηθεί ότι το συγκεκριμένο υποκεφάλαιο παρουσιάζει ομοιότητες με το προηγούμενο, αφού το οξειδωτικό στρες αποτελεί, κατά βάση, το διαμεσολαβητή μεταξύ της μεταγευματικής κατάστασης και της ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού και όχι το μοναδικό τελικό αποτέλεσμα.

Κατά τη μεταγευματική κατάσταση, όπως είναι γνωστό από προηγούμενο υποκεφάλαιο, η κατανάλωση ενός γεύματος που περιέχει υδατάνθρακες και λίπη προκαλεί αύξηση στα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης και πλούσιων σε τριακυλογλυκερόλες λιποπρωτεϊνών μεταφοράς στο αίμα. Αυτά έχουν ως αποτέλεσμα να εντοπίζονται μεταγευματικά δύο καταστάσεις που ονομάζονται μεταγευματική (υπερ)γλυκαιμία και μεταγευματική (υπερ)λιπαιμία, αντίστοιχα κατά τη φυσιολογική μεταβολική διαχείριση των υδατανθράκων και λιπών που καταναλώθηκαν μέσω της τροφής. Τα επίπεδα των παραπάνω θρεπτικών συστατικών επανέρχονται στα φυσιολογικά μετά το πέρας κάποιων ωρών.

Έχει παρατηρηθεί, λοιπόν, ότι ένα γεύμα πλούσιο σε λίπη ή υδατάνθρακες είναι ικανό να επάγει την παραγωγή οξειδωτικού στρες και την ευαισθησία του οργανισμού σε αυτό. Η προαναφερθείσα κατάσταση αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως μεταγευματικό οξειδωτικό στρες [23]. Τα μεταγευματικά μόρια των συστατικών ενός γεύματος, με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, που κυκλοφορούν στο αίμα έχουν τη δυνατότητα να επάγουν προοξειδωτικές καταστάσεις στον οργανισμό έμμεσα μέσω πολύπλοκων μηχανισμών ή άμεσα μέσω προοξειδωτικών μορίων που φέρουν. [23,24,25]

1.6.2 : Μεταγευματική (υπερ)λιπιδαιμία και οξειδωτικό στρες

Αναφορικά με τη μεταγευματική (υπερ)λιπιδαιμία, έχειδειχθεί ότι η αύξηση των μεταγευματικών επιπέδων των μεταφορικών λιποπρωτεϊνών (=χυλομικρά και υπολείμματα χυλομικρών, VLDL) οδηγεί σε αύξηση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού [26].

Ένα συγκεκριμένο παράδειγμα προοξειδωτικών μορίων είναι τα ευοξειδωτα ή οξειδωμένα λιπαρά οξέα που μεταφέρονται, μέσω των μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών, ως τριακυλογλυκερόλες. Φαίνεται ότι η παρουσία αυτών των μορίων στην κατάσταση της μεταγευματικής (υπερ)λιπιδαιμίας συντελεί σε αυξημένη παραγωγή υδροϋπεροξυλίων από τα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος, τα οποία, με τη σειρά τους, ως ισχυρά οξειδωτικά μόρια τείνουν να οξειδώσουν λιποειδικά συστατικά και άλλων κυκλοφορουσών λιποπρωτεϊνών. Ένα εύκολος και συνήθης στόχος τους είναι η (μη-μεταγευματική) λιποπρωτεΐνη LDL που μετατρέπεται στην οξειδωμένη της μορφή. Τα προοξειδωτικά αυτά μόρια μπορούν μέσω αλληλεπιδράσεών τους με τα κύτταρα του ανοσοποιητικού και ιδίως των λευκοκυττάρων να επιφέρουν περαιτέρω αύξηση ελευθέρων ριζών και οξειδωτικού στρες στον οργανισμό [23]. Χαρακτηριστικά έχει παρατηρηθεί αύξηση της παραγωγής ριζών υπεροξειδίου από τα λευκοκύτταρα, κατά τη μεταγευματική (υπερ)λιπιδαιμία [27]. Επιπλέον, η επαγωγή μίας αυξημένης κατάστασης μεταγευματικού οξειδωτικού στρες οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό απομάκρυνσης των μεταγευματικών λιποπρωτεϊνών, αυξάνοντας τις πιθανότητες να υπάρξει χρονική παράταση του φαινομένου. Ακόμη, η μεταγευματική (υπερ)λιπιδαιμία είναι ικανή να επηρεάσει την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων στα κύτταρα του οργανισμού, όπως ο Nf-κΒ, που εμπλέκεται στην παραγωγή ελευθέρων ριζών και κυτταροκινών από κύτταρα του ανοσοποιητικού. [23]

Επιπροσθέτως, έχει φανεί ότι η θερμιδική επιβάρυνση ενός γεύματος, ανεξαρτήτως των συστατικών του οξύνει το μεταγευματικό στρες. Η ένταση του μεταγευματικού στρες σε κατάσταση εξαρτάται και από την ποιότητα των λιπαρών οξέων του γεύματος [24]. Φαίνεται ότι τα λιπαρά οξέα της διατροφής που επάγουν το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες περισσότερο είναι τα trans λιπαρά οξέα, τα οποία ακολουθούνται από τα λιγότερο δραστικά κορεσμένα λιπαρά οξέα. Λιγότερη οξειδωτική διέγερση από τα κορεσμένα έχουν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει συγκεντρωθεί γύρω από το μονοακόρεστο ελαϊκό οξύ του ελαιολάδου) και ακόμα λιγότερη διέγερση εκδηλώνεται πως έχουν τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Ωστόσο, το πιο ήπιο αποτέλεσμα από όλα τα λιπαρά οξέα, βάσει ερευνών, έχουν τα ω-3 λιπαρά οξέα [25]. Αξίζει να σημειωθεί ότι αναφέρεται πως σε πολύ εξειδικευμένο επίπεδο ακόμη και το μήκος των λιπαρών οξέων κάθε ομάδας παίζει ρόλο στο τελικό αποτέλεσμα του μεγέθους του

οξειδωτικού στρες μεταγευματικά, αλλά τα επιστημονικά δεδομένα δεν είναι ξεκάθαρα ως προς τις ακριβείς σχέσεις που διέπουν την τελευταία παρατήρηση [24]. Υπολογίσιμο ρόλο διαδραματίζει και το επίπεδο επεξεργασίας των λιπαρών οξέων που καταναλώθηκαν, καθώς πιο επεξεργασμένα λιπαρά οξέα τείνουν να ανεβάζουν ευκολότερα τα μεταγευματικά επίπεδα οξειδωτικού στρες [26], κάτι το οποίο θα αναλυθεί και παρακάτω.

1.6.3 : Μεταγευματική (υπερ)γλυκαιμία και οξειδωτικό στρες

Εκτός όμως της μεταγευματικής (υπερ)λιπαιμίας, φαίνεται, όπως αναφέρθηκε και πριν, ότι και η μεταγευματική (υπερ)γλυκαιμία εμπλέκεται σε μηχανισμούς αύξησης του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες. Μάλιστα, η χρονική περίοδος και η ένταση της μεταγευματικής (υπερ)γλυκαιμίας σχετίζονται θετικά με το μέγεθος παραγωγής οξειδωτικού στρες. Αναλυτικότερα, ο γλυκαιμικός δείκτης και το γλυκαιμικό φορτίο ενός γεύματος φαίνεται ότι συνδέονται θετικά με την ένταση επαγωγής μεταγευματικού οξειδωτικού στρες και παραγωγής φλεγμονωδών ουσιών [25,28]. Ειδικότερα, γεύματα υψηλού γλυκαιμικού δείκτη προκαλούν μεγαλύτερη αύξηση οξειδωτικού στρες μεταγευματικά, συγκριτικά με γεύματα χαμηλότερου γλυκαιμικού δείκτη [29], καθώς μεγαλύτερα “σκαμπανεβάσματα” της μεταγευματικής γλυκόζης προκαλούν και μεγαλύτερο φόρτο οξειδωτικού στρες στον οργανισμό [28] (κάτι που επηρεάζεται και από τα επίπεδα γλυκόζης προγευματικά) [26]. Ωστόσο, αυτό είναι σχετικό και με την ποσότητα, αφού αν καταναλωθεί μικρή ποσότητα ενός υψηλά γλυκαιμικού γεύματος, δεν επιφέρει μεγάλη επιβάρυνση στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες και ομοίως αν καταναλωθεί μεγάλη ποσότητα ενός χαμηλά γλυκαιμικού γεύματος, μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη διέγερση των μεταγευματικών οξειδωτικών μηχανισμών [28]. Τέλος, αύξηση στο γλυκαιμικό φορτίο ή το γλυκαιμικό δείκτη ενός γεύματος, φαίνεται να επηρεάζει τη συγκέντρωση της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε μη διαβητικά άτομα [25].

Επιπλέον πληροφορία αποτελεί η παρατήρηση ότι τα μεταγευματικά επίπεδα της οξειδωμένης LDL εμφανίζουν συσχέτιση με το βαθμό της μεταγευματικής (υπερ)γλυκαιμίας, το οποίο συνεπάγεται ότι τα διαβητικά άτομα εμφανίζουν πιο αυξημένες συγκεντρώσεις οξειδωμένης LDL συγκριτικά με τα υγιή άτομα. Ακόμη, οξεία (υπερ)γλυκαιμία μεταγευματικά, σε υγιή άτομα, κάτι που συνδέεται και με το είδος των υδατανθράκων ενός γεύματος (απλοί ή σύνθετοι), φαίνεται να αυξάνει την παραγωγή ενεργών μορφών αζώτου στον οργανισμό και παράλληλα να αποδυναμώνει τις αντιοξειδωτικές άμυνες του οργανισμού, κάτι που διεξαχθεί από την παρατήρηση του ότι η

αυξημένη γλυκόζη αδειάζει τα αποθέματα των κυττάρων και συγκεκριμένα των λευκοκυττάρων σε βιταμίνη C in vitro. Το τελευταίο δικαιολογήθηκε από το γεγονός ότι η γλυκόζη και η βιταμίνη C χρησιμοποιούν κοινό σύστημα μεταφοράς στα κύτταρα. [25]

Ολοκληρώνοντας, ενδιαφέρον εύρημα αποτελεί το ότι από αναλύσεις σε ούρα υγιών ατόμων που εμφάνισαν μεταγευματική υπεργλυκαιμία, παρατηρήθηκαν ενώσεις ισοπρωτανίων, τα οποία αποτελούν μεταβολίτη των αντιδράσεων ελευθέρων ριζών με το αραχιδονικό οξύ μεμβρανών κυττάρων και αποτελούν δείκτη οξειδωτικού στρες. Φυσικά, οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν δεν ήταν πολύ μεγάλες συγκριτικά με τις υπέρμετρες συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν σε διαβητικά άτομα που υποβλήθηκαν στο ίδιο πείραμα επαγωγής μεταγευματικής υπεργλυκαιμικής κατάστασης. [30]

1.6.4 : Ειδικότεροι μεταγευματικοί παράγοντες σχετιζόμενοι με οξειδωτικό στρες (AGEs και ALEs)

Πέραν των επιπέδων της μεταγευματικής γλυκόζης και των κυκλοφορούντων λιπαρών οξέων στις λιποπρωτεΐνες, υποστηρίζεται ότι και ουσίες μη-ενζυμικής αμαύρωσης (προχωρημένα προϊόντα των αντιδράσεων Maillard), όπως προϊόντα τελικής γλυκοζηλίωσης (AGEs) είναι ικανά να επάγουν τις διαδικασίες του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες. Αυτές οι ουσίες μπορούν να εισέλθουν μέσω της κατανάλωσης τροφών που περιέχουν υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν επεξεργαστεί / μαγειρευτεί σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες για υπολογίσιμο χρονικό διάστημα. Έχει βρεθεί ότι τα AGEs σχετίζονται με προφλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως η παραγωγή κυτταροκινών IL-6, IL8 και TNFα από τα μακροφάγα, μέσω οξειδωτικών μηχανισμών [24,25]. Υποδοχείς ευαίσθητοι στην παρουσία των AGEs έχουν εντοπισθεί και σε άλλες λευκοκυτταρικές σειρές [26]. Μάλιστα, έχει καταγραφεί ότι ένα γεύμα πλούσιο σε AGEs μπορεί να ενεργοποιήσει μηχανισμούς παραγωγής οξειδωτικού στρες σε κύτταρα του ανοσοποιητικού (μέσω μηχανισμών παραγωγής ελευθέρων ριζών από τα μιτοχόνδρια και την NAD(P)H οξειδάση), επάγοντας την παραγωγή κυτταροκινών που προαναφέρθηκαν, μορίων προσκόλλησης κυττάρων του ανοσοποιητικού, παράγοντα ενεργοποίησης του πλασμινογόνου και της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης [25].

Παρόμοια προοξειδωτική και προφλεγμονώδη δράση με τα AGEs παρατηρείται να έχουν και τα ALEs (προχωρημένα προϊόντα λιποξειδικής οξείδωσης), τα οποία και αυτά παράγονται από λιποειδή των τροφών, όταν αυτές υποβάλλονται σε υψηλή θερμική επεξεργασία μαγειρέματος. Εδώ είναι σημαντικό να τονισθεί ότι τα AGEs και ALEs

δημιουργούνται και ενδογενώς στον οργανισμό σε παθοφυσιολογικές μεταβολικές καταστάσεις, όπως στο διαβήτη και άλλες παθήσεις [25], όμως στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, όπως αναφέρθηκε και πριν, θα εξετασθούν οι επιδράσεις μόνο της μεταγευματικής κατάστασης στο οξειδωτικό στρες (με έμφαση σε παρατηρήσεις που εμφανίζονται σε υγιή άτομα).

Αξίζει να αναφερθεί πως όλες οι παραπάνω συσχετίσεις που αναφέρθηκαν μέχρι τώρα είναι καθαρά εμφανείς σε άτομα που είναι παχύσαρκα ή πάσχουν από διαβήτη (τύπου 1 ή 2) ή πάσχουν από κάποιο καρδιαγγειακό νόσημα και πως σε υγιή άτομα είναι δύσκολο να εντοπιστούν [24]. Συν των άλλων, οι περισσότερες μελέτες έχουν διεκπεραιωθεί με νοσούντες πληθυσμούς και όχι με υγιής, αφήνοντας επιστημονικά κενά στο σύνολο της κατανόησης των παραπάνω σχέσεων και μηχανισμών [25,27].

1.6.5 : Κατασταλτικοί παράγοντες του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες

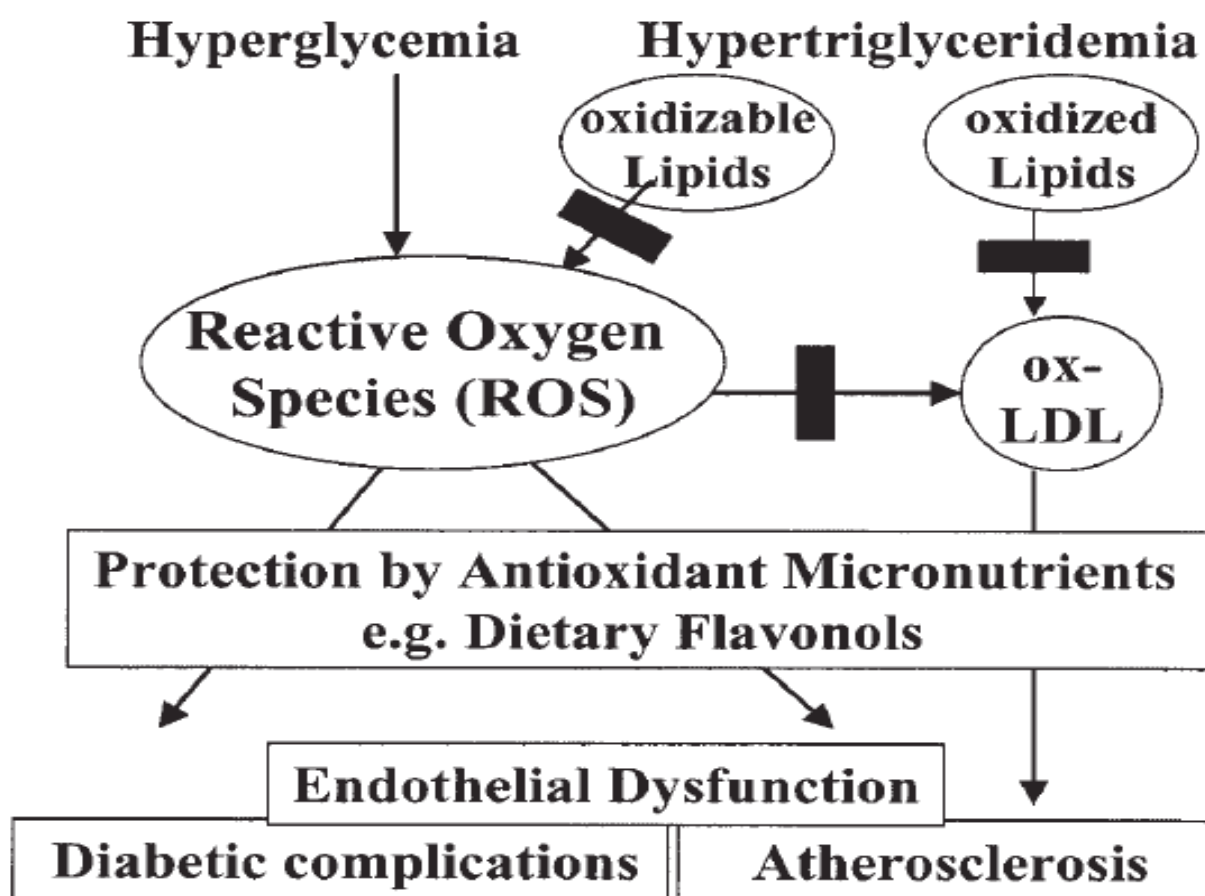
Στον αντίποδα των μεταγευματικών ουσιών και μορίων που αυξάνουν το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες βρίσκονται οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί και τα αντιοξειδωτικά που προσλαμβάνονται μέσω της τροφής.

Χαρακτηριστικά, σημειώνεται ότι η γαστροεντερική γλουταθειόνη, εντεροεπιθηλιακή μορφή του ενδογενούς αντιοξειδωτικού γλουταθειόνη, έχει φανεί ότι μειώνει το οξειδωτικό φορτίο των εισερχόμενων μεταγευματικών λιποειδών, μειώνοντας τα λιποειδικά υπεροξειδία. Βέβαια, η αποτελεσματικότητα του παραπάνω μηχανισμού εξαρτάται από το μέγεθος της εισροής τέτοιων οξειδωτικών λιποειδικών μορίων στον οργανισμό, όπως και της διαθέσιμης ποσότητας γλουταθειόνης. Για παράδειγμα, τα οξειδωμένα μόρια χοληστερόλης (οξυστερόλες) “προσπερνάνε” πιο εύκολα και σε μεγάλο αριθμό τον παραπάνω προστατευτικό μηχανισμό, εισερχόμενα χωρίς κόπο στην αιματική κυκλοφορία, διεγείροντας οξειδωτικούς μηχανισμούς σε κύτταρα φλεγμονής.

Επιπλέον, ένα γεύμα πλούσιο σε αντιοξειδωτικά συστατικά, όπως αντιοξειδωτικές βιταμίνες και φαινολικά διατροφικά συστατικά, έχει τη δυνατότητα να μειώσει την ευαισθησία του οργανισμού στο μεταγευματικό οξειδωτικό στρες και να διακόψει τη διάδοση μηνυμάτων παραγωγής ελευθέρων ριζών, προστατεύοντας έτσι τον οργανισμό [23]. Μερικά τρόφιμα που διαφαίνεται να σχετίζονται με την παραπάνω προστατευτική λειτουργία είναι το κακάο, το τσάι (μαύρο και πράσινο) και ο καφές, αν και υπάρχει έλλειψη δεδομένων από κλινικές μελέτες που να ισχυροποιούν αυτά τα επιστημονικά δεδομένα

[23,25]. Προστατευτικός φαίνεται και ο ρόλος των φρούτων και των λαχανικών, λόγω της υψηλής περιεκτικότητά τους σε αντιοξειδωτικές βιταμίνες, αλλά και φυτικές ίνες, αφού φαίνεται ότι η καθυστέρηση της πέψης των θρεπτικών συστατικών που επιβάλλουν οι φυτικές ίνες, μειώνει το ρυθμό απορρόφησης της γλυκόζης και των λιπών, ελαττώνοντας τις επιδράσεις του μεταγευματικού στρες που δημιουργούν [25,31]. Επιπροσθέτως, αναφέρεται ότι η κανέλα μπορεί να μειώσει τα επίπεδα μεταγευματικού στρες από (υπερ)γλυκαιμία, επιβραδύνοντας το άδειασμα του στομάχου, μειώνοντας εξ' αυτού το ρυθμό απορρόφησης της γλυκόζης από το έντερο [24] . Τέλος, τα επίπεδα ενυδάτωσης του οργανισμού δε φαίνεται να επηρεάζουν τα επίπεδα του μεταγευματικού στρες [25] .

Postprandial Oxidative Stress



(**Εικόνα 1.25:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα ροής των μηχανισμών και των πιθανών τελικών μακροπρόθεσμων συνεπειών του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες [23])

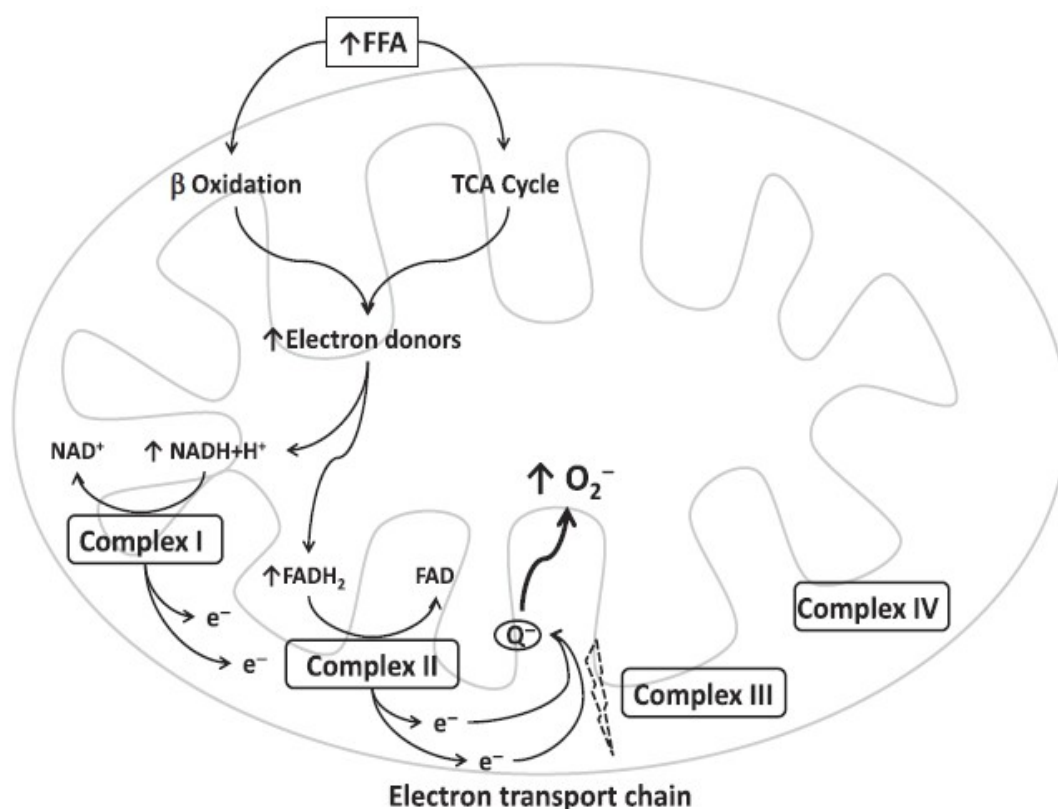
1.6.6 : Ενδοκυττάριοι μηχανισμοί παραγωγής οξειδωτικού στρες κατά τη μεταγευματική κατάσταση

Στο σημείο αυτό θα ήταν αναγκαίο, μετά την ανάλυση των σχέσεων της μεταγευματικής κατάστασης και του οξειδωτικού στρες, να περιγραφεί ο κυτταρικός μηχανισμός με τον οποίο οι παραπάνω σχέσεις λαμβάνουν υπόσταση.

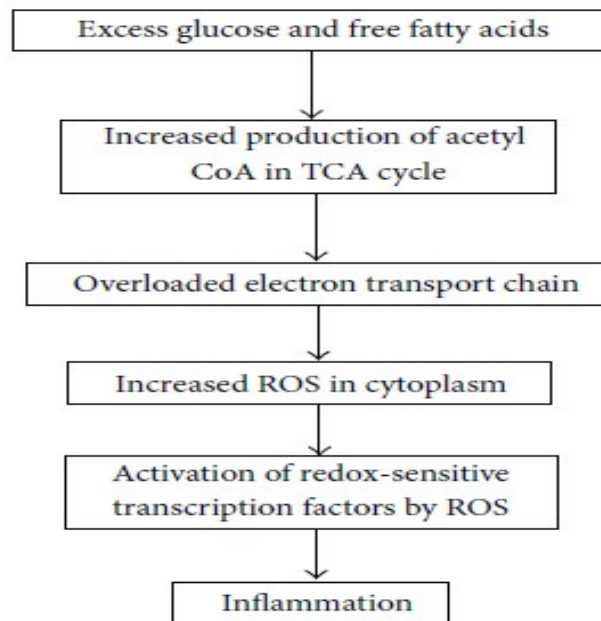
Αυξημένη κυκλοφορία μεταγευματικών λιπαρών οξέων (μέσω των λιποπρωτεϊνών) και μεταγευματικής γλυκόζης οδηγούν σε αυξημένη τάση απομάκρυνσής τους από την αιματική κυκλοφορία, μέσω της εισόδου τους στα κύτταρα του οργανισμού (μυϊκά, ηπατικά, λιπώδους ιστού, λευκοκύτταρα, αιμοπετάλια, ενδοθηλίου των αγγείων, κλπ). Η αυξημένη εισαγωγή γλυκόζης και λιπαρών οξέων στα κύτταρα οδηγεί σε αυξημένη τάση καταβολισμού τους. Από τη μία, η πολλή γλυκόζη υπερφορτώνει την κύρια γλυκολυτική πορεία, με συνέπεια την αυξημένη παραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων και από την άλλη τα πολλά λιπαρά οξέα αυξάνουν την τάση της β-οξειδωσής τους, η οποία αυξάνει την παραγωγή ακετυλο-συνεζύμου A, του οποίου η αυξημένη παραγωγή υπερφορτώνει τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων / κύκλο του Krebs, με συνέπεια πάλι την αυξημένη παραγωγή αναγωγικών ισοδυνάμων. Τα αυξημένα αναγωγικά ισοδύναμα των NADH και FADH₂, ως δότες ηλεκτρονίων, υπερφορτώνουν με τη σειρά τους τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη συσσώρευση ηλεκτρονίων που δημιουργείται από τα αναγωγικά ισοδύναμα στο συνένζυμο Q της αναπνευστικής αλυσίδας, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μεταφορά ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο και του οποίου ο χρόνος ημιζωής αυξάνεται λόγω των παραπάνω. Έτσι, παρατηρείται αυξημένη παράδοση ηλεκτρονίων στο οξυγόνο, η οποία με τη σειρά της αυξάνει την πιθανότητα διαρροών ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα, λόγω αποσύζευξης. Ως τελική συνέπεια, εμφανίζεται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου (O₂⁻). Αυτή η ενδοκυττάρια παραγωγή του οξειδωτικού μορίου του υπεροξειδίου, κινητοποιεί την ενεργοποίηση του αντιοξειδωτικού ενζύμου, δισμουτάση του υπεροξειδίου, η οποία εξουδετερώνει μόρια υπεροξειδίου προς σχηματισμό του λιγότερου δραστικού, αλλά επίσης οξειδωτικού, υπεροξειδίου του υδρογόνου (H₂O₂). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου με τη σειρά του επάγει την κατάσταση του οξειδωτικού στρες σε πιο γενικευμένο επίπεδο στο κύτταρο, μειώνοντας την αντιοξειδωτική του χωρητικότητα του κυττάρου (εξ' αιτίας της κατανάλωσης των ενδοκυττάριων αντιοξειδωτικών) και οξειδώνοντας μόρια, όπως ενδοκυττάρια λιποειδή, πρωτεΐνες, μιτοχονδριακό DNA, κ.ά.. Όλη αυτή η "οξειδωτική φόρτιση και καταπόνηση" του κυττάρου, καταλήγει σε αλλαγές στην κατάσταση του οξειδοαναγωγικού του δυναμικού, με

αποτέλεσμα την ενεργοποίηση οξειδοαναγωγικά ευαίσθητων μεταγραφικών παραγόντων, όπως ο Nf-κB που επάγει προφλεγμονώδεις καταστάσεις, διαμέσω της παραγωγής κυτταροκινών από τα λευκοκύτταρα με μηχανισμούς όπως π.χ. της αύξησης της δραστηριότητας του ενζύμου κυκλοξυγενάση (στα λευκοκύτταρα) προς την παραγωγή προφλεγμονωδών εικοσανοειδών [24,26,27,30,31].

Συμπληρωματικά, διαρροές υπεροξειδίου του υδρογόνου από κύτταρα που σχετίζονται με καταστάσεις φλεγμονής, φαίνεται να αντιδρούν με το μονοξείδιο του αζώτου της κυκλοφορίας του αίματος προς σχηματισμό, αρχικά, υπεροξυνιτριδίου (ONOO^-), το οποίο είναι μία πολύ δραστική ενεργή μορφή αζώτου που είναι ικανό να προκαλέσει οξειδωτική ζημιά σε γύρω πρωτεΐνες, λιποειδή (και στο DNA, αν συντεθεί ενδοκυτταρικά) και έπειτα, νιτροτυροσίνης, κάτι που έχει παρατηρηθεί σε διαβητικά και σε υγιή άτομα μετά από υπερβολική φόρτιση γλυκόζης [30,31].



(**Εικόνα 1.26:** Ο μηχανισμός της μιτοχονδριακής παραγωγής ριζών υπεροξειδίου πυροδοτούμενος από αυξημένη ποσότητα λιπαρών οξέων στο κυτταρόπλασμα [27])



(**Εικόνα 1.27:** Συγκεντρωτικό διάγραμμα ροής του μηχανισμού παραγωγής μεταγευματικού οξειδωτικού στρες. [24])

1.6.7 : Επίλογος Υποκεφαλαίου

Συμπερασματικά, είναι σαφές ότι η κατανάλωση ενός γεύματος μπορεί να προκαλέσει καταστάσεις οξειδωτικού στρες στον οργανισμό υγιών ατόμων [25]. Βεβαίως, ένα υπερφορτωμένο γεύμα με υδατάνθρακες ή λίπη ή και τα δύο μαζί είναι ικανό να προκαλέσει υπολογίσιμη παραγωγή ελευθέρων ριζών και να επάξει προφλεγμονώδεις καταστάσεις στον οργανισμό [23]. Είναι λογικό ότι αν ένα πιο επιβαρυνόμενο γλυκαιμικά ή και λιπιδαιμικά γεύμα προκαλεί πιο έντονα μεταγευματικό οξειδωτικό στρες, λόγω πιο αυξημένων μεταγευματικών επιπέδων γλυκόζης ή πλούσιων σε τριακυλογλυκερόλες λιποπρωτεϊνών, τότε σε παθοφυσιολογικές καταστάσεις, όπου υπάρχει εξ' αρχής διαταραγμένος μεταβολισμός των παραπάνω μορίων, θα παρατηρούνται και θα ανιχνεύονται μεγαλύτερα και εμφανέστερα αποτελέσματα μίας κατάστασης οξειδωτικού στρες [24]. Το τελευταίο όμως δεδομένο είναι και αυτό που υποδεικνύει ότι αν ένα άτομο στη ζωή του υπερφορτώνει οξειδωτικά τον οργανισμό του με τέτοιου είδους γεύματα και ληφθεί υπ' όψιν ότι ο μέσος άνθρωπος περνά το μεγαλύτερο μέρος της ημέρας στο μεταγευματικό στάδιο, τότε ένας τέτοιος τρόπος ζωής εγκυμονεί κινδύνους για εμφάνιση παθοφυσιολογικών μεταβολικών καταστάσεων στο μέλλον, όπως διαβήτη ή μεταβολικό σύνδρομο [27,30].

Ωστόσο, οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει επικεντρώνονται σε νοσούντες πληθυσμούς και όχι σε υγιείς, ενώ παράλληλα εξετάζουν κατά βάση μεμονωμένα την υπεργλυκαιμία ή την υπερλιπιδαιμία μεταγευματικά και όχι συνδυαστικά· κάτι το οποίο θα ήταν πιο κοντά στην πραγματικότητα, καθώς ο άνθρωπος καταναλώνει σύνθετα γεύματα. Εκτός αυτού όμως, το φαινόμενο του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες είναι ένα μικρής ανιχνευσιμότητας φαινόμενο, το οποίο δύσκολα εντοπίζεται, μετράται και αξιολογείται σε υγιή άτομα [25,27]. Επομένως, το τοπίο δεν είναι ακόμα πλήρως επιστημονικά διελευκανσμένο και τεκμηριωμένο ως προς όλες τις παρατηρήσεις, τους μηχανισμούς και τις σχέσεις που το διέπουν και αυτό το γεγονός καθιστά το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες έναν πολλά υποσχόμενο ερευνητικό επιστημονικό τομέα των επομένων χρόνων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΣΚΟΠΟΣ

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές, είναι γνωστό ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία μπορεί να ενεργοποιήσει τόσο τους μηχανισμούς διέγερσης των λευκοκυττάρων όσο και τους μηχανισμούς ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, σε άτομα που πάσχουν από τη μεταβολική νόσο του διαβήτη (τύπου I ή II). Παρόμοιος αντίκτυπος στα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια, σχετιζόμενος με τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία, παρατηρείται και σε ασθενείς άλλων μεταβολικών νοσημάτων (π.χ. ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο).

Ωστόσο, λίγα και όχι πάντοτε τόσο ξεκάθαρα είναι τα επιστημονικά δεδομένα, τα οποία αναφέρουν ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία έχει τη δυνατότητα να επιφέρει βραχυπρόθεσμη αύξηση των λειτουργιών των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και σε υγιή άτομα.

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

Μάλιστα, λόγω του ότι οι προαναφερθέντες μηχανισμοί, επαγόμενοι από τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία, συνδέονται με βιοχημικά μονοπάτια, στα οποία εμπλέκονται διαδικασίες οξειδωτικού στρες, κρίθηκε κατάλληλο να προσδιοριστεί πειραματικά η δραστικότητα διαφόρων σχετικών αντιοξειδωτικών ενζύμων που διαδραματίζουν κύριο ρόλο στη ρύθμιση του όλου συστήματος της μεταγευματικής λευκοκυτταρικής και αιμοπεταλιακής ευαισθητοποίησης. Έτσι, δίνεται η δυνατότητα να γεφυρωθούν πειραματικά οι βιοχημικές εργαστηριακές μετρήσεις με τις πιθανές αλλαγές στη λειτουργία των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων μεταγευματικά, ανοίγοντας το δρόμο για περαιτέρω συσχετισμούς και συμπεράσματα.

Η εργασία αυτή εστιάστηκε συγκεκριμένα στη μέτρηση της δραστικότητας του βασικότερου ενδοκυτταρικού αντιοξειδωτικού ενζύμου στον ανθρώπινο οργανισμό, της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX1) σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων μετά από διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης. Το ένζυμο αυτό μπορεί να ρυθμίζει την ενδογενή οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων και μέσω αυτής να μεσολαβεί σε τροποποιήσεις της δραστικότητας των κυττάρων σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας / υπερινσουλιναίμιας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 : Επιλογή Εθελοντών

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

Στους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες. Η αιμοληψία για τις γυναίκες πραγματοποιούνταν κατά τις πρώτες 7-10 ημέρες του εμμηνορρυσιακού τους κύκλου. Κριτήρια επιλογής των εθελοντών ήταν ο φυσιολογικός Δείκτης Μάζας Σώματος ($\Delta\text{Μ}\Sigma = 18\text{-}25 \text{ Kg/m}^2$), η φυσιολογική αρτηριακή πίεση (Συστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 130 \text{ mmHg}$ και Διαστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 85 \text{ mmHg}$), επίπεδα γλυκόζης νηστείας $\leq 100 \text{ mg/dl}$, επίπεδα γλυκόζης 2 ώρες μετά από φόρτιση 75 g γλυκόζης $< 140 \text{ mg/dl}$, επίπεδα ολικής χοληστερόλης $\leq 200 \text{ mg/dl}$, επίπεδα τριακυλογλυκερολών $\leq 150 \text{ mg/dl}$, περιφέρεια μέσης $\leq 102 \text{ cm}$ και απουσία ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, οι εθελοντές δεν ήταν καπνιστές. Για την καταγραφή των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο. Συμπληρωματικά, πριν την είσοδο των εθελοντών στο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος, ώστε να εξακριβωθεί ότι οι εθελοντές πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια. Οι εθελοντές προτιμήθηκε να είναι είτε μη ενεργά άτομα είτε κατ' ελάχιστο ενεργά άτομα, σύμφωνα με τη κατάταξη του ερωτηματολογίου IPAQ. Επιπρόσθετα, όφειλαν να μη λαμβάνουν ασπιρίνη, ορμόνες, συμπληρώματα διατροφής και αντιυπερτασικά φάρμακα, για τουλάχιστον 2 μήνες.

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

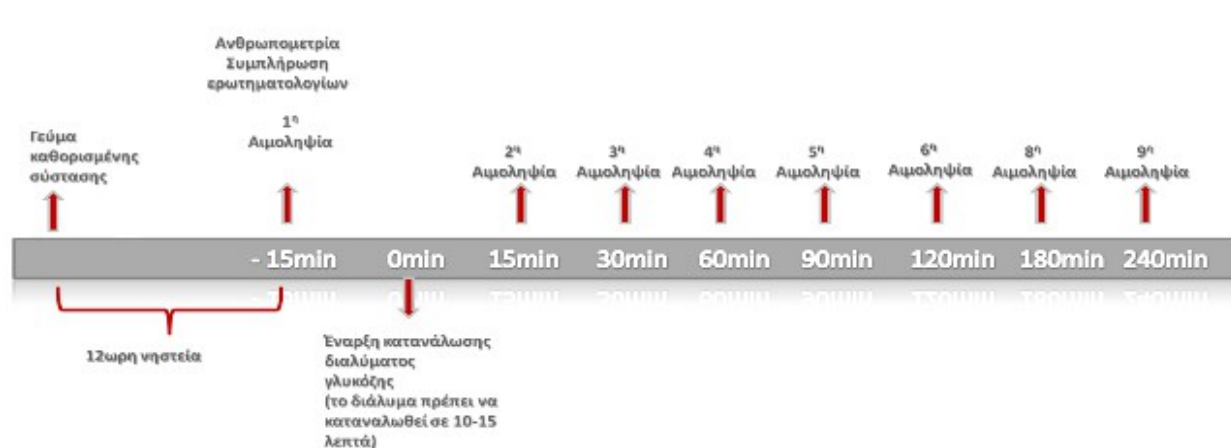
3.2 : Σχεδιασμός της Μελέτης για το πρωτόκολλο της υπεργλυκαιμίας

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

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

Οι εθελοντές είχαν ενημερωθεί εγκαίρως πως το προηγούμενο βράδυ όφειλαν να είχαν ακολουθήσει συγκεκριμένης σύστασης γεύμα, το οποίο έπρεπε να περιείχε 600 Kcal για τις γυναίκες και 750Kcal για τους άνδρες. Το γεύμα χαρακτηριζόταν από περιεκτικότητα 50% σε υδατάνθρακες, 20% σε πρωτεΐνες και 30% σε λίπη (το ακριβές διαιτολόγιο είχε συνταχθεί και είχε δοθεί στους εθελοντές από διαιτολόγο). Μετά από 12ωρη νηστεία προσέρχονταν στο Χαροκόπειο πανεπιστήμιο.

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



3.3 : Ανθρωπομετρία

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

3.4 : Απομόνωση και Επεξεργασία Βιολογικών Δειγμάτων

3.4.1 : Συνολική Περιγραφή

Σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές, μετά την κατανάλωση του διαλύματος γλυκόζης (15, 30, 60, 90, 120, 180 και 240 min), λαμβανόταν αίμα με φλεβοκαθετήρα, το οποίο διαμοιραζόταν σε κατάλληλα σωληνάρια κενού (vacutainers), ανάλογα το είδος και την ποσότητα του βιολογικού δείγματος που ήταν επιθυμητό να απομονωθεί. Επιπρόσθετα, ο διαχωρισμός του ληφθέντος αίματος στα σωληνάρια κενού γινόταν και με βάση το είδος των βιοχημικών αναλύσεων που θα πραγματοποιούνταν σε κάθε χρονική στιγμή.

Τα βιολογικά δείγματα που απομονώθηκαν και το είδος των αναλύσεων ανά βιολογικό δείγμα φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

Βιολογικό δείγμα	Αναλύσεις
Ορός	✓ Γλυκόζη, ✓ Ινσουλίνη
Ολικό αίμα με EDTA	✓ Γενική αίματος

(Ο πίνακας συνεχίζεται στην επόμενη σελίδα...)

Πλάσμα με EDTA	✓ GPX3 (= η εξωκυτταρική μορφή της GPX)
Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια	✓ Συσσώρευση αιμοπεταλίων
Ομογενοποίηση αιμοπεταλίων	✓ GPX1
Ομογενοποίηση λευκοκυττάρων	✓ GPX1

3.4.2 : Απομόνωση πλάσματος και ορού

Αρχικά, 4 mL και 2 mL ληφθέντος αίματος μεταφερόταν σε vacutainers ορού ή πλάσματος με αντιπηκτικό EDTA, αντίστοιχα.

Τα vacutainers ορού παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά και ο ορός παραλαμβάνονταν με φυγοκέντρηση στα 1500g επί 8 λεπτά, στους 15°C. Έπειτα, ο ορός μοιραζόταν σε erpendorfs και φυλασσόταν στους -80°C.

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

3.4.3 : Απομόνωση λευκοκυττάρων

Για να απομονωθούν τα λευκοκύτταρα, συλλέχθηκαν 4 mL αίμα σε vacutainer που περιείχε αντιπηκτικό ηπαρίνη. Ακολούθως, το αίμα αναμιγνυόταν με 1360 μ L διαλύματος δεξτράνης, σύστασης 3% w/v σε φυσιολογικό ορό, και παρέμενε εντός δοκιμαστικού σωλήνα σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο μεταφερόταν με τη βοήθεια πιπέτας σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα, ο οποίος φυγοκεντρούταν στα 500g επί 10 λεπτά, στους 15°C. Στο ίζημα των λευκοκυττάρων που προέκυπτε, το οποίο περιείχε και προσμίξεις ερυθροκυττάρων, προσθετόταν κατάλληλο διάλυμα για τη λύση των ερυθροκυττάρων (8,29g NH_4Cl , 1,0012g KHCO_3 και 0,038g EDTA σε 1 L απιονισμένο νερό). Μετά από 5 λεπτά επώασης σε θερμοκρασία δωματίου, τα πλυμένα λευκοκύτταρα απομονώνονταν με φυγοκέντρηση στα 300g επί 10 λεπτά στους

15°C. Ύστερα, το ίζημα των λευκοκυττάρων αναδιαλυόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 50 mM (pH 7,4) και τα λευκοκύτταρα ομογενοποιούνταν με τη βοήθεια υπερήχων. Στο τέλος, το ομογενοποίημα των λευκοκυττάρων μοιραζόταν σε errendorfs και φυλασσόταν στους -80°C. [32]

3.4.4 : Απομόνωση “πλυμένων” αιμοπεταλίων ανθρώπου για βιοχημικές μετρήσεις

Για την απομόνωση των αιμοπεταλίων, 14 mL αίματος μεταφέρονταν σε σωλήνες που περιείχαν αντιπηκτικό ACD (Acid Citrate Dextrose). Το ολικό αίμα φυγοκεντρούταν στα 173g x 18 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να γίνει απομόνωση του πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (PRP). Στη συνέχεια 1 mL από το PRP φυγοκεντρούνταν στα 700g x 15 min στους 15°C και το ίζημα των αιμοπεταλίων ξεπλένονταν με 500μL φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια με άλλη μία φυγοκέντρωση στα 700g x 15 min στους 15°C παραλαμβάνονταν το ίζημα των πλυμένων ανθρώπινων αιμοπεταλίων, το οποίο αναδιαλυόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris 50 mM (pH 7,4) και τα αιμοπετάλια ομογενοποιούνταν με τη βοήθεια υπερήχων. Στο τέλος, το ομογενοποίημα των αιμοπεταλίων μοιραζόταν σε errendorfs και φυλασσόταν στους -80°C. [33]

3.4.5 : Συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια

3.4.5.1 : Η Πειραματική Μέθοδος

Ο προσδιορισμός της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων βασίζεται στο φαινόμενο του ότι η διαπερατότητα ενός πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια αυξάνεται, όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται, ύστερα από την προσθήκη κατάλληλου ενεργοποιητικού αιμοπεταλιακού παράγοντα. [34]

Αρχικά, από ολικό αίμα, στο οποίο έχει προστεθεί αντιπηκτικό ACD, με κατάλληλη φυγοκέντρωση, απομονώνεται το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP). Το ίζημα αυτής της φυγοκέντρωσης επαναφυγοκεντρείται σε μεγαλύτερες στροφές, ώστε να παραληφθεί ένα ακόμη κλάσμα, το οποίο είναι το πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP). Αν απαιτείται, το PRP αραιώνεται με PPP, ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη συγκέντρωση αιμοπεταλίων (200×10^9 αιμοπετάλια/L), η οποία προσδιορίζεται φωτομετρικά. [34]

Στη συνέχεια, θα περιγραφεί η κύρια φάση της λογικής του πειράματος, κατά την

οποία χρησιμοποιείται το πειραματικό όργανο: συσσωρευματομέτρο. Αυτό το όργανο, είναι ουσιαστικά ένα ειδικό θερμορυθμιζόμενο φωτόμετρο. Σε αυτό, τοποθετούνται κυψελίδες που περιέχουν ποσότητα PRP. Από τις κυψελίδες διέρχεται κάποιο ποσοστό φωτεινής δέσμης. Το συσσωρευματομέτρο έχει τη δυνατότητα να υπολογίζει τη διαπερατότητα του PRP και να την καταγράφει με τη μορφή καμπύλης σταθερής ταλάντωσης, σε ένα διάγραμμα, στο οποίο εμφανίζεται η ποσοστιαία “επί τοις εκατό” (%) διαπερατότητα του δείγματος ως προς τον χρόνο. [34]

Όταν στην κυψελίδα με το PRP, προστεθεί ο κατάλληλος ενεργοποιητικός παράγοντας, τότε ξεκινάει το πρώτο στάδιο του φαινομένου της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης· κατά το οποίο παρατηρείται διόγκωση και αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων. Λόγω αυτού, η διαπερατότητα του περιεχομένου της κυψελίδας μειώνεται, με αποτέλεσμα στο καταγραφικό του οργάνου να διακρίνεται μία καμπύλη μικρότερης ταλάντωσης που έχει κλίση προς τα κάτω. [34]

Στη συνέχεια, ακολουθεί το δεύτερο στάδιο του φαινομένου της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, κατά το οποίο σχηματίζονται θρόμβοι από συσσωρευμένα αιμοπετάλια. Σε αυτό το στάδιο, η διαπερατότητα του περιεχομένου της κυψελίδας αυξάνεται και ως απόρροια αυτού, στο καταγραφικό του οργάνου εμφανίζεται μία καμπύλη που έχει κλίση προς τα πάνω. Αυτό το στάδιο, συνοδεύεται με μία συνεχώς μεγαλύτερη ταλάντωση και συνάμα παραγωγή θορύβου από το όργανο, οι οποίες είναι ανάλογες του μεγέθους των σχηματιζόμενων θρόμβων. [34]

Εάν η συγκέντρωση του ενεργοποιητικού παράγοντα είναι επαρκής, η όλη διαδικασία σταματά στο δεύτερο στάδιο. Αν από την άλλη, η συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα δεν είναι αρκετά μεγάλη, επακολουθεί ένα τρίτο στάδιο, κατά το οποίο πραγματοποιείται η αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων και η τελική τους επαναφορά στην αρχική τους κατάσταση. Στην περίπτωση αυτή, η καμπύλη στο καταγραφικό θα έχει κλίση προς τα κάτω και θα συνοδεύεται από μία σταδιακά φθίνουσα ταλάντωση, η οποία θα κυμαίνεται στα επίπεδα της αρχική της μορφής, καθώς και κοντά στο αρχικό επίπεδο της “επί τοις εκατό” (%) διαπερατότητας. Μία τυπική μέτρηση διαρκεί από 3 έως 6 λεπτά. [34]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι οι ενεργοποιητικοί παράγοντες των αιμοπεταλίων προστίθενται στο περιεχόμενο της κυψελίδας παρουσία ιόντων Ca^{2+} . Ακόμη, η όλη διαδικασία τελείται ενώ το δείγμα υφίσταται ανάδευση. Η απεικόνιση της καταγραφόμενης διαπερατότητας, με τη βοήθεια του συσσωρευματομέτρου, γίνεται ταυτόχρονα με τις μεταβάσεις των διαφόρων πειραματικών φάσεων. [34]

3.4.5.2 : Τα Πειραματικά Στάδια

Τα στάδια μέτρησης της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων που ακολουθήθηκαν ήταν τα παρακάτω : σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προσθέτονταν 250 μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων, όπως και ένας μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρεφόταν με 1200 rpm. Το εναιώρημα επωαζόταν για 20 λεπτά σε υδρόλουτρο 37°C. Ακολουθούσε ρύθμιση στην κλίμακα του συσσωρευματομέτρου με το 100 της κλίμακας να αντιστοιχεί στο PPP και το 0 στο εναιώρημα αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετούταν στην ειδική θερμοστατούμενη θέση της στο συσσωρευματομέτρο. Έπονταν προσθήκες διαφόρων ποσοτήτων ενεργοποιητικού παράγοντα, ο οποίος ήταν διαλυτοποιημένος σε φυσιολογικό ορό. Στη συνέχεια, καταγραφόταν η καμπύλη συσσώρευσης, ως συνάρτηση της αύξησης της διαπερατότητας. [34]

Το ύψος και η μορφή της καμπύλης του καταγραφικού είναι ανάλογα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, όπως είναι λογικό, το όλο φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. [34]

Βάσει της προσθήκης διαφορετικών διαλυμάτων γνωστής συγκέντρωσης ενεργοποιητικού παράγοντα στο δείγμα, σχεδιαζόταν η καμπύλη της “επί τοις εκατό” (%) συσσώρευσης, συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενεργοποιητικού παράγοντα. Ως 100 % συσσώρευση οριζόταν η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Από την καμπύλη συσσώρευσης υπολογιζόταν για το δείγμα, ο δείκτης EC_{50} (Effective Concentration of 50% = η τιμή της συγκέντρωσης του ενεργοποιητικού παράγοντα που απαιτείται για την επαγωγή του φαινομένου της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στο μισό της ολικής της δυναμικότητας). [34]

Οι ενεργοποιητικοί παράγοντες που χρησιμοποιήθηκαν ξεχωριστά ήταν το ADP (Adenosine Diphosphate = διφωσφορική αδενοσίνη) και το TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide = Ενεργοποιητικό πεπτίδιο του υποδοχέα της θρομβίνης).

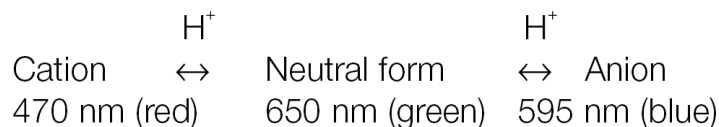
3.4.6 : Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με τη μέθοδο Bradford

Για να καταστεί δυνατός ο προσδιορισμός της ειδικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPX) στα βιολογικά δείγματα που είχαν απομονωθεί, ήταν αναγκαίο να υπολογιστεί πρωτίστως η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που περιεχόταν σε κάθε δείγμα που χρησιμοποιούταν κάθε φορά, δεδομένου ότι η δραστηριότητα της GPX εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης κάθε δείγματος. Εξ' αιτίας αυτού, λοιπόν, μετρίονταν η συγκέντρωση κάθε δείγματος σε πρωτεΐνη με το μέθοδο Bradford, η οποία θα αναλυθεί στη συνέχεια.

3.4.6.1 : Αρχή μεθόδου

Στη συγκεκριμένη μέθοδο χρησιμοποιείται η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250, η οποία απαντάται σε 3 μορφές: την κατιονική (κόκκινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 465nm), την ουδέτερη (πράσινο χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 650nm) και την ανιονική (μπλε χρώμα και μέγιστη απορρόφηση στα 595nm). [35]

Οι 3 μορφές της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 και οι αντίστοιχες απορροφήσεις [35]



Η μέθοδος βασίζεται στην αύξηση της απορρόφησης που συμβαίνει όταν η χρωστική συνδέεται με πρωτεΐνες σε όξινο περιβάλλον. Δυνάμεις Van der Waals και υδρόφοβες δυνάμεις αναπτύσσονται μεταξύ της χρωστικής και των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, η χρωστική αποκτά 2 πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε. Η χρωματική αλλαγή που παρατηρείται οφείλεται στην παρουσία κάποιων βασικών αμινοξέων στις πρωτεΐνες, όπως η αργινίνη, η λυσίνη και η ιστιδίνη. [35]

3.4.6.2 : Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια

Τα όργανα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πιπέτες ευρών 1-10, 10-100 και 100-1000 μ L (και πολυπιπέτα 10-100 μ L), όπως και ειδικό φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων..

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν : φυσιολογικός ορός, πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) - 100 μ g/mL και αντιδραστήριο Bradford (αραίωση διαλύματος Bradford με νερό 1:5 (1mL Bradford + 4mL H_2O). [35]

3.4.6.3 : Αναλυτική πορεία

Κατά τη μέθοδο Bradford, το χρησιμοποιούμενο διάλυμα BSA υποβαλλόταν σε διαδοχικές αραιώσεις για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων (όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα), τα οποία χρησιμοποιούνταν για την κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς. Όλες οι αραιώσεις γίνονταν μέσα σε πλακίδια (plates) 96 θέσεων, απλού τύπου. [35]

Αραιώσεις χρησιμοποιούμενου διαλύματος BSA [35]

Διάλυμα	Ποσότητα BSA (μg)	Ποσότητα H ₂ O (μL)	Τελική ποσότητα BSA (μg/mL)
Τυφλό	-	200	0
S1	2	198	0,2
S2	5	195	0,5
S3	10	190	1
S4	15	185	1,5
S5	20	180	2,0
S6	25	175	2,5
S7	30	170	3,0

Στα δείγματά πραγματοποιούνταν αραιώση 1:100 σε τελικό όγκο 200 μL (2μL δείγματος + 198μL φυσιολογικού ορού), μέσα σε errendorfs. Από κάθε αραιωμένο δείγμα, μεταφέρονταν 10μL σε πηγάδι του πλακιδίου, ακολουθούσε συμπλήρωση ως τα 200μL με απεσταγμένο νερό και καλή ανάδευση. Σε κάθε πηγάδι γινόταν προσθήκη 50μL αντιδραστηρίου Bradford, καλή ανάδευση και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η διαδικασία ολοκληρωνόταν με τη φωτομέτρηση των δειγμάτων στα 595nm με τη χρήση του φασματοφωτομέτρου μικροπλακιδίων και την καταγραφή των μετρήσεων. [35]

3.4.6.4 : Υπολογισμοί

Αρχικά, οι τιμές των απορροφήσεων της πρωτεΐνης των δειγμάτων εισάγονταν σε ένα αρχείο τύπου “excel”. Με βάση τις τιμές της ποσότητας της BSA των προτύπων διαλυμάτων και τις τιμές απορρόφησής τους, κατασκευαζόταν η πρότυπη καμπύλη αναφοράς. Από την εξίσωση που εξαγόταν από την πρότυπη καμπύλη, υπολογιζόταν η ποσότητα της πρωτεΐνης για καθένα από τα δείγματα, σύμφωνα με τις τιμές των απορροφήσεών τους.

3.4.7 : Προσδιορισμός Δραστικότητας της Υπεροξειδάσης της Γλουταθειόνης σε ομογενοποίημα λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων

3.4.7.1 : Εξοπλισμός - Αντιδραστήρια

Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις του πειράματος ήταν το ειδικό φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων. Στα αναλώσιμα του πειράματος συγκαταλέγονταν πουάρ και σιφώνιο (0-10mL), πιπέτες (100-1000μL και 10-100μL) (και πολυπιπέτα 0-10μL) και πλακίδια 96 θέσεων, απλού τύπου. [36]

Τα στερεά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

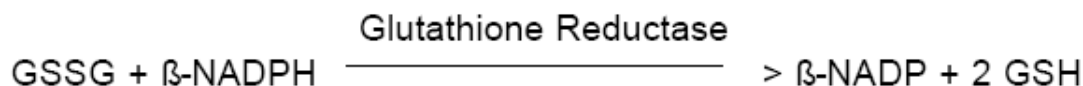
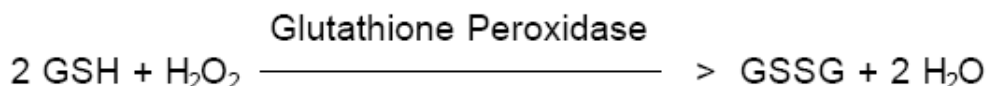
- Sodium phosphate monobasic, $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid, Tetrasodium Salt) (Sigma, E6511)
- Sodium Azide (Sigma, S-2002)
- β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form (β -NADPH), Tetrasodium Salt (201-201), 1 φιαλίδιο
- Glutathione Reductase (Sigma, G-3664) (Αναγωγή της γλουταθειόνης)
- GSH (Sigma, G-4251) (Γλουταθειόνη)
- Dithiothreitol (Sigma, D-0632)
- H_2O_2 30% (Sigma, H-1009)

Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM με EDTA 0.4 mM, pH 7.0 (**PBS/EDTA**) : 6,900 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (S5) και 0,1665 g EDTA (E1) σε 1000 mL απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση pH με NaOH 1M
- Sodium Azide 1 mM σε PBS 50 mM/EDTA 0.4 mM/pH 7.0 (**PBS/Sodium azide**): 0,0032 g NaN_3 σε 50 mL PBS/EDTA
- Διάλυμα αναγωγής της γλουταθειόνης 100 U/mL (**GR**): Αραίωση stock διαλύματος αναγωγής με παγωμένο απεσταγμένο νερό. Παρασκευή αμέσως πριν το πείραμα.
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200 mM (**GSH**): 0,0615 g σε 1 mL απεσταγμένο νερό

Διάλυμα H_2O_2 0.042% (**H_2O_2**): 14 μL διαλύματος H_2O_2 και 9986 μL απεσταγμένο νερό. Παρασκευή αμέσως πριν το πείραμα [36]

3.4.7.2 : Αντίδραση



[36]

3.4.7.3 : Αναλυτική Πορεία

Βάσει των αποτελεσμάτων που είχαν διεξαχθεί από τους υπολογισμούς της αντίδρασης Bradford, υπολογιζόταν η απαιτούμενη ποσότητα κάθε δείγματος που θα έπρεπε να προστεθεί στη συνέχεια στα πηγάδια των πλακιδίων, έτσι ώστε να εμπεριεχόταν συνολική ποσότητα πρωτεΐνης 4-50mg. [36]

Στη συνέχεια, πραγματοποιούνταν η παρασκευή των διαλυμάτων της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, λίγο πριν το πείραμα. Ακόμη, παρασκευαζόταν το μείγμα της αντίδρασης σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα: [36]

PBS/Sodium azide	9100 μL
GR	100 μL (22 μL + 78 μL απεστ. νερό)
GSH	50 μL
NADPH	1 mg (100 μL)

Έπειτα, ακολουθούσε η αναδιάλυση του NADPH στο μείγμα με ήπια ανακίνηση και ρύθμιση pH, αν ήταν ανάγκη στο 7,0. Το διάλυμα διατηρούταν στους 25°C. [36]

Τέλος, εκτελούνταν η προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων στα πηγάδια των πλακιδίων και η διεξαγωγή του πειράματος σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα: [36]

	Τυφλό	Δείγμα
Μείγμα αντίδρασης	200 μL	200 μL
Διαλύτης διαλύματος GPX	50 μL	-
Διάλυμα GPX	-	50 μL
	Ανάμιξη με το tip της πιπέτας και παραμονή 1 λεπτού σε θερμοκρασίας δωματίου	
Διάλυμα H_2O_2	5 μL	5 μL
	Μέτρηση απορρόφησης στα 340 nm για 5 λεπτά ανά 1 λεπτό στο φασματοφωτόμετρο	

3.4.7.4 : Υπολογισμοί

$$\text{Units/mL} = \frac{(\Delta A/\text{min, δείγματος} - \Delta A/\text{min, τυφλού}) \times 2 \times 0,255}{5,60 \times V_{\text{ενζ.}}}$$

παρασκευάσματος

[36]

όπου:

ΔA: Διαφορά Απορρόφησης

2: Τα 2 μmoles της GSH που παράγονται για κάθε μmole NADPH που οξειδώνεται

0,255: Ο τελικός όγκος του περιεχομένου του κάθε πηγαδιού του πλακιδίου σε mL

df: Ο συντελεστής αραίωσης (αν το δείγμα της GPX αραιωθεί)

5,60 : Ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm και για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,9 cm)

$V_{\text{ενζ.}}$: Ο όγκος σε mL του ενζυμικού παρασκευάσματος που χρησιμοποιείται στην πειραματική διαδικασία ανά πηγάδι του πλακιδίου

Αφού υπολογιζόταν η δραστηριότητα του ενζύμου, ακολουθούσε τυπική διαίρεση με την τιμή της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης ανά δείγμα, ώστε να υπολογιστεί τελικά η ειδική δραστηριότητα της GPX σε μονάδες Units/mg.

3.5 : Στατιστική Ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάσθηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Όλες οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD (standard deviation, τυπική απόκλιση). Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson, ενώ μεταξύ μεταβλητών που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή με το συντελεστή συσχέτισης Spearman. Η σύγκριση των τιμών των παραμέτρων, πριν και σε διαφόρους χρόνους μετά την παρέμβαση, έγινε με τη Friedman Rank ανάλυση. Το iAUC υπολογίσθηκε από το εμβαδόν που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης μεταβολής μίας μετρούμενης παραμέτρου και της νοητής ευθείας παράλληλης στον άξονα x, η οποία ξεκινά από την τιμή της παραμέτρου σε χρόνο 0. Οι συσχετίσεις των iAUC, μεταξύ των διαφορετικών παρεμβάσεων, έγιναν με το κριτήριο Mann-Whitney. Όλες οι αναφερόμενες τιμές πιθανοτήτων (p) βασίζονται σε αμφίπλευρους ελέγχους και συγκρίνονται στο επίπεδο σημαντικότητας του 5%.

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

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 : Εισαγωγή

Όπως αναφέρθηκε αναλυτικά στο κεφάλαιο του σκοπού της μελέτης, το πειραματικό κομμάτι αυτής της πτυχιακής εργασίας επικεντρώθηκε γύρω από τη διελεύκανση του ερωτήματος: εάν η μεταγευματική κατάσταση (και συγκεκριμένα η μεταγευματική υπεργλυκαιμία) μπορεί να επηρεάσει τις λειτουργίες των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων υγιών ατόμων. Έτσι, πραγματοποιήθηκε ένα πειραματικό πρωτόκολλο φόρτισης γλυκόζης υγιών εθελοντών, με σκοπό την επαγωγή καταστάσεων υπεργλυκαιμίας και υπερινσουλιναίμιας, οι οποίες είναι γνωστό βιβλιογραφικά πως επηρεάζουν τη δραστικότητα του ενζύμου της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης. Η τελευταία, ως βασικό αντιοξειδωτικό ένζυμο, με τη σειρά της επηρεάζει άμεσα τα επίπεδα του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες, το οποίο αποτελεί βασικό παράγοντα ενεργοποίησης των κυττάρων του ανοσοποιητικού και της αιμόστασης. Συνεπώς, μέσω της μέτρησης της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης μπορεί να γίνει σύνδεση του αντικτύπου της μεταβολής της δραστικότητάς της με τις λειτουργίες των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων των εθελοντών, με τελικό στόχο την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης που μπορεί να έχει στα κύτταρα αυτά, η συγκεκριμένη μεταγευματική υπεργλυκαιμία. Στο κεφάλαιο αυτό θα παρατεθούν τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν καθ' όλη την πειραματική διαδικασία.

4.2 : Οι εθελοντές της μελέτης

Συνολικά, συγκεντρώθηκαν 5 εθελοντές, των οποίων τα βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά παραθέτονται στον πίνακα 4.1.

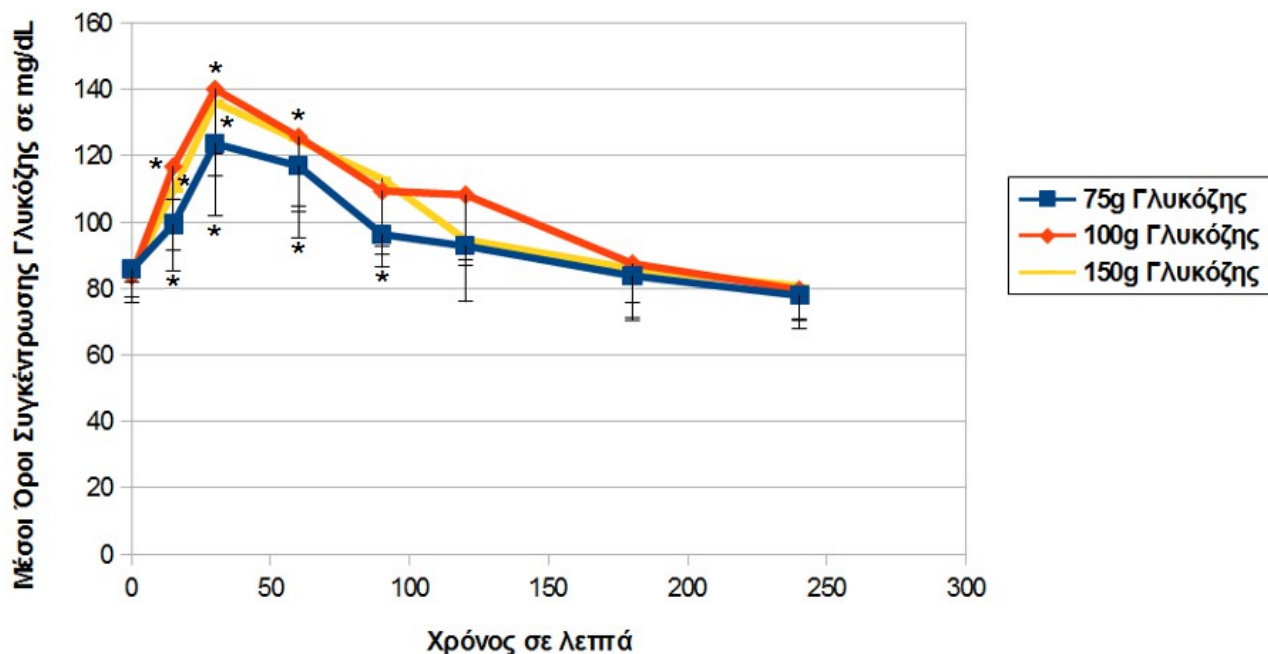
Πίνακας 4.1: Βασικά ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης στις τρεις διαφορετικές παρεμβάσεις

Παράμετρος	75 γρ (N=5)	100 γρ (N=5)	150 γρ (N=5)	p
Αντρες : Γυναίκες	2 : 3	2 : 3	2 : 3	
Ηλικία	28,4 ± 7,2	28,4 ± 7,2	28,4 ± 7,2	NS
BMI (kg/m ²)	22, ± 2,9	21,7 ± 2,7	22,0 ± 2,6	NS
DBP (mmHg)	75 ± 10	69 ± 11	73 ± 17	NS
SBP (mm Hg)	120 ± 19	110 ± 11	121 ± 24	NS
WBC (10 ³ /μL)	4,6 ± 1,1	5,0 ± 1,3	4,5 ± 1,0	NS
PLT (10 ³ /μL)	224 ± 55	199 ± 21	186 ± 32	NS
MPV (fL)	7,8 ± 0,5	7,8 ± 0,5	7,7 ± 0,4	NS
GLU_0 (mg/dl)	85 ± 4	84 ± 8	84 ± 7	NS
GLU_120 (mg/dl)	93 ± 4	108 ± 21	95 ± 19	NS
INS_0 (μIU/ml)	5,9 ± 2,4	6,4 ± 2,8	3,7 ± 2,0	NS
HOMA-IR	1,26 ± 0,54	1,32 ± 0,58	0,75 ± 0,41	NS

4.3 : Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης

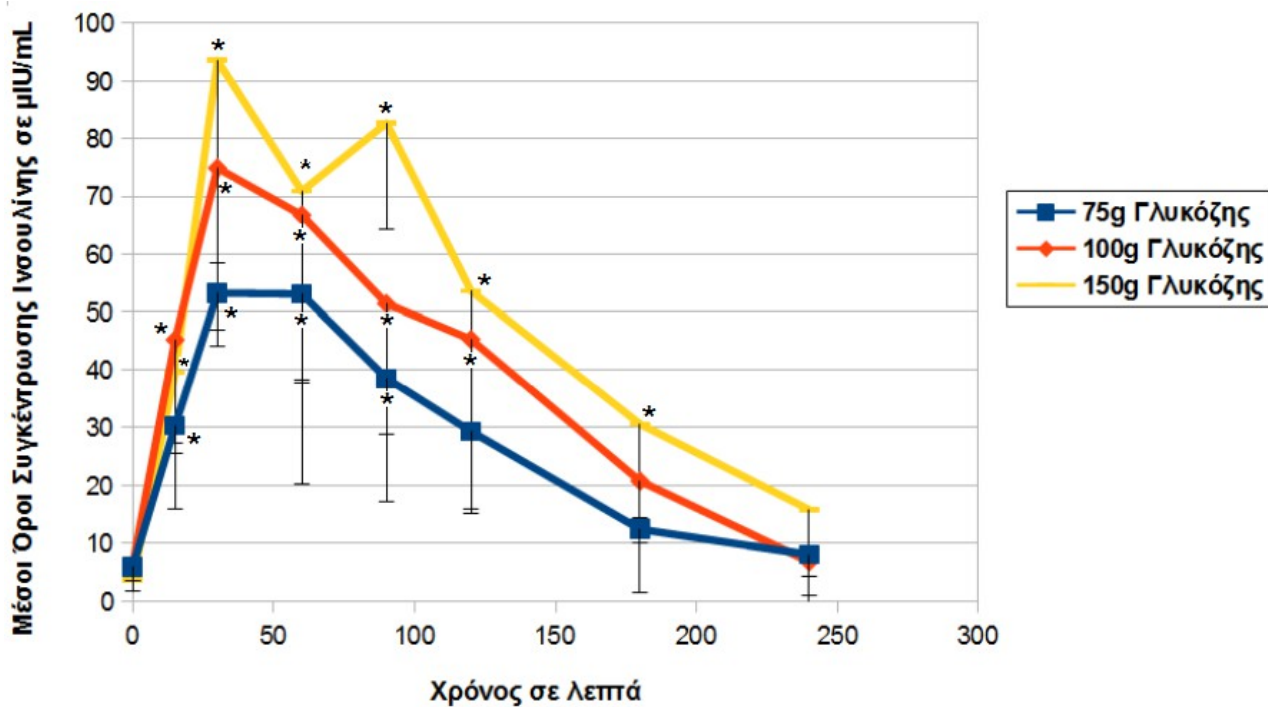
Τα διαγράμματα των μεταβολών της γλυκόζης και ινσουλίνης, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε ποσοστιαίες μεταβολές, φαίνονται στα σχήματα 4.1-4.4.

Σχήμα 4.1: Διαγράμματα Μεταβολής Απολύτων Τιμών της Γλυκόζης όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση



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

Σχήμα 4.2: Διαγράμματα Μεταβολής Απολύτων Τιμών της Ινσουλίνης όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

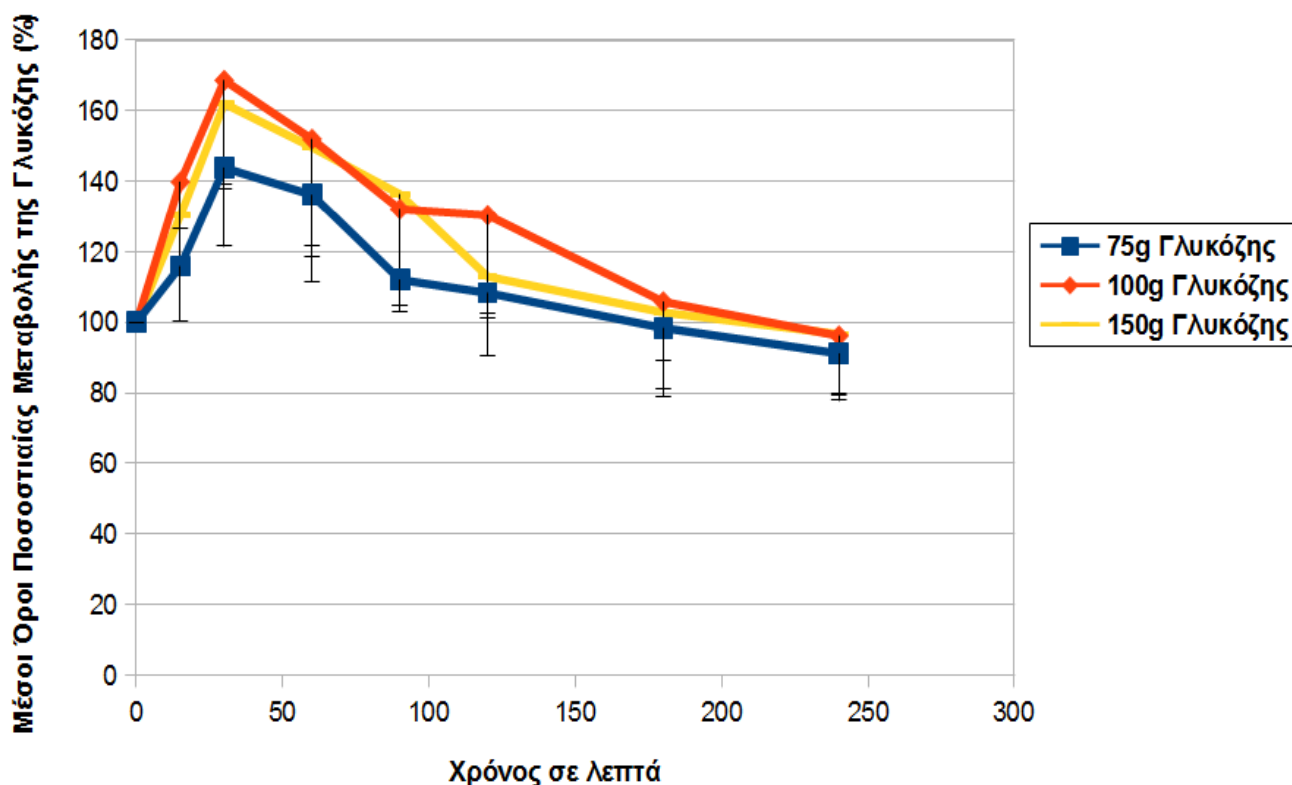


(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon)

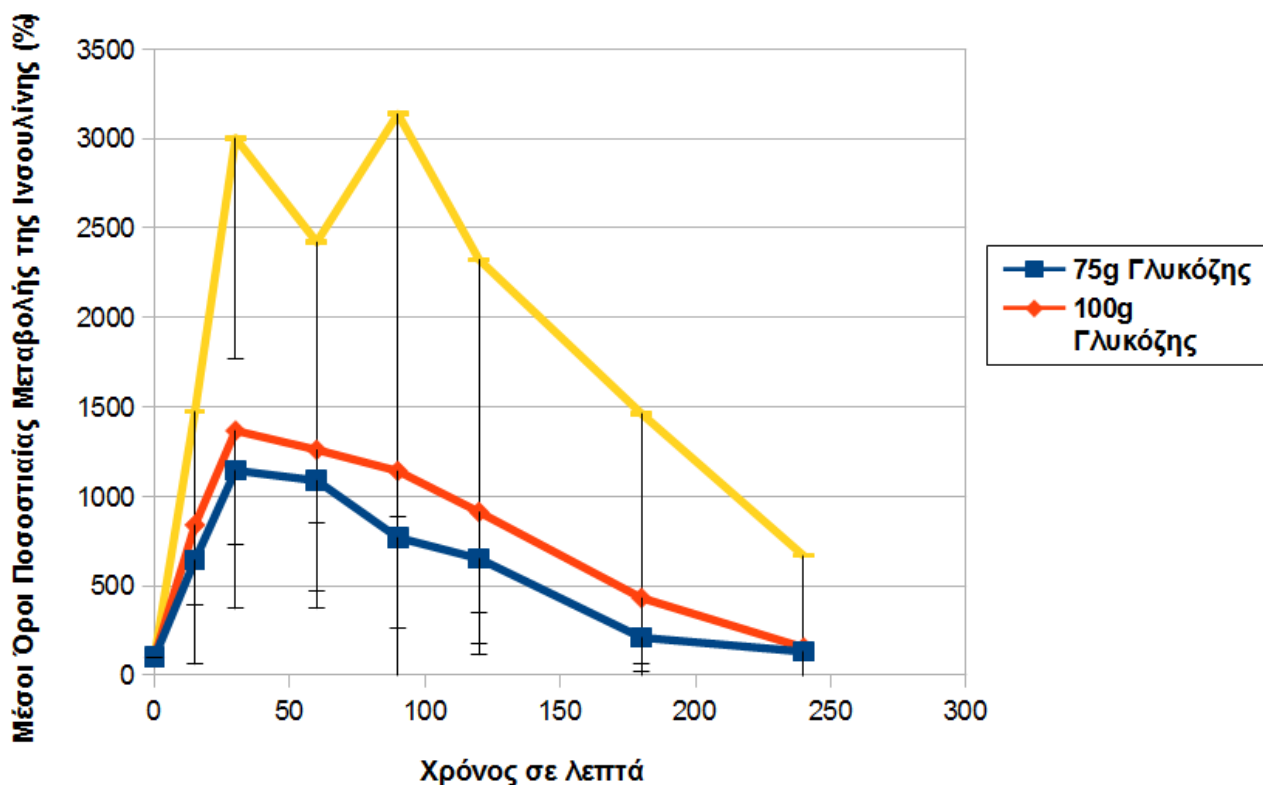
Στα διαγράμματα αυτά φαίνονται συγκεντρωτικά οι μεταβολές των τιμών των συγκεντρώσεων της γλυκόζης και της ινσουλίνης ανά κάθε χρονική στιγμή της κάθε αιμοληψίας, για καθεμία από τις τρεις παρεμβάσεις φόρτισης γλυκόζης (75g, 100g, 150g).

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

Σχήμα 4.3: Διαγράμματα Ποσοστιαίας Μεταβολής της Γλυκόζης όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

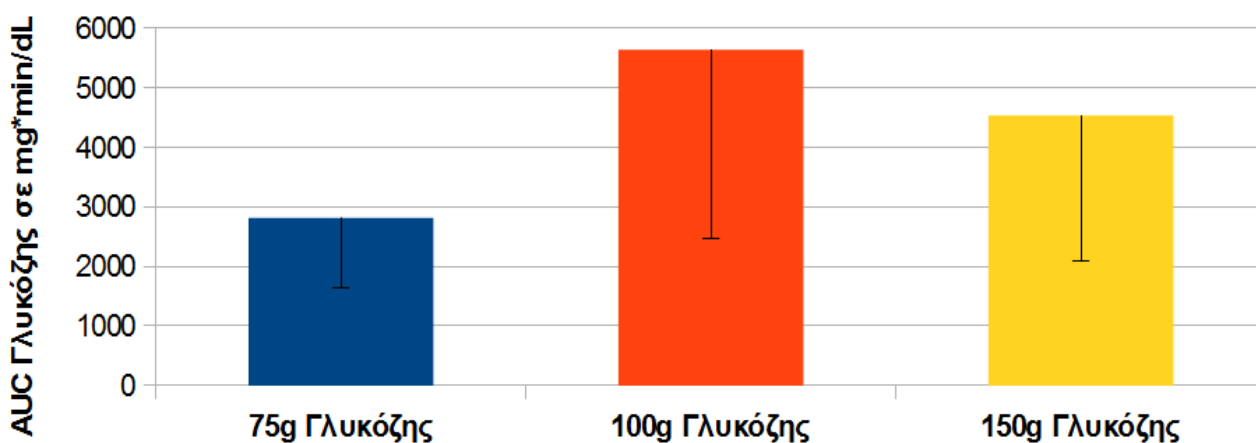


Σχήμα 4.4: Διαγράμματα Ποσοστιαίας Μεταβολής της Ινσουλίνης όλων των Εθελοντών, συναρτήσει του χρόνου για κάθε παρέμβαση

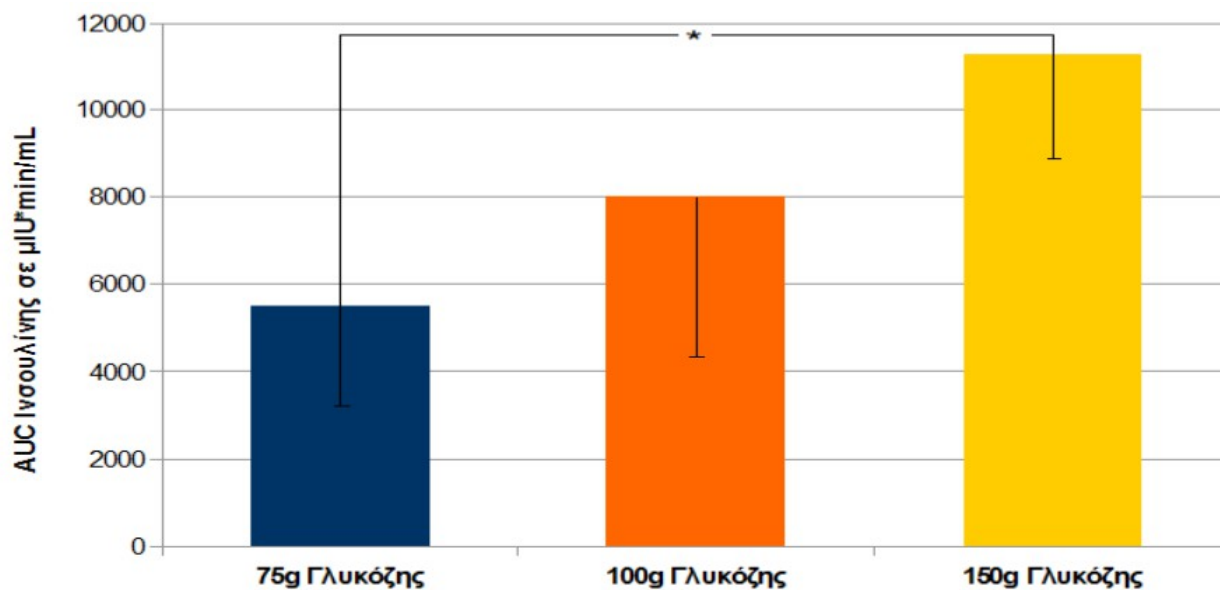


Τέλος, τα αποτελέσματα για τη γλυκόζη και την ινσουλίνη, ολοκληρώνονται με τα ραβδογράμματα, στα οποία εμφανίζονται τα “εμβαδά για την περιοχή κάτω από τις καμπύλες” (Areas Under the Curves / AUCs), υπολογισμένα με βάση τις απόλυτες τιμές κάθε μέτρησης. (Σχήματα 4.5, 4.6)

Σχήμα 4.5: Συγκριτική Παράθεση των AUC της Γλυκόζης όλων των Εθελοντών



Σχήμα 4.6: Συγκριτική Παράθεση των AUC της Ινσουλίνης όλων των Εθελοντών



(* = $p < 0,05$ σε σχέση με τις δύο παρεμβάσεις (75g και 150g), σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon)

Σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon εμφανίζεται μία οριακά σημαντική διαφορά στο iAUC της γλυκόζης, μεταξύ της φόρτισης των 75g και 150g ($p=0,080$). Συνεπώς, υπάρχει μία τάση αύξησης της υπεργλυκαιμίας με την αύξηση της φόρτισης γλυκόζης, η οποία δεν καταφέρνει όμως να είναι στατιστικά σημαντική.

Ωστόσο, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των iAUC της ινσουλίνης τόσο μεταξύ 75g-100g ($p=0,043$), όσο και μεταξύ 75g-150g ($p=0,043$), αλλά και οριακά μεταξύ 100g-150g ($p=0,080$).

4.4 : Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στις δραστικότητας GPX1 λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων

Ακολουθεί παράθεση των διαγραμμάτων της μεταβολής της δραστικότητας της ενδοκυττάριας GPX, συναρτήσει των χρονικών στιγμών των αιμοληψιών για καθεμία από τρεις παρεμβάσεις φόρτισης, για τα δείγματα των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων των εθελοντών.

4.4.1 : Διαγράμματα Μεταβολής της Δραστικότητας της GPX1 των Λευκοκυττάρων σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση

Στον πίνακα 4.2 φαίνονται οι διάμεσες τιμές (25°-75° τεταρτημόριο) των ειδικών δραστικοτήτων της GPX1 των λευκοκυττάρων στις τρεις διαφορετικές παρεμβάσεις. Αν και οι ειδικές δραστικότητες της GPX1 είχαν μεγάλες διαφορές από εθελοντή σε εθελοντή, δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των παρεμβάσεων, γεγονός που δείχνει ότι οι ειδικές δραστικότητες της GPX1 του ίδιου εθελοντή δε διέφεραν σημαντικά από παρέμβαση σε παρέμβαση.

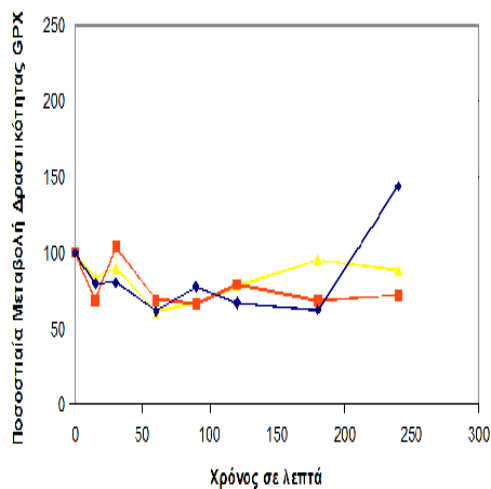
Πίνακας 4.2: Δεδομένα Διαμέσων Τιμών Ειδικών Δραστικοτήτων της GPX1 των Λευκοκυττάρων των Εθελοντών

Παρέμβαση Φόρτισης Γλυκόζης	Διάμεσες Τιμές Ειδικών Δραστικοτήτων
75g	61,3 (26,7-128,9)
100g	55,1 (35,4-110,3)
150g	65,1 (34,4-94,0)

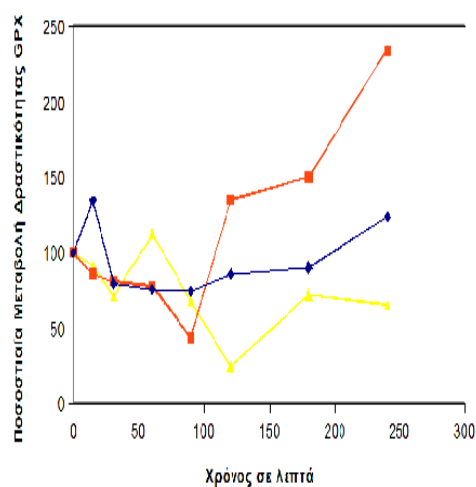
Στο Σχήμα 4.7 εμφανίζονται τα διαγράμματα μεταβολής της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων για κάθε εθελοντή.

Σχήμα 4.7: Χρονικές Μεταβολές της GPX1 των Λευκοκυττάρων ανά Εθελοντή

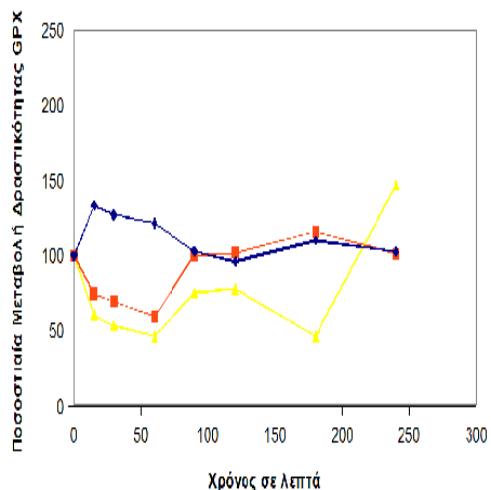
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Λευκοκύτταρα του Εθελοντή 1



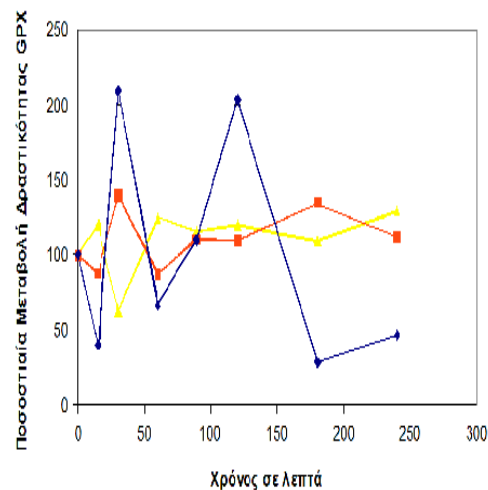
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Λευκοκύτταρα του Εθελοντή 2



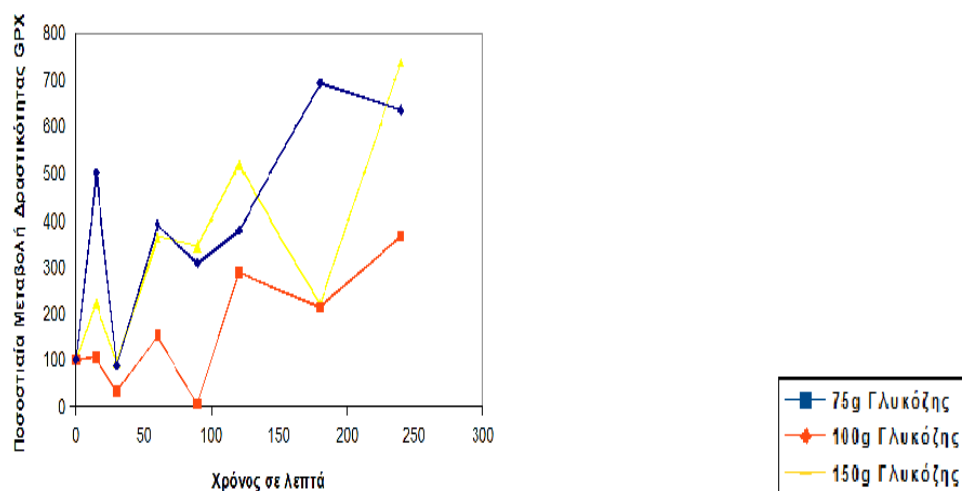
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Λευκοκύτταρα του Εθελοντή 3



Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Λευκοκύτταρα του Εθελοντή 4

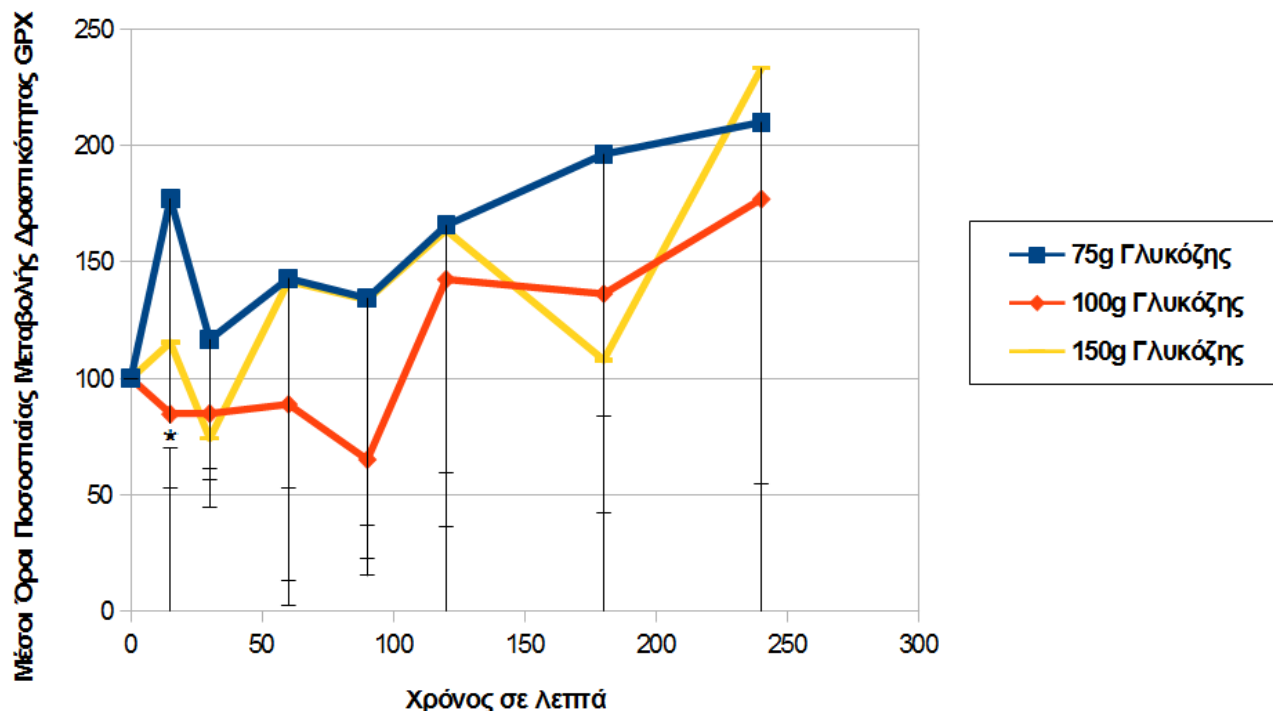


Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Λευκοκύτταρα του Εθελοντή 5



Στη συνέχεια στο σχήμα 4.8 εμφανίζονται οι μέσοι όροι των ποσοσטיαίων μεταβολών της δραστηριότητας της GPX, από τους οποίους κατασκευάστηκε η μέση ποσοσטיαία καμπύλη μεταβολής της δραστηριότητας της GPX , ανά παρέμβαση, όπως φαίνεται ακολούθως (Σχήμα 4.8):

Σχήμα 4.8: Χρονικές Ποσοσטיαίες Μεταβολές των Μέσων Τιμών της GPX1 των Λευκοκυττάρων όλων των Εθελοντών



(* = $p < 0,05$ σε σχέση με το χρόνο μηδέν, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon)

Η μη παραμετρική ανάλυση Friedman έδειξε ότι μόνο στη φόρτιση των 100g γλυκόζης υπήρχε σημαντική μεταβολή της δραστηριότητας της GPX1 στο χρόνο ($p=0,030$). Σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon, η διαφορά αυτή εντοπίζεται μεταξύ των χρόνων 0 και 15 λεπτών ($p=0,080$). Επίσης, βάσει της ανάλυσης Kruskal-Wallis, δεν υπήρχαν διαφορές στις μεταβολές της GPX1 των λευκοκυττάρων μεταξύ των παρεμβάσεων.

4.4.2 : Διαγράμματα Μεταβολής της Δραστικότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων σε σχέση με το χρόνο, ανά παρέμβαση

Για τα διαγράμματα των αιμοπεταλίων ακολουθήθηκε η ίδια ακριβώς λογική με εκείνη της κατασκευής των διαγραμμάτων των λευκοκυττάρων. Για αυτό το λόγο, τα αποτελέσματα (δεδομένα και διαγράμματα) των αιμοπεταλίων θα παρατεθούν με την ίδια ακριβώς δομή που είχαν τα αποτελέσματα στο κομμάτι των λευκοκυττάρων.

Στον πίνακα 4.3 φαίνονται οι διάμεσες τιμές (25^ο-75^ο τεταρτημόριο) των ειδικών δραστηριοτήτων της GPX1 των αιμοπεταλίων στις τρεις διαφορετικές παρεμβάσεις. Αν και οι ειδικές δραστηριότητες της GPX1 είχαν μεγάλες διαφορές από εθελοντή σε εθελοντή, δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ των παρεμβάσεων, γεγονός που δείχνει ότι οι ειδικές δραστηριότητες της GPX1 του ίδιου εθελοντή δε διέφεραν σημαντικά από παρέμβαση σε παρέμβαση.

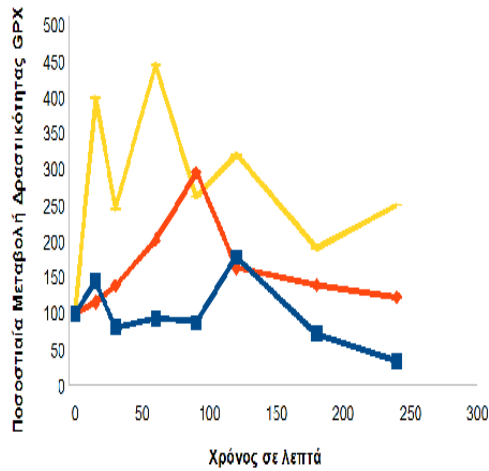
Πίνακας 4.3: Δεδομένα Διαμέσων Τιμών Δραστηριοτήτων GPX1 των Αιμοπεταλίων των Εθελοντών

Παρέμβαση Φόρτισης Γλυκόζης	Διάμεσες Τιμές Ειδικών Δραστηριοτήτων
75g	64,2 (59,6-88,9)
100g	63,8 (52,4-89,2)
150g	91,3 (35,5-101,8)

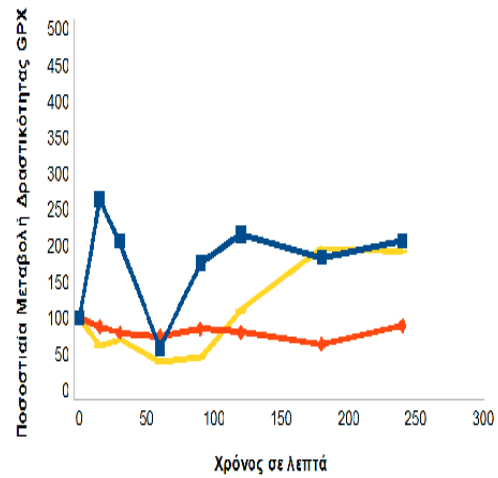
Στο Σχήμα 4.9 εμφανίζονται τα διαγράμματα μεταβολής της δραστηριότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων για κάθε εθελοντή.

Σχήμα 4.9: Χρονικές Μεταβολές της GPX1 των Αιμοπεταλίων ανά Εθελοντή

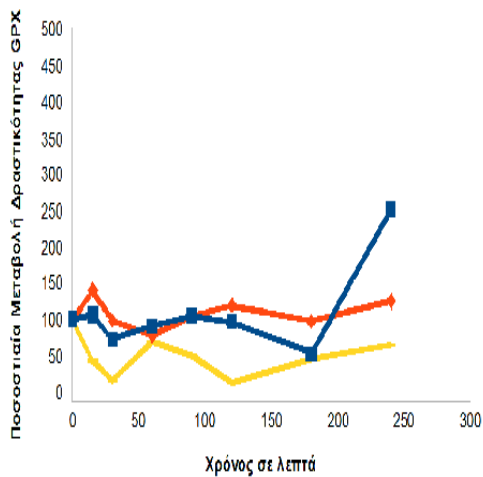
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Αιμοπετάλια του Εθελοντή 1



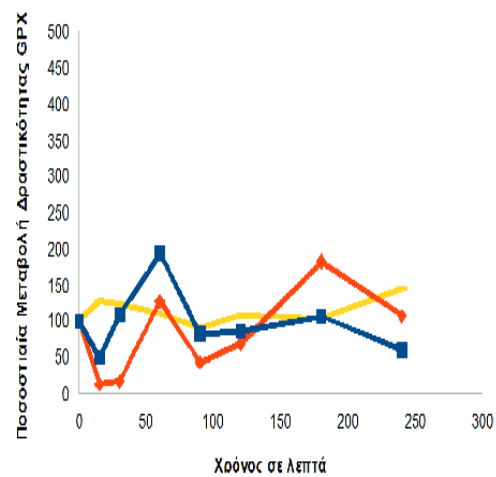
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Αιμοπετάλια του Εθελοντή 2



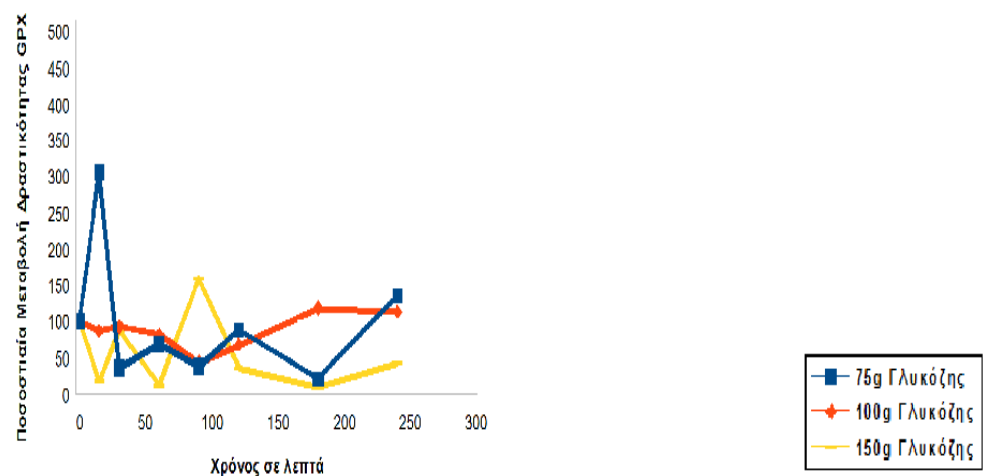
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Αιμοπετάλια του Εθελοντή 3



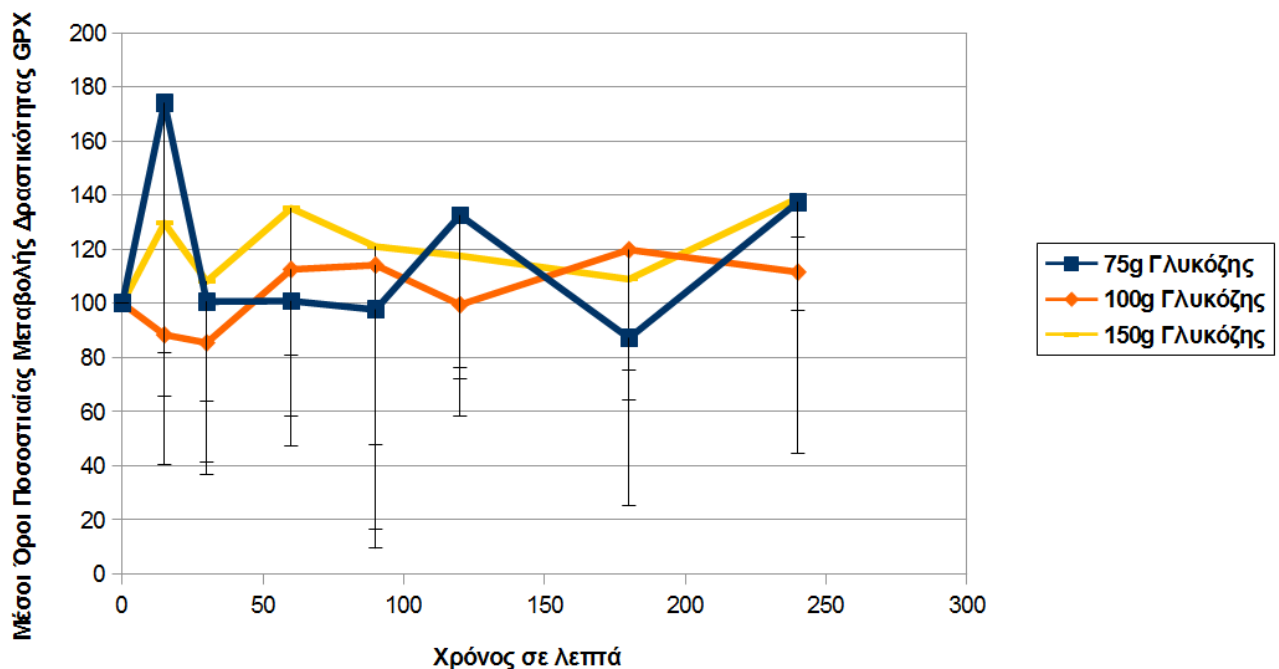
Διαγράμματα Μεταβολής της GPX4 για τα Αιμοπετάλια του Εθελοντή 4



Διαγράμματα Μεταβολής της GPX για τα Αιμοπετάλια του Εθελοντή 5



Σχήμα 4.10: Χρονικές Ποσοστιαίες Μεταβολές των Μέσων Τιμών της GPX1 των Αιμοπεταλίων όλων των Εθελοντών



Η μη παραμετρική ανάλυση Friedman έδειξε ότι δεν υπήρχε σημαντική μεταβολή της δραστικότητας της GPX1 στο χρόνο, για καμία φόρτιση γλυκόζης. Επίσης, βάσει της ανάλυσης Kruskal-Wallis δεν υπήρχαν διαφορές στις μεταβολές της GPX1 των αιμοπεταλίων μεταξύ των παρεμβάσεων.

4.5 : Συσχετίσεις

4.5.1: Βασικές Συσχετίσεις

Στα πλαίσια αύξησης της χρηστικότητας και της λειτουργικότητας των αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκαν στατιστικές συσχετίσεις, κατά τις οποίες μελετήθηκε ο βαθμός συσχέτισης της τιμής της δραστικότητας της ενδοκυττάριας GPX των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων για τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης με όλους τους υπόλοιπους βιολογικούς δείκτες και ανθρωπομετρικές μετρήσεις που έγιναν.

Από όλες αυτές, οι μόνες που αποδείχθηκαν στατιστικές σημαντικές είναι εκείνες που παραθέτονται στους ακόλουθους πίνακες.(Πίνακες 4.4, 4.5)

Πίνακας 4.4: Στατιστικά Σημαντικές Συσχετίσεις μεταξύ της GPX1 των Λευκοκυττάρων και βασικών ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

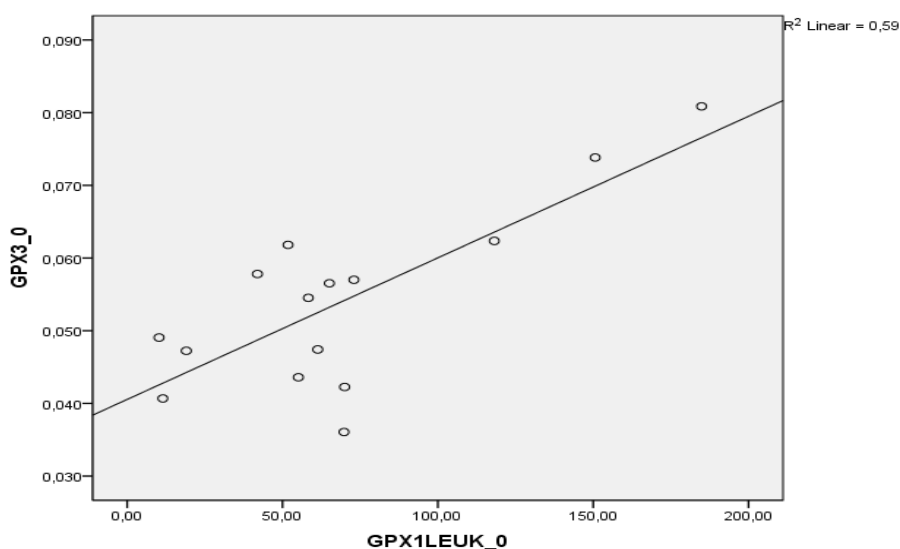
Μεταβλητή	Συντελεστής συσχέτισης r του Pearson	Επίπεδο Στατιστικής Σημαντικότητας (p)
Ηλικία	0,711	0,003
Αριθμός Ερυθροκυττάρων (RBC)	0,673	0,008
Μέση Συγκέντρωση Αιμοσφαιρίνης (MCH)	0,673	0,008
Μέσος Όγκος Ερυθροκυττάρων (MCV)	-0,699	0,002
Μέσος Όγκος Αιμοπεταλίων (MPV)	-0,515	0,059
Εύρος Κατανομής Μεγέθους Αιμοπεταλίων (PDW)	-0,557	0,038
EC ₅₀ του ADP	0,511	0,052
GPX1 των αιμοπεταλίων	-0,586	0,022
GPX3	0,768	0,001

Πίνακας 4.5: Στατιστικά Σημαντικές Συσχετίσεις μεταξύ της GPX1 των Αιμοπεταλίων και βασικών ανθρωπομετρικών και βιοχημικών χαρακτηριστικών των εθελοντών για τη χρονική στιγμή μηδέν των παρεμβάσεων

Μεταβλητή	Συντελεστής συσχέτισης r του Pearson	Επίπεδο Στατιστικής Σημαντικότητας (p)
Ηλικία	-0,593	0,020
Αριθμός Ερυθροκυττάρων (RBC)	-0,589	0,027
EC ₅₀ του ADP	-0,638	0,010
EC ₅₀ του TRAP	-0,546	0,035
GPX1 των λευκοκυττάρων	-0,586	0,022

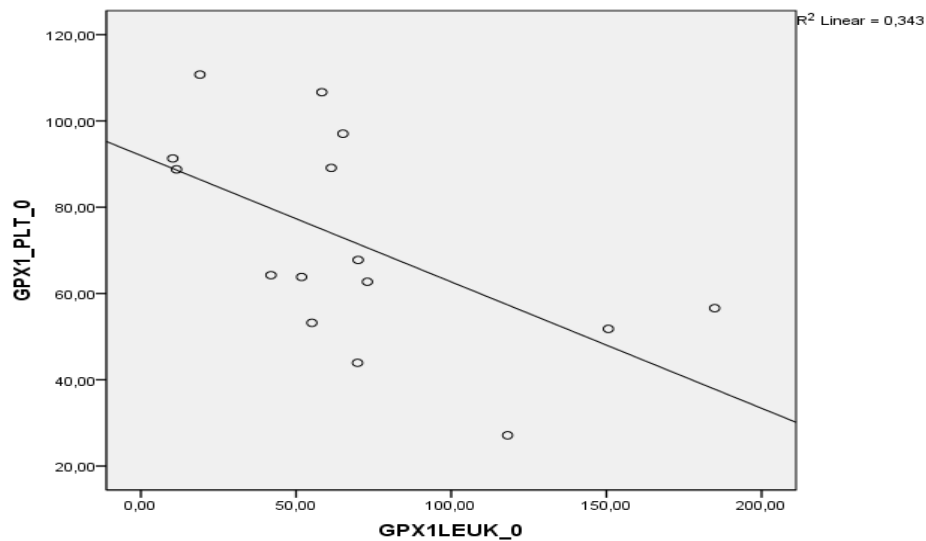
Στη συνέχεια, επισυνάπτονται και τα αντίστοιχα διαγράμματα διασποράς (scatterplots) μερικών εκ των παραπάνω συσχετίσεων. (Σχήματα 4.11, 4.12, 4.13, 4.14)

Σχήμα 4.11: Διάγραμμα Διασποράς της GPX1 των Λευκοκυττάρων και της GPX3 των Εθελοντών (t₀)



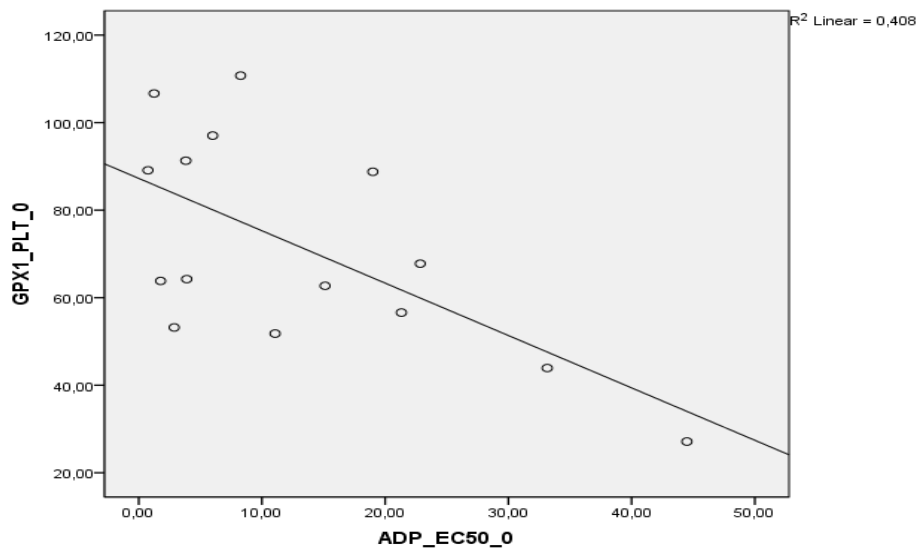
(όπου GPX1LEUK_0 = η ενδοκυττάρια GPX των λευκοκυττάρων τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης, GPX3_0 = η εξωκυττάρια GPX τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης)

Σχήμα 4.12: Διάγραμμα Διασποράς της GPX1 των Λευκοκυττάρων και της GPX1 των Αιμοπεταλίων των Εθελοντών (t_0)



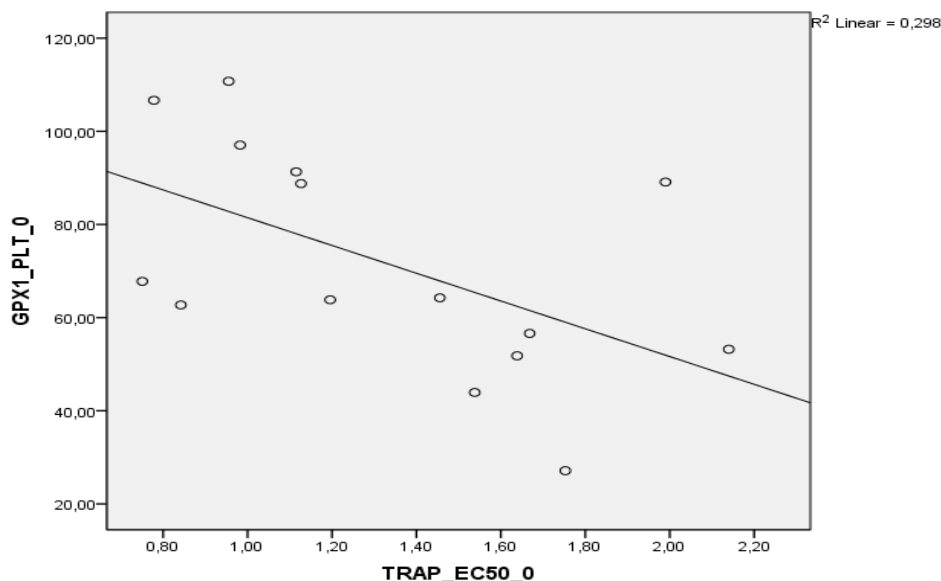
(όπου GPX1LEUK_0 = η ενδοκυττάρια GPX των λευκοκυττάρων τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης, GPX1_PLT_0 = η ενδοκυττάρια GPX των αιμοπεταλίων τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης)

Σχήμα 4.13: Διάγραμμα Διασποράς του EC_{50} του ADP και της GPX1 των Αιμοπεταλίων των Εθελοντών (t_0)



(όπου GPX1_PLT_0 = η ενδοκυττάρια GPX των αιμοπεταλίων τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης, ADP_EC50_0 = ο δείκτης EC_{50} του ενεργοποιητικού αιμοπεταλιακού παράγοντα ADP για τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης)

Σχήμα 4.14: Διάγραμμα Διασποράς του EC_{50} του TRAP και της GPX1 των Αιμοπεταλίων των Εθελοντών (t_0)



(όπου GPX1_PLT_0 = η ενδοκυττάρια GPX των αιμοπεταλίων τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης, TRAP_EC50_0 = ο δείκτης EC_{50} του ενεργοποιητικού αιμοπεταλιακού παράγοντα TRAP για τη χρονική στιγμή μηδέν κάθε παρέμβασης)

4.5.2: Περαιτέρω Συσχετίσεις

Επίδραση των αρχικών επιπέδων της GPX1 των λευκοκυττάρων και της GPX1 των αιμοπεταλίων στη μεταγευματική απόκριση του οργανισμού

Συσχετίσεις Spearman μεταξύ των αρχικών επιπέδων των GPX1 των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων με τις ποσοστιαίες μεταβολές της γλυκόζης και της ινσουλίνης, όπως και με τα αντίστοιχα AUC, δεν έδειξαν ότι τα αρχικά επίπεδα του ενζύμου σχετίζονται με τη μεταγευματική υπεργλυκαιμία και υπερινσουλιναιμία.

Επιπλέον, συσχετίσεις των αρχικών επιπέδων της GPX1 των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων με τα ποσοστά μεταβολών των δεικτών EC_{50} έδειξαν ότι μόνο η GPX1 των λευκοκυττάρων, και για τη φόρτιση των 150g γλυκόζης, σχετίζεται αρνητικά με την ποσοστιαία μεταβολή του EC_{50} του ADP στα 90 λεπτά ($\rho = -0,900$ / $p = 0,037$).

Επίδραση των μεταβολών της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων με τις μεταβολές της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων

Συσχετίσεις μεταξύ των ποσοστιαίων μεταβολών της GPX1 των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων και των ποσοστιαίων μεταβολών των δεικτών EC_{50} του ADP και του TRAP, σε κάθε χρονική στιγμή, δεν έδειξαν ότι οι μεταβολές των δραστικότητων των GPX1 επηρεάζουν τις μεταβολές των δεικτών EC_{50} .

4.5.3: Ειδικές Συσχετίσεις (Παλινδρομήσεις)

Σε μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης, η συσχέτιση της GPX1 των λευκοκυττάρων με τη GPX1 των αιμοπεταλίων χάνεται, όταν χρησιμοποιηθεί ως συγχυτικός παράγοντας η ηλικία. Αντιθέτως, η θετική συσχέτιση μεταξύ της GPX1 των λευκοκυττάρων και της GPX3 δε χάνεται, χρησιμοποιώντας ως συγχυτικό παράγοντα την ηλικία. Όσο για τη συσχέτιση της GPX1 των λευκοκυττάρων με τον αριθμό των ερυθροκυττάρων, φαίνεται πως διατηρείται παρουσία της ηλικίας, αλλά δεν μπορεί να ειπωθεί το ίδιο για τη συσχέτιση μεταξύ της GPX1 των λευκοκυττάρων και του μέσου όγκου αιμοπεταλίων, η οποία χάνεται συνυπολογίζοντας τον παράγοντα της ηλικίας.

Αναφορικά με τη GPX1 των αιμοπεταλίων, βρέθηκε πως η συσχέτισή της με το δείκτη EC_{50} του ADP χάνεται με την παρουσία του συγχυτικού παράγοντα της ηλικίας. Ωστόσο, η συσχέτιση της GPX1 των αιμοπεταλίων με το δείκτη EC_{50} του TRAP δε χάνεται ούτε στην περίπτωση που συνυπολογίζεται ως συγχυτικός παράγοντας η ηλικία ούτε όταν συνδυάζονται η ηλικία και η GPX3 μαζί στο μοντέλο της παλινδρόμησης, ως συγχυτικοί παράγοντες.

Ενδεικτικά, παραθέτονται τα δεδομένα των συντελεστών γραμμικής παλινδρόμησης που υπολογίστηκαν σχετικά με το δείκτη EC_{50} του TRAP στον πίνακα 4.6 που ακολουθεί.

Πίνακας 4.6: Δεδομένα Μοντέλου Πολλαπλής Γραμμικής Παλινδρόμησης με το δείκτη EC_{50} του TRAP ως εξαρτημένη μεταβλητή.

	Δείκτης EC_{50} του TRAP (μM)		
	Συντελεστής Γραμμικής Παλινδρόμησης (B)	Τυπικό Σφάλμα (Standard Error)	Επίπεδο Στατιστικής Σημαντικότητας (p)
Ηλικία (σε χρόνια)	-0,65	0,050	0,233
BMI (Kg/m^2)	-0,055	0,108	0,627
GPX3	21,51	0,419	0,293
RBC	-0,178	0,446	0,700
GPX1 Αιμοπεταλίων	-0,021	0,009	0,057

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στο τελευταίο κεφάλαιο αυτής της πτυχιακής εργασίας, θα πραγματοποιηθεί σχολιασμός των ευρημάτων που παρατέθηκαν στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων, όπως και μία γενικότερη αποτίμηση της μελέτης που εξετάστηκε.

5.1 : Επίδραση της φόρτισης γλυκόζης στις μεταβολές γλυκόζης - ινσουλίνης

Η απεικόνιση των μεταβολών της γλυκόζης, τόσο για τις απόλυτες τιμές της όσο και για τις ποσοστιαίες, ακολούθησε την κλασική παραβολική καμπύλη μεταβολής γλυκόζης που είναι γνωστή από τη βιβλιογραφία. Όπως προέκυψε από τις μη παραμετρικές συγκρίσεις των τριών καμπυλών, δεν παρατηρήθηκε διαφορά μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης των εθελοντών. Αυτή η παρατήρηση είναι πιο εμφανής από τα ραβδόγραμματα των iAUC της γλυκόζης, βάσει των οποίων ενισχύεται το συμπέρασμα πως το πρωτόκολλο που σχεδιάστηκε δεν κατάφερε να διαφοροποιήσει γλυκαιμικά τις τρεις παρεμβάσεις φόρτισης.

Αναφορικά με τις καμπύλες μεταβολής της ινσουλίνης των εθελοντών, ομοίως παρατηρείται πως εμφανίζουν τη φυσιολογική παραβολική καμπύλη μεταβολής ινσουλίνης που επαληθεύεται από τη βιβλιογραφία. Βάσει των στατιστικών συγκρίσεων των τριών παρεμβάσεων φόρτισης ως προς τα μεταγευματικά επίπεδα της ινσουλίνης των εθελοντών, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση, μόνο όμως μεταξύ της παρέμβασης της κατανάλωσης των 75g γλυκόζης συγκριτικά με εκείνη των 150g. Το τελευταίο εύρημα οπτικοποιείται εμφανέστατα από το ραβδόγραμμα των iAUC της ινσουλίνης. Συνεπώς, διεξάγεται το συμπέρασμα πως αυτό που ουσιαστικά κατάφερε να επιτύχει το πειραματικό πρωτόκολλο της μελέτης αυτής, ήταν να προκαλέσει διαφοροποιήσεις στην υπερινσουλιναιμία και όχι στην υπεργλυκαιμία, μέσω των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης.

Βεβαίως, τα συμπεράσματα αυτά δεν προκαλούν έκπληξη, αφού μιας και το ανθρώπινο δυναμικό των εθελοντών της μελέτης αποτελούταν από υγιή άτομα, είναι αναμενόμενο αυτά τα άτομα να χαρακτηρίζονται από εύρυθμους μηχανισμούς μεταβολικής ομοιόστασης. Ως εκ τούτου, όσο περισσότερη γλυκόζη τους δινόταν να καταναλώσουν,

τόση περισσότερη ινσουλίνη παρήγαγε το πάγκρεάς τους, με σκοπό να μειωθούν τα προβλεπόμενα αυξημένα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης στην κυκλοφορία. Άλλωστε για αυτό και παρατηρείται μία γραμμική τάση αύξησης της μεταγευματικής έκκρισης ινσουλίνης αναλογικά με τη βαρύτητα φόρτισης της κάθε παρέμβασης, όπως φαίνεται στο ραβδόγραμμα του iAUC της ινσουλίνης.

5.2 : Σχολιασμός Αποτελεσμάτων Διαγραμμάτων της GPX των Λευκοκυττάρων

Όσον αφορά το κάθε διάγραμμα για κάθε εθελοντή, παρατηρείται πως δεν εμφανίζεται μία ξεκάθαρη τάση μεταβολής της δραστηριότητας της GPX1, αναλογικά με το χρόνο ανά παρέμβαση. Δυστυχώς, ο αριθμός του δείγματος της μελέτης είναι μικρός για να μπορούν να διεξαχθούν ασφαλή και διακριτά πρότυπα μεταβολών της GPX, ανά παρέμβαση. Επιπροσθέτως, κάθε άνθρωπος χαρακτηρίζεται από τη δική του ξεχωριστή οργανική μοναδικότητα που τον διαφοροποιεί από τους άλλους και αν και κατά τη γενικότερη πλειοψηφία των βιολογικών φαινομένων οι μηχανισμοί που ακολουθούνται είναι ίδιοι, έχει παρατηρηθεί πως εκφράζονται με διαφορετικό τρόπο σε κάθε άνθρωπο. Αυτό σε συνδυασμό με το μικρό δείγμα της μελέτης δικαιολογεί τη διαφοροποίηση που παρατηρείται. Ακόμη, τα επίπεδα και η δραστηριότητα της GPX1 των λευκοκυττάρων μπορούν εύκολα να μεταβληθούν ανά άνθρωπο, αναλόγως το πρόσφατο ιστορικό λοιμώξεων του κάθε ανθρώπου, τις διατροφικές του συνήθειες, τυχόν αλλεργίες [37] που μπορεί να έχει, την εποχή που διεξήχθη το πείραμα ή και ακόμα αναλόγως το πόσο ξεκούραστος ή όχι είναι τη στιγμή του πειράματος [38,39]. Αναλογιζόμενοι, λοιπόν, όλες αυτές τις επιφυλάξεις διεξαγωγής συμπερασμάτων για πιθανούς τρόπους μεταβολής της λευκοκυτταρικής GPX1, θα ήταν καλό να είναι ξεκαθαρισμένο ότι τα όποια συμπερασματικά σχόλια από τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής και φειδούς ως προς τη γενικευσιμότητά τους.

Παρ' όλα αυτά είναι αναγκαίο να αναφερθεί πως παρατηρείται, κατά γενική ομολογία, μία σχετική τάση αρχικής μείωσης της δραστηριότητας της GPX των λευκοκυττάρων κατά τους αρχικούς χρόνους, η οποία ακολουθείται από αυξομειώσεις που τείνουν να καταλήξουν σε μία αύξηση της δραστηριότητας της GPX των λευκοκυττάρων κατά τους τελευταίους χρόνους, ανά παρέμβαση. Μάλιστα, η (αυξομειώμενη) ανοδική τάση είναι λίγο πιο ξεκάθαρη στο συγκεντρωτικό διάγραμμα των μέσων όρων των ποσοστιαίων

μεταβολών. Ακόμη, παρατηρείται πως τη μεγαλύτερη δραστικότητα εμφανίζουν τα σημεία της καμπύλης της παρέμβασης της κατανάλωσης των 75g γλυκόζης, καθώς κυμαίνονται σε υψηλότερα επίπεδα τιμών συγκριτικά με τα σημεία των υπολοίπων παρεμβάσεων. Για τις υπόλοιπες δύο παρεμβάσεις, δεν μπορεί να διεξαχθεί ένα ξεκάθαρο συμπέρασμα για τη σχετική θέση των καμπυλών τους ανά παρέμβαση.

Από τις παραπάνω παρατηρήσεις, θα μπορούσε να ειπωθεί, με μεγάλη επιφύλαξη όμως, πως ίσως αρχικά να εμφανίζεται μία μείωση της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων, λόγω του πρώτου κύματος ινσουλίνης που εκκρίνεται από τον οργανισμό, ενώ ακόμα η γλυκόζη αρχίζει να απορροφάται από το εντερικό επιθήλιο. Η μείωση αυτή συνεχίζεται, καθώς το δεύτερο κύμα έκκρισης ινσουλίνης έπεται του πρώτου [40]. Είναι σημαντικό να τονισθεί πως στον οργανισμό μεταγευματικά η ινσουλίνη εκκρίνεται σε δύο “κύματα”, ένα το οποίο διεγείρεται από ιντεργκρίνες, ενώ η τροφή διασχίζει τον γαστρεντερικό σωλήνα (“προετοιμαστικό κύμα”) και ένα το οποίο εκκρίνεται όταν η γλυκόζη της τροφής εισέλθει στην αιματική κυκλοφορία [26]. Όταν ολοκληρώνεται το έργο του δεύτερου κύματος και η γλυκόζης πλέον εισέρχεται με αισθητό ρυθμό εντός των διαφόρων κυττάρων του οργανισμού (συμπεριλαμβανομένων και των λευκοκυττάρων), αρχίζει παράλληλα η “υπερφόρτωσή” τους με αναγωγικά ισοδύναμα που οδηγεί, σύμφωνα με βιβλιογραφικές πηγές από το θεωρητικό κομμάτι, σε διαρροή ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των κυττάρων και άρα επαγωγή καταστάσεων οξειδωτικού στρες. Το οξειδωτικό στρες λειτουργεί ως διεγέρτης των κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος (λευκοκυττάρων) και συνάμα συντελεί στην παραγωγή ελευθέρων ριζών. Ως ομοιοστατική αντίδραση, ενεργοποιούνται γονίδια παραγωγής αντιοξειδωτικών μορίων και ενζύμων από τα λευκοκύτταρα για να καταστείλουν το οξειδωτικό φαινόμενο και να προστατέψουν τα κύτταρα από ζημιές και την υπερβολική τους διέγερση [6,7]. Στο τελευταίο, πιθανότατα να οφείλεται και η τελική αύξηση των αυξομειώσεων που παρατηρείται για τη δραστικότητα της GPX των λευκοκυττάρων, αφού η δραστικότητά της εξαρτάται άμεσα από τη διαθέσιμη ποσότητά της. Έτσι, εμφανίζονται τελικά επίπεδα δραστικότητας της GPX μεγαλύτερα των αρχικών. Εάν γίνονταν μετρήσεις σε χρονικές στιγμές ύστερες των 240 λεπτών, ίσως να παρατηρούνταν επαναφορά της δραστικότητας της GPX στα αρχικά της επίπεδα, καθώς με το πέρας του χρόνου επέρχεται ξανά η οξειδοαναγωγική ισορροπία στον οργανισμό. Οι ενδιάμεσες διακυμάνσεις της δραστικότητας, ίσως να οφείλονται στην “πάλη” μεταξύ των επιδράσεων της μεταγευματικής γλυκαιμίας και της παράλληλης ενεργοποίησης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των λευκοκυττάρων, κάτι που διαφοροποιείται ως προς την ευαισθησία

επίδρασής του ανά άτομο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως όλοι αυτοί οι μηχανισμοί, όντας πολύπλοκοι και με πολλαπλά στάδια, ίσως να καθυστερούν να συμβαδίσουν με τα διαγράμματα γλυκόζης και ινσουλίνης και για αυτό μάλλον είναι και εμφανίσιμοι διαγραμματικά σε μετέπειτα χρόνους.

Επιπλέον, πιθανότατα τα 75g γλυκόζης να εμφανίζουν στην πλειοψηφία των εθελοντών τις μεγαλύτερες τιμές δραστηριότητας, συγκριτικά με τις υπόλοιπες παρεμβάσεις, επειδή (ως η λιγότερη χορηγούμενη ποσότητα γλυκόζης) χαρακτηρίζονται από τη μικρότερη γλυκαιμική επιβάρυνση του οργανισμού μεταγευματικά και άρα από τη μικρότερη οξειδωτική επιβάρυνση και λευκοκυτταρική διέγερση.

Ολοκληρώνοντας το σχολιασμό για τα αποτελέσματα της μεταγευματικής μεταβολής της δραστηριότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων, είναι σημαντικό να σημειωθεί πως αν και υπήρξαν κάποιες στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ κάποιων χρονικών στιγμών, αυτές πιθανολογούνται ότι οφείλονται στο μικρό αριθμό του δείγματος της μελέτης, αφού ένα δείγμα μικρού πλήθους είναι ικανό πολλές φορές να επηρεάσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων ενός στατιστικού κριτηρίου. Άλλωστε, στα επιμέρους διαγράμματα των εθελοντών, γενικά παρατηρούνται σε αρκετά σημεία ακραίες μεταβολές δραστηριότητας που υποδηλώνουν μία υπολογίσιμη αστάθεια και ποικιλομορφία του φαινομένου, η οποία δε συσχετίζεται λογικά με μερικές στατιστικά σημαντικές διαφορές, οι οποίες ίσως απλώς να στηρίζονται στο ότι κάποιες εκ των τιμών των μέσων όρων δεν εμφανίζουν πολύ μεγάλη τυπική απόκλιση μεταξύ τους.

5.3 : Σχολιασμός Αποτελεσμάτων Διαγραμμάτων της GPX των Αιμοπεταλίων

Όσον αφορά τα διαγράμματα των αιμοπεταλίων, πρέπει πάλι να ληφθούν υπ' όψιν οι ίδιοι περιορισμοί που αναλύθηκαν στα λευκοκύτταρα, οι οποίοι βασίζονται κυρίως στο μικρό δείγμα των εθελοντών.

Βέβαια, στα διαγράμματα των αιμοπεταλίων του κάθε εθελοντή παρατηρούνται πολύ μεγαλύτερες διαφοροποιήσεις διακυμάνσεων των τιμών μεταβολής της GPX, συγκριτικά με εκείνες που εμφανίζονταν στα αντίστοιχα διαγράμματα της δραστηριότητας του ενζύμου για τα λευκοκύτταρα. Έτσι, δυστυχώς δεν μπορεί να διεξαχθεί κάποια ξεκάθαρη λογική / τάση που να ακολουθούν οι γραφικές παραστάσεις, ούτε από τη μία χρονική στιγμή στην επόμενη ούτε ανά παρέμβαση. Για άλλη μία φορά η ιδιοσυγκρασία του κάθε ανθρώπου αναφορικά με ένα τόσο ευαίσθητο και μικρής κλίμακας φαινόμενο,

προκαλεί τόση ποικιλομορφία στα διαγράμματα που είναι αδύνατο όμως αυτή τη φορά να διεξαχθεί κάποιο συμπερασματικό σχόλιο για το μοτίβο που ίσως να ακολουθούν τα πειραματικά δεδομένα που συλλέχθηκαν.

Σε δεύτερο επίπεδο, θα μπορούσε βέβαια να ειπωθεί πως αν και υπάρχουν αρκετές και ανόμοιες αυξομειώσεις ανά εθελοντή και τα στατιστικά τεστ σύγκρισης των συγκεντρωτικών αποτελεσμάτων δεν εμφάνισαν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των χρονικών στιγμών ή των παρεμβάσεων, αξίζει να αναφερθεί πως αν παρατηρηθεί το κάθε διάγραμμα του κάθε εθελοντή ξεχωριστά, υπάρχουν κάποιες ακραίες μεταβολές τιμών που συγκριτικά με τις υπόλοιπες τριγύρω τους (είτε χρονικά είτε ανά παρέμβαση) διαφέρουν αισθητά, παρ' όλο που αυτή η διαφορά δεν μπορεί να επικυρωθεί στατιστικά. Το τελευταίο ισχύει και για τις μεταβολές της δραστηριότητας των λευκοκυττάρων των εθελοντών, για ορισμένα σημεία. Φυσικά και πάλι δεν μπορούν να διεξαχθούν ξεκάθαρα συμπεράσματα, καθώς με τόσο μικρό δείγμα εθελοντών, η διαφορετικότητα του κάθε εθελοντή επηρεάζει πολύ τα τελικά διαγράμματα και συγκρίσεις.

5.4 : Σχολιασμός Αποτελεσμάτων των Συσχετίσεων

Αρχικά, παρατηρείται ότι όλοι οι συντελεστές συσχέτισης κυμαίνονται από 0,5 μέχρι 0,7 περίπου, τιμές που καθιστούν τις συσχετίσεις των μεταβλητών ελαφριά προς μέτρια ισχυρές.

5.4.1 : Σχολιασμοί Συσχετίσεων Δραστηριότητας GPX1 των Λευκοκυττάρων των Εθελοντών σε χρόνο μηδέν

Αναφορικά με τις συσχετίσεις της GPX1 των λευκοκυττάρων των εθελοντών, η πρώτη και από τις πιο ισχυρές θετικές συσχετίσεις που βρέθηκε ήταν εκείνη με την ηλικία των εθελοντών. Αυτό σημαίνει ότι η GPX1 των λευκοκυττάρων σχετίζεται θετικά με την ηλικία των ατόμων. Ωστόσο, το δείγμα της ήταν μικρό και με ηλικιακό εύρος 21-35 έτη. Αυτό χαρακτηρίζει το εύρημα από επιφυλακτικότητα, καθώς δεν μπορεί να γενικευτεί σε όλο το ηλικιακό εύρος των ανθρώπων. Πρέπει να τονιστεί ότι ο μεγαλύτερος σε ηλικία εθελοντής ήταν πρώην καπνιστής και αυτό μπορεί να οδήγησε σε ομοιοστατική αύξηση της GPX1 προς αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες, δεδομένου ότι υψηλά επίπεδα GPX1 πρέπει να θεωρούνται μάλλον δείκτης αυξημένου οξειδωτικού στρες.

Οι συσχετίσεις της GPX1 των λευκοκυττάρων με τα αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών (RBC, MCH, MCV) δεν μπορούν με μία πρώτη ματιά να ερμηνευτούν και ούτε έχει αναφερθεί κάτι αντίστοιχο στη βιβλιογραφία. Ωστόσο, υπάρχει μία μικρή

περίπτωση η θετική συσχέτιση μεταξύ της GPX1 των λευκοκυττάρων και του αριθμού των ερυθροκυττάρων να οφείλεται στη μεθοδολογία και στη συνεισφορά της GPX1 των ερυθροκυττάρων στη δραστικότητα της GPX1 των λευκοκυττάρων, εάν το lysis buffer δεν μπορεί να διαλυτοποιήσει 100% τα εναπομείναντα ερυθροκύτταρα στο ίζημα των λευκοκυττάρων. Αυτό μπορεί να διαφανεί μόνο εφόσον συσχετιστεί η δραστικότητα της GPX1 στο ίζημα των λευκοκυττάρων με τη συγκέντρωση αιμοσφαιρίνης εκεί.

Ωστόσο, η πάρα πολύ οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0,059$) αρνητική σχέση μεταξύ της GPX1 των λευκοκυττάρων και του MPV μπορεί να αποδοθεί ως εξής: η συγκέντρωση της GPX1 των λευκοκυττάρων συσχετίζεται θετικά με το δείκτη EC_{50} του ADP (όπως αναφέρεται παρακάτω) που σημαίνει πως υψηλή συγκέντρωση της GPX1 των λευκοκυττάρων συνεπάγεται μείωση της δραστικότητας των αιμοπεταλίων και δεδομένου ότι ο MPV είναι ένας αδρός δείκτης της δραστικότητας των αιμοπεταλίων, μπορεί να εξηγηθεί η αρνητική αυτή σχέση μεταξύ λευκοκυτταρικής GPX1 και MPV.

Έπειτα, παρατηρείται θετική συσχέτιση της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων με το EC_{50} του ADP για τα αιμοπετάλια. Η οριακά στατιστικά σημαντική ($p=0,052$) θετική αυτή συσχέτιση σημαίνει ότι μεγαλύτερη δραστικότητα GPX1 των λευκοκυττάρων συνεπάγεται περισσότερη απαιτούμενη ποσότητα ADP για τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ή με άλλα λόγια πιο αδρανή αιμοπετάλια. Αυτό επαληθεύεται από τη λογική που αναλύθηκε και πιο πάνω, δεδομένου ότι ακολουθείται αρνητική συσχέτιση της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων και της δραστικότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων. Συμπληρωματικά, αξίζει να σχολιαστεί το εύρημα της σχετικής παλινδρόμησης που δείχνει πως, τουλάχιστον για τη φόρτιση των 150g, οι άνθρωποι που έχουν αυξημένη δραστικότητα της GPX1 των λευκοκυττάρων τους εμφανίζουν μεγαλύτερη μεταγευματική μείωση των επιπέδων του δείκτη EC_{50} .

Η επόμενη συσχέτιση είναι πολύ σημαντική και είναι η αρνητικά παρατηρούμενη συσχέτιση της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων και της δραστικότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων. Ουσιαστικά, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, η παραπάνω συσχέτιση μεταφράζεται σε αντίστροφη συσχέτιση δραστικοτήτων μεταξύ των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων, αφού αυξημένη δραστικότητα GPX1, για τα λευκοκύτταρα ή τα αιμοπετάλια, σημαίνει ότι υπάρχει αυξημένη συγκέντρωση οξειδωτικών μορίων εντός τους, τα οποία μόρια λειτουργούν ως διεγέρτες των λειτουργιών τους. Επομένως, αυτό δείχνει, με όσες επιφυλάξεις είναι σωστό να υπονοούνται από το μικρό δείγμα της μελέτης, πως όσο ένας άνθρωπος έχει μεγαλύτερη δυνατότητα διέγερσης λευκοκυττάρων τόσο μικρότερη δυνατότητα διέγερσης αιμοπεταλίων έχει και αντίστροφα.

Τέλος, παρατηρείται θετική συσχέτιση της δραστικότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων με τη δραστικότητα της εξωκυττάριας GPX (GPX3). Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί από το ότι όσο μεγαλύτερη δραστικότητα GPX1 και άρα διέγερση εμφανίζουν τα λευκοκύτταρα, τόσο περισσότερο επικρατεί μία κατάσταση οξειδωτικού στρες στην κυκλοφορία, στην οποία οφείλεται και το ενδοκυττάριο οξειδωτικό τους στρες και συνάμα η ενεργοποίησή τους. Συνεπώς, είναι λογικό, αφού υπάρχει αυξημένη οξειδωτική τάση στην κυκλοφορία, ο οργανισμός να παράγει περισσότερη GPX3 για να αντισταθμίσει τις πιθανές επιζήμιες συνέπειες του φαινομένου. Βέβαια και πάλι όλα αυτά αναφέρονται με επιφύλαξη, όχι μόνο λόγω του μικρού δείγματος, αλλά και λόγω του ότι ένα τέτοιας μικρής κλίμακας ευαίσθητο φαινόμενο είναι δύσκολο να ανιχνευθεί επαρκώς σε υγιή άτομα και άρα οι μεταβολές της δραστικότητας της GPX3 (μιας και είναι ένας εξωκυττάριος παράγοντας) να επηρεάζονται και από άλλους παράγοντες.

5.4.2 : Σχολιασμοί Συσχετίσεων Δραστικότητας GPX1 των Αιμοπεταλίων των Εθελοντών σε χρόνο μηδέν

Αρχικά, βάσει βιβλιογραφικών πηγών, αξίζει να αναφερθεί ότι τα αιμοπετάλια είναι μία πλούσια πηγή της GPX1 [41] και μάλιστα η δραστικότητα της GPX1 στα αιμοπετάλια θεωρείται ένας καλός δείκτης βιοδιαθεσιμότητας και διατροφικής πρόσληψης σεληνίου[42].

Αναφορικά με τις συσχετίσεις, παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της δραστικότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων με την ηλικία των εθελοντών. Αυτό σημαίνει ότι μόνο για το ηλικιακό εύρος των εθελοντών της μελέτης, μπορεί να ειπωθεί πως όσο η ηλικία αυξάνεται, η δραστικότητα του ενζύμου μειώνεται, όσο ο οργανισμός γερνάει και φθείρεται. Αυτό επιβεβαιώνεται και βιβλιογραφικά, αφού έχει φανεί χαμηλότερη δραστικότητα αιμοπεταλιακής GPX1 σε μεγαλύτερες ηλικίες, λόγω μειωμένης ποσότητας του ενζύμου, αυξημένης βιοδιαθεσιμότητας H_2O_2 και αυξημένης συσσώρευσης αιμοπεταλίων [43]. Μάλιστα, σε μεγαλύτερο επίπεδο εμβάθυνσης, μειωμένη δραστικότητα της GPX1 των αιμοπεταλίων με την ηλικία αποδεικνύεται ότι οδηγεί σε μεγαλύτερη σύνθεση προφλεγμονωδών και προσυσσωρευτικών εικοσανοειδών (δηλαδή προσταγλαδινών, θρομβοξανών και λευκοτριενίων), λόγω της επαγόμενης οξειδωσης του αραχιδονικού οξέος των κυτταρικών μεμβρανών των αιμοπεταλίων, εξ' αιτίας της αυξημένης παραγωγής μορίων H_2O_2 , όπως συμβαίνει σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες [44,45,46,47]. Επιπλέον, συμπληρωματικό στοιχείο αποτελεί πως σε ποντίκια, στα οποία έχει υπερεκφραστεί η GPX1, δεν παρατηρείται η αυξημένη συσσώρευση αιμοπεταλίων με την ηλικία [48].

Στη συνέχεια, παρατηρείται αρνητική συσχέτιση της δραστηριότητας της GPX1 των αιμοπεταλίων με τους δείκτες EC_{50} του ADP και EC_{50} του TRAP. Αυτό εκφράζει πως όσο πιο αυξημένη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου GPX1 έχουν τα αιμοπετάλια, τόσο λιγότερη ποσότητα των παραπάνω ενεργοποιητικών παραγόντων απαιτούν για να συσσωρευτούν και άρα τόσο πιο δραστικά είναι. Εναλλακτικώς, όσο μία κατάσταση οξειδωτικού στρες επικρατεί σε έναν οργανισμό, σε τόσο μεγαλύτερο οξειδωτικό κίνδυνο εκτίθενται τα αιμοπετάλιά του και ταυτόχρονα, μιας και το οξειδωτικό στρες τα διεγείρει, τα κάνει να έχουν μεγαλύτερη τάση ενεργοποίησης και παράλληλα συσώρευσης. Ως εκ τούτου, για να μετριαστεί η “υπερλειτουργία” του φαινομένου, παράγεται περισσότερη GPX1 εντός των αιμοπεταλίων, αυξάνοντας τη μετρούμενη δραστηριότητα του ενζύμου. Άλλωστε, στον οργανισμό, αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών εντός των αιμοπεταλίων, συντελεί και σε μεγαλύτερη ευαισθησία ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από την επαφή τους με το κολλαγόνο, κάτι που μπορεί να μετριασθεί από την αναγωγή και εξουδετέρωση αυτών των δραστικών μορίων, μέσω της δράσης και της αύξησης της παραγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων, όπως η GPX1 [10,49].

5.5 : Δεδομένα Άλλων Μελετών

Σε γενικές γραμμές, στη βιβλιογραφία αναφέρονται ελάχιστες μελέτες που να έχουν εξετάσει την επίδραση της μεταγευματικής (υπερ)γλυκαιμίας στις λειτουργίες των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων υγιών εθελοντών, μέσω της επίδρασης που έχει η (υπερ)γλυκαιμία αυτή σε αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης. Συνήθως, μελετάται ο ρόλος της μεταγευματικής (υπερ)λιπαιμίας στα λευκοκύτταρα και τα αιμοπετάλια ή αν μελετάται η μεταγευματική (υπερ)γλυκαιμία, μετράται σε πληθυσμούς μεταβολικών ασθενών, όπως διαβητικών ασθενών. Είναι λογικό το ερευνητικό ενδιαφέρον να επικεντρώνεται περισσότερο στα λίπη παρά στους υδατάνθρακες, καθώς, όλα αυτά τα χρόνια, τα λίπη είναι εκείνα που έχουν συνδεθεί άμεσα με ποικίλα καρδιομεταβολικά νοσήματα. Είναι ακόμη λογικό, οι μελέτες να εστιάζονται σε νοσούντες πληθυσμούς, αφού από αυτούς διεξάγονται πιο εμφανή αποτελέσματα και έτσι συνδράμουν καλύτερα στη δημιουργία θεραπειών των νόσων. Τέλος, οι περισσότερες μελέτες που έχουν εξετάσει το αντικείμενο αυτής της πτυχιακής σε υπολογίσιμο επίπεδο, είναι δυστυχώς είτε μελέτες *in vitro* είτε μελέτες σε πειραματόζωα και όχι *in vivo* μελέτες σε ανθρώπους.

Όλα αυτά, καθιστούν αυτή τη μελέτη διαφορετική από τις περισσότερες, επειδή σκόπευε να ερευνήσει μηχανισμούς που ίσως να λειτουργούν σε πραγματικές συνθήκες

υγιών ανθρώπων, με απώτερο στόχο τη συνεισφορά στον τομέα της πρωτογενούς πρόληψης των καρδιομεταβολικών νοσημάτων.

Ωστόσο, θα παρατεθούν μερικές σχετικές έρευνες που ήταν δυνατό να συλλεχθούν, οι οποίες σχετίζονται με το αντικείμενο που πραγματεύτηκε.

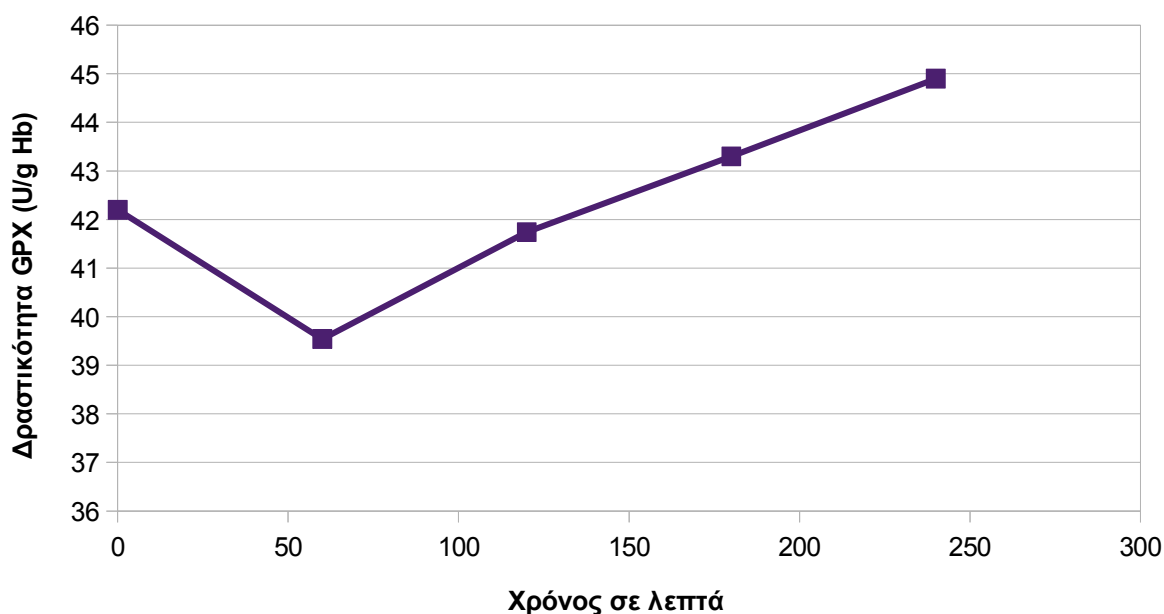
Βάσει μίας κλινικής μελέτης που εξέταζε την πιθανή επίδραση που μπορεί να έχει η παράλληλη λήψη αντιοξειδωτικών κατά την πραγματοποίηση ενός κλασικού τεστ καμπύλης γλυκόζης, στην αγγειοδιαστολή του επιθηλίου 10 υγιών ατόμων (20-30 ετών), καταγράφηκαν οι εξής τιμές για τη δραστικότητα της ενδοκυττάριας υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης των ερυθροκυττάρων για την ομάδα ελέγχου της μελέτης [50]: (Πίνακας 5.1)

Πίνακας 5.1: Τιμές Μεταγευματικής Δραστικότητας GPX1 των Ερυθροκυττάρων συναρτήσει του χρόνου (Ομάδα ελέγχου) [50]

Χρόνος (min)	0	60	120	180	240
Δραστικότητα GPX1 Ερυθροκυττάρων (U/g αιμοσφαρίνης)	42,2	39,5	41,7	43,3	44,9
Τυπική Απόκλιση	22,7	19,1	20,7	18,7	17,1

Σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα, κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα. (Σχήμα 5.1)

Σχήμα 5.1: Μεταγευματική Μεταβολή Δραστικότητας της GPX1 των Ερυθροκυττάρων συναρτήσει του χρόνου για την ομάδα ελέγχου μελέτης



Από το διάγραμμα παρατηρείται πως η μεταγευματική μεταβολή της δραστηριότητας της GPX1 των ερυθροκυττάρων της παραπάνω μελέτης, ακολουθεί μία καμπύλη τύπου “μπαστούνιού”, καθώς μειώνεται αρχικά και στη συνέχεια αυξάνεται μέχρι να φτάσει σε επίπεδα μεγαλύτερα της αρχικής, μέσα στις 4 ώρες από τη λήψη των 75g γλυκόζης. Αν αναλογιστεί ότι οι συσχετίσεις των αποτελεσμάτων αυτής της πτυχιακής έδειξαν μία θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των ερυθροκυττάρων και της δραστηριότητας της GPX1 των λευκοκυττάρων, η οποία έμοιαζε να ακολουθεί μία τάση αυξομειώσεων παρόμοιας μορφής με αυτή του διαγράμματος αυτής της μελέτης, τότε ίσως θα μπορούσε να ειπωθεί με τεράστια επιφύλαξη πως είναι σαν να υπάρχει μία ελαφριά επιβεβαίωση της τάσης των γραφημάτων αυτής της πτυχιακής.

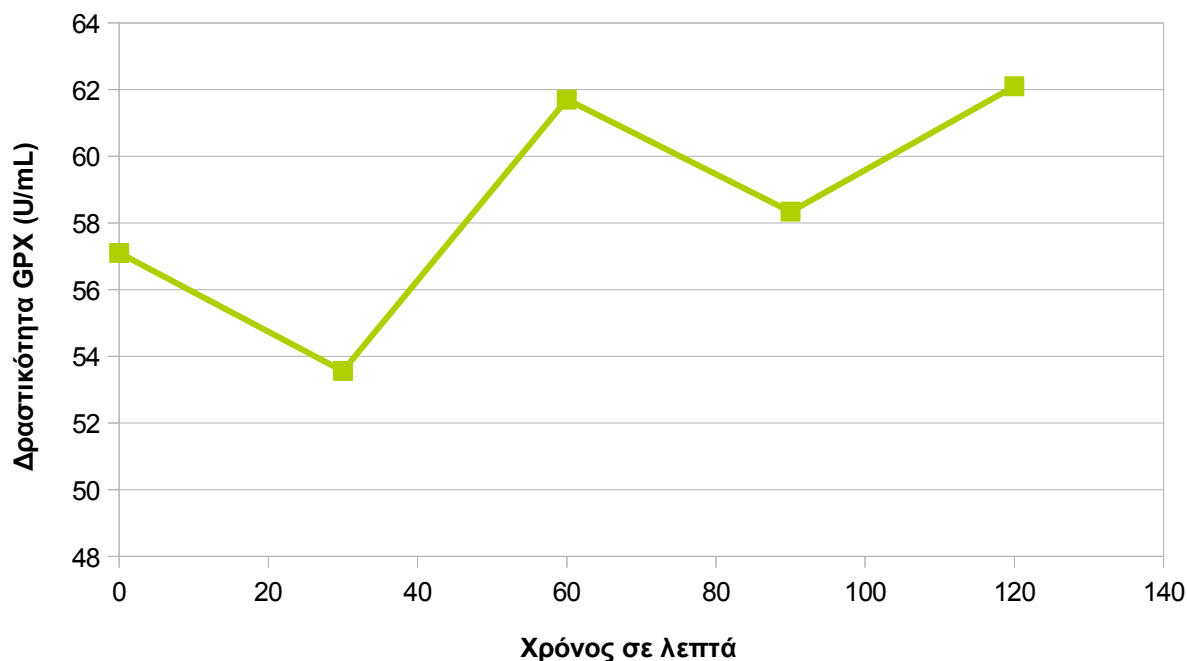
Μία άλλη κλινική μελέτη, η οποία διερεύνησε την μεταγευματική επίδραση τριών διαφορετικών μαρμελάδων σε 16 υγιείς ενήλικες (20-30 ετών), μέτρησε εκτός των άλλων και τη μεταγευματική μεταβολή της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης του ορού (GPX3). Τα τρία είδη μαρμελάδας ήταν : μαρμελάδα υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρο, μαρμελάδα χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρο και μαρμελάδα χαμηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρο με προσθήκη πολυφαινόλων. Από κάθε μαρμελάδα χορηγούταν ποσότητα 60g στους εθελοντές της μελέτης. Στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι τιμές της δραστηριότητας της GPX3 που μετρήθηκαν σχετικά με τη μαρμελάδα υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρο, μιας και αυτή προσομοιάζει στο πειραματικό πρωτόκολλο αυτής της πτυχιακής μελέτης [51]: (Πίνακας 5.2)

Πίνακας 5.2: Τιμές Μεταγευματικής Δραστηριότητας GPX3 μετά την κατανάλωση μαρμελάδας υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρο [51]

Χρόνος (min)	0	30	60	90	120
Δραστηριότητα GPX3 (U/mL)	57,1	53,56	61,7	58,34	62,1
Τυπική Απόκλιση	29,05	29,72	28,41	33,1	32,58

Πάλι, σύμφωνα με τις τιμές του πίνακα, κατασκευάστηκε το παρακάτω διάγραμμα. (Σχήμα 5.2)

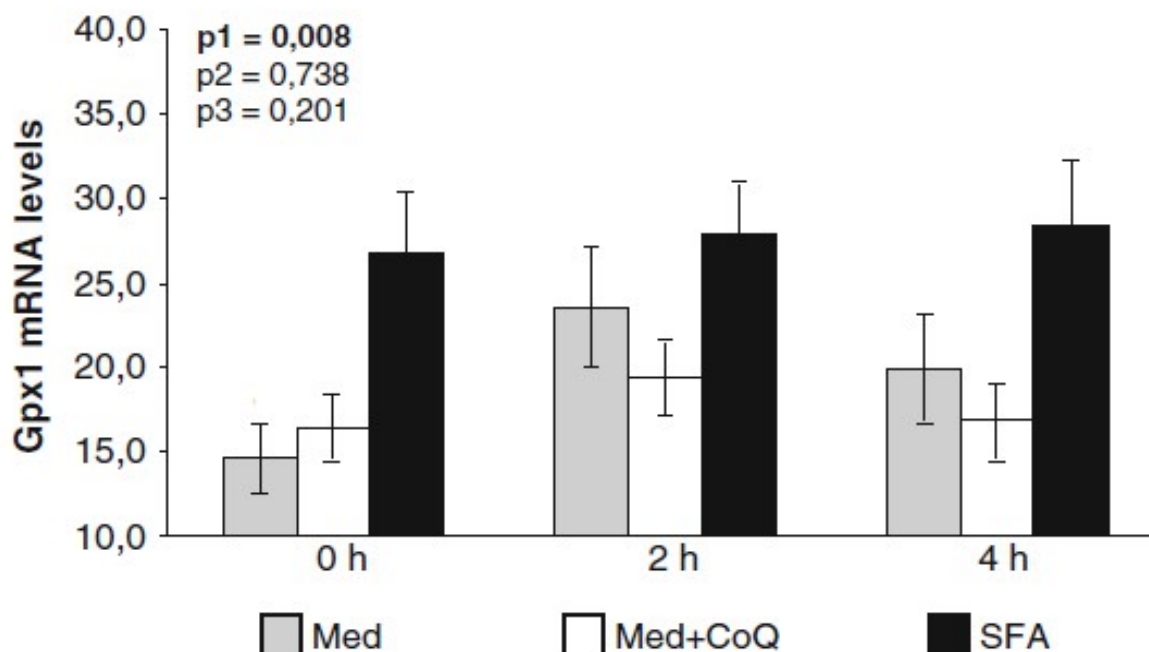
Σχήμα 5.2: Μεταγευματική Μεταβολή Δραστικότητας της GPX3 συναρτήσει του χρόνου για την ομάδα ελέγχου μελέτης μετά την κατανάλωση μαρμελάδας υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα



Αν και δεν είναι ξεκάθαρο τόσο από το σχήμα, όσο από τις τιμές του πίνακα, παρατηρείται ξανά μία ελαφριά αρχική μείωση της δραστικότητας, η οποία ακολουθείται από μία ανοδική τάση αυξομειώσεων, η οποία ξεπερνά τελικά σε απόλυτες τιμές την αρχική δραστικότητα, εύρημα το οποίο διαφαίνεται και από τα διαγράμματα της μεταγευματικής μεταβολής της δραστικότητας της GPX1 στα λευκοκύτταρα των εθελοντών του πειραματικού πρωτοκόλλου αυτής της πτυχιακής.

Τέλος, μία τρίτη κλινική μελέτη διασταύρωσης επιχείρησε να ελέγξει τη μεταγευματική επίδραση τριών ειδών διαιτών μεταξύ τους (μεσογειακή, μεσογειακή με παράλληλη χορήγηση συμπληρώματος συνενζύμου Q και δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λίπη) στα επίπεδα μεταγευματικής ενεργοποίησης έκφρασης γονιδίων αντιοξειδωτικών ενζύμων σε περιφερικά μονοκύτταρα. Ένα από τα γονίδια που μελετήθηκε ήταν το γονίδιο που κωδικοποιεί την GPX1 των μονοκυττάρων. Οι εθελοντές της μελέτης ήταν 20 στο πλήθος και όλοι υγιείς, ηλικίας μεγαλύτερης ή ίσης με 65 έτη. Στο παρακάτω διάγραμμα που παρατίθεται φαίνονται οι μεταβολές των επιπέδων του μεταγευματικού mRNA που μετρήθηκαν σε διαστήματα 2 και 4 ωρών μετά την κατανάλωση πρωινού σχετικού με τη δίαιτα κάθε ομάδας. [52] (Σχήμα 5.3)

Σχήμα 5.3: Ραβδογράμματα Επιπέδων mRNA της GPX1 σε Μονοκύτταρα Υγιών Εθελοντών Μελέτης [52]



(Με γκριζο χρώμα σημειώνονται τα επίπεδα του mRNA σχετικά με τη μεσογειακή διαίτα, με λευκό εκείνα σχετικά με τη μεσογειακή διαίτα με την παράλληλη χορήγηση συμπληρώματος συνενζύμου Q και με μαύρο εκείνα σχετικά με τη διαίτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά) (p_1 = συντελεστής στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση μεταξύ των παρεμβάσεων, p_2 = συντελεστής στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση μεταξύ των χρονικών στιγμών, p_3 = συντελεστής στατιστικής σημαντικότητας για τη σύγκριση μεταξύ των παρεμβάσεων και των χρονικών στιγμών μαζί)

Καταρχήν, η συγκεκριμένη μελέτη διαφέρει σε αρκετά σημεία από το σχεδιασμό του πρωτοκόλλου αυτής της πτυχιακής μελέτης. Οι εθελοντές είναι πολύ μεγαλύτερης ηλικίας και εξετάζεται σύνολο συστατικών ως γεύμα και όχι η γλυκόζη μεμονωμένα. Ωστόσο, παρατίθεται για να δείχθει ότι παρατηρείται αύξηση όλων των επιπέδων mRNA της GPX1 για τα μονοκύτταρα μεταγευματικά. Δεν έχει νόημα να αναλυθούν περισσότερες λεπτομέρειες, αφού τα αποτελέσματα δεν είναι λογικά συγκρίσιμα με αυτά της πτυχιακής, πέραν της αύξησης της έκφρασης της GPX1 μεταγευματικά, κάτι που και πάλι είναι επίφοβο να συνδεθεί λογικά με αύξηση των επιπέδων του ενζύμου, καθώς οτιδήποτε μεταγράφεται δε σημαίνει ότι απαραίτητα μεταφράζεται και παράγεται τελικά κατά τον ίδιο βαθμό. Στόχος της παράθεσής τους ήταν απλώς να δείχθει ένα επιστημονικό στοιχείο που να υποδεικνύει τη μεταγευματική αύξηση της παραγωγής της GPX1 σε λευκοκύτταρα.

Ολοκληρώνοντας, είναι σημαντικό να αναφερθεί πως καμία εκ των δύο πρώτων μελετών δεν εμφάνιζε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τιμών της δραστηριότητας της εκάστοτε GPX [50,51] και επιπλέον η τελευταία μελέτη δε διέκρινε διαφορές μεταξύ

των επιπέδων του mRNA της GPX1 των μονοκυττάρων, συγκριτικά με το χρόνο [52]. Η αδυναμία εύρεσης στατιστικά σημαντικών διαφορών μεταξύ των διαφόρων τιμών των μεταβολών της δραστηριότητας της GPX1 ως προς τις λοιπές χρονικές στιγμές, ήταν εμφανώς εντυπωμένη και στα αποτελέσματα αυτής της πτυχιακής μελέτης.

5.6 : Επίλογος Κεφαλαίου

Στο τελευταίο αυτό υποκεφάλαιο, θα γίνει μία σύντομη αποτίμηση της πειραματικής μελέτης αυτής της πτυχιακής εργασίας.

Η πτυχιακή αυτή μελέτη χαρακτηρίζεται τόσο από θετικά όσο και από αρνητικά σημεία. Στα θετικά χαρακτηριστικά της θα μπορούσαν να συγκαταλεχθούν: 1) το αντικείμενο μελέτης της, αφού η βιβλιογραφία πάσχει από ένα αισθητό κενό κλινικών μελετών που να εξετάζουν την επίδραση της μεταγευματικής (υπερ)γλυκαιμίας στη λειτουργία των κυττάρων του ανοσοποιητικού και της αιμόστασης, από τη σκοπιά μηχανισμών σχετιζόμενων με το οξειδωτικό στρες, σε υγιή άτομα, 2) οι αναλυτικές πειραματικές μέθοδοι που ακολουθήθηκαν για τη διεξαγωγή των αποτελεσμάτων και 3) η μέτρηση πολλών παράπλευρων βιολογικών παραγόντων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για περαιτέρω συσχετίσεις. Από την άλλη, αρνητικά χαρακτηριστικά της αποτελούν 1) ο μικρός αριθμός δείγματος, 2) η δυσκολία ασφαλούς και ολοκληρωμένης διεξαγωγής συμπερασμάτων λόγω της υψηλής ευμεταβλητότητας του φαινομένου που εξέτασε και 3) η έλλειψη παράθεσης πρόσθετων δεδομένων και για άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα, ώστε να διευκυνθεί και να εμπλουτιστεί ακόμη περισσότερο η περιγραφή των πιθανών μηχανισμών που εκτελούνται κατά την κατάσταση του μεταγευματικού οξειδωτικού στρες.

Ωστόσο, έγινε φιλότιμη και υπεύθυνη προσπάθεια, δεδομένου των συνθηκών, η όλη πτυχιακή μελέτη να είναι ικανή να σταθεί αξιοπρεπώς στον επιστημονικό χώρο, ως ένα έγγραφο έγκυρης επιστημονικής γνώσης που να προσφέρει τόσο στον επιστήμονα όσο και στον απλό ενδιαφερόμενο άνθρωπο μία εμπειριστατωμένη θεώρηση ενός επιστημονικού πεδίου ανερχόμενου ενδιαφέροντος που πολύ πιθανά να κρύβει “αλήθειες” πίσω από άλλες “αλήθειες”, οι οποίες να μπορέσουν να συνδράμουν αποφασιστικά στο μέλλον προς μία κατεύθυνση πιο σοφής και πιο ολοκληρωμένης πρωτογενούς ιατρικής πρόληψης, με σκοπό έναν καλύτερο και πιο υγιή ανθρώπινο πληθυσμό για τις γενεές που πρόκειται να ακολουθήσουν.

Βιβλιογραφία:

1. Gropper Sarren S., Smith Jack L., Groff Jones (επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Λάμπρος Συντώσης), *Διατροφή και Μεταβολισμός*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007 (Τόμος Ι)
2. Δημόπουλος Κωνσταντίνος Α., Αντωνοπούλου Σμαραγδή, *Βασική Βιοχημεία (2η έκδοση, με βελτιώσεις και προσθήκες)*, Αθήνα 2009
3. Luz Sdos, S., et al., [*Current concepts of digestion and absorption of carbohydrates*]. *Arq Gastroenterol*, 1997. **34**(3): p. 175-85.
4. Gropper Sarren S., Smith Jack L., Groff Jones (επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Λάμπρος Συντώσης), *Διατροφή και Μεταβολισμός*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2007 (Τόμος ΙΙ)
5. Boron Walter F., Boulpaep Emile L. (επιμέλεια ελληνικής έκδοσης: Μιχαήλ Κουτσιλιέρης), *Ιατρική Φυσιολογία: Κυτταρική και Μοριακή Προσέγγιση*, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2006 (Τόμος ΙΙΙ)
6. Gostner, J.M., et al., *Redox regulation of the immune response*. *Redox Rep*, 2013. **18**(3): p. 88-94.
7. Kesarwani, P., et al., *Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease*. *Antioxid Redox Signal*, 2013. **18**(12): p. 1497-534.
8. Hou, C.C., et al., *Oxidative stress and pyrogenic fever pathogenesis*. *Eur J Pharmacol*, 2011. **667**(1-3): p. 6-12.
9. Duan, J. and D.L. Kasper, *Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species*. *Glycobiology*, 2011. **21**(4): p. 401-9.
10. Alexandru, N., D. Popov, and A. Georgescu, *Intraplatelet oxidative/nitrative stress: inductors, consequences, and control*. *Trends Cardiovasc Med*, 2010. **20**(7): p. 232-8.
11. Violi, F. and P. Pignatelli, *Platelet oxidative stress and thrombosis*. *Thromb Res*, 2012. **129**(3): p. 378-81.
12. Alipour, A., et al., *Novel aspects of postprandial lipemia in relation to atherosclerosis*. *Atheroscler Suppl*, 2008. **9**(2): p. 39-44.
13. Botham, K.M. and C.P. Wheeler-Jones, *Postprandial lipoproteins and the molecular regulation of vascular homeostasis*. *Prog Lipid Res*, 2013. **52**(4): p. 446-64.
14. Burdge, G.C. and P.C. Calder, *Plasma cytokine response during the postprandial period: a potential causal process in vascular disease?* *Br J Nutr*, 2005. **93**(1): p. 3-9.

15. Siegel-Axel, D., et al., *Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis*. Cardiovasc Res, 2008. **78**(1): p. 8-17.
16. Korporaal, S.J. and J.W. Akkerman, *Platelet signaling induced by lipoproteins*. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem, 2006. **4**(2): p. 93-109.
17. Olufadi, R. and C.D. Byrne, *Effects of VLDL and remnant particles on platelets*. Pathophysiol Haemost Thromb, 2006. **35**(3-4): p. 281-91.
18. Hyson, D.A., et al., *Postprandial lipemia is associated with platelet and monocyte activation and increased monocyte cytokine expression in normolipemic men*. Clin Appl Thromb Hemost, 2002. **8**(2): p. 147-55.
19. 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.
20. Yamagishi, S.I., et al., *Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction*. Diabetes, 2001. **50**(6): p. 1491-4.
21. 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.
22. Sudic, D., et al., *High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms*. Br J Haematol, 2006. **133**(3): p. 315-22.
23. Sies, H., W. Stahl, and A. Sevanian, *Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress*. J Nutr, 2005. **135**(5): p. 969-72.
24. Munoz, A. and M. Costa, *Nutritionally mediated oxidative stress and inflammation*. Oxid Med Cell Longev, 2013. **2013**: p. 610950.
25. Calder, P.C., et al., *Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity*. Br J Nutr, 2011. **106 Suppl 3**: p. S5-78.
26. O'Keefe, J.H. and D.S. Bell, *Postprandial hyperglycemia/hyperlipidemia (postprandial dysmetabolism) is a cardiovascular risk factor*. Am J Cardiol, 2007. **100**(5): p. 899-904.
27. Wallace, J.P., et al., *Postprandial lipaemia, oxidative stress and endothelial function: a review*. Int J Clin Pract, 2010. **64**(3): p. 389-403.
28. O'Keefe, J.H., N.M. Gheewala, and J.O. O'Keefe, *Dietary strategies for improving postprandial glucose, lipids, inflammation, and cardiovascular health*. J Am Coll Cardiol, 2008. **51**(3): p. 249-55.

29. Blaak, E.E., et al., *Impact of postprandial glycaemia on health and prevention of disease*. Obes Rev, 2012. **13**(10): p. 923-84.
30. Node, K. and T. Inoue, *Postprandial hyperglycemia as an etiological factor in vascular failure*. Cardiovasc Diabetol, 2009. **8**: p. 23.
31. Giugliano, D., A. Ceriello, and K. Esposito, *Glucose metabolism and hyperglycemia*. Am J Clin Nutr, 2008. **87**(1): p. 217S-222S.
32. Ντετοπούλου Π. *Διερεύνηση της σχέσης μεταβολισμού του PAF και διατροφικών παραγόντων σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια καθώς και σε υγιείς εθελοντές*. Διδακτορική Διατριβή. 2010
33. Mustard JF, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA. *Isolation of human platelets from plasma by centrifugation and washing*. Methods Enzymol. 1989;169:3-11
34. Antonopoulou, S., Nomikos, T., Fragopoulou, E. and Karantonis, H.C., *Isolation and characterization of cyanobacterial polar lipids with bioactivity towards platelet aggregation in "Protocols on algal research"*, Editors: Bagchi S.N., Kleiner, D., and Mohanty, P., Alpha Science Intl Ltd, 2010
35. Bradford MM., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.
36. S Wendel A., *In The enzymatic Basis of Detoxification*, Jakoby, W.B., Ed.; Academic Press: New York, 1980; Vol 1, p 333.
37. De Luca, C., et al., *The search for reliable biomarkers of disease in multiple chemical sensitivity and other environmental intolerances*. Int J Environ Res Public Health, 2011. **8**(7): p. 2770-97.
38. Powers, S.K., L.L. Ji, and C. Leeuwenburgh, *Exercise training-induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity: a brief review*. Med Sci Sports Exerc, 1999. **31**(7): p. 987-97.
39. Finaud, J., G. Lac, and E. Filaire, *Oxidative stress : relationship with exercise and training*. Sports Med, 2006. **36**(4): p. 327-58.
40. Wang, X., L. Tao, and C.X. Hai, *Redox-regulating role of insulin: the essence of insulin effect*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **349**(2): p. 111-27.
41. Doni, M.G., et al., *Glutathione peroxidase, selenium, and prostaglandin synthesis in platelets*. Am J Physiol, 1981. **240**(5): p. H800-3.
42. Levander, O.A., et al., *Platelet glutathione peroxidase activity as an index of selenium status in rats*. J Nutr, 1983. **113**(1): p. 55-63.

43. Rey, C., et al., *Purification and characterization of glutathione peroxidase from human blood platelets. Age-related changes in the enzyme*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1226**(2): p. 219-24.
44. Lagarde, M., et al., *Involvement of lipid peroxidation in platelet signalling*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 1997. **57**(4-5): p. 489-91.
45. Hill, T.D., J.G. White, and G.H. Rao, *Platelet hypersensitivity induced by 1-chloro-2, 4-dinitrobenzene, hydroperoxides and inhibition of lipoxygenase*. Thromb Res, 1989. **53**(5): p. 447-55.
46. Bryant, R.W., T.C. Simon, and J.M. Bailey, *Hydroperoxy fatty acid formation in selenium deficient rat platelets: coupling of glutathione peroxidase to the lipoxygenase pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 1983. **117**(1): p. 183-9.
47. Hornberger, W. and H. Patscheke, *Primary stimuli of icosanoid release inhibit arachidonoyl-CoA synthetase and lysophospholipid acyltransferase. Mechanism of action of hydrogen peroxide and methyl mercury in platelets*. Eur J Biochem, 1990. **187**(1): p. 175-81.
48. Dayal, S., et al., *Hydrogen peroxide promotes aging-related platelet hyperactivation and thrombosis*. Circulation, 2013. **127**(12): p. 1308-16.
49. Jang, J.Y., et al., *Reactive oxygen species play a critical role in collagen-induced platelet activation via SHP-2 oxidation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(16): p. 2528-40.
50. Title, L.M., et al., *Oral glucose loading acutely attenuates endothelium-dependent vasodilation in healthy adults without diabetes: an effect prevented by vitamins C and E*. J Am Coll Cardiol, 2000. **36**(7): p. 2185-91.
51. Ibero-Baraibar, I., et al., *Different postprandial acute response in healthy subjects to three strawberry jams varying in carbohydrate and antioxidant content: a randomized, crossover trial*. Eur J Nutr, 2014. **53**(1): p. 201-10.
52. Yubero-Serrano, E.M., et al., *Postprandial antioxidant gene expression is modified by Mediterranean diet supplemented with coenzyme Q(10) in elderly men and women*. Age (Dordr), 2013. **35**(1): p. 159-70.