



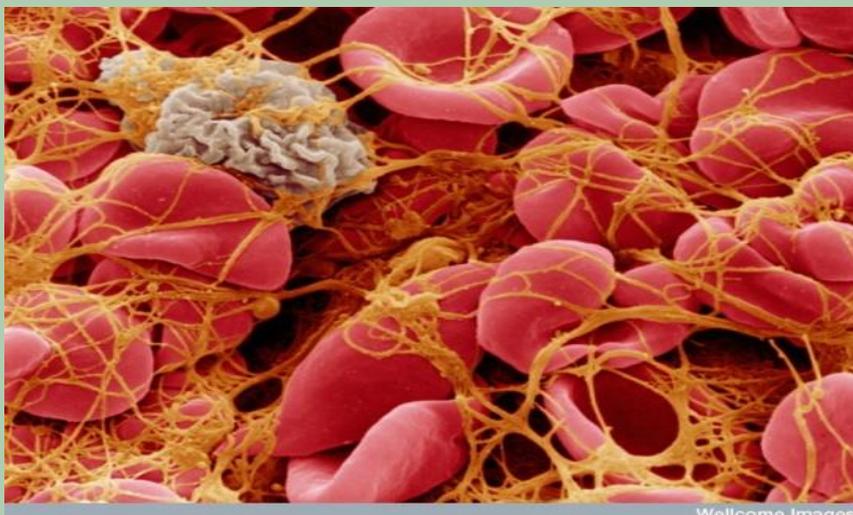
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ
ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ**

ΑΝΔΡΕΑ ΠΑΟΛΑ ΡΟΧΑΣ ΧΙΑ

ΑΜ: 4521302

2017



Wellcome Images

ΑΘΗΝΑ 28 ΦΕΒΡΟΥΑΡΙΟ 2017



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ & ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Νομικός Τζώρτζης, Επίκουρος Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Νομικός Τζώρτζης, Επίκουρος Καθηγητής

Αντωνοπούλου Σμαραγδή, Καθηγήτρια

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια

Η Ανδρέα Παόλα Ρόχας Χιλ

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.

2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Αφιερωμένο στα παιδιά μου τον Νικόλα και τον Τόμας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς τον επιβλέπον καθηγητή αυτής της εργασίας τον Επίκουρο Καθηγητή Τζώρτζης Νομικός για την αμέριστη συνεργασία προς την επίτευξη αυτής της διπλωματικής εργασίας, για τον ενδιαφέρον του και την στήριξη του. Η βοήθεια και η καθοδήγησή του υπήρξε ιδιαίτερα πολύτιμη και καθοριστική για την ολοκλήρωση της ερευνητικής αυτής προσπάθειας.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Καθηγήτρια Κυρία Σμαράγμδη Αντωνοπούλου και την Επίκουρη Καθηγήτρια Ελισάβετ Φραγκοπούλου για την πολύτιμη παρουσία τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο για την δυνατότητα να πραγματοποιήσω την πτυχιακή μου εργασία στο χώρο αυτό.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα για την συνεχή βοήθειά, στήριξη και πειραματική καθοδήγηση της, την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Μικελίδι

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα παιδιά μου για την αμέριστη συμπαράσταση και υποστήριξη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
ABSTRACT	11
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1. Τα αιμοπετάλια	14
1.1. Φυσιολογική ενεργοποίηση αιμοπεταλίων	14
1.2 Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων PAF	17
2. Η ινσουλίνη	18
2.1 Μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης	19
2.2 Σακχαρώδης διαβήτης και αντίσταση στην ινσουλίνη	21
2.3 Διαταραχές μεταγωγής του σήματος της ινσουλίνης στον ΣΔΤΠ	22
2.4 Διαβήτης και αθηρογένεση	23
3. Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και αιμοπετάλια	24
3.1 Είσοδος και Μεταβολισμός της γλυκόζης στα αιμοπετάλια	25
3.2 Μεταγωγή σήματος της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια	25
3.3 Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από την ινσουλίνη	26
3.4 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και αθηροσκλήρωση	29
3.5 Οξεία μεταγευματική υπεργλυκαιμία και αιμοπετάλια	30
3.5 Ανωμαλίες της λειτουργίας των αιμοπεταλίων στο διαβήτη	31
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	34
ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	36

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

1.	Επιλογή Εθελοντών	36
2.	Ανθρωπομετρία	37
3.	Πρωτόκολλο της υπεργλυκαιμίας	37
4.	Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων ανθρώπου για συσσώρευση αιμοπεταλίων	38
5.	Απομόνωση Πλούσιου σε αιμοπετάλια Πλάσματος για συσσώρευση αιμοπεταλίων	38
6.	Συσσώρευση αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια	38
7.	Επίδραση του PAF στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης	40
8.	Μέτρηση της γλυκόζης, ινσουλίνης και α -σελεκτίνης	40
9.	Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Immunoblotting)	41
9.1	Εκχύλιση πρωτεϊνών από πλυμένα αιμοπετάλια	43
9.2	Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS κατά Laemmli (SDS PAGE ηλεκτροφόρηση).	44
9.3	Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	45
9.4	Επώαση με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών-στόχος	45
9.5	Ανίχνευση του εκπεμπόμενου σήματος με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.	46
10.	Στατιστική Ανάλυση	46
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ		49
1.	Βασικά ανθρωπομετρικά και περιγραφικά χαρακτηριστικά εθελοντών	49
2.	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση της γλυκόζης και ινσουλίνης σε υγιείς εθελοντές	50
2.1	Επίδραση των φορτίσεων γλυκόζης στα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης	50

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

2.2	Επίδραση των φορτίσεων γλυκόζης στα μεταγευματικά επίπεδα ινσουλίνης	51
3.	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές	53
3.1	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές στο ADP	53
3.2	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές στο TRAP	55
3.3	Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην μεταβολή της συγκεντρώσεως της sP-σελεκτίνης	57
4.	Συσχέτιση μεταγευματικής ινσουλιναίμιας/υπεργλυκαιμίας με τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων	59
5.	Αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης σε PRP και πλυμμένα αιμοπετάλια ανθρώπου.	61
6.	Επίδραση του PAF στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης	62
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	67
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Εισαγωγή: Η μεταγευματική φλεγμονή και θρόμβωση προκαλούμενες από την υπεργλυκαιμία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Η ινσουλίνη φαίνεται να διαμεσολαβεί σε αυτήν την ενεργοποίηση μέσω της αναστολής της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων. Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) απελευθερώνεται υπό φλεγμονώδεις καταστάσεις και το μεταγωγικό μονοπάτι του αντιτίθεται στις αντίστοιχες οδούς της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια. Σκοπός: Η διερεύνηση της αντιαιμοπεταλιακής ιδιότητας της δράσης της ινσουλίνης σε *in vivo* και *in vitro* συνθήκες και η εμπλοκή του PAF σε αυτήν.

Μεθοδολογία: Για τα *in vivo* πειράματα δέκα υγιείς εθελοντές κατανάλωσαν με τυχαία σειρά υδατικά διαλύματα γλυκόζης με συνολική ποσότητας 75g, 100g και 150g γλυκόζης. Λήφθησαν δείγματα αίματος σε διάφορες χρονικές στιγμές έως και 4 ώρες μετά τη φόρτιση και προσδιορίστηκαν: η συσσώρευση των αιμοπεταλίων επαγόμενη από την ADP και το TRAP, η γλυκόζη και η ινσουλίνη ορού και η sP-σελεκτίνη του πλάσματος. Για τα *in vitro* πειράματα, χρησιμοποιήθηκαν πλυμένα ανθρώπινα αιμοπετάλια και πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια. Εκτιμήθηκε η αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης έναντι του TRAP και η δυνατότητα του PAF να αναστέλλει τη δράση αυτή. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση της ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) της πρωτεϊνικής κινάσης Θ (PKC Θ) με ανοσοτύπωση κατά Western.

Αποτελέσματα: Στη μελέτη φόρτισης γλυκόζης φάνηκε μείωση της ευαισθησίας των αιμοπεταλίων, ανεξάρτητα από το ποσό της γλυκόζης, πιθανώς λόγω της δράσης της εκκρινόμενης ινσουλίνης κατά την λειτουργία των αιμοπεταλίων. Ωστόσο, όσο υψηλότερη ήταν η υπερινσουλιναιμία τόσο χαμηλότερη ήταν η εξασθένηση της ευαισθησίας των αιμοπεταλίων. Η sP-σελεκτίνη εμφανίζει μία τάση αύξησης στις μεγάλες φορτίσεις γλυκόζης. Η ινσουλίνη αναστέλλει την προκληθείσα συσσωμάτωση αιμοπεταλίων από την θρομβίνη σε ανθρώπινα αιμοπετάλια (IC₅₀: 26 nM). Προ-επάση των αιμοπεταλίων με διάφορες συγκεντρώσεις του PAF (15-1500nM) ελαχιστοποιεί την αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης με δόσοεξαρθώμενο τρόπο.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Η μελέτη της ενεργοποίησης της PKC θ έδειξε αύξηση της φωσφορυλίωσής της μετά από προ-επάση των αιμοπεταλίων με PAF (1670 nM) και ινσουλίνη (200,5 nM), όπου στις ίδιες συνθήκες βρέθηκε και η μέγιστη ελαχιστοποίηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της ινσουλίνης.

Συζήτηση: Η ινσουλίνη φαίνεται να ρυθμίζει τη δράση των αιμοπεταλίων κατά τη μεταγευματική κατάσταση. Βρέθηκε πως στο φυσιολογικό πληθυσμό, μικρές διαφορές στην ινσουλινοαντίσταση μπορούν να επηρεάσουν την υποκλινική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Φάνηκε ο PAF να είναι αναστολέας της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της ινσουλίνης μέσω της ενεργοποίησης του μεταγωγικού μονοπατιού του. Στη δράση του αυτή φαίνεται ότι εμπλεκεται η PKC θ , ενεργοποίηση της οποίας δρα αρνητικά στην δράση της ινσουλίνης.

Λέξεις κλειδιά: Αιμοπετάλια, υπερινσουλιναιμίας, υπεργλυκαιμία, Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), ινσουλίνη.

ABSTRACT

EFFECT OF HYPERGLYCEMIA / HYPERINSULINEMIA ON INSULIN'S SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAYS IN PLATELETS

Introduction: Postprandial hyperglycemia-induced inflammation and thrombosis play a crucial role in atherosclerosis development. Insulin seems to regulate this activation by inhibiting platelet aggregation. Platelet-activating factor (PAF) is released under inflammatory conditions and its signal transduction pathways oppose the respective pathways of insulin in platelets. Purpose: The purpose of this study was to investigate the antiplatelet properties of insulin action under in vivo and in vitro conditions and the involvement of PAF on them.

Methodology: For this purpose: 1) Ten healthy volunteers randomly consumed, in three different days, aqueous solutions of glucose (OGLT) containing 75g, 100g and 150 g. . Thrombin-receptor activating peptide (TRAP)- and ADP-induced platelet aggregation, serum glucose, insulin and plasma sP-selectin were measured prior to glucose intake and 15,30,60,90,120,180,240 minutes after glucose consumption. 2) Washed human platelets and platelet rich plasma was preincubated with various concentrations of PAF. The antiplatelet activity of insulin was then evaluated by estimating the percent inhibition of platelet aggregation induced by thrombin. A analysis of the activation (phosphorylation) of the Protein kinase C theta (PKC θ) was study by Western immunoblotting .

Results: The oral glucose load experiments demonstrated the post-load reduction of platelet sensitivity, independently of the glucose amount, possibly due to the antiplatelet action of secreted insulin. However, the higher the hyperinsulinemia the lower the attenuation of platelet sensitivity.

It was also found that insulin inhibits platelet aggregation induced by thrombin (0.015 U / mL) and by TRAP (25 nM) in human platelets (IC₅₀: 26 nM). The sP-selectin exhibits a tendency to be increased in large glucose loads. It was also found even in baseline conditions, fasting insulin and HOMA-IR, show a positive correlation with sP-selectin. Pre-incubation of platelets with different concentrations of PAF (15-1500nM) minimizes the antiplatelet activity of insulin in dose and time dependent manner. The study of the PKC θ activation showed increased phosphorylation of the

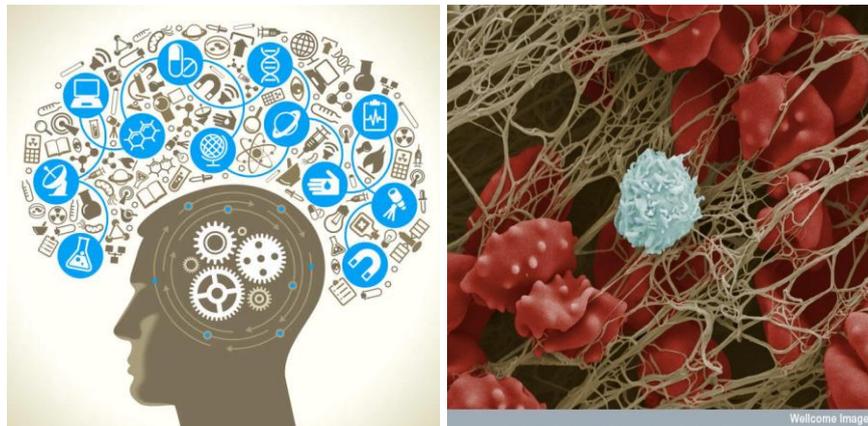
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

following pre-incubation of platelets with PAF (1670 nM) and insulin (200,5 nM), in which the same conditions were found and the maximum minimization of antiplatelet effect of insulin.

Discussion: Insulin appears to modulate the action of platelets in the postprandial state. It was found that in the normal population, slight differences in the insulin resistance may affect subclinical platelet activation. PAF is seemed to be an inhibitor of antiplatelet effect of insulin via activation of the pathway. Specifically, there is evidence of the involvement of activation of PKC θ which phosphorylation downregulates insulin actions.

Keywords: Platelets, hyperinsulinemia, hyperglycemia, Platelet activating factor, insulin

Εισαγωγή



ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Τα αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, δισκοειδή, διάφανα θραύσματα κυττάρων που προέρχονται από απύρηνα μεγακαρυοκύτταρα με διάμετρο 2-3 μικρόμετρα που κυκλοφορούν στο αίμα των ανθρώπων για 7 έως 10 ημέρες. Η κύρια λειτουργία τους είναι η διακοπή της αιμορραγία που προκύπτει ως αποτέλεσμα τραυματισμού ιστών ή αγγειακής βλάβης. Η ευαισθησία των αιμοπεταλίων διαμορφώνεται με τις περιβαλλοντικές αλλαγές. Η ταχεία προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε περιοχές του τραύματος ή της αγγειακής βλάβης αποτελούν βασικά γεγονότα στη διατήρηση της κανονικής αιμόστασης (1).

1.1. Φυσιολογική ενεργοποίηση αιμοπεταλίων

Υπό κανονικές συνθήκες, η προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο αγγειακό τοίχωμα παρεμποδίζεται λόγω της αντιθρομβωτικής φύσης της επιφάνειας των ενδοθηλιακών κυττάρων και της μόνιμης απελευθέρωσης των αντι-αιμοπεταλιακών παραγόντων από το ενδοθήλιο (2).

Μετά την αγγειακή βλάβη, ειδικά υπό την επίδραση της υψηλής διατημητικής τάσης, τα αιμοπετάλια δεσμεύονται και προσκολλούνται με το εκτεθειμένο υπο-ενδοθηλιακό κολλαγόνο μέσω του σύμπλοκου δεσμευτικών γλυκοπρωτεϊνών Ib/IX/V που μεσολαβείται από το παράγοντα von Willebrand (vWF). Η αρχική αλληλεπίδραση ενισχύεται στη συνέχεια από την αλληλεπίδραση του κολλαγόνου με τον υποδοχέα του, τη γλυκοπρωτεΐνη VI (GPVI), και με την ιντεγκρίνη $\alpha 2\beta 1$. Η σύνδεση αυτών των πρωτεϊνών ενεργοποιεί την οικογένεια των Src-τυροσινικών κινασών (SFKs) που οδηγούν στη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης $C\gamma 2$ (PLC $\gamma 2$). Η τελευταία προκαλεί την υδρόλυση της μεμβρανικής 4,5-διφωσφορικής φωσφατιδυλοϊνοσιτολης (PIP2) σε διακυλογλυκερόλη (DAG) και 1,4,5-τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), η οποία ενεργοποιεί αντίστοιχα την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) και διεγείρει την απελευθέρωση του Ca^{2+} από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες.

Η PKC συνδέεται και φωσφορυλιώνει την κυτοπλασμική ουρά της $\beta 3$ υπομονάδας του συμπλόκου ιντεγκρίνης $\alpha IIb\beta 3$, το οποίο στη συνέχεια επιστρατεύει τα πρωτεΐνες Talin και kindlin-3. Αυτό με τη σειρά του προκαλεί μια αλλαγή στη διαμόρφωση της εξωκυτταρικής περιοχής της ιντεγκρίνης και επιτρέπει την πρόσδεση του κυκλοφορούντος ινωδογόνου (μέσα-έξω

σηματοδότηση). Η σύνδεση με το ινωδογόνο ενεργοποιεί τις $\alpha\text{IIb}\beta_3$ ιντεγκρίνες των γειτονικών αιμοπεταλίων και εκκινεί τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Ύστερα από αυτή τη σύνδεση, το ινωδογόνο ξεκινά τη λεγόμενη "outside-in" σηματοδότηση της ιντεγκρίνης. Αυτό το βήμα περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της SFKs, η οποία προάγει τη φωσφορυλίωση της β_3 ιντεγκρίνης σε κατάλοιπα τυροσίνης και την πρόσδεση των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών που οδηγούν στην ενεργοποίηση της 3-κινάσης της φωσφατιδυλινοσιτόλης (PI3K) και στη συγκόλληση των αιμοπεταλίων. Το Ca^{2+} και η DAG επίσης, δρουν από κοινού για να ενεργοποιήσουν τον παράγοντα ανταλλαγής της γουανωσίνης (CalDAGGEF) που είναι σημαντικός για την ενεργοποίηση της μικρής GTPάσης Rap1. Η τελευταία ενεργοποιεί την μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK), η οποία είναι γνωστό ότι είναι ανηφορικά στον καταρράκτη σηματοδότησης της φωσφολιπάσης A2 (PLA2)/κυκλοοξυγενάσης (COX) που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του θρομβοξανίου A2 (3).

Η PKC και η MAPK ενεργούν συντονισμένα για την ενίσχυση της απελευθέρωσης των διαφόρων δεύτερων μεσολαβητών από τα κοκκία των αιμοπεταλίων. Οι αγωνιστές διφωσφορική αδενοσίνη (ADP), σεροτονίνη και θρομβοξανίου A2 συνδέονται με τους συζευγμένους με την πρωτεΐνη G (GPCRs) αντίστοιχους υποδοχείς τους. Μέσω της ενεργοποίησης των οδών σηματοδότησης των G πρωτεϊνών, μπορεί να αυξήσουν περαιτέρω τη δική τους έκφραση ή/και την απελευθέρωσή τους, προκαλώντας έτσι θετική ανατροφοδότηση, ενισχύοντας την αντίδραση των αιμοπεταλίων με τη στρατολόγηση περαιτέρω αιμοπεταλίων και την προώθηση της συσσωμάτωσης (4).

Εκτός από τη διέγερση της αποκοκκίωσης, η αύξηση της Ca^{2+} στα αιμοπετάλια, οδηγεί επίσης στην ενεργοποίηση των καλπαϊνών, μια οικογένεια εξαρτώμενων από το Ca^{2+} ουδέτερων κυστεϊνο-πρωτεασών. Παρόλο που κάποιες καλπαΐνες εκφράζονται μόνο σε συγκεκριμένους ιστούς, τα αιμοπετάλια είναι γνωστό ότι εκφράζουν τουλάχιστον δύο ισομορφές αυτού του ενζύμου, δηλαδή την μ -καλπαΐνη (καλπαΐνη 1) και m -καλπαΐνη (καλπαΐνη 2). Μετά την ενεργοποίησή τους, οι καλπαΐνες επάγουν την περιορισμένη πρωτεόλυση ενός αριθμού πρωτεϊνών που εμπλέκονται στην κυτταροσκελετική αναδιάταξη, την αποκοκκίωση και τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων (5).

Στα τελικά στάδια της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, η φωσφατιδυλοσερίνη, η οποία βρίσκεται κανονικά στο εσωτερικό μέρος της πλασματικής μεμβράνης, μεταφέρεται στο εξωτερικό

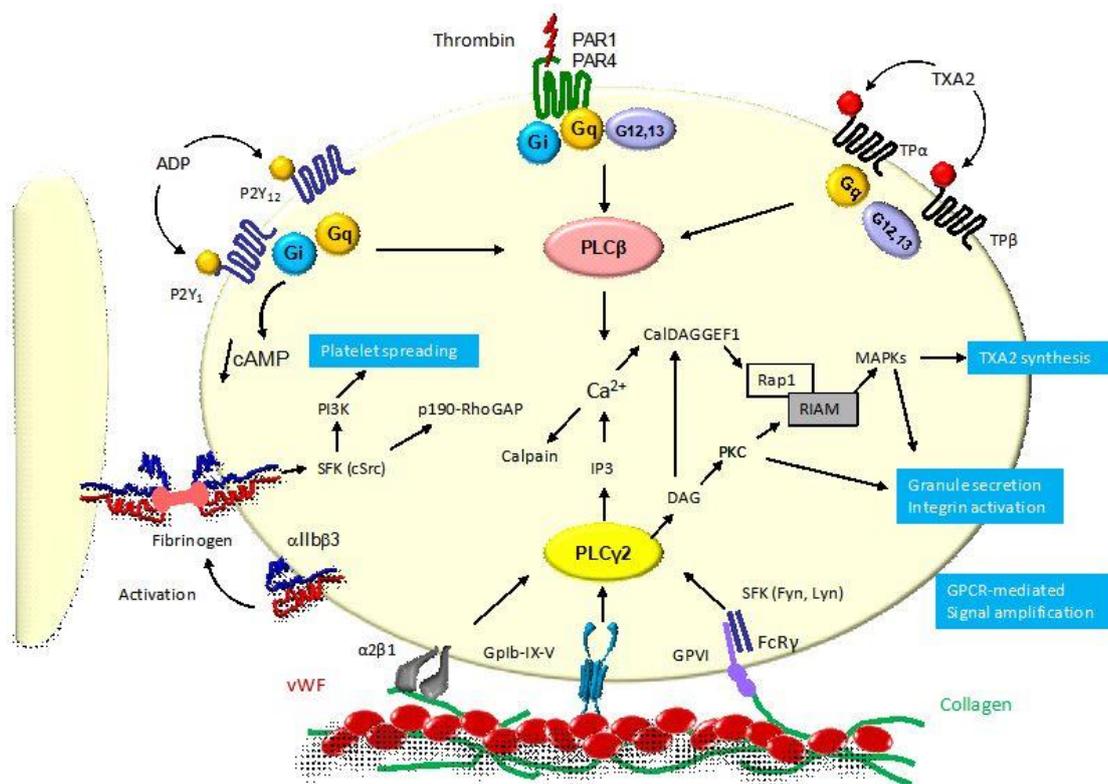
ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

της και οδηγεί στην αποβολή των μικροσωματιδίων δίνοντας αιμοπετάλια μια επιφάνεια προπηκτική.

Μετά από διέγερση, το Ca^{2+} απομακρύνεται από το κυτοσόλιο και αποθηκεύεται στις ενδοκυτταρικές αποθέματα ή/και εξωθείται στον εξωκυττάριο χώρο με τη δράση της ΑΤΡάσης- Ca^{2+} του ενδοπλασματικού δικτύου (SERCA) και της ΑΤΡάσης- Ca^{2+} της πλασματικής μεμβράνης (PMCA), αντίστοιχα (εικόνα 1).

Ο σχηματισμός του πήγματος των αιμοπεταλίων ή η πρωτογενή αιμόσταση, σχετίζονται με την ενεργοποίηση του καταρράκτη της πήξης, ο οποίος οδηγεί σε εναπόθεση του ινώδους, τη σύνδεση (δευτερογενής αιμόσταση) και τη δημιουργία ενός ερυθρού θρόμβου. Αφού έχει σχηματιστεί ο θρόμβος, τα αιμοπετάλια αναδιατάσσουν και συρρικνώνουν το ενδοκυτταρικό κυτταροσκελετό ακτίνης/μυοσίνης τους. Δεδομένου ότι το δίκτυο της ενδοκυτταρικής ακτίνης είναι συνδεδεμένο με το εσωτερικό τμήμα της ιντεγκρίνης $\alpha IIb\beta 3$, η συσταλτική δύναμη των αιμοπεταλίων στο δίκτυο ινώδους θα οδηγήσει σε "συστολή του θρόμβου». Τέλος, το ινώδες βραδέως διαλύεται από το ινωδολυτικό ένζυμο πλασμίνη, τα αιμοπετάλια εκκαθαρίζονται από φαγοκυττάρωση και η επούλωση των πληγών θα λάβει χώρα (3).

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ



Εικόνα 1. Κύριο μεταγωγικό μονοπάτι των αιμοπεταλίων (3)

1.2 Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων Platelet Activating Factor (PAF)

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) αποτελεί λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών. Η ονομασία της ένωσης κατά IUPAC ως 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφο-χολίνη προσδιορίζει δομικά την ένωση ως ένα γλυκεριναιθερικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης (6).

Ο PAF διαδραματίζει κεντρικό ρόλο σε πολλές βιοχημικές διαδικασίες παθολογικές ή μη. Βιοσυντίθεται από πολλούς τύπους κυττάρων, από κύτταρα προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά, από φυτικά-ζωικά κύτταρα, αλλά και από ιστούς. Παρουσιάζει πληθώρα δράσεων και εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων (7).

Στα αιμοπετάλια, το PAF διαμεσολαβεί στην αποκοκκίωση, στην συσσώρευση και στην αλλαγή σχήματος των αιμοπεταλίων ανάλογα με την προέλευση τους και το εξωκυττάριο Ca^{2+} . Επίσης προκαλεί την αύξηση της εισροής του Ca^{2+} , την ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλγλυκερόλυσης και της παραγωγής προϊόντων μεταβολισμού του αραχιδονικού οξέος, τη σύνθεση TXA2 και τη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών (8).

Τα αιμοπετάλια βιοσυνθέτουν PAF ύστερα από ενεργοποίηση με αγωνιστές όπως το ιονοφόρο του Ca^{2+} A23187, τη θρομβίνη, και το κολλαγόνο (9). Ο PAF εκκρίνεται από τα αιμοπετάλια μετά την ενεργοποίησή τους, συνδεδεμένος στα μικροσωματίδια των αιμοπεταλίων (10).

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων προκαλούμενη από τον PAF, γίνεται μέσω της ιντεγκρίνης $\alpha\text{IIb}\beta_3$ την οποία ακολουθεί σύνδεση του ινωδογόνου. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σηματοδότηση προς το εσωτερικό του κυττάρου με αποτέλεσμα πρόσθετες ενισχυτικές δράσεις (11). Μετά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, μέσα σε λίγα λεπτά, τα εικοσανοειδή, από το αραχιδονικό οξύ απελευθερώνεται από τα φωσφολιποειδή των μεμβρανών. Συγχρόνως, ελευθερώνονται χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες που είναι προσχηματισμένα και αποθηκευμένα στα αποθηκευτικά κοκκία των αιμοπεταλίων (12).

2. Η ινσουλίνη

Η ινσουλίνη είναι μία μείζων γλυκορυθμιστική, αντιλιπολυτική, αντικετονογόνος και αναβολική πεπτιδική ορμόνη (Mr 6000). Αποτελείται από δύο πεπτιδικές αλυσίδες (A & B), οι οποίες συνδέονται με τρεις δισουλφιδικούς δεσμούς. Η αλυσίδα B αποτελεί τον κορμό της βιολογικής δραστηριότητας της ορμόνης, ενώ η αλυσίδα A περιέχει ειδικές θέσεις χαρακτηριστικές για κάθε είδος. Οι δύο πεπτιδικές αλυσίδες της ινσουλίνης συντίθεται από τα (ενδοκρινή) β -κύτταρα του παγκρέατος των νησιδίων του Langerhans. Ένα γονίδιο κατευθύνει τη σύνθεση μιας προ-προορμόνης, από την οποία απελευθερώνεται το σηματοδοτικό πεπτίδιο για να αποδώσει την προϊνσουλίνη, που είναι μία απλή αλυσίδα. Η ινσουλίνη εκκρίνεται με εξωκύτωση από τα κοκκία της, τα οποία διατάσσονται παράλληλα με τα μικροσωληνάρια στο κυτταρόπλασμα των β -κυττάρων (13).

Η έκκριση της ινσουλίνης ελέγχεται από εξωγενείς θρεπτικές ουσίες (γλυκόζη, αμινοξέα, ελεύθερα λιπαρά οξέα, κάλιο, χολινεργικά και β -ανδρενεργικά ερεθίσματα). Όταν η παροχή των θρεπτικών αυτών ουσιών είναι μικρή ή λείπει (καταστάσεις νηστείας και άσκησης), η έκκριση της ινσουλίνης μειώνεται και η κινητοποίηση των ενδογενών καυσίμων ενισχύεται. Η ινσουλίνη προωθεί την αποθήκευση των καυσίμων μορίων. Κύριο ρυθμιστικό μόριο της ινσουλίνης είναι η γλυκόζη. Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης κυμαίνονται κάτω από 50mg/dl, τότε μειώνεται ή και ακόμα αναστέλλεται η έκκριση της ινσουλίνης. Σε περιπτώσεις που τα επίπεδα της γλυκόζης είναι υψηλότερα από 250mg/dl, τότε η απόκριση της ινσουλίνης φθάνει σε μέγιστα επίπεδα. Ο κυριότερος παράγοντας ελέγχου στην έκκριση της ινσουλίνης είναι η συγκέντρωση της γλυκόζης

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

του πλάσματος, καθώς έχει άμεσες επιδράσεις στα β-κύτταρα του παγκρέατος. Η έκκριση της ινσουλίνης καθορίζεται από τη ρυθμιστική δράση της γλυκοκινάσης, η οποία αποτελεί τον ρυθμιστικό παράγοντα φωσφορυλίωσης της γλυκόζης στα β-κύτταρα και δρα ως «γλυκοαισθητήρας» που γεφυρώνει την έκκριση ινσουλίνης με την τρέχουσα συγκέντρωση γλυκόζης στο πλάσμα. Αυτό οφείλεται στην παραγωγή ATP από την ενδοκυττάρια γλυκόλυση, αφού αυτή αποτελεί ουσιαστικό στάδιο στη διαδικασία έκκρισης της ινσουλίνης. Αυξημένα επίπεδα ATP προκαλεί το κλείσιμο ATP-ευαίσθητων διαύλων K^+ στη μεμβράνη των β-κυττάρων, επιφέροντας με αυτό τον τρόπο κυτταροπλασματική εκπόλωση. Στη συνέχεια, η εκπόλωση αυτή ανοίγει τασεο-ευαίσθητους διαύλους Ca^{2+} επιτρέποντας με αυτό τον τρόπο την είσοδο ιόντων ασβεστίου εντός του κυττάρου. Η αύξηση κυττοσολικού ασβεστίου δίνει το έναυσμα μετατόπισης και εξωκυττάρωσης ινσουλινούχων κυστιδίων (14)

2.1 Μηχανισμός δράσης της ινσουλίνης

Για την πρόσληψη της γλυκόζης, υπάρχει ένα σύστημα ειδικού μεταφορέα της εντός της κυτταρικής μεμβράνης των κυττάρων. Οι μεταφορείς αυτοί ανήκουν στην υποοικογένεια των GLUTs που διευκολύνει τη διάχυση (όχι την ενεργητική μεταφορά) της εξωκυττάριας γλυκόζης εντός του κυτταροπλάσματος, ακολουθώντας την κατεύθυνση μιας προϋπάρχουσας κλίσης συγκέντρωσης της γλυκόζης. Η ινσουλίνη αυξάνει τη σύνθεση των GLUT καθώς και τη μεταφορά του από τις αποθήκες του κυτταροπλάσματος στην κυτταρική μεμβράνη. Η αυξημένη ινσουλίνη διεγείρει ορισμένα κυτταροπλασματικά κυστίδια, τα οποία φέρουν στην επιφάνειά τους τον GLUT μεταφορέα, ώστε να συντηγηθούν με την κυτταροπλασματική μεμβράνη αυξάνοντας σημαντικά τον αριθμό των μεμβρανικών υποδοχέων στο κύτταρο-στόχο, γεγονός που με τη σειρά του αυξάνει την ταχύτητα μεταφοράς της γλυκόζης από το εξωκυττάριο υγρό στο εσωτερικό των κυττάρων (διευκολυνόμενη μεταφορά) (15).

Το πρώτο βήμα για τη δράση της ινσουλίνης είναι η πρόσδεση της ορμόνης στον υποδοχέα της στην κυτταρική μεμβράνη. Ο υποδοχέας αυτός είναι μία γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από δύο συμμετρικές υπομονάδες οι οποίες συνδέονται με δισουλφιδικούς δεσμούς. Καθεμία από τις υπομονάδες αποτελείται από την υπομονάδα α, που εκτείνεται εξωκυτταρικά και δεσμεύει την ορμόνη, και από την υπομονάδα β, που διαπερνά την κυτταρική μεμβράνη και καταλήγει σε μια ενδοκυτταροπλασματική ουρά (16).

Τα μόρια του υποδοχέα ανακυκλώνονται μεταξύ μίας κυτταροπλασματικής δεξαμενής και της κυτταρικής μεμβράνης, ο αριθμός των οποίων μορίων ρυθμίζεται από την ινσουλίνη. Μετά την πρόσδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της, η υπομονάδα β αυτοφωσφορυλιώνεται με ATP σε ειδικές θέσεις τυροσίνης. Ο φωσφορυλιωμένος αυτός υποδοχέας μόλις δεσμευτεί με την ινσουλίνη αυτοφωσφορυλιώνεται και αποκτά δράση κινάσης τυροσίνης.

Η αυτοφωσφορυλίωση αυτή του υποδοχέα προκαλεί την ενεργοποίηση διαφόρων μορίων ενδοκυτταρικά όπως των πρωτεϊνών IRS, Cbl (casitas B- lineage lymphoma) και CAP (Cbl associated protein). Τα μόρια αυτά συμμετέχουν ενεργά στη μεταγωγή του σήματος της ινσουλίνης διαμέσου πολλών μονοπατιών που έχουν ως τελικό στόχο την ενεργοποίηση του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT, που βρίσκεται στο εσωτερικό του κυττάρου, ώστε να μεταφερθεί στην πλασματική μεμβράνη όπου και θα προσλάβει τη γλυκόζη.

Αμέσως μετά την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα έπεται η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών IRS 1 και 2. Οι πρωτεΐνες IRS 1 και 2 αποτελούν θέσεις αναγνώρισης για τη στρατολόγηση άλλων μορίων που ακολουθούν το μεταγωγικό μονοπάτι. Πιο συγκεκριμένα η IRS1 και λιγότερο η IRS2, δεσμεύονται στη ρυθμιστική υπομονάδα p85 της PI3K επιτρέποντας την ενεργοποίηση της καταλυτικής υπομονάδας p110 του ίδιου μορίου. Οι PI3K είναι μεσολαβητές του σήματος της ινσουλίνης και έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν την πρωτεΐνη PKB μέσω της δημιουργίας 3,4-διφωσφορικής ινοσιτόλης (PIP2) και 3,4,5-τριφωσφορικής ινοσιτόλης (PIP3). Τα παραπάνω μόρια προσελκύουν και ενεργοποιούν την PKB (protein kinase B), γνωστή και ως Akt διαμέσου άλλων δύο άλλων κινασών, της PKD1 (phosphoinositide-dependent kinase 1) και της mTOR. Επιπλέον, το PIP3 ενεργοποιεί την άτυπη πρωτεϊνική κινάση C (αPKC), η οποία λαμβάνει και αυτή μέρος στην ενεργοποίηση της GLUT. Για τη μεταφορά αυτή σημαντικό ρόλο παίζει ο κυτταροσκελετός και η μεταφορική πρωτεΐνη δυνεΐνη (17).

Ένα άλλο μονοπάτι που ενεργοποιείται μετά την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα της ινσουλίνης, είναι αυτό του c-Cbl, CAP, TC10. Είναι ένα μονοπάτι ανεξάρτητο από το μονοπάτι της PI3K, με τελικό στόχο όμως την ενεργοποίηση και μεταφορά του μεταφορέα GLUT. Αμέσως μετά την εγκατάσταση της ινσουλίνης στον υποδοχέα IR προκαλείται φωσφορυλίωση του c-CBL, η οποία διευκολύνεται μέσω ενός άλλου μορίου, της πρωτεΐνης APS. Το φωσφορυλιωμένο c-CBL συνδέεται με την πρωτεΐνη CAP και το σύμπλοκο c-CBL /CAP μεταναστεύει προς τις λιπιδικές σχεδίες (lipid rafts) της πλασματικής μεμβράνης, χάρη στην αλληλεπίδραση της CAP με τη flotillin (πρωτεΐνη που είναι συνδεδεμένη με τις λιπιδικές σχεδίες). Οι λιπιδικές σχεδίες είναι πλούσιες σε υδρόφοβες πρωτεΐνες που ονομάζονται καβεολίνες. Με την μετανάστευση των c-CBL /CAP

προσελκύεται και ένα άλλο σύμπλοκο, το Crk/ C3G. Η C3G ενεργοποιεί μια μικρή G πρωτεΐνη, που βρίσκεται και αυτή στην πλασματική μεμβράνη, την TC10. Η πρωτεΐνη αυτή, μαζί με το PI3K μονοπάτι, θα συμβάλλει στην πλήρη ενεργοποίηση και μεταφορά του μεταφορέα της γλυκόζης GLUT (18).

Μετά τη δέσμευση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της, το ενεργοποιημένο σύμπλοκο ενδοκυττάρωνεται στα ενδοσώματα, απομακρύνεται η ινσουλίνη και οδηγείται στα λυσοσώματα για αποικοδόμηση. Ο υποδοχέας, είτε ακολουθεί την ίδια πορεία, είτε επαναφέρεται στην αρχική του θέση, στην κυτταρική μεμβράνη. Ο μηχανισμός αυτός είναι σημαντικός για την πλήρη ενεργοποίηση του υποδοχέα καθώς και για την ενεργοποίηση των IRS και της ρυθμιστικής υπομονάδας p85 της PI3K (19,20).

Επίσης, μετά την πρόσληψη της γλυκόζης από την GLUT ακολουθεί η ενδοκυττάρωσή της, η οποία ρυθμίζεται και αυτή από τα ενδοσώματα. Ο μεταφορέας θα ακολουθήσει την ίδια πορεία με τον υποδοχέα της ινσουλίνης. Η ρύθμιση της ενδοκυττάρωσης πραγματοποιείται με τη μεσολάβηση μιας οικογένειας GTPases πρωτεϊνών των Rabs. Τρεις πρωτεΐνες της οικογένειας αυτής, Rab4, Rab5, Rab11, που συμμετέχουν στο ενδοσωμικό σύστημα ανακύκλωσης, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενδοκυττάρωση αλλά και στη μετακίνηση άλλων πρωτεϊνών. Πιο ειδικά, το Rab5 εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη, στα κυστίδια κλαθρίνης και στα πρώιμα ενδοσώματα. Έχει παρατηρηθεί ότι παίζει σημαντικό ρόλο στην εσωτερικοποίηση της GLUT, στην μετακίνηση άλλων μορίων, όπως της PI3K, με σκοπό την ενεργοποίηση άλλων, που είτε παίζουν ρόλο στην τελική ενεργοποίησή της GLUT, είτε στο μηχανισμό της ενδοκυττάρωσης. Επίσης ενεργό ρόλο διαδραματίζει και στην κίνηση του κυτταροσκελετού (21)

2.2 Σακχαρώδης διαβήτης και αντίσταση στην ινσουλίνη

Ο σακχαρώδης διαβήτης είναι μια πολυπαραγοντική νόσος που προκαλείται από έναν συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων. Παρά το γεγονός ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη και απορύθμιση της ομοιόστασης της γλυκόζης και των λιπιδίων είναι τα κύρια χαρακτηριστικά της νόσου, η νοσηρότητα και θνησιμότητα που σχετίζεται με τον διαβήτη είναι κυρίως αποτέλεσμα των μικρο- και μακρο-αγγειακών επιπλοκών (22).

Η μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη σε συνδυασμό με τη διαταραχή των β-κυττάρων δείχνουν να συντελούν στην παθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η αντίσταση στην

ινσουλίνη αναφέρεται στη μειωμένη ευαισθησία ή/και ανταπόκριση στις μεταβολικές δράσεις της ινσουλίνης που προάγουν τη διάθεση της γλυκόζης.

Σε καταστάσεις ινσουλινοαντίστασης, ο οργανισμός εκκρίνει μεγαλύτερες ποσότητες ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, προκαλώντας έτσι υπερινσουλιναιμία, ιδιαίτερα μετά από κάθε γεύμα. Η υπερινσουλιναιμία αυτή μπορεί με τη σειρά της να διαταράξει τη φυσιολογική λειτουργία του παγκρέατος και να οδηγήσει στην παθοφυσιολογία του διαβήτη τύπου 2. Η αντίσταση στην ενδογενή ινσουλίνη στους σκελετικούς μύες, το ήπαρ και στο λιπώδη ιστό, προσπαθεί να αντισταθμιστεί από την υψηλή συγκέντρωση ινσουλίνης στον ορό σε σχέση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στον ορό σε σχέση με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο αίμα (23).

Οι μηχανισμοί ανάπτυξης αντίστασης στην ινσουλίνη ποικίλουν ανάλογα με την κλινική οντότητα στην οποία συνυπάρχουν. Η αντίσταση στην ινσουλίνη μπορεί να οφείλεται σε αυτοαντισώματα στον υποδοχέα της ινσουλίνης, όπως στο σύνδρομο τύπου Β αντίστασης στην ινσουλίνη, ή σε μεταλλάξεις στον υποδοχέα της ινσουλίνης, όπως στον Leprechaunism. Στις περισσότερες περιπτώσεις όμως οι μηχανισμοί είναι σύνθετοι και αφορούν πολλαπλά μονοπάτια στην ενδοκυττάρια μετάδοση του μηνύματος της ινσουλίνης, καθώς και την αλληλεπίδραση μεσολαβητών, μεταβολικών ή ορμονικών όπως συμβαίνει στο σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, στο μεταβολικό σύνδρομο και την παχυσαρκία (24)

2.3 Διαταραχές μεταγωγής του σήματος της ινσουλίνης στον ΣΔΤ2

Πρόσφατες μελέτες συσχετίζουν την ινσουλινοαντίσταση με την παχυσαρκία και συγκεκριμένα η θεωρία της λιποτοξικότητας έδειχνε να εξηγεί τις επιπτώσεις της παχυσαρκίας στην ευαισθησία της ινσουλίνης. Σύμφωνα με τη θεωρία, αυτή η λιπώδης διήθηση του ήπατος και των μυών, μπορεί να επηρεάζει τη σηματοδότηση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα την υπερινσουλιναιμία και τη μη ανοχή στη γλυκόζη. Πλέον όμως είναι γνωστό ότι ο λιπώδης ιστός παίζει έναν πιο ενεργό ρόλο στη ρύθμιση της ινσουλινοαντίστασης (25)

In vitro μελέτες σε μονοκύτταρα και λιποκύτταρα ασθενών με ΣΔΤ2 έχουν δείξει κατά 20%-30% ελαττωμένη τη δεσμευτική ικανότητα της ινσουλίνης, λόγω μείωσης του αριθμού των υποδοχέων της, ωστόσο in vivo σε διαλυτούς υποδοχείς της ινσουλίνης προερχόμενοι από τους μύες και το ήπαρ ασθενών με ΣΔΤ2 βρέθηκε φυσιολογική. Σημαντικές παθοφυσιολογικές μεταλλάξεις του γονιδίου του υποδοχέα της ινσουλίνης δεν έχουν ανευρεθεί και φαίνεται να μην παίζουν ρόλο οι δομικές γονιδιακές αλλαγές του υποδοχέα της ινσουλίνης ως αιτία της αντίστασης στην ινσουλίνη στον ΣΔΤ2 (26)

Η δραστικότητα της τυροσινική κινάσης του υποδοχέα της ινσουλίνης έχει μελετηθεί σε σκελετικούς μύες, ηπατοκύτταρα, λιποκύτταρα, ερυθροκύτταρα ατόμων με ΣΔΤ2 και έχει βρει ελαττωμένη. Ειδικότερα, σε μελέτες *in vivo* με ευγλυκαιμικά υπερινσουλιναϊμικά clamp και βιοψίες μύος παχύσαρκων φυσιολογικών ατόμων και ασθενών με ΣΔΤ2, βρέθηκε σημαντική ελάττωση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης.

Αντιθέτως, έχει παρατηρηθεί φυσιολογική αύξηση της φωσφορυλίωσης της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης, μετά από διέγερση με ινσουλίνη, σε φυσιολογικά άτομα ή σε άτομα με διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν ότι η διαταραγμένη δραστηριότητα της τυροσινικής κινάσης του υποδοχέα της ινσουλίνης είναι επίκτητη, πιθανόν αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας και άλλων μεταβολικών διαταραχών (27)

Διαταραχές που συνδέονται με την ενεργοποίηση και δραστικότητα του IRS-1 και της PI3-κινάσης είναι χαρακτηριστικές, ενδοκυττάριας διαταραχές στον ΣΔΤ2 και σχετίζονται με την αντίσταση στην ινσουλίνη. Η φωσφορυλίωση του IRS-1 και η δραστικότητα της PI3-κινάσης έχει βρεθεί ελαττωμένη σε άτομα με ΣΔΤ2 και σε παχύσαρκα χωρίς ΣΔΤ2 άτομα σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Παρόμοιο εύρημα έχει βρεθεί επίσης σε άτομα με οικογενειακό ιστορικό ΣΔΤ2 σε σύγκριση με τους μάρτυρες, παρ'όλη τη φυσιολογική φωσφορυλίωση της τυροσίνης του υποδοχέα της ινσουλίνης (28)

Η αντίσταση της ινσουλίνης, στη μετάδοση του σήματός της μέσω της PI3-κινάσης, αντιπαραβάλλεται με την ικανότητα της ινσουλίνης να διεγείρει τα μονοπάτια μετάδοσης του σήματος μέσω της MAP-κινάσης σε παχύσαρκα μη διαβητικά άτομα και ασθενείς με ΣΔΤ2. Η υπερινσουλιναϊμία που παρατηρείται σε άτομα με αντίσταση στην ινσουλίνη αυξάνει τη δραστικότητα της MEK-1 και τη φωσφορυλίωση των ERK-1/2 κινασών του συστήματος της MAP-κινάσης. Η διατήρηση της ικανότητας της ινσουλίνης να διεγείρει τα μονοπάτια μετάδοσης του σήματος των MAP-κινασών μπορεί να επιτείνει την αντίσταση στην ινσουλίνη. Η ERK-1/2 μπορεί να φωσφορυλιώσει τον IRS-1 στη σερίνη, και η φωσφορυλίωση της σερίνης του IRS-1 αλλά και του ίδιου του υποδοχέα της ινσουλίνης ενοχοποιείται στην απευαισθητοποίηση του σήματος της ινσουλίνης (29).

2.4 Διαβήτης και αθηρογένεση

Ο διαβήτης είναι μια σύνθετη κατάσταση που χαρακτηρίζεται από χρόνια υπεργλυκαιμία και συνδέεται με αθηροθρομβωτικές επιπλοκές. Αθηροθρόμβωση είναι η κύρια αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας σε ασθενείς με διαβήτη (30). Ο διαβήτης αυξάνει τον κίνδυνο στεφανιαίας

νόσου, εγκεφαλικού επεισοδίου, και περιφερικής αρτηριακής νόσου από 2 έως 4 φορές (31). Ο διαβήτης είναι ανεξάρτητος παράγοντας κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα και προστίθεται σε άλλους παράγοντες κινδύνου όπως υπέρταση, παχυσαρκία, κάπνισμα, και δυσλιπιδαιμία. Θεωρείται ως μια προθρομβωτική κατάσταση. Διάφοροι παράγοντες συμβάλλουν στην προθρομβωτική κατάσταση, όπως η αύξηση της πήξης, της ινωδόλυσης, η μειωμένη, ενδοθηλιακή λειτουργία και η υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων (32)

Η υπερδραστικότητα των αιμοπεταλίων έχει βρεθεί επίσης σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1. Προτείνεται ότι η υπεργλυκαιμία από μόνη της μπορεί να προκαλέσει τροποποίηση στην ανταπόκριση των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη. Το οξειδωτικό στρες που χαρακτηρίζει τους δύο τύπους διαβήτη, έχει επίσης βρεθεί ως σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τις φαινοτυπικές αλλαγές των αιμοπεταλίων στον διαβήτη (33).

3. Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και αιμοπετάλια

Ο όρος μεταγευματική υπεργλυκαιμία, αναφέρεται στις αυξήσεις της συγκέντρωσης της γλυκόζης του αίματος μετά από την κατανάλωση ενός γεύματος. Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης ξεκινά περίπου 10 λεπτά μετά την έναρξη ενός γεύματος, ως αποτέλεσμα της πέψης των υδατανθράκων, κορυφώνεται περίπου στα 30-60 λεπτά και επανέρχεται στα επίπεδα νηστείας μέσα σε 2 ώρες από την κατανάλωση του γεύματος. Το προφίλ της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας καθορίζεται από μία πληθώρα παραγόντων όπως ο χρόνος κατανάλωσης του γεύματος (πρωινό, μεσημεριανό, βραδινό), η ποσότητα, η σύνθεση του γεύματος, η περιεκτικότητα και το είδος των υδατανθράκων (απλοί, σύνθετοι υδατάνθρακες, χαμηλού, υψηλού γλυκαιμικού φορτίου) και η έκκριση ινσουλίνης και γλυκαγόνης. (34)

Η κατανάλωση γευμάτων υψηλού ενεργειακού περιεχομένου οδηγούν σε υπερβολικές αυξήσεις γλυκόζης και λιποειδών στο αίμα. Η κατανάλωση τέτοιων γευμάτων ακολουθείται από μία οξεία, παροδική, συντριπτική ροή υποστρωμάτων υψηλής ενέργειας (γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα) στα κύτταρα. Η ανεπαρκής μεταβολική κάθαρση αυτών των υποστρωμάτων, η οποία είναι πιο έντονη κάτω από συνθήκες της αντίστασης στην ινσουλίνη οδηγεί σε παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου, προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης και υπολειμμάτων λιποπρωτεϊνών πλούσιων σε τριγλυκερίδια (35).

Το μεταγευματικά επαγόμενο οξειδωτικό στρες επάγει φλεγμονώδη αντίδραση, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, και ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Οι καταστάσεις αυτές

συμμετέχουν ενεργά στη διαδικασία της αθηρογένεσης και στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας, μέσω των μεσολαβητών που εκκρίνονται (36)

3.1 Είσοδος και Μεταβολισμός της γλυκόζης στα αιμοπετάλια

Η συσσωμάτωση και η έκκριση των αιμοπεταλίων εξαρτώνται από τη γλυκόζη του πλάσματος σαν μοναδική πηγή για την αναερόβια ανασύνθεση του μεταβολικού ATP. Τα αιμοπετάλια έχουν μικρού μεγέθους μιτοχόνδρια και για αυτό σε συνθήκες ηρεμίας εξασφαλίζουν την ενεργεία τους κατά 60-70% από την αναερόβια γλυκόλυση, ενώ την υπόλοιπη ενέργεια την εξασφαλίζουν από τον οξειδωτικό μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. Στο κυτταρόπλασμα των αιμοπεταλίων αποθηκεύεται γλυκογόνο το οποίο δεν χρησιμοποιείται σε συνθήκες ηρεμίας, και κατά συνέπεια η κάλυψη των ενεργειακών αναγκών οφείλεται κυρίως στην ικανότητα τους να μεταφέρουν γλυκόζη στο εσωτερικό του κυττάρου. Σε ηρεμία η κύρια ενεργειακή ανάγκη των αιμοπεταλίων είναι η διατήρηση της σταθερής κατάστασης μεταξύ του πολυμερισμού και από-πολυμερισμού της ακτίνης, διαδικασία η οποία θεωρείται απαραίτητη για την διατήρηση της δομικής ακεραιότητας του κυττάρου.

Κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, δίνεται το έναυσμα για την έναρξη γεγονότων που απαιτούν ενέργεια όπως ο πολυμερισμός της ακτίνης, η αλλαγή σχήματος, η συσσώρευση, η έκκριση των κοκκίων, η διέγερση της PLC και της PKC, η αύξηση των ενδοκυτταρικών επιπέδων ασβεστίου με απελευθέρωση από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες και εισροή από τον εξωκυττάριο χώρο, αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, και απελευθέρωση του αραχιδονίου οξέος. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες έχουν ως αποτέλεσμα να τριπλασιάζουν τις ενεργειακές ανάγκες των αιμοπεταλίων σε σχέση με τις ανάγκες τους σε συνθήκες ηρεμίας. Για να καλυφθούν αυτές οι ανάγκες διεγείρεται η γλυκογονόλυση αλλά και η μεταφορά γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων (37).

3.2 Μεταγωγή σήματος της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια

Στα αιμοπετάλια, η πρόσληψη της γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω των GLUT3, οι οποίοι είναι παρόντες στη πλασματική μεμβράνη (15%) και στη μεμβράνη των ενδοκυτταρικών α-κοκκίων (85%) (38).

Όπως προαναφέρθηκε ένα σημαντικό στοιχείο σηματοδότησης σε ιστούς ινσουλινοευαίσθητους είναι η PKB, η οποία συμμετέχει στη πρόσληψη της γλυκόζης που επάγεται

από την ινσουλίνη. Τα αιμοπετάλια εκφράζουν τις ισομορφές PKB α και PKB β , της πρωτεϊνικής κινάσης, που συμβάλλουν στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων (39).

Η δραστηριότητα της PKB εξαρτάται από τη φωσφορυλίωση σε κατάλοιπα σερίνης (Ser 473/4) και θρεονίνης (Thr 308/9) για την PKB α και PKB β αντίστοιχα και από ένα μηχανισμό ανεξάρτητο της PI3 κινάσης ο οποίος περιλαμβάνει την πρωτεϊνική κινάση, ευαίσθητη στα ιόντα ασβεστίου, την κινάση διασυνδεδεμένη με ιντεργκρίνες, τη διακίνηση της φωσφιδυλοσερίνης και την κινάση της Src-οικογένειας Lyn (40)

Λόγω της δράσης της ινσουλίνης στους ινσουλινο-ευαίσθητους ιστούς, θα αναμένονταν ως απόκριση στην ινσουλίνη, τα αιμοπετάλια να αυξάνουν τη λήψη της γλυκόζης μέσω ενός μηχανισμού εξαρτώμενο από την PKB. Παρόλα αυτά, η αύξηση της λήψης γλυκόζης προϋποθέτει την αύξηση της έκφρασης των GLUT-3 στην πλασματική μεμβράνη των αιμοπεταλίων, κάτι που πραγματοποιείται με σύντηξη των α -κοκκίων με την πλασματική μεμβράνη και απαιτεί την αύξηση της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης των ιόντων ασβεστίου. Σύμφωνα με τον Ferreira και τους συνεργάτες του, η ινσουλίνη ενεργοποιεί την PKB, και διεγείρει τη λήψη γλυκόζης από τα αιμοπετάλια, παρόλο που αναστέλλει την κινητοποίηση ιόντων ασβεστίου στο κυτταρόπλασμα.

Η συγκεκριμένη μελέτη, προτείνει ότι η δράση της ινσουλίνης ως ενεργοποιητή ή ως αναστολέας για την PKB, εξαρτάται από τις συγκεντρώσεις γλυκόζης στον εξωκυτταρικό χώρο. Συγκεκριμένα, σε χαμηλά επίπεδα γλυκόζης (0,1mM) τόσο η θρομβίνη όσο η ινσουλίνη προκαλούν τη λήψη γλυκόζης από τα κύτταρα, μειώνοντας το K_m του μεταφορέα για γλυκόζη (θρομβίνη και ινσουλίνη) και αυξάνοντας το V_{max} του (θρομβίνη). Σε φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης (5mM), η ινσουλίνη φαίνεται να συμπεριφέρεται και ως αναστολέας της πρόσληψης γλυκόζης λόγω της επίδρασης της θρομβίνης, μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος φαίνεται να είναι ανεξάρτητος με την PKB. Σύμφωνα με τον Ferreira, φαίνεται ότι και ο GLUT-3 επηρεάζεται έμμεσα από την ινσουλίνη μέσω της δράσης της PKB. Παρατηρείται λοιπόν, ότι ο GLUT-3 και κατά συνέπεια η πρόσληψη γλυκόζης από τα αιμοπετάλια, ρυθμίζεται από τις αλλαγές στην έκφρασή του στην επιφάνεια του κυττάρου και διαμόρφωση της συγγένειάς του με το μόριο της γλυκόζης, όπου και τα δύο φαίνεται να ελέγχονται μέσω τις PKB (41).

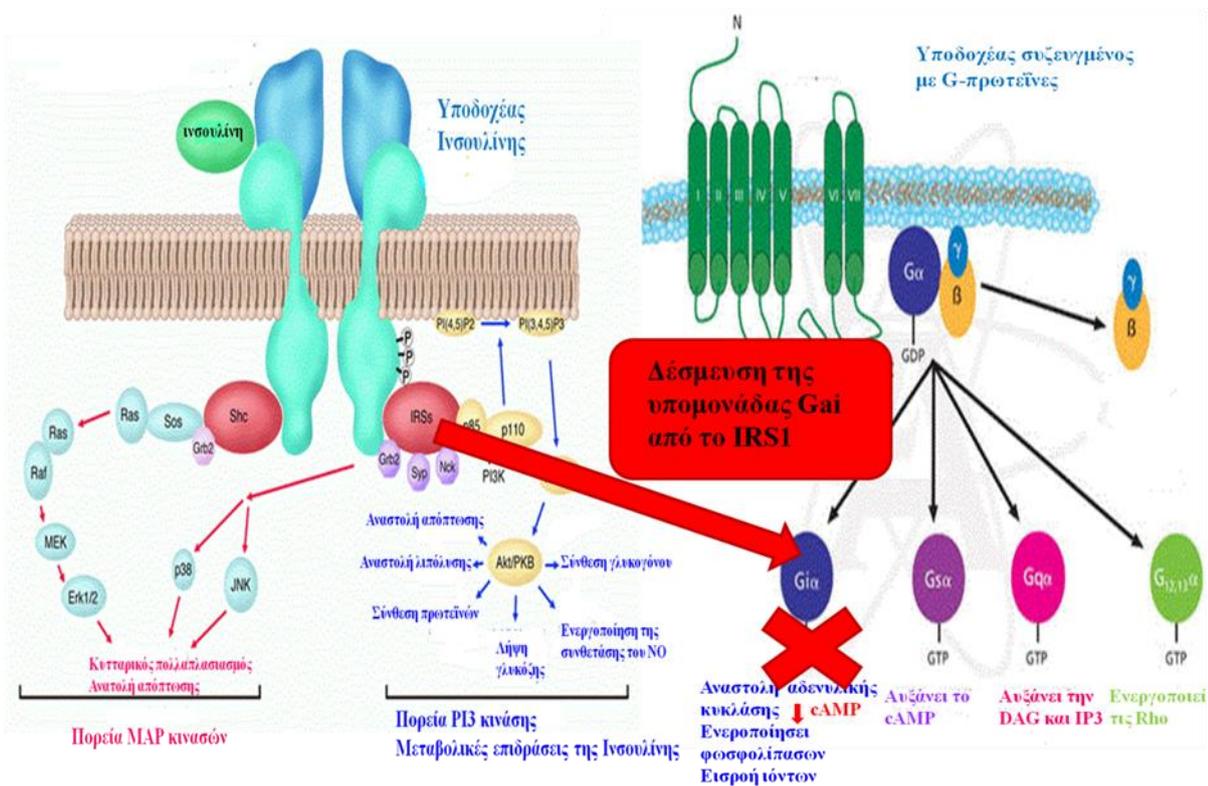
3.3 Αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από την ινσουλίνη

In vitro μελέτες έχουν δείξει την ικανότητα της ινσουλίνης να αναστέλλουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων που διαμεσολαβείτε από την ADP, PAF, θρομβίνη και επινεφρίνη.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Όπως έχει αναφερθεί νωρίτερα βασικό στοιχείο σε ινσουλίνο-ευαίσθητους ιστούς είναι η πρωτεΐνη IRS-1 η οποία ελέγχει τη μεταγωγή σήματος από τον υποδοχέα ινσουλίνης προς τη PI3-K. Στα αιμοπετάλια, η ενεργοποίηση του IRS-1 επάγει τη σύνδεση του IRS-1 με την υπομονάδα Gai των υποδοχέων που είναι συζευγμένοι με G-πρωτεΐνες (υποδοχέας του PAF, πουρινεργικός υποδοχέας P2Y12 του ADP, υποδοχέας της θρομβίνης PAR-1 κ.λ.π) (42).

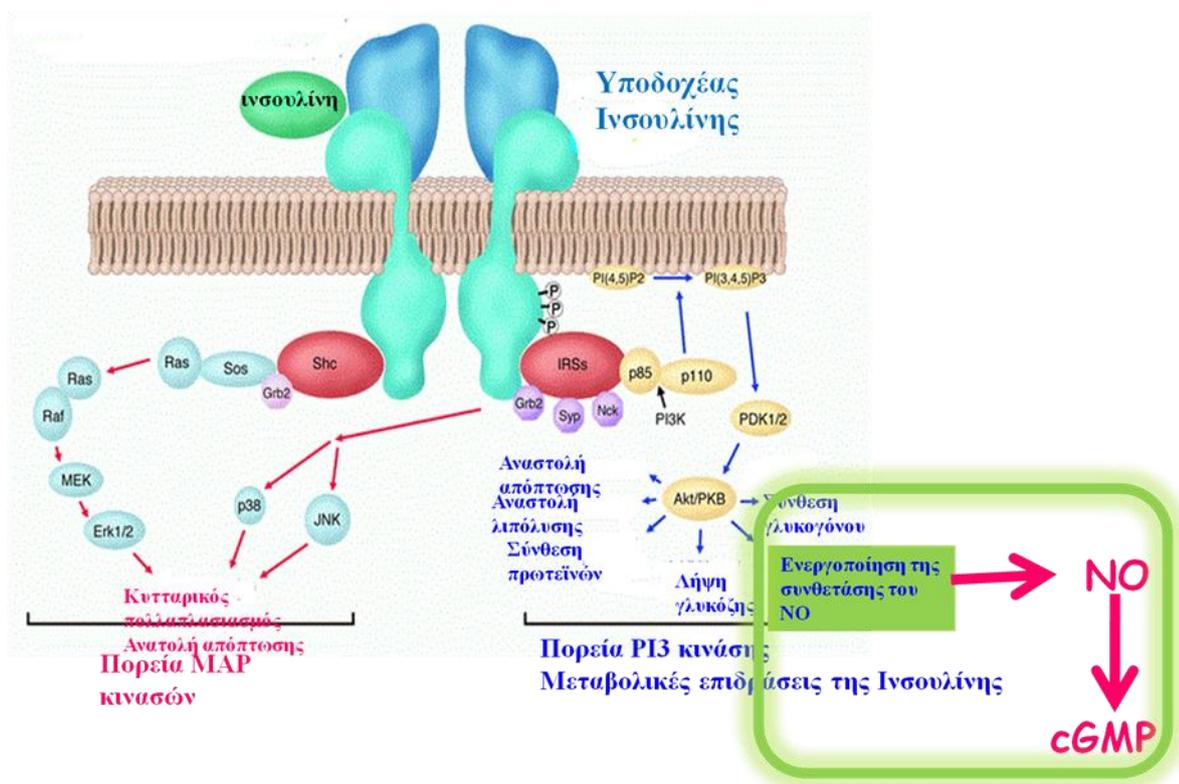
Οι υποδοχείς, οι οποίοι είναι συζευγμένοι με Gi-πρωτεΐνες, κατά την ενεργοποίησή τους προκαλούν αναστολή της αδενυλικής κυκλάσης, με αποτέλεσμα να μειώνουν την ενδοκυτταρική συγκέντρωση του cAMP, υποστηρίζοντας έτσι την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (43,44). Το αποτέλεσμα της φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης της υπομονάδας Gai είναι η αδρανοποίηση των Gi-πρωτεΐνων, με επακόλουθο την διατήρηση των υψηλών επιπέδων ενδοαιμοπεταλιακού cAMP και των χαμηλών συγκεντρώσεων ιόντων ασβεστίου, με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (Εικόνα 3).



Εικόνα 2: Κατά τη σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της στα αιμοπετάλια, η ενεργοποίηση του IRS-1 προκαλεί τη σύνδεση του IRS-1 με την υπομονάδα Gai των υποδοχέων που είναι συζευγμένη με Gi-πρωτεΐνες και προκαλεί την αναστολή τους με τελικό αποτέλεσμα την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, μέσω παρεμπόδισης της μείωσης του ενδοκυτταρικού cAMP.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Το κυκλικό GMP συντίθεται από τη γουανυλική κυκλάση και η ενεργοποίησή της επάγεται από το NO και από νίτρο-αγγειοδιασταλτικούς παράγοντες. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη γουανυλική κυκλάση αυξάνοντας τη συγκέντρωση του cGMP, το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μείωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και την επαγόμενη από την ινσουλίνη αντί-συσσωρευτική επίδραση στα αιμοπετάλια. Έχει παρατηρηθεί πειραματικά, ότι η χορήγηση φυσιολογικής ποσότητας ινσουλίνης στα ανθρώπινα αιμοπετάλια έχει ως αποτέλεσμα να αυξάνεται και το cAMP εκτός από το cGMP, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου και κατά συνέπεια η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (45,46).



Εικόνα 3: Η ινσουλίνη ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της NOS στα αιμοπετάλια και μέσω του NO γρήγορα αυξάνεται το ενδοκυτταρικό περιεχόμενο του cGMP.

Το αποτέλεσμα της δράσης των cAMP και cGMP είναι να αποτρέπουν την ελευθέρωση Ca^{2+} από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες, επειδή εμποδίζουν την ενεργοποίηση της PLC και κατά συνέπεια το σχηματισμό της IP3 η οποία μεσολαβεί ώστε να κινητοποιηθεί το Ca^{2+} από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες μαζί με την DAG

Η δράση των κυκλικών νουκλεοτιδίων cAMP και cGMP επίσης μειώνει τη σύνδεση της θρομβίνης με τους υποδοχείς της, παρεμβαίνει στη PKC, υποκινεί την Ca-ATPase η οποία ενισχύει την εξώθηση Ca^{2+} από τα αιμοπετάλια και τη λήψη Ca^{2+} από το πυκνό σωληνοειδές σύστημα (47).

Ο δεύτερος τρόπος δράσης της ινσουλίνης μέσω του οποίου μειώνει το ενδοκυτταρικό Ca^{2+} λαμβάνει χώρα μέσω της αντλίας της Na^+-K^+ ATPase, η οποία ανταλλάσσει ενδοκυτταρικό K^+ με εξωκυτταρικό Ca^{2+} . Όταν διεγερθεί η αντλία μέσω της ανταλλαγής των ιόντων μεταξύ του ενδοκυτταρικού και εξωκυτταρικού χώρου, η περικυτταρική μεμβράνη υπερπολώνεται με αποτέλεσμα το κλείσιμό της, διαδικασία εξαρτώμενη από την τάση της μεμβράνης, με αποτέλεσμα τη μείωση του ενδοκυτταρικού ασβεστίου (48).

Σε καταστάσεις παχυσαρκίας, παχυσαρκίας - σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 και αρτηριακής υπέρτασης, έχει σημειωθεί ότι η αντι-συσσωρευτική επίδραση της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια είναι μειωμένη. Επίσης, έχει βρεθεί ότι σε ασθενείς με ινσουλινο-αντοχή η δράση του cAMP είναι σοβαρά εξασθενημένη και σε αιμοπετάλια ζώων και ανθρώπων με ινσουλινο-αντοχή παρουσιάζεται αυξημένο κυτταρικό ασβέστιο (49,50).

3.4 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία και αθηροσκλήρωση

Οι βιοχημικοί μηχανισμοί που διέπουν τη διασύνδεση μεταξύ μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας και αθηροσκλήρωσης συνδέονται με την έναρξη της οξειδωτικής και φλεγμονώδους αντίδρασης στο ενδοθήλιο.

Υψηλές μεταγευματικές αυξήσεις της γλυκόζης μπορεί να οδηγήσουν στον σχηματισμό των προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), τα οποία συνδέονται με τους υποδοχείς τους (RAGES) σε μονοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα και ενεργοποιούν τις MAPK, την PKC και το NF-kB που με τη σειρά αυξάνει τη μεταγραφή προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών TNF α , IL-1 και IL-6, του μορίου προσκόλλησης (VCAM1), αγγειοσυσταλτικών μορίων (αγγειοτενσίνη II, ενδοθηλίνη-1), του ενεργοποιητή του αναστολέα του πλασμινογόνου (PAI-1) και αυξητικών παραγόντων (TGF και VEGF). Επιπλέον, τα σχηματιζόμενα AGEs αναστέλλουν τη NO συνθάση καθιστώντας με τον τρόπο αυτό το αγγειακό ενδοθήλιο σε προθρομβωτική κατάσταση. Ο PAF, μόριο κλειδί για τη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης, πιθανόν να παράγεται κατά το μεταγευματικό στάδιο, καθώς οι συνθήκες που επικρατούν ευνοούν τον σχηματισμό του από

πληθώρα κυττάρων, και προάγουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσω της παρεμπόδισης της φυσιολογικής ανασταλτικής δράσης της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια (51).

Η σταθερή προσκόλληση των αιμοπεταλίων στο φλεγμονώδες ενδοθήλιο διαμεσολαβείται από τους παράγοντες αIIbβ3 και GP1ba των αιμοπεταλίων και από τους ICAM-1 και ιντεγκρίνες ανβ3 του ενδοθηλίου (52). Τα προσκολληθέντα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται περαιτέρω λόγω της έκκρισης των μεσολαβητών ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων από ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, όπως η θρομβίνη, ADP και ο PAF (53). Επιπλέον, ο PAF, ενσωματωμένος στην εξωτερική στοιβάδα της ενδοθηλιακής μεμβράνης, μπορεί να ενεργοποιήσει περαιτέρω τα αιμοπετάλια και με αυτό τον τρόπο να αυξήσει την έκφραση κυτοκίνων και χημειοκίνων από τα αγγειακά κύτταρα, τα οποία με τη σειρά τους ενεργοποιούν λευκοκύτταρα και ενδοθηλιακά κύτταρα σε ένα φλεγμονώδη υπόβαθρο.

Ο PAF πιθανόν να παράγεται κατά το μεταγευματικό στάδιο, καθώς οι συνθήκες που επικρατούν, ευνοούν τον σχηματισμό του από πληθώρα κυττάρων. Οι μηχανισμοί που ενεργοποιούνται σε αυτό το στάδιο (ενεργοποίηση του NF-κB, αυξημένα κυκλοφορούντα επίπεδα φλεγμονωδών κυτταροκινών, όπως TNF-α, IL-6) είναι πιθανόν να διεγείρουν την έκκριση PAF από τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα και τα επιθηλιακά κύτταρα. Ο μεταγευματικά παραγόμενος PAF θα μπορούσε διττά να ενεργοποιήσει τα αιμοπετάλια, είτε άμεσα ως ένας από τους ισχυρότερους αγωνιστές της συσσώρευσης τους, είτε έμμεσα εμποδίζοντας την αντ αιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης (54).

3.5 Οξεία μεταγευματική υπεργλυκαιμία και αιμοπετάλια

Τα αποτελέσματα της υπεργλυκαιμίας/υπερίνσουλιναίμιας που προκαλείται, είτε από ένα γεύμα, είτε από μία φόρτιση γλυκόζης (oral glucose load, OGL) στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων, είναι αντιφατικές και εξαρτώνται από τον λειτουργικό δείκτη που προσδιορίζεται και το κλινικό προφίλ του ατόμου. Έχει βρεθεί πως η οξεία υπεργλυκαιμία μπορεί να προκαλέσει αυξήσεις των συσσωματωμάτων αιμοπεταλίων/μονοκυττάρων, των επιπέδων της διαλυτής P-σελεκτίνης (sP-σελετίνης) και της έκφρασης της P-σελεκτίνης, επαγόμενη από την ADP σε διαβητικούς ασθενείς τύπου II (55).

Η P-σελεκτίνη (CD62P) αποτελεί το μεγαλύτερο μόριο από την οικογένεια των σελεκτινών, με μάζα 140 kDa. Λειτουργεί ως μόριο κυτταρικής προσκόλλησης επί των επιφανειών των

ενεργοποιημένων ενδοθηλιακών κυττάρων. Εκφράζεται στα ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια και αποτελεί σημαντικό μόριο για την σύνδεση των ουδετερόφιλων. Συντίθεται και αποθηκεύεται σε κυτταροπλασματικά κοκκία που μεταφέρονται στην επιφάνεια των ενεργοποιημένων κυττάρων. Στα θρομβοκύτταρα περιέχεται στα α-κοκκία και στα ενδοθηλιακά κύτταρα στα σωμάτια Weibel – Palade (56). Η ισταμίνη και η θρομβίνη προκαλούν την έκφραση της από το αγγειακό ενδοθήλιο. Οι πρωτεΐνες IL-1 και IFN, επίσης, επάγουν την παραγωγή της καταδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο των κυτταροκινών στη βλάβη από φλεγμονή. Οι σελεκτίνες μπορούν να συνδεθούν με υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Η πρόσδεση με τα μόρια υδατανθράκων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της προσκόλλησης (57). Τα επίπεδα της P-σελεκτίνης έχουν προταθεί ως ένας αξιόπιστος δείκτης ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών βλαβών (58). Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν ήταν σε θέση να βρουν σημαντικές αυξήσεις της έκφρασης της P-σελεκτίνης επαγόμενης από τις ADP και θρομβίνης σε διαβητικούς ασθενείς, ή διαφορές στην έκκριση της sP-σελεκτίνης σε εθελοντές με διαταραγμένη ανοχή στην γλυκόζη (59).

3.5 Ανωμαλίες της λειτουργίας των αιμοπεταλίων στο διαβήτη

Τα αιμοπετάλια διαδραματίζουν κεντρικό ρόλο στην αθηροθρόμβωση των ασθενών με διαβήτη. Χαρακτηρίζονται από απορρύθμιση αρκετών οδών σηματοδότησης, έχουν αυξημένη δραστηριότητα, δείχνοντας αυξημένη προσκόλληση, ενεργοποίηση και συσσωμάτωση (60). Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων συνεισφέρει στην παθολογία όχι μόνο με την πυροδότηση του σχηματισμού θρόμβων, αλλά επίσης προκαλεί μικροτριχοειδικούς εμβολές και απελευθέρωση συσταλτικών, οξειδωτικών και μιτογόνων ουσιών, που επιταχύνουν την πρόοδο των τοπικών αγγειακών βλαβών.

Η μη ενζυμική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών μπορεί να είναι σημαντική σε διαβητικούς με αθηροθρόμβωση (61). Αυξημένη γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών της μεμβράνης των αιμοπεταλίων παρατηρείται στο διαβήτη και τα περισσότερα από τα γλυκοζυλιωμένα αιμοπετάλια μπορούν να ενσωματωθούν σε θρόμβους (62). Μερικά από τα AGEs προκαλούν εξωτερίκευση της φωσφατιδυλοσερίνης της μεμβράνης των αιμοπεταλίων, οδηγούν στην ενεργοποίηση των παραγόντων πήξεως στην επιφάνεια και έτσι ενισχύουν άμεσα τη θρομβογόνο κατάσταση (63). Η γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών επιφάνειας των αιμοπεταλίων των διαβητικών ασθενών προκαλεί μειωμένη ρευστότητα της μεμβράνης και αύξηση της ευαισθησίας σε αγωνιστές των αιμοπεταλίων (64). Αιμοπετάλια από ασθενείς παρουσιάζουν χαμηλά ενδοκυττάρια επίπεδα των ενδογενών αντιοξειδωτικών, και αυτό με τη σειρά έχει συνδεθεί με αυξημένη παραγωγή θρομβοξάνης (65). Ο

μέσος όγκος αιμοπεταλίων (MPV) είναι καθοριστικός παράγοντας της λειτουργικότητάς τους και αυξημένο MPV σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για έμφραγμα του μυοκαρδίου, εγκεφαλικό επεισόδιο και παροδικές ισχαιμικές προσβολές (66). Αύξηση των MPV έχει τεκμηριωθεί σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο, εγκεφαλικό επεισόδιο, σακχαρώδη διαβήτη και σε ασθενείς με διαταραχές της γλυκόζη νηστείας. Στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης στον διαβήτη υπάρχουν πολλοί πιθανοί συνεισφέροντες παράγοντες, στους οποίους περιλαμβάνονται η αυξημένη δημιουργία ενδοαγγειακής θρομβίνης και μειωμένο ινωδολυτικό δυναμικό (67). Τα επίπεδα του ινωδογόνου μπορεί επίσης να είναι αυξημένα και να ευνοείται ο σχηματισμός των ινωδών θρόμβων και η συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. Η ινωδολυτική δραστηριότητα που έχει αναφερθεί ότι είναι χαμηλή στο διαβήτη τύπου 2 (68) πιστεύεται ότι οφείλεται στα υψηλά επίπεδα του PAI-1 (69). Το οξειδωτικό στρες μπορεί επίσης να επηρεάσει άμεσα την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Τα ανιόντα υπεροξειδίου ενισχύουν την ενδοαιμοπεταλιακή απελευθέρωση ασβεστίου κατά την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, συμβάλλοντας στην ενίσχυση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (70). Το φυσιολογικό ενδοθηλίο παράγει μονοξειδίο του αζώτου (NO) και προστακυκλίνη που αναστέλλουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Στην ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, χαρακτηριστική στον διαβήτη, μειώνεται η παραγωγή του NO και προστακυκλινών συμβάλλοντας στην αιμοπεταλιακή υπερδραστικότητα. Το NO μπορεί να οξειδωθεί από ανιόντα υπεροξειδίου, οδηγώντας σε περαιτέρω μείωση της ημίσειας ζωής και της αντιαιμοπεταλιακής δράσης του. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων αυξάνεται σε ασθενείς με ανεξέλεγκτο ινσουλινοεξαρτώμενο διαβήτη και επιστρέφει σε φυσιολογικά επίπεδα μετά από 24 ώρες θεραπείας με έγχυση ινσουλίνης (71). Η υπερσφρευτικότητα των αιμοπεταλίων στο διαβήτη τύπου 2 μπορεί να προκαλείται από την απώλεια της ευαισθησίας στην ινσουλίνη. Κάτω από πειραματικές συνθήκες, τα αιμοπετάλια των ασθενών με διαβήτη τύπου 2 εμφανίζουν καλύτερη προσκόλληση σε μία προθρομβωτική επιφάνεια κάνουν μεγαλύτερα συσσωματώματα, έχουν αυξημένη προπηκτική επιφάνεια σε σύγκριση με τα αιμοπετάλια από υγιείς μάρτυρες (72). Ένα βήμα κλειδί στην έναρξη του αιμοστατικού βύσματος είναι η έκθεσης στον ιστικό παράγοντα (TF). Ο TF αποτελεί αναπόσπαστη διαμεμβρανική πρωτεΐνη που βρίσκεται στη πλασματική μεμβράνη. Ο TF δεσμεύει το ενεργοποιημένο FVII και το σύμπλοκο αυτό ενεργοποιεί τους παράγοντες FVIII, FIX και FX, προκαλώντας τη δημιουργία της θρομβίνης και την πρόκληση της πήξης (73). Σε υγιή άτομα, η σύνθεση TF αναστέλλεται από την ινσουλίνη, αλλά σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 η αναστολή αυτή είναι μειωμένη (73). Από την άλλη πλευρά, διαπιστώθηκε ότι ασθενείς με διαβήτη υψηλού κινδύνου τύπου 2, χωρίς προηγούμενη ισχαιμικά επεισόδια έχουν φυσιολογικό προφίλ

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

λειτουργικότητας των αιμοπεταλίων (74). Συνοψίζοντας, σύμφωνα με την Watala et al. 2005, μεταξύ των ασθενών με ΣΔ, η αυξημένη συσσώρευση και προσκόλληση των αιμοπεταλίων οφείλεται στα εξής: στη μειωμένη ρευστότητα της μεμβράνης των αιμοπεταλίων λόγω των αλλαγών στη λιπιδική σύνθεση της μεμβράνης, στη γλυκοζυλίωση πρωτεϊνών μεμβράνης, στη αυξημένη παραγωγή της θρομβοξάνης A₂, στη αυξημένη έκφραση μορίων προσκόλλησης αιμοπεταλίων, στην αυξημένη έκφραση των επιφανειακών υποδοχέων των αιμοπεταλίων και στη παραγωγή θρομβίνης εξαρτώμενη από τα αιμοπετάλια (64). Τα αιμοπετάλια των ασθενών με ΣΔ είναι λιγότερα ευαίσθητα στις επιδράσεις της προστακυκλίνης και NO, δείχνουν διαταραγμένη ομοιόσταση ασβεστίου και μαγνησίου. Τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια σε ασθενείς με διαβήτη είναι επίσης πλούσια σε κυτοκίνες και χημειοκίνες και ως εκ τούτου συμβάλλουν στη φλεγμονή και την αθηρογένεση, παράλληλα με ένα προπηκτικό περιβάλλον. Σε παιδιατρικούς ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 έχει βρεθεί ότι παρουσιάζουν μορφολογικά στοιχεία της υπερλειτουργικότητας. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερος μέσος όγκος (MPV) και ποσοστό των κυττάρων με μεγαλύτερο μέγεθος. Το γεγονός αυτό δυνητικά θα μπορούσε να συμβάλλει σε αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο σε ενήλική ζωή (75, 76).

Συνοψίζοντας οι πιθανοί μηχανισμοί της υπερδραστικότητας των αιμοπεταλίων φαινονται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1. Πιθανοί μηχανισμοί της υπερδραστικότητας των αιμοπεταλίων (32)

Μειωμένη ρευστότητα της μεμβράνης
Διαταραγμένη ομοιόσταση του Ca ²⁺ και του Mg ²⁺
Μη ενζυμική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών επιφανείας των αιμοπεταλίων
Αυξημένη προσκόλληση και ενεργοποίηση
Αυξημένος μεταβολισμό του αραχιδονικού οξέος
Αυξημένη σύνθεση θρομβοξάνης A ₂
Αύξηση του αριθμού των υποδοχέων γλυκοπρωτεΐνης
Αύξηση του όγκου των αιμοπεταλίων
Ενισχυμένη παραγωγή δραστικών ελευθερών ριζών οξυγόνου
Μειωμένα επίπεδα αντιοξειδωτικών
Μειωμένη προστακυκλίνης και μειωμένη παραγωγή νιτρικού οξειδίου
Μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η σχέση της υπεργλυκαιμίας/υπερινσουλιναίμιας με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μέσα από δύο μεθοδολογικές προσεγγίσεις. Στην πρώτη προσέγγιση μελετήθηκε η επίδραση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας/υπερινσουλιναίμιας, μέσω διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης, στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων που επάγεται από διαφορετικούς συσσωρευτικούς παράγοντες. Στη δεύτερη, ex vivo προσέγγιση, σκοπός της εργασίας ήταν να βρεθούν συνθήκες για την μελέτη της μοριακής αλληλεπίδρασης της ινσουλίνης με το μεταγωγικό μονοπάτι του συσσωρευτικού παράγοντα PAF, συγκεκριμένα τη εύρεση συνθηκών αναστολής της συσσώρευσης με ινσουλίνη, τη εύρεση συνθηκών αναστολής της δράσης της ινσουλίνης από τον PAF και η μελέτη της μεταγωγής σήματος στη σχέση PAF - ινσουλίνης

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ



ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Επιλογή Εθελοντών

Στα πλαίσια της έρευνας που πραγματοποιείται αυτή η πτυχιακή μελέτη, επιλέχθηκαν υγιή άτομα, άνδρες και γυναίκες, με ηλικιακό εύρος 20-40.

Στους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες. Η αιμοληψία για τις γυναίκες πραγματοποιήθηκε κατά τις πρώτες 7-10 ημέρες του εμμηνορυσιακού 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 75g 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. 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 στο ελάχιστο ενεργά, 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.

2. Ανθρωπομετρία

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ελαφρύ ρουχισμό και χωρίς υποδήματα, σε ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας. Το ύψος μετρήθηκε με τη χρήση εντοιχισμένου αναστημομέτρου σε όρθια στάση, χωρίς παπούτσια και με ακρίβεια $0,5 \text{ cm}$. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν εις διπλούν. Ακόμη, υπολογίστηκαν ο μέσος όρος του βάρους και ο μέσος όρος του ύψους κάθε εθελοντή, σύμφωνα με τους οποίους έπειτα υπολογίστηκαν ο $\Delta\text{Μ}\Sigma$ (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, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για την περιφέρεια μέσης και την περιφέρεια ισχίου, όπως και υπολογισμός για το πηλίκο της περιφέρειας μέσης ως προς την περιφέρεια ισχίου.

3. 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, καταναλώνει 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, πραγματοποιήθηκαν οι ανθρωπομετρήσεις (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) και μέτρηση της αρτηριακής πίεσης. Προτού οι εθελοντές οδηγηθούν στη φάση της παρέμβασης, πραγματοποιήθηκε αιμοληψία με τη βοήθεια φλεβοκαθετήρα. Στη συνέχεια, δόθηκε 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 έγιναν από ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό με παράλληλη παρουσία ιατρού.

4. Απομόνωση πλούσιων αιμοπεταλίων ανθρώπου για συσσώρευση αιμοπεταλίων (77)

Κατάλληλη ποσότητα αίματος μεταφέρθηκε σε σωλήνες που περιέχουν αντιπηκτικό ACD σε αναλογία αίμα/αντιπηκτικό 10:1 (Κιτρικό οξύ συγκέντρωσης 0,065M, κιτρικό νάτριο συγκέντρωσης 0,085M και 11,1 mM δεξτρόζη). Ακολούθησε ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωλήνα με το αίμα 4-5 φορές απαλά προσέχοντας να μην αφρίσει. Το Πλάσμα Πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP) απομονώθηκε με φυγοκέντρηση στα 160g για 14 λεπτά στους 24°C χωρίς επιτάχυνση και φρένο. Το υπερκείμενο (PRP) μεταφέρθηκε σε καινούργιο σωλήνα. Σε αυτό

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

προστέθηκε προσταγλανδίνη E1 (40 ng/ml) και ακολούθησε φυγοκέντρηση στα 700g για 15 λεπτά στους 24°C χωρίς επιτάχυνση και φρένο. Το ίζημα των αιμοπεταλίων αναδυαλύθηκε σε κατάλληλη ποσότητα Tyrode's-HEPES buffer(145 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 5 mM γλυκόζη, pH 7,3) ώστε να προκύψει εναιώρημα αιμοπεταλίων συγκέντρωσης 1 x 10⁸ αιμοπετάλια/ml. Ακολούθησε παραμονή του εναιωρήματος των αιμοπεταλίων στο πάγκο για 30 λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί για δοκιμασίες.

5. Απομόνωση Πλούσιου σε αιμοπετάλια Πλάσματος για συσσώρευση αιμοπεταλίων

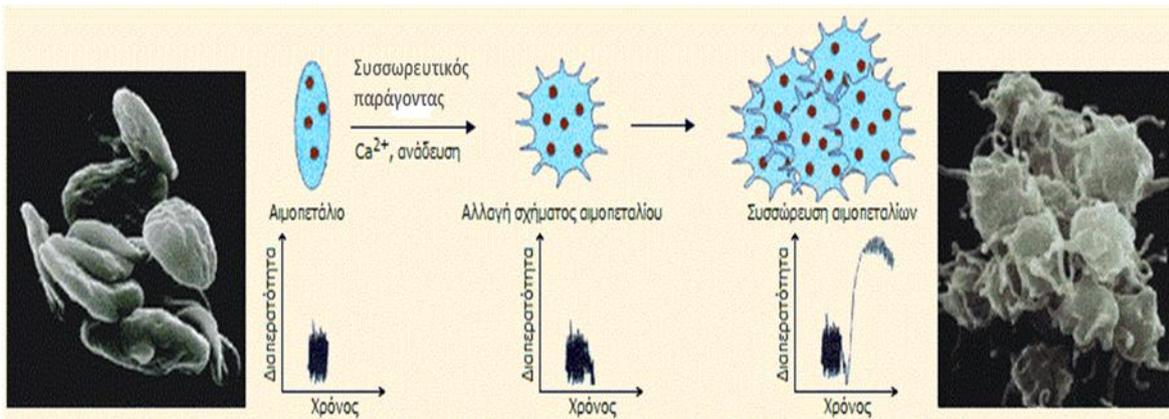
Κατάλληλη ποσότητα αίματος λήφθηκε σε πλαστικό σωλήνα που περιέχει αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών σε αναλογία αίμα/αντιπηκτικό (10:1). Ακολουθεί ανάδευση αναποδογυρίζοντας το σωλήνα με το αίμα 4-5 φορές απαλά προσέχοντας να μην αφρίσει. Γίνεται φυγοκέντρηση στα 160 g για 16 λεπτά στους 24°C χωρίς επιτάχυνση και φρένο. Ακολουθεί μεταφορά του υπερκειμένου (Platelet-rich plasma, PRP) σε πλαστικό σωλήνα, με προσοχή και το PRP αφήνεται στον πάγκο έως ότου παραληφθεί και το PPP. Γίνεται φυγοκέντρηση στα 1500g για 15 λεπτά στους 24°C ώστε να παραληφθεί το υπερκείμενο, το οποίο και μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων υπολογίζεται από την απορρόφηση του PRP στα 530 nm και από καμπύλη αναφοράς $A=f(C \text{ platelets})$, η οποία έχει κατασκευαστεί στο εργαστήριο.

6. Συσσώρευση ανθρώπινων αιμοπεταλίων σε πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (78)

Ο προσδιορισμός της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων βασίζεται στην αύξηση της διαπερατότητας πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια όταν αυτό τοποθετηθεί σε κατάλληλη κυψελίδα και ενεργοποιηθεί με κατάλληλο ενεργοποιητικό παράγοντα. Κατά την τοποθέτηση του PRP σε ειδικό θερμοστατούμενο φωτόμετρο, το συσσωρευματομέτρο, διέρχεται κάποιο ποσοστό της φωτεινής δέσμης και η διαπερατότητα αυτή καταγράφεται με τη μορφή σταθερής ταλάντωσης καμπύλης σε διάγραμμα % διαπερατότητας ως προς τον χρόνο. Όταν στη συνέχεια προστεθεί ο κατάλληλος ενεργοποιητικός παράγοντας, τότε κατά το πρώτο στάδιο του φαινομένου της συσσώρευσης, όπου επέρχεται αλλαγή σχήματος και διόγκωση των αιμοπεταλίων, η διαπερατότητα μειώνεται και το καταγραφικό δίνει καμπύλη μικρότερης ταλάντωσης που κινείται προς τα κάτω. Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο του φαινομένου της συσσώρευσης, όπου σχηματίζονται θρόμβοι από συσσωρευμένα αιμοπετάλια, η διαπερατότητα αυξάνεται και το καταγραφικό δίνει

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

καμπύλη που κινείται προς τα άνω, με συνεχώς μεγαλύτερη ταλάντωση (θόρυβο), ανάλογα με το μέγεθος των σχηματιζόμενων θρόμβων. Αν η συγκέντρωση του συσσωρευτικού μέσου δεν είναι πολύ μεγάλη, ακολουθεί και τρίτο στάδιο κατά το οποίο επέρχεται αποσυσώρευση των αιμοπεταλίων και επαναφορά τους στην αρχική τους κατάσταση, οπότε η καμπύλη στο καταγραφικό κινείται προς τα κάτω με συνεχώς μικρότερη ταλάντωση και καταλήγει στην αρχική της μορφή και περίπου στο αρχικό επίπεδο της % διαπερατότητας. Η τυπική μέτρηση διαρκεί από 3 έως 6 min, Εικόνα 4



Εικόνα 4. Σχηματική απεικόνιση των μορφολογικών αλλαγών των αιμοπεταλίων κατά τη συσσώρευσή τους, από τον συσσωρευτικούς παράγοντες, παρουσία Ca^{2+} και υπό ανάδευση με ταυτόχρονη απεικόνιση της καταγραφόμενης διαπερατότητας με τη βοήθεια συσσωρευματομέτρου.

Πρακτικά, τα στάδια μέτρησης της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων είναι τα εξής:

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 250 μ L από το εναιώρημα αιμοπεταλίων καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200 rpm. Το εναιώρημα επωάζεται για 20 min σε υδατόλουτρο 37° C. Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του συσσωρευματομέτρου με PPP και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων. Η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες ενεργοποιητικού παράγοντα (TRAP, ADP και PAF) το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5 mg/ml (PAF) ή σε Φυσιολογικό ορό (TRAP, ADP) και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα ενεργοποιητικού παράγοντα σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενεργοποιητικού παράγοντα.

Ως 100% συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Από την καμπύλη συσσώρευσης υπολογίζεται το EC50 του ενεργοποιητικού παράγοντα που χρησιμοποιείται.

7. Επίδραση του PAF στην αντ αιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης

Αρχικά στην κυψελίδα με το εναιώρημα των πλυμένων αιμοπεταλίων συγκέντρωσης $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ml, προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF, και ακολουθεί επώαση για 5 λεπτά στο θερμοστατούμενο υδατόλουτρο (37°C), ύστερα τοποθετείται μαγνητικός αναδευτήρας και η κυψελίδα μεταφέρεται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου όπου και προστίθεται ινσουλίνη σε συγκέντρωση 200,5 nM. Επώάζεται για 1 λεπτό στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και στην συνέχεια προστίθεται 0,5μM TRAP. Υπολογίζεται η % συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

8. Μέτρηση της γλυκόζης, ινσουλίνης και p-Selectin με την μέθοδο ELISA

Η γλυκόζη προσδιορίστηκε φασματοφωτομετρικά με εμπορικό διαθέσιμο κιτ (Biosis, Αθήνα, Ελλάδα) τροποποιημένο για πλάκες 96-φρεατίων σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Η Ινσουλίνη και η SP-σελεκτίνης προσδιορίστηκαν στον ορό και το πλάσμα, αντίστοιχα, με εμπορικά διαθέσιμα κιτ ELISA (Invitrogen και την R & D, αντίστοιχα).

9. Ανοσοαποτύπωση κατά Western (Western Immunoblotting)

Η ανοσοαποτύπωση κατά Western είναι μία από τις καλύτερες μεθόδους ανίχνευσης συγκεκριμένων πρωτεϊνών ενός σύνθετου μίγματος, που συνδυάζει την υψηλή αναλυτική ικανότητα της ηλεκτροφόρησης σε γέλη ακρυλαμιδίου, την ειδικότητα των αντισωμάτων και την ευαισθησία των ενζυματικών μεθόδων. Ο όρος ηλεκτροφόρηση αναφέρεται στο φαινόμενο μετανάστευσης ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων-ιόντων με την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Με τον τρόπο αυτό, οι πρωτεΐνες που υπόκεινται σε ηλεκτροφόρηση, λόγω των διαφορετικών φορτίων και μοριακών τους βαρών, διαχωρίζονται επιτυχώς.

Υλικά για την ανοσοτύπωση Western Blott

PBS 10X (Phosphate Buffer Saline- PBS 10X): (1000ml)

- NaCl 80g
- KCl 2g
- Na₂HPO₄ 14,4g
- KH₂PO₄ 2,4g

Αναμιγνύονται σε 800ml dH₂O, ρυθμίζεται το pH στο 7,4 και το τελικό διάλυμα ογκομετρείται σε τελικό όγκο 1000ml.

2X lysis buffer: (10ml)

- 0,5M διάλυμα TRIS-HCl pH6.8 2,5ml
- διαλύματος 20% SDS 2ml
- 100% Γλυκερόλη 2ml
- απιονισμένο νερό 3,5ml
- χρωστική Bromophenol Blue 0,001g

Blocking: (5ml)

- PBS 1X 4,5ml
- BSA (Bovine Serum Albumin) 0,15g

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

PBS-Tween 1X:	(50ml)
• PBS 1X	50ml
• Tween	50μl

Running Buffer 10X:	(1000ml)	(500ml)
• Tris-Base _(MB : 121.14)	30g	15g
• Glycine	144g	72g
• SDS	5g	2,5 g

pH=8.3

Transfer Buffer 10X:	(1000ml)
• Tris-Base _(MB : 121.14)	30g
• Glycine	144g

pH=8.4

TBS 10X:	(1000ml)	(500ml)
• Tris-Base _(MB : 121.14)	60,55g	30,275g
• NaCl	87,66g	43,83g

Πίνακας 2. Οδηγίες για την Παρασκευή πήκτωμα αгарόζης για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών

Πήκτωμα διαχωρισμού pH 8.8				
	7%	10%	12%	15%
dH₂O	5,1ml	4,1ml	3,4ml	2,4ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2,5ml	2,5ml	2,5ml	2,5ml
20% (w/v) SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	2,3ml	3,3ml	4,0ml	5,0ml
10% (w/v) ammonium persulfate	0,05ml	0,05ml	0,05ml	0,05ml
TEMED	0,010ml	0,010ml	0,010ml	0,010ml

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

Τελικός όγκος	10,005ml	10,005ml	10,005ml	10,005ml
Πήκτωμα στοιβάσματος pH 6.8				
dH ₂ O	3,075ml		6,15ml	
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1,25ml		2,5ml	
20% (w/v) SDS (Sodium Didecyl Sulfate)	0,025ml		0,05ml	
Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v)	0,67ml		1,34ml	
10% (w/v) ammonium persulfate	0,025ml		0,05ml	
TEMED	0,010ml		0,010ml	
Τελικός όγκος	5,05ml		10,1ml	

Ponceau 10x

- Ponceau 2g
- Trichloroacetic acid 30g
- Sulfosalicylic acid 30g

Άλλα υλικά

Μεμβράνη Νιτροκυτταρίνης ή PVDF.

Αζιδίου του νατρίου (Sodium Azide) 20%

ECL

Η μέθοδος περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια :

9.1 Εκχύλιση πρωτεϊνών από πλυμένα αιμοπετάλια

Μετά την ενεργοποίηση των κυττάρων στο εναιώρημα προστίθεται ίσος όγκος από ρυθμιστικό διάλυμα λύσης που περιλαμβάνει 2% Triton X-100, 2% sodium deoxycholate, 0.2% SDS, 300 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mM EDTA και διαλύμενη μία ταμπλέτα cocktail αναστολέων πρωτεασών. Το SDS δεσμεύεται στις πρωτεΐνες, διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς, απελευθερώνει τις πολυπεπτιδικές αλυσίδες και συνδέεται με αυτές ανάλογα με το Μοριακό Βάρος τους, εξουδετερώνοντας το φορτίο των πρωτεϊνών και καθιστώντας τις αρνητικές. Η β-Μερκαπτοαιθανόλη διασπά τους δισουλφιδικούς δεσμούς (S-S)

των πρωτεϊνών. Ακολουθεί βρασμός των θραυσμάτων κυττάρων στους 100°C για 5 λεπτά, ώστε να είναι εφικτή η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών.

9.2 Διαχωρισμός των πρωτεϊνών με ηλεκτροφόρηση σε γέλη πολυακρυλαμίδης παρουσία SDS κατά Laemmli (SDS PAGE ηλεκτροφόρηση).

Στη SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση ως μέσο διαχωρισμού χρησιμοποιείται το ακρυλαμίδιο. Το πήκτωμα (gel) δημιουργείται από τον πολυμερισμό μονομερών ακρυλαμιδίου, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αλυσίδων πολυακρυλαμιδίου. Ο πολυμερισμός οφείλεται στην καταλυτική δράση των ελευθέρων ριζών. Στις αλυσίδες πολυακρυλαμιδίου ενσωματώνονται μόρια NN-μεθυλεν-bis-ακρυλαμιδίου (bis), σχηματίζοντας πλέγμα. Η κατάλυση συμβαίνει με τη χρήση της βάσης TEMED (NNN'N'- τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνης), με τη βοήθεια ελευθέρων ριζών που δημιουργούνται με υπερθειικά ιόντα (S₂O₃²⁻), χάρη στην παρουσία ενός δευτέρου καταλύτη, του υπερθειικού άλατος του αμμωνίου (Ammonium Persulfate/APS). Οι πρωτεΐνες διαχωρίζονται κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης βάσει του μοριακού τους βάρους, καθώς όλες οι πρωτεΐνες έχουν κοινό ανιοντικό φορτίο.

Οι πρωτεΐνες κατά την ηλεκτροφόρηση μετακινούνται προς την άνοδο περνώντας από τους πόρους δύο συνεχόμενων πήκτωμάτων, στα οποία διακρίνεται η γέλη ακρυλαμίδης. Πρόκειται για το ανώτερο ή πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) και το κατώτερο ή πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Στο stacking gel το ποσοστό ακρυλαμίδης είναι σταθερό (4%) και ανεξάρτητο από το μέγεθος των υπό ανάλυση πρωτεϊνών, ενώ στο separating gel το ποσοστό της ακρυλαμίδης εξαρτάται από το μοριακό βάρος των διαχωριζόμενων πρωτεϊνών. Το πήκτωμα πακεταρίσματος συσσωρεύει τις πρωτεΐνες, ώστε να εισέλθουν ταυτόχρονα στο πήκτωμα διαχωρισμού. Όταν τοποθετηθεί το πήκτωμα πακεταρίσματος πάνω από το πήκτωμα διαχωρισμού, προτού ακόμα πήξει, βυθίζεται στο πρώτο μία οδοντωτή μήτρα, η οποία δημιουργεί τα φρεάτια στα οποία θα φορτωθούν τα πρωτεϊνικά δείγματα. Μετά από περίπου 30 λεπτά, το πήκτωμα σταθεροποιείται (πήξει). Ακολουθεί η συναρμολόγηση της συσκευής ηλεκτροφόρησης και το δοχείο γεμίζει με το ρυθμιστικό διάλυμα Running Buffer.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα φορτώνονται στην επιθυμητή ποσότητα στα κελιά της πηκτής. Η κατάλληλη ποσότητα του πρωτεϊνικού περιεχομένου σε κάθε δείγμα προσδιορίζεται με ηλεκτροφόρηση, βαφή με Coomassie Blue και διορθώνεται με πυκνομέτρηση της τουμπουλίνης. Ταυτόχρονα φορτώνεται 1 δείγμα μάρτυρα (ladder: Benchmarck Prestained), ο οποίος αφού ηλεκτροφορηθεί αποδίδει πρωτεϊνικές μπάντες με γνωστά μοριακά βάρη. Στη συνέχεια εφαρμόζεται τάση ρεύματος 80V για το χρονικό διάστημα που οι πρωτεΐνες βρίσκονταν στο πήκτωμα πακεταρίσματος και 120V για το χρονικό διάστημα που βρίσκονταν στο πήκτωμα διαχωρισμού. Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιείται ως ρυθμιστικό διάλυμα το Running Buffer 1x. Ο μέσος όρος της διάρκειας της ηλεκτροφόρησης στα πειράματα είναι περίπου 3 ώρες (2,5-3,5 ώρες).

9.3 Μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι πρωτεΐνες που διαχωρίζονται στο πήκτωμα καθλώνονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με ηλεκτρομεταφορά μέσω της διαδικασίας του transfer (μεταφοράς), κατά την οποία εφαρμόζεται ρεύμα σταθερής έντασης 300mA. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, αφαιρούνται τα πήκτωμα από τη συσκευή και απορρίπτεται το πήκτωμα πακεταρίσματος. Στη συνέχεια, στην κασετίνα μεταφοράς τοποθετούνται τα παρακάτω, με την ακόλουθη σειρά: ένα σφουγγαράκι, 3 διηθητικά χαρτιά, το πήκτωμα διαχωρισμού, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, 3 διηθητικά χαρτιά και ένα επιπλέον σφουγγαράκι. Το πήκτωμα τοποθετήθηκε προς τη μεριά του αρνητικού πόλου και η μεμβράνη προς το θετικό πόλο.

Η συσκευή γεμίζει με το ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς, τοποθετείται σε αυτή ένας αναδευτήρας και μία παγοθήκη και όλο το σύστημα μεταφέρεται σε ψυχόμενο δωμάτιο ή περιβάλλεται από πάγο. Κατόπιν, το σύστημα συνδέεται με τροφοδοτικό σε ένταση ρεύματος 300mA. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, οι πρωτεΐνες μετακινούνται προς την άνοδο και επικάθονται στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ως ακριβές αντίγραφο – αποτύπωμα του πηκτώματος.

9.4 Επώαση με αντισώματα έναντι των πρωτεϊνών-στόχος.

Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης επωάζεται με διάλυμα μπλοκαρίσματος (blocking) των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης των αντισωμάτων για 1 ώρα. Το διάλυμα μπλοκαρίσματος παρασκευάζεται από άπαχο γάλα σε μορφή σκόνης, διαλυμένο σε TBS-Tween 1x. Ακολουθεί υβριδοποίηση των μεμβρανών με ειδικά πρωτογενή αντισώματα (Anti-phospho PKC θ 1:1000 και anti-actin 1:2000) για ένα 24ωρο, σε κινούμενη επιφάνεια και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πρωτογενή αντισώματα θα είναι αραιωμένα σε διάλυμα μπλοκαρίσματος, παρουσία αζιδίου του

νατρίου (Sodium Azide) 20%, το οποίο εμποδίζει την ανάπτυξη μικροοργανισμών κατά τη διάρκεια της επώασης. Για την παρασκευή 15ml πρωτογενούς αντισώματος χρησιμοποιείται 15ml TBS-Tween και 15μl Sodium Azide, στα οποία γίνεται η διάλυση του πρωτογενούς αντισώματος σύμφωνα με την επιθυμητή συγκέντρωση.

Μετά από ολονύκτια επώαση και τρεις 5λεπτες πλύσεις με TBS-Tween, ακολουθεί επώαση διάρκειας 1 ώρας με τα δευτερογενή αντισώματα (anti-rabbit 1: 2000) σε κινούμενη επιφάνεια και σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα είναι ειδικό για το πρωτογενές αντίσωμα με το οποίο γίνεται η πρώτη επώαση και περιλαμβάνει το ένζυμο υπεροξειδάση (Horse Raddish Hyperoxidase). Η αραίωση των δευτερογενών αντισωμάτων γίνεται με διάλυμα μπλοκαρίσματος χωρίς την προσθήκη αζιδίου του νατρίου 20%, καθότι αυτό καταστρέφει το ένζυμο της υπεροξειδάσης. Για την παρασκευή 15ml δευτερογενούς αντισώματος χρησιμοποιείται 15ml TBS-Tween, στα οποία γίνεται η διάλυση του δευτερογενούς αντισώματος σύμφωνα με την επιθυμητή συγκέντρωση. Ακολουθούν 3 10λεπτες πλύσεις με TBS-Tween.

9.5 Ανίχνευση του εκπεμπόμενου σήματος με τη μέθοδο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας.

Εν συνεχεία, γίνεται ανίχνευση σήματος σε φωτογραφικό φιλμ με τη χρήση αντιδραστηρίου ECL (H₂O₂ και luminol) (GE Healthcare Biosciences AB, Sweden). Η ανίχνευση βασίζεται στο φαινόμενο της ενισχυμένης χημειοφωταύγειας. Συγκεκριμένα, το δευτερογενές αντίσωμα φέρει προσδεμένο το ένζυμο της υπεροξειδάσης, το οποίο με την επίδραση διαλύματος H₂O₂ σε αλκαλικό περιβάλλον καταλύει την οξείδωση του luminol. Η μέγιστη εκπομπή φωτονίων λαμβάνει χώρα σε μήκος κύματος 428nm και παρουσιάζει μέγιστη τιμή 5-20 λεπτά μετά την προσθήκη των αντιδραστηρίων. Η ανίχνευση επιτυγχάνεται με την χρήση συστήματος ChemiDoc XRS+ και η ποσοτικοποίηση με το πρόγραμμα Image Studion Lite Ver 5.2.

10. Στατιστική Ανάλυση

Η κανονικότητα των συνεχών μεταβλητών εξετάστηκε με εφαρμογή του ελέγχου Kolmogorov-Smirnov. Όλες οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± 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 καμπυλών μεταξύ των φορτίσεων έγινε με ανάλυση διακύμανσης RM-ANOVA. Το iAUC υπολογίστηκε από το εμβαδόν

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑΣ/ΥΠΕΡΙΝΣΟΥΛΙΝΑΙΜΙΑΣ ΣΕ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΥΣ ΜΕΤΑΓΩΓΗΣ ΣΗΜΑΤΟΣ ΤΗΣ
ΙΝΣΟΥΛΙΝΗΣ ΣΤΑ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΑ

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).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Βασικά ανθρωπομετρικά και περιγραφικά χαρακτηριστικά εθελοντών

Δέκα, μη καπνίζοντες, υγιείς εθελοντές κατανάλωσαν, σε τρεις διαφορετικές ημέρες, υδατικά διαλύματα γλυκόζης (75, 100 και 150 g) με τυχαία σειρά. Τα υποκείμενα είχαν φυσιολογικό σωματικό βάρος, φυσιολογικές τις εργαστηριακές εξετάσεις ρουτίνας και δεν ήταν υπό φαρμακολογική θεραπεία. Τα βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών της μελέτης συμπεριλαμβάνουν την ηλικία, το δείκτη μάζα σώματος (BMI), την συστολική και διαστολική αρτηριακή πίεση, τον αριθμός και όγκο των αιμοπεταλίων, τη γλυκόζη και την ινσουλίνη. Δεν υπήρχαν στατιστικές σημαντικές διαφορές στην σύγκριση των προ-φόρτισης χαρακτηριστικών ανάμεσα στις 3 παρεμβάσεις όπως φαίνεται στον πίνακα 1.

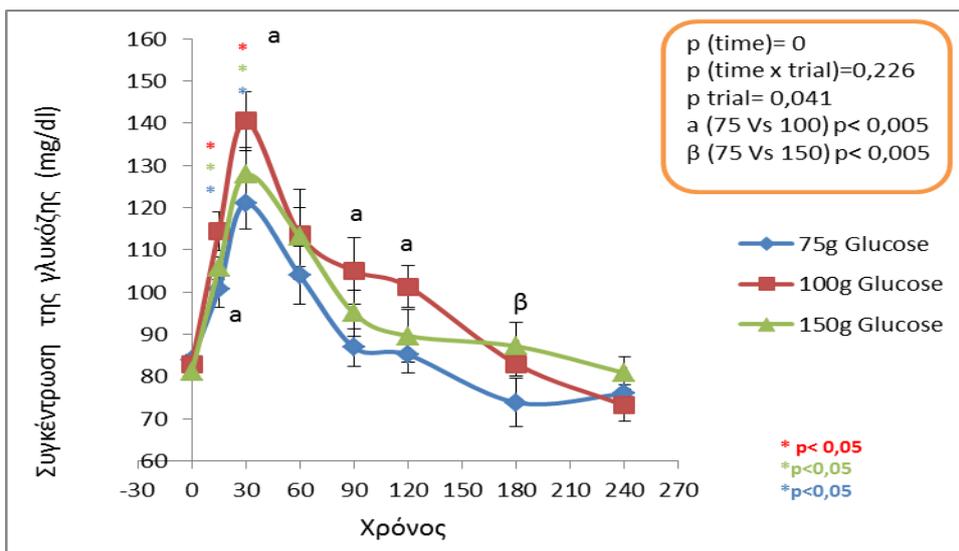
Πίνακας 3: Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών.

Ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά εθελοντών	75 g (N=10)	100 g (N=10)	150 g (N=10)	p
Άντρες : Γυναίκες	5 : 5	5 : 5	5 : 5	
Ηλικία	28 (19-39)	28 (19-39)	28 (19-39)	NS
BMI (kg/m ²)	22.2 (18.29-25.96)	22.6 (18.45-25.47)	22.7 (18.45-25.31)	NS
DBP (mmHg)	73.4 (60.00-83.00)	69.1 (57-83)	69.5 (50.0-98.8)	NS
SBP (mm Hg)	121,3 (94-140)	119,0 (104,0-131,0)	121,78 (95,0- 158,0)	NS
PLT (10 ³ /μL)	235 (170- 329)	207 (169-313)	213 (153-342)	NS
MPV (fL)	8 (7.1-8.4)	7.9 (7.2-8.6)	8 (7.3-8.3)	NS
GLU_0 (mg/dl)	83.9 (77.8-91.2)	83 (75-92.3)	81 (70.6-92)	NS
INS_0 (μIU/ml)	7.5 (2.3-14)	7.7 (2-14.8)	5.9 (0.90-13.5)	NS

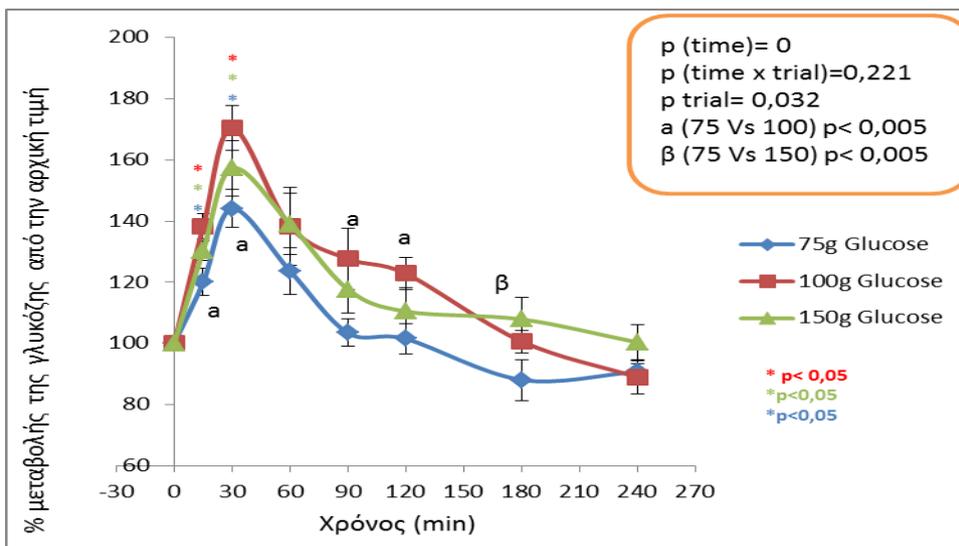
2. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση της γλυκόζης και ινσουλίνης σε υγιείς εθελοντές

2.1 Επίδραση των φορτίσεων γλυκόζης στα μεταγευματικά επίπεδα γλυκόζης

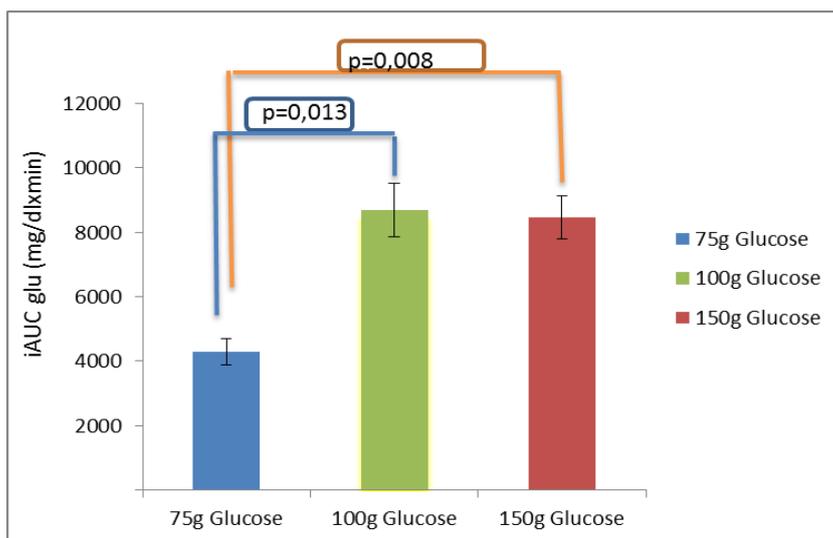
Η πρόσληψη αυξανόμενων ποσοτήτων γλυκόζης οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων της υπεργλυκαιμίας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο.



Σχήμα 1. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην συγκέντρωση της γλυκόζης (mg/ml) σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



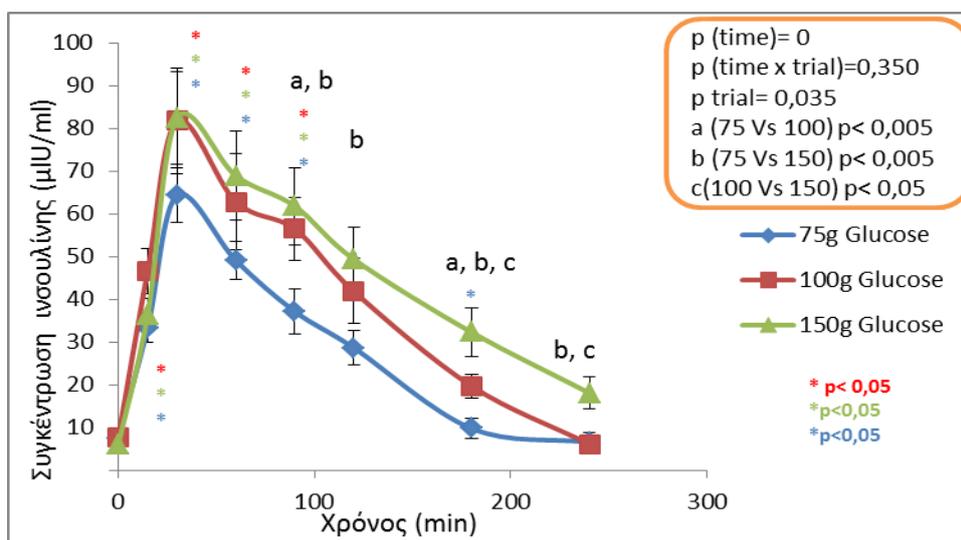
Σχήμα 2. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην ποσοστιαία μεταβολής της συγκέντρωσης της γλυκόζης από την αρχική τιμή, σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



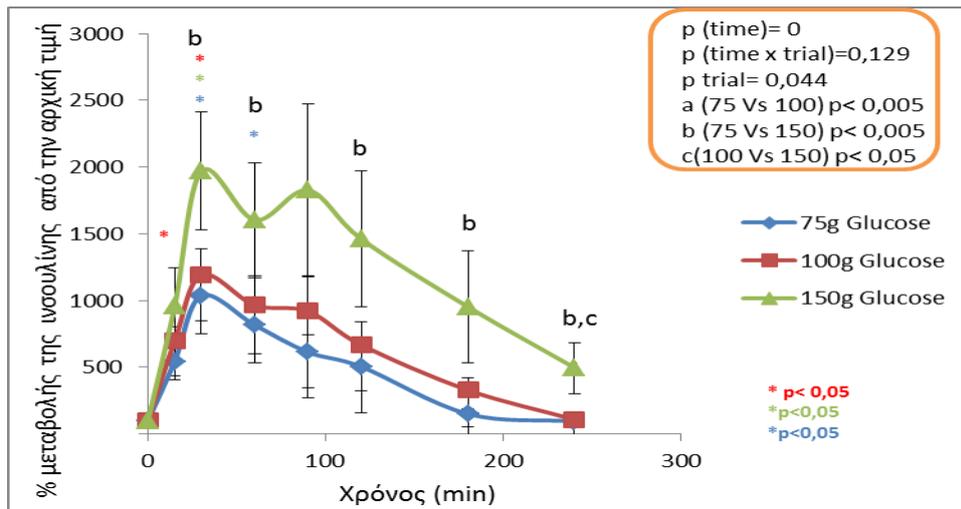
Σχήμα 3. Επίδραση της φόρτισης με γλυκόζη σε διαφορετικές συγκεντρώσει(75gr 100gr και 150gr) στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve) της συγκέντρωσης της γλυκόζης

2.2 Επίδραση των φορτίσεων γλυκόζης στα μεταγενεματικά επίπεδα ινσουλίνης

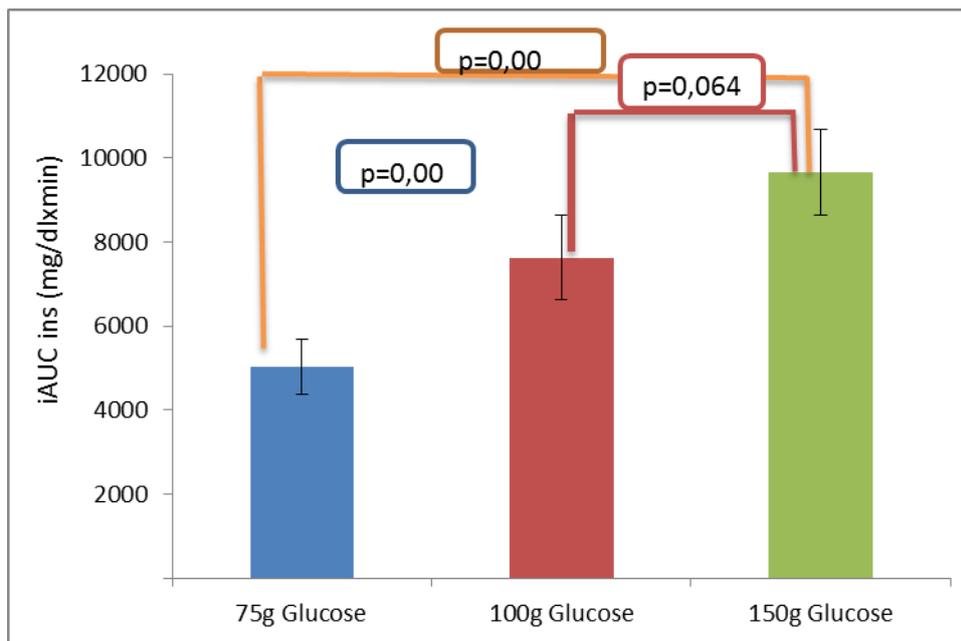
Η πρόσληψη αυξανόμενων ποσοτήτων γλυκόζης οδήγησε σε αύξηση των μεταφορτισιακών επιπέδων της ινσουλίνης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο αντίστοιχα με την γλυκόζη.



Σχήμα 4. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην συγκέντρωση της ινσουλίνης (μIU/ml) σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



Σχήμα 5. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην ποσοστιαία μεταβολή της συγκέντρωσης της ινσουλίνης από την αρχική τιμή σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.

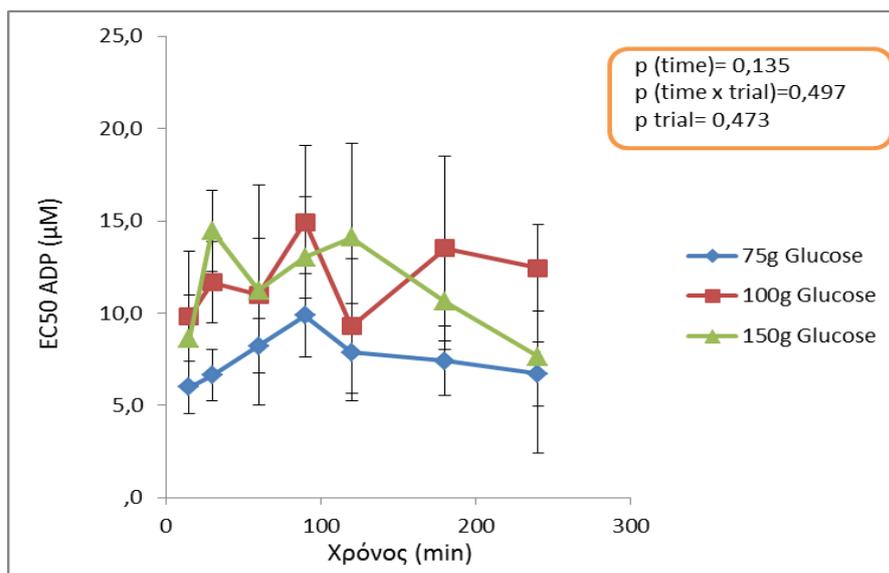


Σχήμα 6. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve) της συγκέντρωσης της ινσουλίνης.

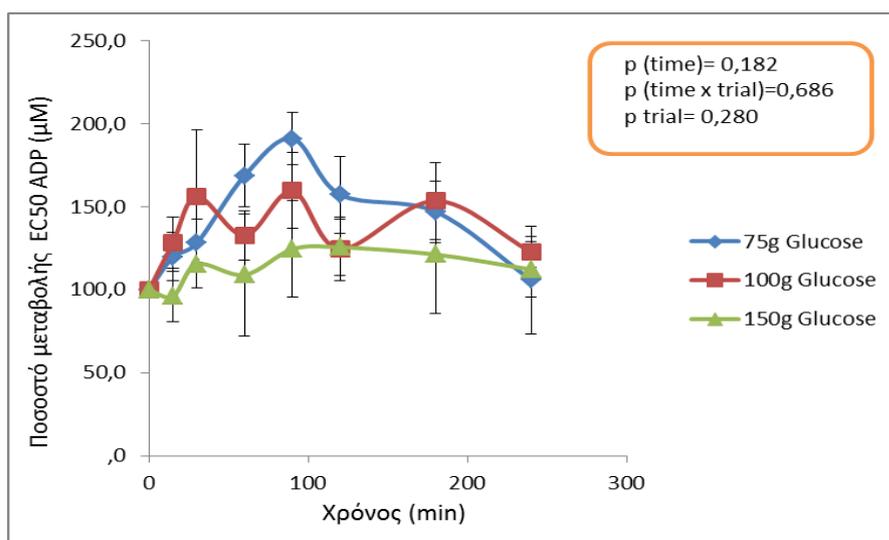
3. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές

Σε κάθε χρονική στιγμή μετά τις φορτίσεις γλυκόζης προσδιορίστηκε το EC50 για τους παράγοντες ADP και TRAP. Οι καμπύλες των EC50 σε σχέση με το χρόνο φαίνονται στα παρακάτω σχήματα.

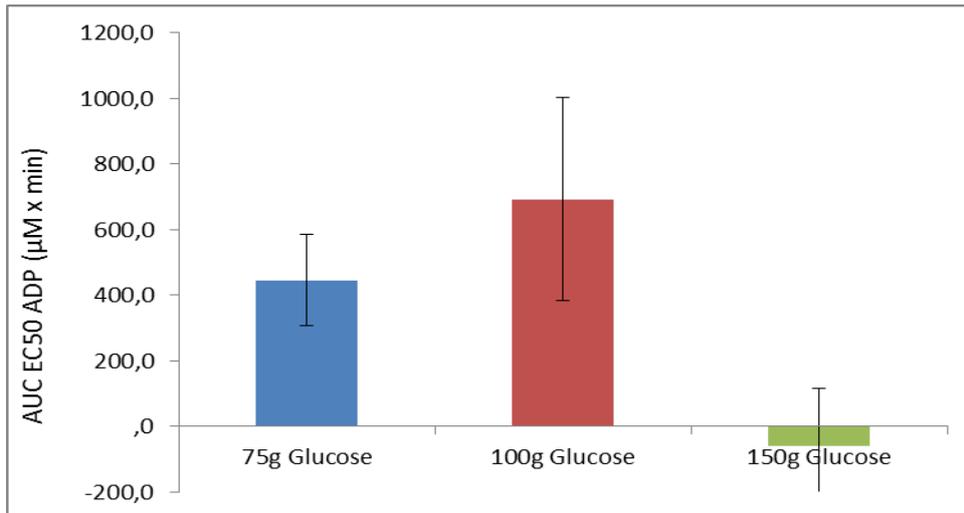
3.1 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές στο ADP



Σχήμα 7. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο EC50 του ADP σε χρονικό διάστημα 4 ωρών

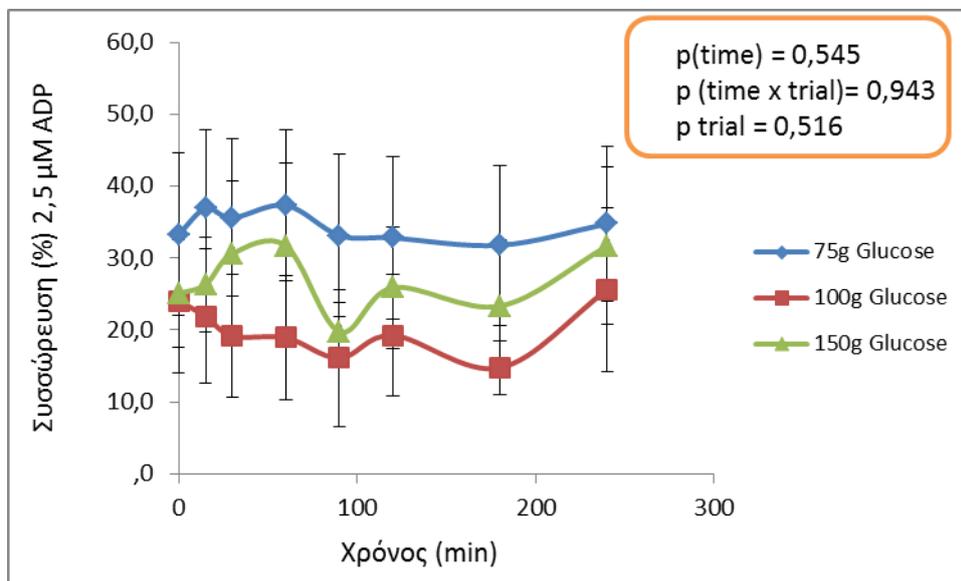


Σχήμα 8. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο ποσοστό της μεταβολής του EC50 του ADP σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



Σχήμα 9. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve) του διαγράμματος $EC_{50}(ADP)=f(t)$.

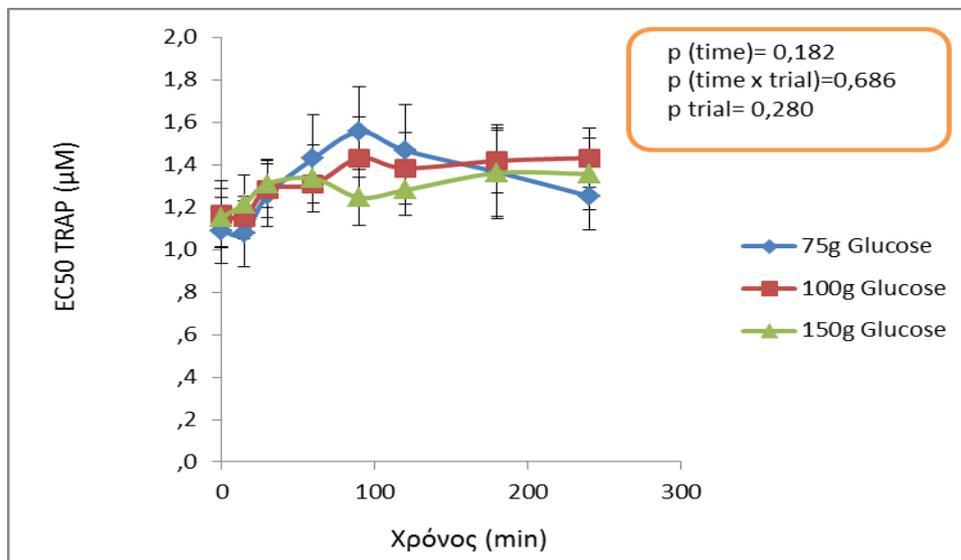
Όπως φαίνεται από τα σχήματα 7-9 υπάρχει τάση αύξησης του EC_{50} του ADP αμέσως μετά τις φορτίσεις, η οποία όμως δεν καταφέρνει να είναι στατιστικά σημαντική κυρίως λόγω της μεγάλης διακύμανσης των τιμών μεταξύ των εθελοντών. Ωστόσο, η τάση αύξησης αυτή εκμηδενίζεται στη φόρτιση των 150g.



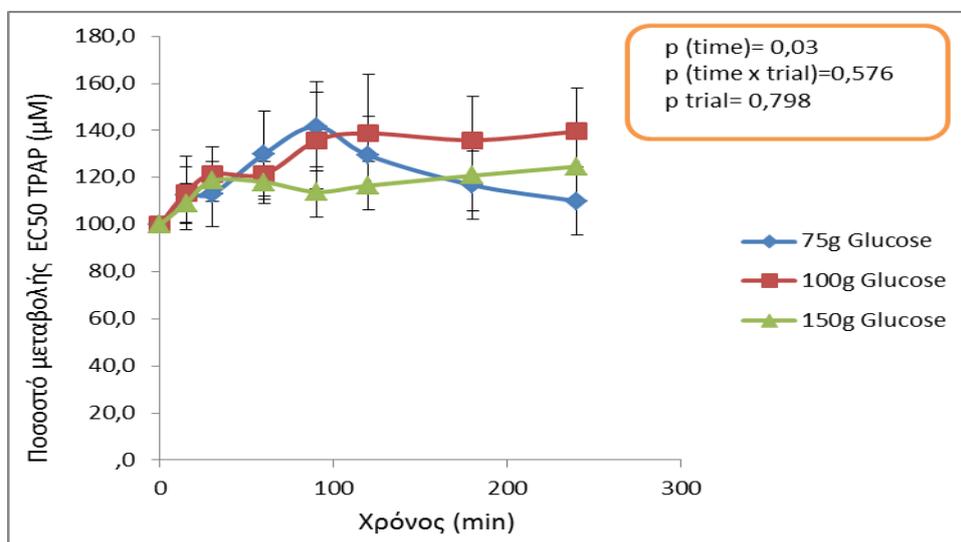
Σχήμα 10. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο ποσοστό της μεταβολή του συσσώρευσης μετά από επίδραση με 2,5 μM ADP σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.

Όπως φαίνεται στο διάγραμμα 10 με τη προσθήκη συγκεκριμένης ποσότητας ADP δεν υπήρξαν διαφορές στην απόκριση των αιμοπεταλίων.

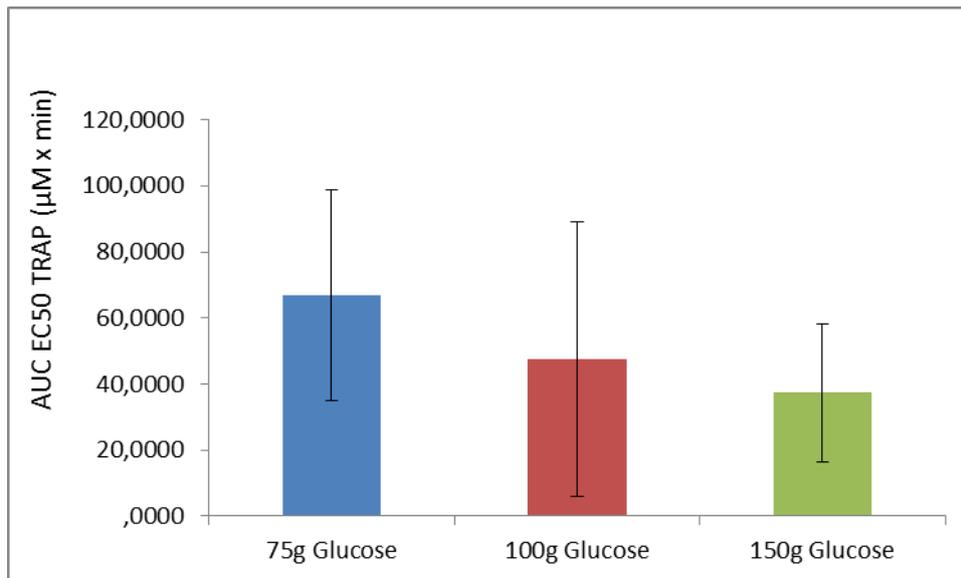
3.2 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην απόκριση των αιμοπεταλίων σε υγιείς εθελοντές στο TRAP



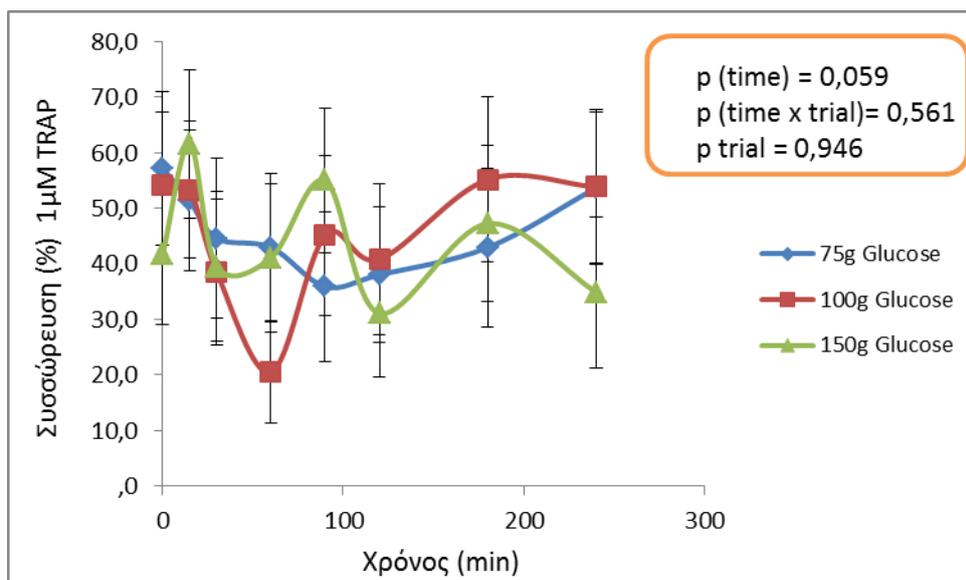
Σχήμα 11. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο EC50 (TRAP) σε χρονικό διάστημα 4 ωρών



Σχήμα 12. Επίδραση της των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο ποσοστό της μεταβολή του EC50 (TRAP) σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



Σχήμα 13. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve) του διαγράμματος $EC50(TRAP)=f(t)$.



Σχήμα 14. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο ποσοστό της μεταβολή του συσώρευσης μετά από επίδραση με 1 μM TRAP σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.

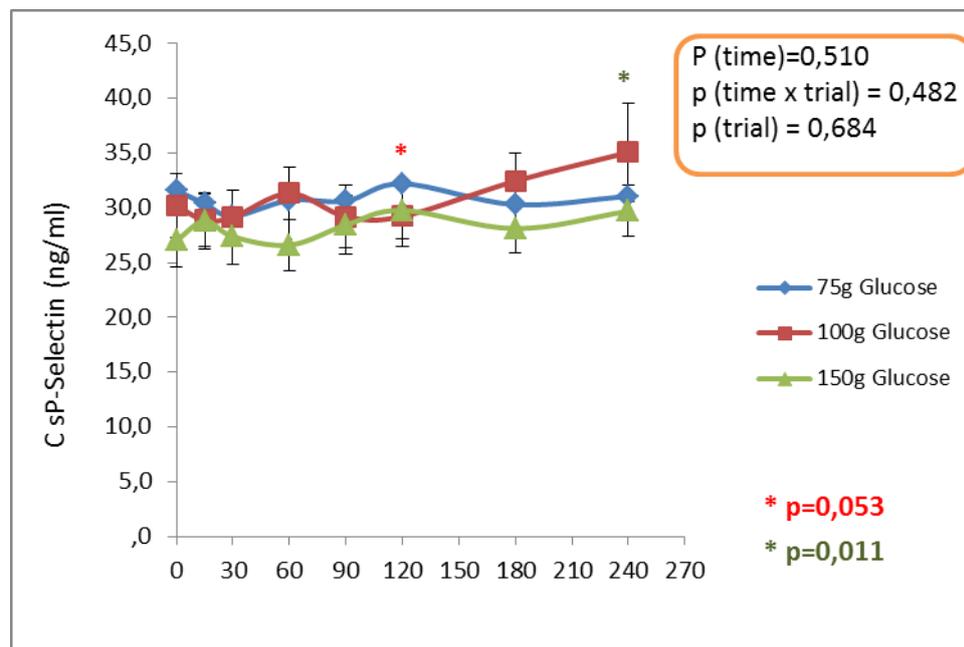
Η Σύγκριση μεταξύ baseline και των άλλων χρονικών στιγμών δείχνει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα 90 min (75 g φόρτιση) και στα 60 min (100 g φόρτιση).

Εμφανίζεται διαφοροποίηση στο χρόνο της ικανότητας του 1 μ M TRAP να προκαλεί συσώρευση, χωρίς αυτή η διαφοροποίηση να διαφέρει μεταξύ των φορτίσεων.

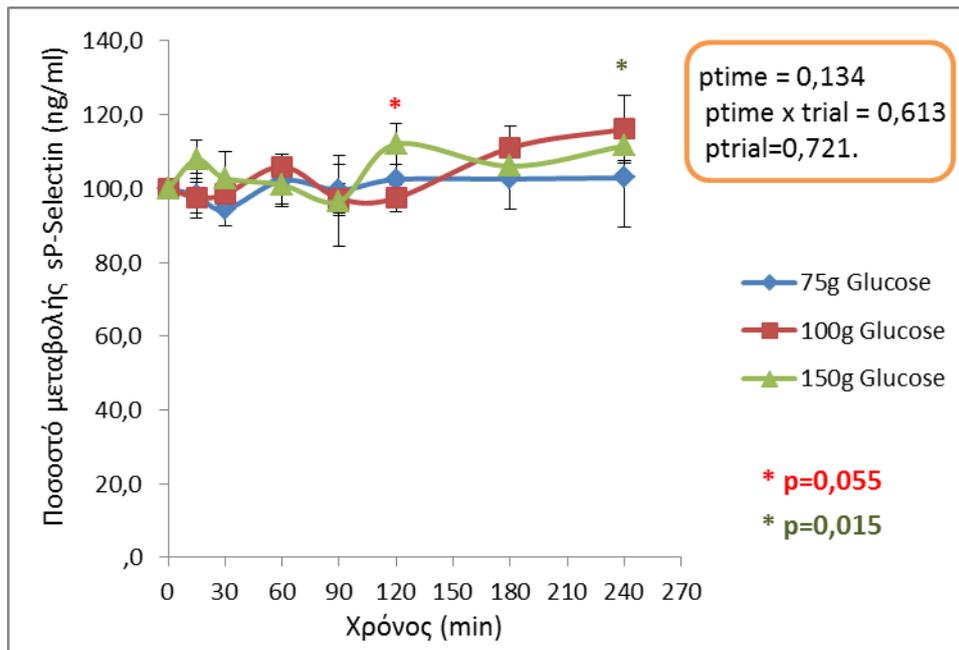
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν όταν η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων γίνει με TRAP προσομοιάζουν με αυτά του ADP όπου ωστόσο είναι πιο εμφανής η μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων στη φόρτιση των 75g. Παρατηρείται επίσης το ίδιο φαινόμενο που εμφανίστηκε και στο ADP δηλαδή η μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων να είναι λιγότερο σημαντική σε μεγάλες φορτίσεις αν και πάλι η παρατήρηση αυτή δεν φτάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας.

3.3 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην μεταβολή της συγκεντρώσεις της sP-σελεκτίνης

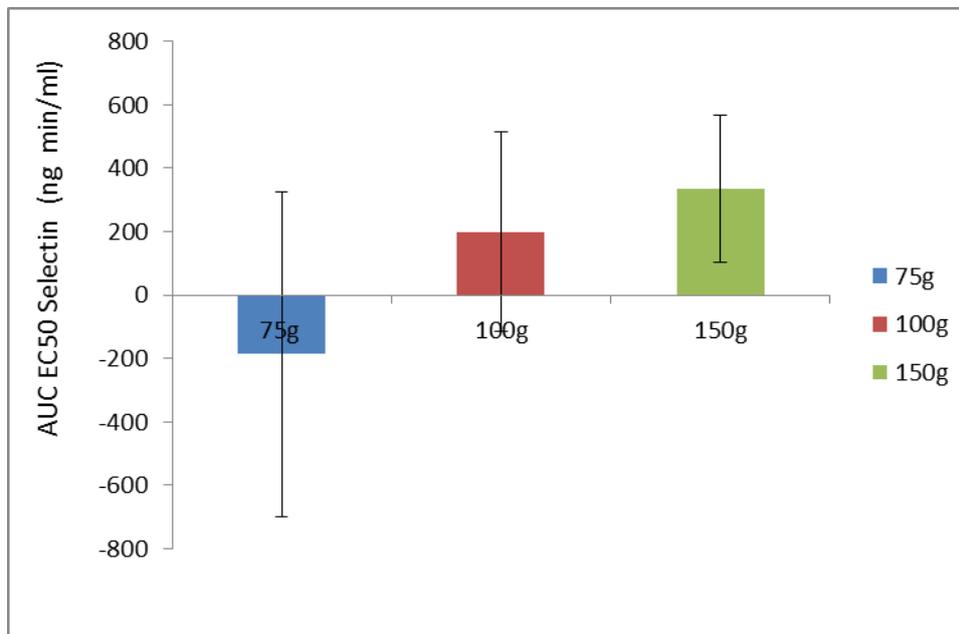
Η sP-σελεκτίνη αποτελεί δείκτη ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και συγκεκριμένα δείκτη της ικανότητά τους να εκκρίνουν κοκκία κάτω από συνθήκες ενεργοποίησης. Τα αποτελέσματα της μεταβολής της sP-σελεκτίνης μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις φαίνονται στα παρακάτω σχήματα



Σχήμα 15. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην μεταβολή της συγκεντρώσεις της sP-σελεκτίνης σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



Σχήμα 16. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στο ποσοστό της μεταβολή της συγκέντρωσης της sP-selectin από την αρχική τιμή σε χρονικό διάστημα 4 ωρών.



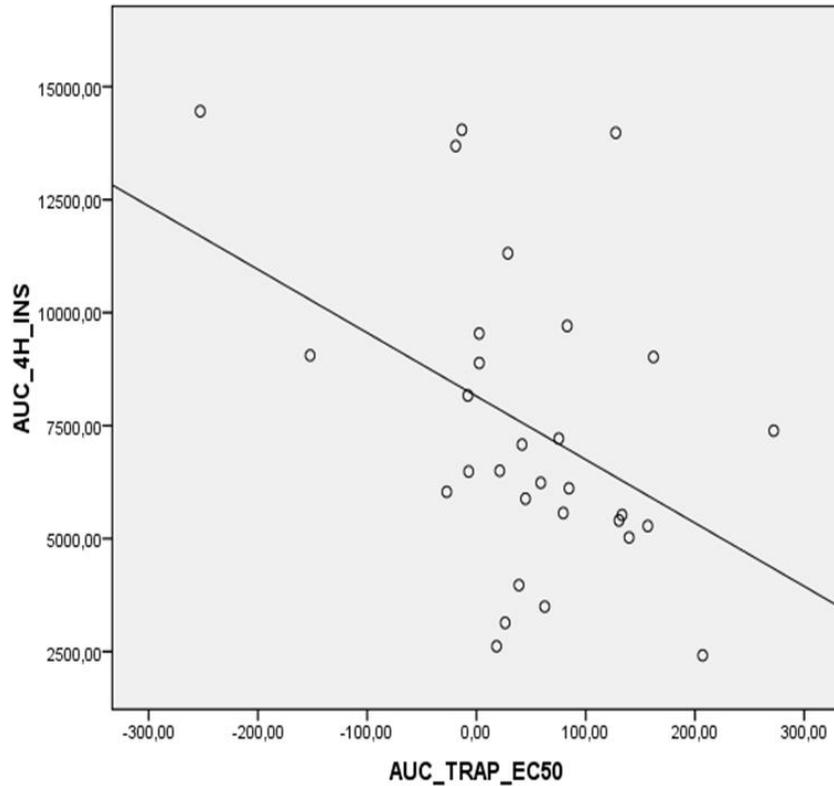
Σχήμα 17. Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης (75gr, 100gr και 150gr) στην περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve) της sp-σελεκτίνης.

Όπως φαίνεται από τα σχήματα 13-15 η sP-σελεκτίνη δεν μεταβάλλεται σημαντικά μετά τις φορτίσεις και δεν διαφοροποιείται η μεταβολή της μεταξύ των διαφορετικών

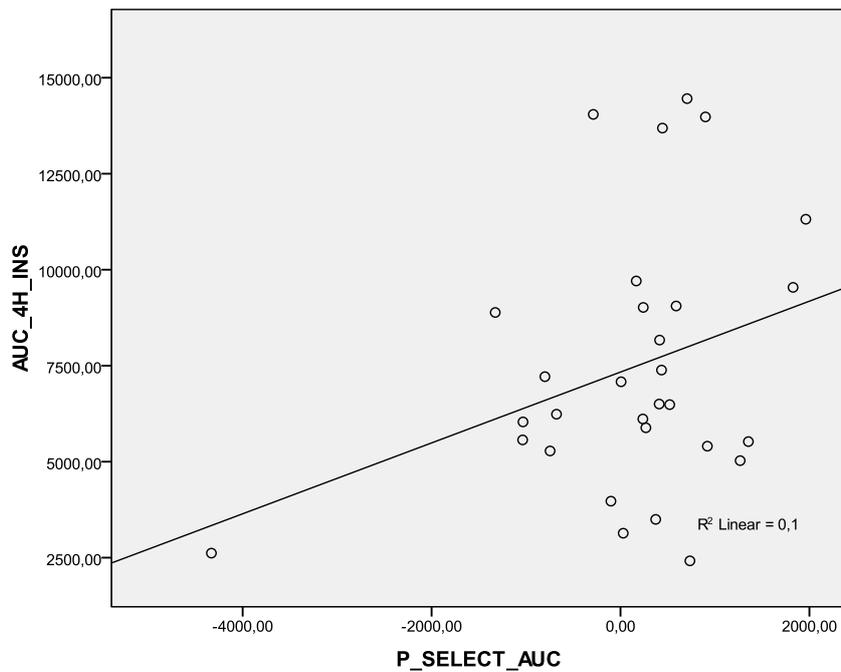
φορτίσεων. Εμφανίζεται μία τάση αύξησης σε μεγάλους χρόνους μετά τη μεγάλη φόρτιση 150 g ωστόσο και αυτή είναι μικρή και χωρίς ιδιαίτερη κλινική σημασία.

4. Συσχέτιση μεταγευματικής ινσουλιναίμιας/υπεργλυκαιμίας με τη δραστηριότητα των αιμοπεταλίων

Σε μία προσπάθεια να βρεθεί από τα δικά μας δεδομένα κατά πόσο υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των μεταβολών της γλυκόζης/ινσουλίνης και των μεταβολών της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων έγινε ανάλυση συσχετίσεων μεταξύ των iAUC των αντίστοιχων τιμών. Η ανάλυση έγινε ενώνοντας όλες τις φορτίσεις (75, 100, 150g). Παρατηρήθηκε μία αρνητική συσχέτιση μεταξύ iAUC ινσουλίνης και EC50 TRAP ($r=-0,414$, $p=0,023$) γεγονός που υποδηλώνει ότι όσο μεγαλύτερη η μεταφορτισιακή υπερινσουλιναίμια τόσο μικρότερη η αύξηση του EC50 του TRAP η με άλλα λόγια σε μεγάλες υπερινσουλιναίμίες η μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων δεν είναι τόσο μεγάλη. Η σχέση αυτή επιβεβαιώνει ουσιαστικά το σχήμα 12. Παράλληλα, παρατηρείται μία οριακά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ iAUC ινσουλίνης και iAUC sP-σελεκτίνης (σχήμα 17) που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η sP-σελεκτίνη εμφανίζει μία τάση αύξησης στις μεγάλες φορτίσεις (σχήμα 15). Δεν εμφανίστηκαν σημαντικές συσχετίσεις με τα AUC της γλυκόζης.

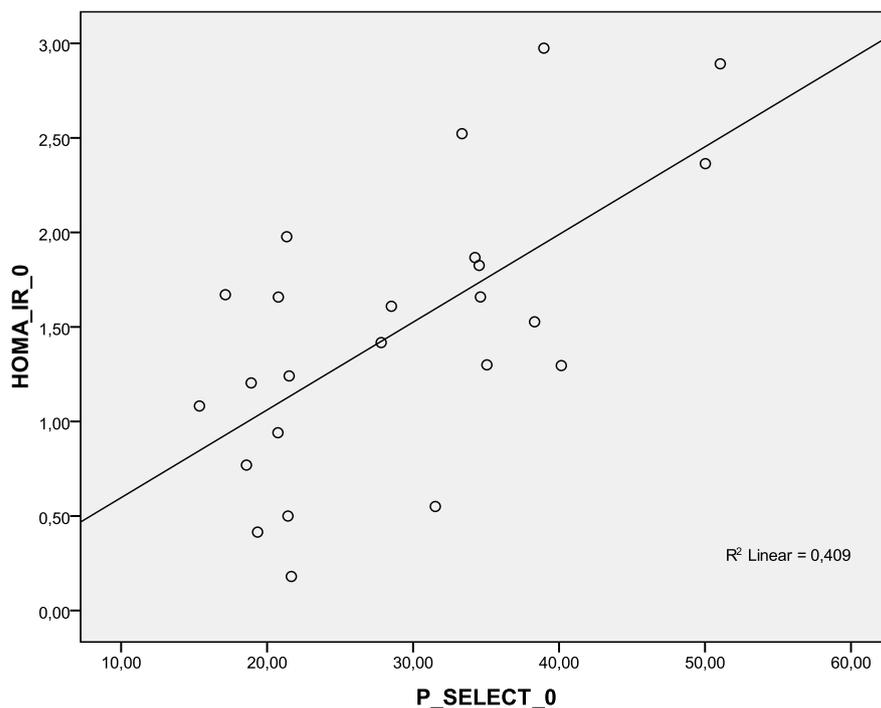


Σχήμα 18 .Συσχέτιση του *iAUC* της ινσουλίνης με το *iAUC* το *EC50* του *TRAP*.



Σχήμα 19 .Συσχέτιση του *iAUC* της ινσουλίνης με το *iAUC* της *sP*-σελεκτίνης

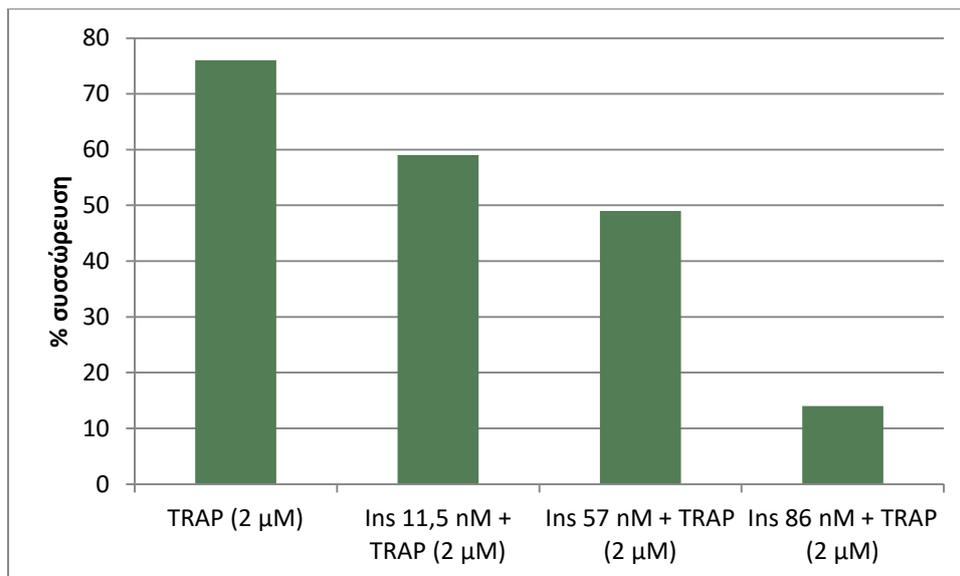
Πρέπει επίσης να τονιστεί ότι ακόμα και σε baseline συνθήκες η ινσουλίνης νηστείας ($r=0,569$, $p=0,001$) και το HOMA-IR ($r=0,640$, $p=0,001$) εμφανίζουν θετική συσχέτιση με την sP-σελεκτίνη γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμα και σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό, μικρές διαφορές στην ινσουλινοαντίσταση μπορούν να επηρεάσουν την υποκλινική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων



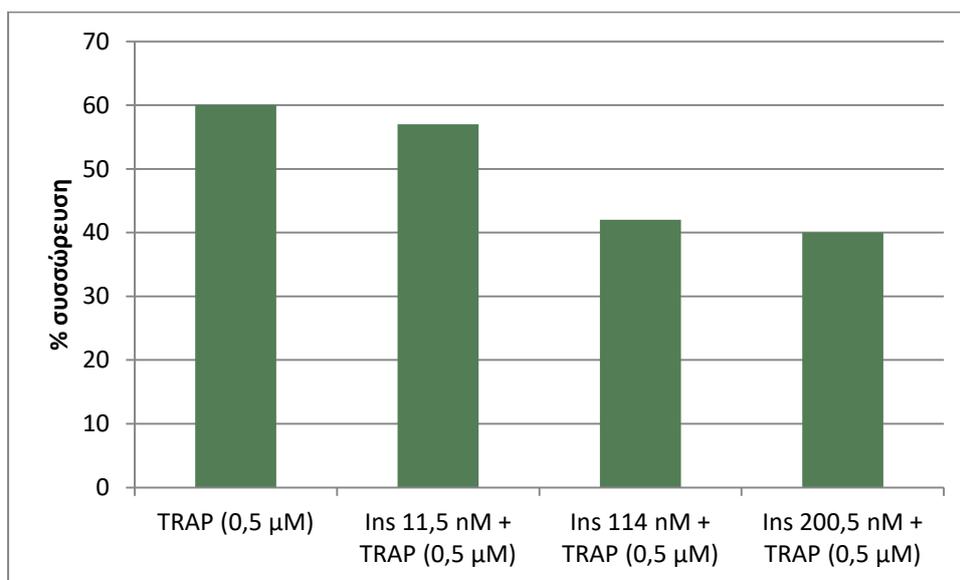
Σχήμα 20 .Συσχέτιση HOMA-IR και sP-σελεκτίνης σε συνθήκες νηστείας

5. Αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης σε PRP και πλυμμένα αιμοπετάλια ανθρώπου.

Η ινσουλίνη μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από TRAP συσσώρευση αιμοπεταλίων τόσο σε PRP όσο και σε εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων. Οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης στις οποίες ασκεί αντιαιμοπεταλιακή δράση κυμαίνονται ανάλογα τον εθελοντή. Αποτελέσματα από ενδεικτικά πειράματα φαίνονται στα παρακάτω σχήματα. Σε όλα τα πειράματα, τα αιμοπετάλια προεπώαζονταν για 5 min με ινσουλίνη πριν την προσθήκη του TRAP.



Σχήμα 21. Αναστολή συσσώρευσης αιμοπεταλίων, επαγόμενης από TRAP, από την ινσουλίνη. Το πείραμα έγινε σε PRP.



Σχήμα 22. Αναστολή συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων ανθρώπου, επαγόμενης από TRAP, από την ινσουλίνη.

6. Επίδραση του PAF στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης

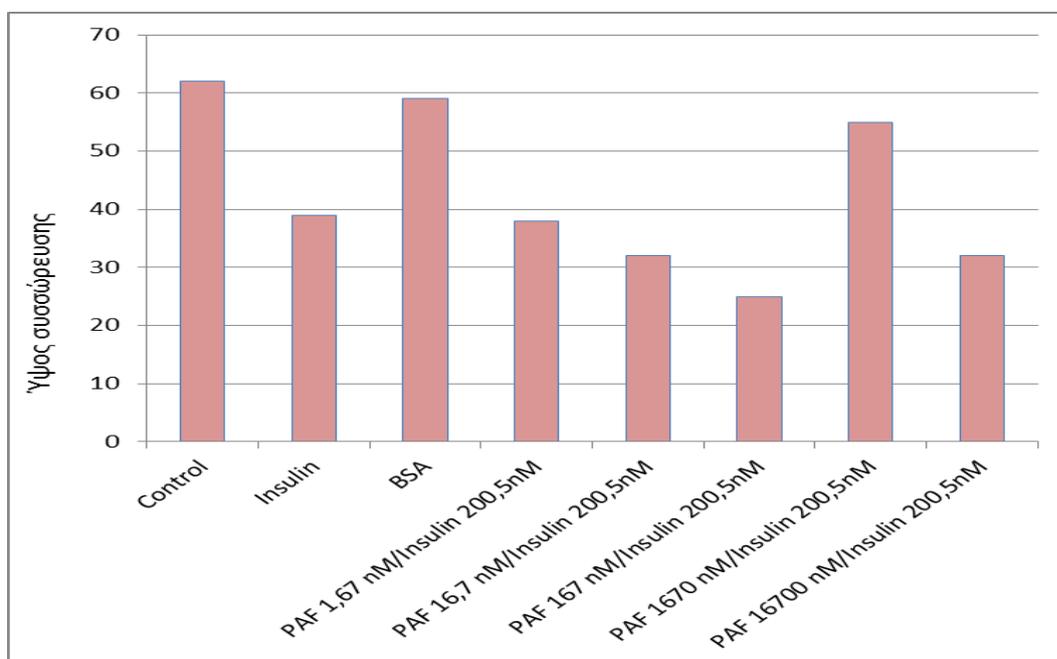
Μετά την πιστοποίηση της αντιαιμοπεταλιακής δράσης της ινσουλίνης σε πλυμένα αιμοπετάλια, θέλαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο ο PAF μπορεί να παρεμποδίζει αυτή

τη δράση της ινσουλίνης και άρα να δρα έμμεσα ως ένας πιθανός μεσολαβητής της αντίστασης της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια μεταγευματικά.

Μετά από επώαση των αιμοπεταλίων με διαφορετικές δόσεις του PAF και ινσουλίνης (200,5 nM) για 5 λεπτά και ύστερα από επαγωγή της συσσώρευσης με TRAP παρατηρήθηκε όπως φαίνεται στον πίνακα, διαφοροποίηση της ανασταλτικής δράσης της ινσουλίνης, όταν τα αιμοπετάλια προεπώαζονταν πριν από την ινσουλίνη με PAF. Η δραστική συγκέντρωση PAF, στην οποία μπορεί να αίρει την αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης είναι 1670 nM PAF

Πίνακας 4. Συνθήκες διερεύνησης της επίδραση του PAF στην ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στην επαγόμενη από TRAP συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Προεπώαση 1	Προεπώαση 2	Χρόνος προεπώασης	Συσσωρευτικός παράγοντας	Ύψος συσσώρευσης	Slope	AUC
-	Φυσιολογικός ορός 35 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)	62	92	201
-	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)	39	35	124
BSA 5 μ L	Φυσιολογικός ορός 30 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)	59	57	294
PAF 5 μ L 10 ⁻⁷ M (16,7 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)	32	37	149
PAF 5 μ L 10 ⁻⁴ M (16700 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)	32	50	89
PAF 5 μ L 10 ⁻⁵ M (1670 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)	55	42	250
PAF 5 μ L 10 ⁻⁶ M (167 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)	25	18	101
PAF 5 μ L 10 ⁻⁸ M (1,67 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)	38	24	117

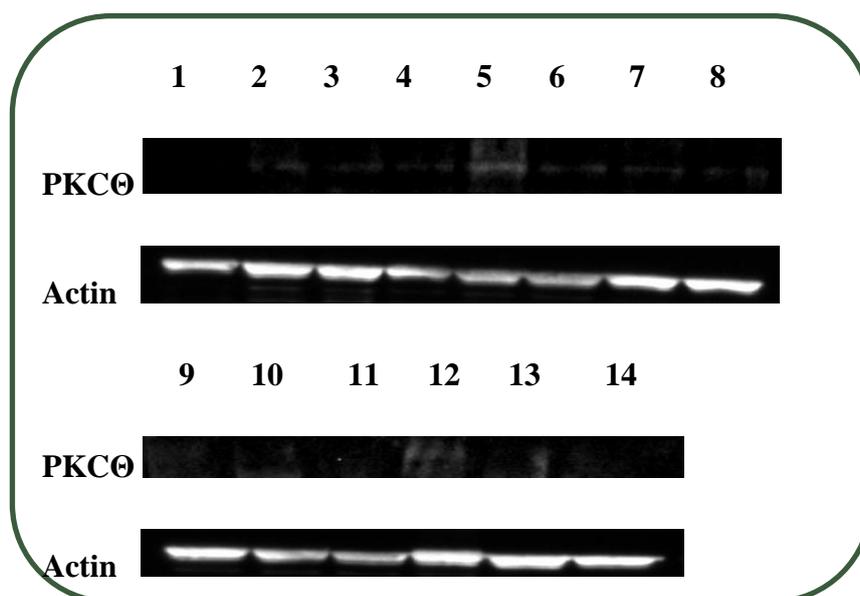


Σχήμα 23 Επίδραση του PAF στην ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στην συσσώρευση των αιμοπεταλίων με το συσσωρευτικό παράγοντα TRAP

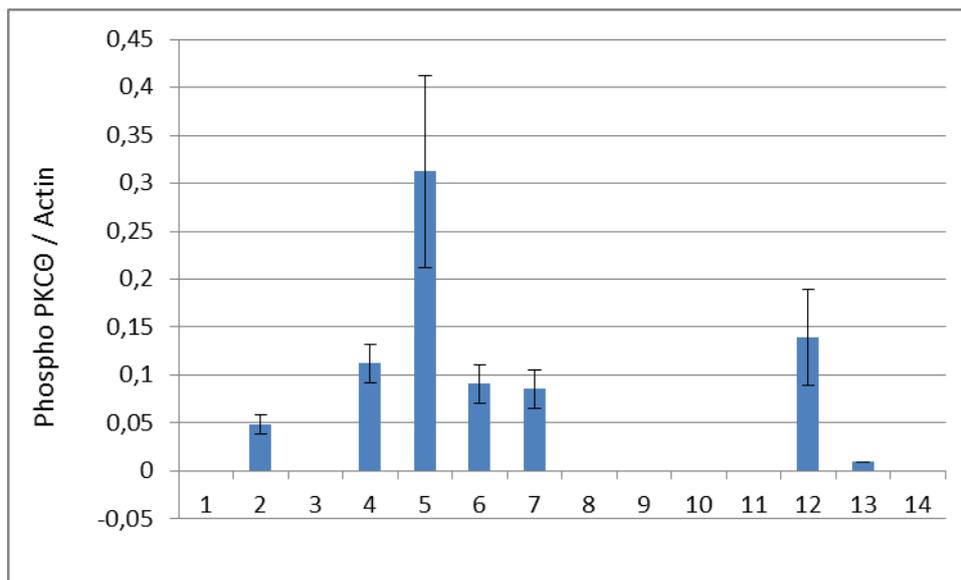
Η μελέτη της ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) της πρωτεΐνης PKC θ με ανοσοτύπωση κατά western έδειξε αύξηση της φωσφορυλίωσης της PKC θ μετά από πρόκληση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με TRAP χωρίς προεπάση (δείγμα 5) και μετά από προεπάση με PAF (1670 nM) + ινσουλίνη (200,5 μ M) για 5 λεπτά και πρόκληση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με TRAP (δείγμα 12).

Πίνακας 5. Συνθήκες διερεύνησης της επίδραση του PAF στην ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στην επαγόμενη από TRAP συσσώρευση των αιμοπεταλίων και την ενεργοποίηση της PKC θ πρωτεΐνης

	Προεπάση 1	Προεπάση 2	Χρόνος προεπάσης	Συσσωρευτικός παράγοντας
1	-	Φυσιολογικός ορός 50 μ L	5 min	-
2	-	Φυσιολογικός ορός 35 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)
3	-	Φυσιολογικός ορός 35 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)
4	-	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	-
5	-	Φυσιολογικός ορός 35 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)
	-	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)
7	BSA 5 μ L	Φυσιολογικός ορός 30 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)
8	PAF 5 μ L 10 ⁻⁷ M (16,7 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)
9	BSA 5 μ L	Φυσιολογικός ορός 30 μ L	5 min	TRAP (0,5 μ M)
10	PAF 5 μ L 10 ⁻⁷ M (16,7 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)
11	PAF 5 μ L 10 ⁻⁴ M (16700 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)
12	PAF 5 μ L 10 ⁻⁵ M (1670 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)
13	PAF 5 μ L 10 ⁻⁶ M (167 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)
14	PAF 5 μ L 10 ⁻⁸ M (1,67 nM)	Ins 35 μ L (200,5 nM)	5 min	TRAP (0,5 μ M)

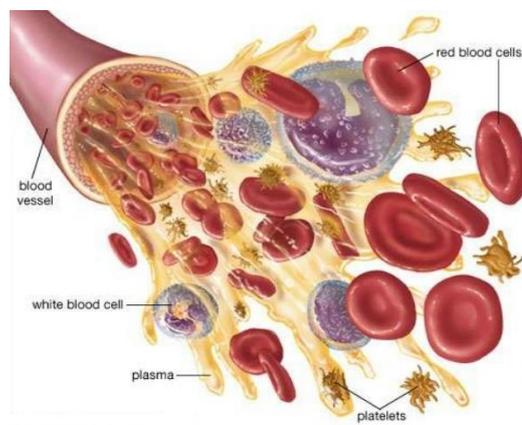


Σχήμα 24 Μελέτη της ενεργοποίησης-φωσφορυλίωσης της PKC θ κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων από το συσσωρευτικό παράγοντα TRAP μετά από προεπάση του PAF και ινσουλίνη. Πραγματοποιήθηκε ανοσοτύπωση κατά Western με αντίσωμα αντι-phospho PKC θ (1:1000), και αντι-ακτίνης (1: 2000) σε ολικά εκχυλίσματα αιμοπεταλίων σε 12 διαφορετικές συνθήκες (πίνακας 5).



Σχήμα 25. Πυκνομετρία της ανοσοτύπωσης κατά western με αντίσωμα αντι-phospho PKC θ , σε ολικά εκχυλίσματα αιμοπεταλίων σε 12 διαφορετικές συνθήκες (πίνακας 2). Στο ιστόγραμμα φαίνονται τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης PKC θ ομαλοποιημένης σύμφωνα με την μέτρηση της έκφρασης της ακτίνης. Τα δεδομένα είναι μέσος όρος \pm SD από 3 διαφορετικά western.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ



ΣΗΖΗΤΗΣΗ

Τα τελευταία χρόνια η συχνότητα εμφάνισης του σακχαρώδη διαβήτη τύπου δύο, της ινσουλινοαντίστασης, του μεταβολικού συνδρόμου, ακόμα και σε παιδικό πληθυσμό, είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό και τείνει να πάρει μορφή επιδημίας.

Χαρακτηριστικό του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II (ΣΔ II) είναι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης που παρατηρούνται. Οι ασθενείς αυτοί έχει φανεί ότι έχουν 2-5 φορές περισσότερες πιθανότητες για πρόωρη αρτηριοσκληρωτική νόσο, συμπεριλαμβανομένου του έμφραγματος του μυοκαρδίου, τα εγκεφαλικά επεισόδια και την περιφερειακή αρτηριοπάθεια (79).

Τα αιμοπετάλια είναι δυναμικά κύτταρα με δραστηριότητες που εκτείνονται πέρα από την αιμόσταση· κατέχουν κεντρικό ρόλο στην έναρξη και την πρόοδο της αθηροθρόμβωσης (80). Ο τρόπος με τον οποίο τα αιμοπετάλια ανταποκρίνονται στο περιβάλλον τους, ορίζεται ως η ικανότητά τους να εκπληρώσουν το ρόλο τους στην αιμόσταση και επίσης την τάση τους να συμβάλουν προς την εξέλιξη της νόσου. Τα αιμοπετάλια αντιμετωπίζουν ανασταλτικά σήματα που τα κρατούν σε κατάσταση ηρεμίας στα υγιή αγγεία, ενεργοποιητικά σήματα σε θέσεις αγγειακής βλάβης που προκαλούν ταχεία πρόσφυση και συνάθροιση, και αρνητικά ρυθμιστικά σήματα που παρέχουν αρνητική ανάδραση όταν αρχίσει η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και χρησιμεύουν για να περιορίσουν τον σχηματισμό θρόμβου (81). Η ισορροπία μεταξύ όλων αυτών των σημάτων είναι απαραίτητα για την αγγειακή ομοιόσταση.

Η ινσουλίνη ασκεί ανασταλτική επίδραση στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, παρουσία διάφορων διεγερτικών παραγόντων (82). Η προθρομβωτική κατάσταση έχει πρόσφατα αναγνωριστεί ως σημαντικό συστατικό σε παθολογικές καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από ινσουλινοαντίσταση, όπως ο ΣΔII, το μεταβολικό σύνδρομο, η παχυσαρκία, το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών κτλ. Η κατάσταση αυτή χαρακτηρίζεται από αυξημένα επίπεδα του ινωδογόνου, του αναστολέα-1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, από φλεγμονή και ασυνήθιστες ανωμαλίες στις λειτουργίες των αιμοπεταλίων (83).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη οφείλεται σε γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η μειωμένη φυσική δραστηριότητα, το κάπνισμα, η παχυσαρκία, και η υψηλή

πρόσληψη λίπους σε αντίθεση με την συνολική ποσότητα ή ποιότητα των καταναλισκόμενων υδατανθράκων, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην δημιουργία της αντίστασης στην ινσουλίνης (84).

Το δυτικό πρότυπο διατροφής χαρακτηρίζεται από την ημερήσια πρόσληψη γευμάτων υψηλής ενέργειας, πλούσια σε εξευγενισμένους υδατάνθρακες και λίπη. Η κατανάλωση τέτοιων γευμάτων ακολουθείται από μία οξεία, παροδική, συντριπτική ροή υψηλών ενεργειακών υποστρωμάτων (η γλυκόζη και τα λιπαρά οξέα) στα κύτταρα. Η ανεπαρκής μεταβολική κάθαρση αυτών των υποστρωμάτων, η οποία είναι πιο έντονη κάτω από τις συνθήκες της ινσουλίνης, αντοχής, οδηγεί στην παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου και αζώτου (RONS) και τελικών προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs), προκαλώντας οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση του συστήματος πήξης, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και φλεγμονή (85).

Επειδή στο μεγαλύτερο μέρος της ημέρας ο άνθρωπος βρίσκεται σε μεταγευματική κατάσταση, η μελέτη των βιοχημικών διαταραχών που προκαλούνται στην κατάσταση αυτή, θα συμβάλει στην κατανόηση των παθοφυσιολογικών μηχανισμών στους οποίους η διατροφή παίζει σημαντικό ρόλο.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας/υπερίνσουλιναίμιας στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και στους μηχανισμούς μεταγωγής σήματος της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια.

Συγκεκριμένα, διερευνήθηκε η επίδραση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας μέσω διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με διαφορετικούς συσσωρευτικούς παράγοντες και η επίδραση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας στα επίπεδα ινσουλίνης.

Επίσης, διερευνήθηκε η επίδραση του PAF στην ανασταλτική δράση της ινσουλίνης και η πιθανή εμπλοκή της ενεργοποίησης της PKC θ σε αυτό.

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της γλυκόζης και της ινσουλίνης ύστερα από φόρτιση με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο, και με την μεγαλύτερη συγκέντρωση τους να παρατηρείτε στα 30 λεπτά μετά την κατανάλωση του ροφήματος με την γλυκόζη.

Η ευαισθησία των αιμοπεταλίων μειώθηκε μετά την φόρτιση της γλυκόζης ανεξαρτήτως της ποσότητας της γλυκόζης. Παρατηρήθηκε τάση αύξησης του EC50 του ADP αμέσως μετά τις φορτίσεις με γλυκόζη, ωστόσο, αυτή η τάση αύξησης εκμηδενίζεται στη φόρτιση των 150g. Εμφανίζεται διαφοροποίηση στο χρόνο της ικανότητας του 1 μM TRAP να προκαλεί συσσώρευση, χωρίς αυτή η διαφοροποίηση να διαφέρει μεταξύ των φορτίσεων. Σύγκριση μεταξύ baseline και των άλλων χρονικών στιγμών δείχνει στατιστικά σημαντική μεταβολή στα 90 min με 75 g φόρτιση και στα 60 min με 100 g φόρτιση. Είναι λοιπόν φανερό ότι και κάτω από έντονες υπεργλυκαιμικές συνθήκες, όχι μόνο δεν ενεργοποιούνται τα αιμοπετάλια, αλλά εξασθενεί η δραστηριότητα τους σε φυσιολογικούς εθελοντές.

Η μεταγευματική υπεργλυκαιμία έχει συσχετιστεί σε πληθώρα μελετών με το κίνδυνο ανάπτυξης πρώιμης αθηρωμάτωσης και υπάρχει ισχυρή συσχέτιση μεταξύ της μεταγευματικής γλυκαιμίας με τη στεφανιαία νόσο και τον στεφανιαίο θάνατο (86).

Σε προδιαβητικούς ασθενείς με μειωμένη ανοχή στην γλυκόζη, η μεταγευματική κατάσταση χαρακτηρίζεται από μεγάλη και γρήγορη αύξηση της γλυκόζης του αίματος ικανή να προκαλέσει οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση της πήξης, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και φλεγμονή, με τα αιμοπετάλια να εμφανίζουν μεγαλύτερη ενεργοποίηση (87).

Αποτελέσματα από μεγάλο αριθμό μελετών επιβεβαιώνουν ότι τα αιμοπετάλια είναι υπερνεργοποιημένα σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας σε σύγκριση με τις φυσιολογικές συνθήκες. Σε υπεργλυκαιμία βρέθηκε αυξημένη η ικανότητα συσσώρευσης αιμοπεταλίων-μονοκυττάρων, αιμοπεταλίων-φαγοκυττάρων, αιμοπεταλίων-λευκοκυττάρων, η έκφραση του ιστικού παράγοντα TF, του προσδέτη του CD40 (CD49L), της p-selectin και των προσωρινών καναλιών ασβεστίου (TRPC6) (88).

Σε μελέτη *in vitro* σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας βρέθηκαν υπερνεργοποιημένα αιμοπετάλια με υπέρμετρη παραγωγή δραστικών ριζών οξυγόνου, η οποία αποδόθηκε στον υπέρμετρο μεταβολικό καταβολισμό της γλυκόζης στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια των αιμοπεταλίων (89).

Σε μελέτη *in vitro*, ανθρώπινο αίμα σε νηστεία επώαστηκε με διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (5, 15 και 30 mmol/l) αλλά και με άλλα σάκχαρα. Σε αυτή τη μελέτη βρέθηκε πως τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης αυξάνουν την έκφραση της p-selectin

από τα αιμοπετάλια επαγόμενη από ADP και TRAP, καθώς και την δέσμευση των αιμοπεταλίων με το ινωδογόνου επαγόμενη από την TRAP. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με 30 mmol/l 1-γλυκόζη, σακχαρόζη και γαλακτόζη. Η υπεργλυκαιμία αύξησε επίσης την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων /λευκοκυττάρων με την επίδραση του TRAP. Συμπερασματικά, η μελέτη αυτή έδειξε ότι η οξεία υπεργλυκαιμία προκαλεί υπεραντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων μέσω αυξημένης οσμωτικότητας που στην συνέχεια επηρεάζει την αιμοπεταλιακή ενδοκυτταρική σηματοδότηση κυρίως μέσω PKC σηματοδότησης (90).

Οι πιθανολογούμενοι μηχανισμοί μέσω των οποίων τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης του αίματος αυξάνουν το κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων στο διαβήτη περιλαμβάνουν τη δράση των γλυκοζυλιωμένων πρωτεϊνών (AGEs), το οξειδωτικό στρες, τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, τα αυξημένα επίπεδα τριακυλογλυκερολών στο πλάσμα και τα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης στο πλάσμα (91).

Στην παρούσα εργασία η απόκριση των αιμοπεταλίων μειώθηκε μετά την φόρτιση της γλυκόζης με σύγχρονη αύξηση των επιπέδων της ινσουλίνης. Είναι πιθανόν να συμμετέχει η αντ αιμοπεταλιακή δράση της εκκρινόμενης ινσουλίνης. Ωστόσο, η στατιστική ανάλυση της σχέσης της μεταγευματικής ινσουλίνης με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με ADP έδειξε πως όσο υψηλότερη είναι η υπερινσουλιναιμία τόσο χαμηλότερη είναι η εξασθένηση της ευαισθησίας των αιμοπεταλίων. Επιπλέον, κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων τόσο με TRAP όσο με ADP παρατηρήθηκε πως η μείωση της δραστηριότητας των αιμοπεταλίων είναι λιγότερο σημαντική σε μεγάλες φορτίσεις (150gr γλυκόζης) (αν και η παρατήρηση αυτή δεν φτάνει σε επίπεδα στατιστικής σημαντικότητας). Στις μεγάλες φορτίσεις γλυκόζης παρατηρήθηκε και μεγαλύτερη αύξηση της ινσουλίνης.

Η ινσουλίνη φάνηκε να μπορεί να αναστείλει την επαγόμενη από TRAP συσσώρευση αιμοπεταλίων τόσο σε πλυμένα αιμοπετάλια όσο και σε εναιώρημα πλυμένων αιμοπεταλίων. Οι συγκεντρώσεις της ινσουλίνης στις οποίες ασκεί αντ αιμοπεταλιακή δράση κυμαίνονται ανάλογα με τον εθελοντή.

Έχει αποδειχτεί πως η ινσουλίνη επάγει την αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από επίδραση διάφορων ενεργοποιητικών παραγόντων, οι όποιοι δρουν μέσω διαφορετικών μεταγωγικών μονοπατιών. Αυτό υποδηλώνει πως η ανασταλτική δράση της ινσουλίνης πραγματοποιείται ανεξάρτητα από το

ενεργοποιητικό παράγοντα (92). Ένας από τους μηχανισμούς που περιγράφει τη μεσολάβηση της αντι-αιμοπεταλίων δράση της ινσουλίνης, είναι η ενεργοποίηση της AMP πρωτεϊνικής κινάσης (AMPK) και της AKT από την PI3K. Η ινσουλίνη μπορεί επίσης να αναστείλει τη κινητοποίηση του Ca^{2+} με την ενεργοποίηση της ανασταλτικής G πρωτεΐνης Gi. Ωστόσο, επειδή η ινσουλίνη μπορεί επίσης να διεγείρει την απελευθέρωση της ADP, η ικανότητα της ινσουλίνης να ενεργοποιεί ή να αναστέλλει τα αιμοπετάλια μπορεί να εξαρτάται από τη συγκέντρωση της (93).

In vitro πειράματα χρησιμοποιώντας αιμοπετάλια από υγιή μη παχύσαρκα άτομα αποκαλύπτουν ότι η σύνδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της προκαλεί την μετακίνηση του μαγνησίου στο αιμοπετάλιο και συνδέεται με μειωμένη προκαλούμενη από θρομβίνη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και μειωμένη παραγωγή θρομβοξανίου B2. Η πρόσδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της οδηγεί επίσης σε αύξηση των ενδοαιμοπεταλίων επιπέδων cAMP, αναστέλοντας την P2Y12 σηματοδότηση και μειώνοντας την δραστηριότητα των αιμοπεταλίων. Περαιτέρω, in vivo, πειράματα σε υγιείς μη παχύσαρκους άτομα επιβεβαιώνουν ότι η ινσουλίνη αναστέλλει την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με το κολλαγόνο και εξασθενεί τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και την επίδραση των αγωνιστών τους (94).

Σε υγιείς, μη-διαβητικούς εθελοντές πραγματοποιήθηκε μελέτη ολόκληρου του προφίλ έκφρασης του γονιδιώματος των αιμοπεταλίων πριν και μετά 24 ώρες υπεργλυκαιμίας (HG) (γλυκόζη~200 mg / dL) και υπερίνσουλιναίμιας (HI). Η μελέτη αυτή απέδειξε ότι 24 ώρες σε κατάσταση HG + HI, ακόμη και σε μη διαβητική, υγιή κατάσταση, παρατηρούνται αλλαγές στα αιμοπετάλια στην σηματοδότηση της ινσουλίνης και στα προπηκτικά μεταγωγικά μονοπάτια. Συνολικά, υπήρχε αύξηση της έκφρασης των ρυθμιστικών πρωτεϊνών GSK3B (Glycogen synthase kinase 3 beta) και PTPN11 (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11) και μείωση της έκφρασης του STXBP4 (Syntaxin Binding Protein 4) μαζί με πιθανή μείωση του IRS1. Και οι 4 πρωτεΐνες είναι σημαντικοί μεσολαβητές στην σηματοδότηση της ινσουλίνης, αλλά και στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων (95).

Η παχυσαρκία, ένα κοινό χαρακτηριστικό σε ασθενείς DM2 που μπορεί να επιδεινώσει ή να προκαλέσει αντίσταση στην ινσουλίνη, συνδέεται με υπεραντιδραστικότητα των αιμοπεταλίων (96).

Σε παχύσαρκους ασθενείς έχει βρεθεί αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων με αυξημένα επίπεδα CD40L στο πλάσμα, αυξημένα επίπεδα μικροσωματιδίων που προέρχονται από την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και μεγαλύτερη παραγωγή θρομβοξάνης (97). Έχει βρεθεί επίσης ότι η βελτίωση της ευαισθησίας της ινσουλίνης με πιογλιταζόνη καθώς και η απώλεια βάρους μειώνει τους δείκτες της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων σε παχύσαρκες γυναίκες (98).

Σε *in vivo* μελέτες με ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη ο Ueno et al. σαφώς έδειξε ότι μετά από OGTT η δραστηριότητα των αιμοπεταλίων εξαρτάται από την κατάσταση της ινσουλινο-ευαισθησίας των ατόμων, την πιθανή ύπαρξη στεφανιαίας νόσου και την θεραπεία τους (99).

Σε ασθενείς με ΣΔΠ όπου μελετήθηκε η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μεταγευματικά φάνηκε ότι η μεταγευματική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων σχετίζεται με τη μεταγευματική ινσουλίνη αλλά όχι με τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Σε αντίθεση, σε ασθενείς με ΣΔΙ που δεν είναι σε θέση να εκκρίνουν ινσουλίνη, δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων μεταγευματικά παρά την πολύ υψηλή μεταγευματική γλυκόζη όταν δεν λαμβάνουν προγευματική ινσουλίνη. Όταν όμως λαμβάνουν προγευματική ινσουλίνη, έδειξαν σημάδια ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (100).

Ο μηχανισμός που υπόκειται σε αυτά τα αντιφατικά αποτελέσματα της δράσης της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια υγιών ατόμων έναντι ασθενών με αντίσταση στην ινσουλίνη φαίνεται να είναι η δυσλειτουργία του υποδοχέα ινσουλίνης και του μονοπατιού σηματοδότησής της, που λαμβάνει χώρα, όχι μόνο σε ιστούς, αλλά και σε αιμοπετάλια. Η μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη των αιμοπεταλίων οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα cAMP, αύξηση της ενδοαιμοπεταλιακής συγκέντρωσης του ασβεστίου, και υπερδραστηριότητα των αιμοπεταλίων (101). Παραδόξως, η θεραπεία με ινσουλίνη σε ασθενείς με ΣΔ τύπου 2 μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση στην δραστηριότητα των αιμοπεταλίων *in vivo* (102). Επιπλέον, τα αιμοπετάλια από διαβητικούς ασθενείς δείχνουν, ανεξάρτητα από το IRS, μείωση της ευαισθησίας στους βασικούς ενδογενείς αναστολείς των αιμοπεταλίων που είναι η προστακυκλίνη και το NO. Η υπερινσουλιναίμια είναι, ως εκ τούτου, δυνητικά επιζήμια για την δραστηριότητα αιμοπεταλίων σε ασθενείς με αντίσταση στην ινσουλίνη (103).

Στην παρούσα μελέτη βρέθηκε πως η έκφραση sP-σελεκτίνης δεν μεταβάλλεται σημαντικά μετά τις φορτίσεις και δεν διαφοροποιείται η μεταβολή της μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων. Εμφανίζεται μία τάση αύξησης σε μεγάλους χρόνους μετά τη μεγάλη φόρτιση με 150 g γλυκόζης, ωστόσο, και αυτή είναι μικρή και χωρίς ιδιαίτερη κλινική σημασία. Παράλληλα, παρατηρείται μία οριακά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ iAUC ινσουλίνης και iAUC sP-σελεκτίνης που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι η sP-σελεκτίνη εμφανίζει μία τάση αύξησης στις μεγάλες φορτίσεις γλυκόζης. Δεν εμφανίστηκαν σημαντικές συσχετίσεις με τα AUC της γλυκόζης. Βρέθηκε ακόμα ότι η ινσουλίνης νηστείας και το HOMA-IR εμφανίζουν θετική συσχέτιση με την sP-σελεκτίνη γεγονός που υποδηλώνει ότι ακόμα και σε ένα φυσιολογικό πληθυσμό, μικρές διαφορές στην ινσουλινοαντίσταση μπορούν να επηρεάσουν την υποκλινική ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων

Η P-σελεκτίνη είναι διαμεμβρανική πρωτεΐνη που συντίθεται από τα αιμοπετάλια και τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποθηκεύεται σε ενδοκυτταρικά κοκκία και εκφράζεται στην πλασματική μεμβράνη μόνο κατά την κυτταρική ενεργοποίηση. Η P-σελεκτίνη ρυθμίζει θετικά των ιστικό παράγοντα (TF) στα μονοκύτταρα και οδηγεί σε συσσώρευση λευκοκυττάρων προωθώντας εναπόθεση του ινώδους σε τομείς αγγειακής βλάβης που σχετίζονται με θρόμβωση και φλεγμονή. Η P-σελεκτίνη υπάρχει και σε διαλυτή μορφή (sP-σελεκτίνη), που παράγεται κυρίως από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια. Οι συγκεντρώσεις sP-σελεκτίνης του πλάσματος είναι αυξημένες σε θρομβοτικές καταστάσεις και συνδέονται με τον κίνδυνο ανάπτυξης αγγειακών επιπλοκών (104).

Σε μελέτη παχύσαρκων μη-διαβητικών γυναικών βρέθηκε η sP-σελεκτίνη να σχετίζεται θετικά με το δείκτη μάζα σώματος, το HOMA IR, την ινσουλίνης νηστείας και τα επίπεδα PAI-1 του πλάσματος (105).

Σε μελέτη με άτομα με κεντρικού τύπου παχυσαρκία, πριν και μετά από διαιτητική παρέμβαση με 10% απώλεια βάρους, έδειξε αρχικά θετική συσχέτιση της αντίστασης στην ινσουλίνης με την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Μετά από την απώλεια του βάρους βρέθηκε μείωση των συγκεντρώσεων της sCD-40L και sP-σελεκτίνης με επιπλέον σημαντική αύξηση στην ικανότητα της προστακυκλίνης, του NO, της cAMP και της cGMP να μειώσουν την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από το ADP. Ως εκ τούτου, η μελέτη αυτή δείχνει ότι η μείωση της SCD-40L και της sP-σελεκτίνης είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η απώλεια βάρους μειώνει τον

καρδιαγγειακό κίνδυνο, πιθανόν μέσω της αύξησης της ευαισθησίας στην ινσουλίνη.
(106)

Στην παρούσα εργασία θέλαμε να διαπιστώσουμε κατά πόσο ο PAF μπορεί να παρεμποδίζει αυτή τη δράση της ινσουλίνης και άρα να δρα έμμεσα ως ένας πιθανός μεσολαβητής της αντίστασης της ινσουλίνης στα αιμοπετάλια μεταγευματικά. Μετά από επώαση των αιμοπεταλίων με διαφορετικές δόσεις του PAF και ινσουλίνης (200,5 nM) για 5 λεπτά και ύστερα από επαγωγή της συσσώρευσης με TRAP παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της ανασταλτικής δράσης της ινσουλίνης, όταν τα αιμοπετάλια προεπώαζονταν πριν από την ινσουλίνη με PAF. Η δραστική συγκέντρωση PAF, στην οποία μπορεί να αίρει την αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης είναι 1670 nM PAF

Η μεταγευματική υπεργλυκαιμία είναι ικανή να προκαλέσει οξειδωτικό στρες, ενεργοποίηση του συστήματος πήξης, ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και φλεγμονή (107).

Ο PAF είναι μεσολαβητής της φλεγμονώδους απόκρισης, ο οποίος εκκρίνεται σε καταστάσεις οξειδωτικού στρες. Η μεταγωγή σήματος του PAF αντιτίθεται σε εκείνη της ινσουλίνης μειώνοντας την δράση της. Σχετικά με τους μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να δρα ο PAF: .

1. Είναι γνωστό ότι η αύξηση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} που προκαλείται από τον PAF μπορεί να επηρεάζει τη πορεία μεταγωγής σήματος της ινσουλίνης, είτε διακόπτοντας τη πορεία, είτε προκαλώντας απευαισθητοποίηση των υποδοχέων της ινσουλίνης, η οποία επέρχεται λόγω του ότι προκαλείται η έκκριση περισσότερης ινσουλίνης για να επιτευχθεί η μείωση του ενδοκυτταρικού Ca^{2+} (108)

2. Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) με τις διάφορες ισομορφές της (α, β1, βII, γ, δ, ε, η, θ, μ, ζ, ι/λ και ν) έχει βρεθεί ότι φωσφορυλιώνει τον υποδοχέα της ινσουλίνης και αναστέλλει το σήμα της προωθώντας τη φωσφορυλίωση ομάδων σερίνης των IRs πρωτεϊνών, όπως IRs-1. Η PKC όπως και μερικές ισομορφές της ενεργοποιούνται από τη DAG. Σε διαβητικά ζώα παρατηρήθηκαν αυξημένα επίπεδα DAG μαζί με αυξημένη δράση της PKC σε μη νευρικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένου του αγγειακού ιστού. Κατά τη σηματοδότηση του PAF η DAG αποτελεί δεύτερο μήνυμα και σχηματίζεται μέσω του κύκλου του φωσφατιδυλινωσίτη. Είναι πιθανό η DAG ως δεύτερο μήνυμα, κατά τη πορεία σηματοδότησης του PAF, να ενεργοποιεί την PKC με αποτέλεσμα να διακόπτει το σήμα της ινσουλίνης μέσω της φωσφορυλίωσης του υποδοχέα της (109).

3. Ένας σημαντικός μηχανισμός εισαγωγής σήματος του PAF είναι και η φωσφορυλίωση, σε υπομονάδες τυροσίνης, των κινάσεων που ενεργοποιούν την μίτωση των κυττάρων (MAPK). Οι MAPKs χωρίζονται σε τρεις τάξεις: Οι ERKs (extracellular signal-regulated kinases), οι P38 και οι JNKs/SAPKs . Και οι τρεις τάξεις των MAPK ενεργοποιούνται από το PAF από διαφορετικές πορείες που εξαρτώνται από τα είδη ή και το τύπο των κυττάρων (110)

Οι JNKs είναι πρωτεϊνικές κινάσες οι οποίες ενεργοποιούνται από το στρες. Πρόσφατα γενετικά στοιχεία και φαρμακολογικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η ενεργοποίηση της JNK μπορεί να παίζει ρόλο στο διαβήτη τύπου 2, στην ινσουλινοαντίσταση και στην παχυσαρκία. Πρόσφατες μελέτες εμπλέκουν τον υποδοχέα της ινσουλίνης (IR) και τα υποστρώματα του υποδοχέα της IRS και δείχνουν ότι η φωσφορυλίωση σε συγκεκριμένα μόρια σερίνης στα IRS μπορεί να αναστέλλει το σήμα της ινσουλίνης και να προάγει την αντίσταση στην ινσουλίνη (111). Οι IRS πρωτεΐνες περιέχουν μία περιοχή σύνδεσης για τις περιοχές διασύνδεσης της JNK και η JNK έχει παρουσιαστεί να φωσφορυλιώνει το μόριο της σερίνης 307 των πρωτεϊνών IRS1 σε *in vitro* πειράματα (112). Επίσης η δράση της JNK έχει παρουσιαστεί να είναι ανώμαλα αυξημένη σε μοντέλα ζώων με διαβήτη. Αυτό υποδηλώνει ότι η JNK μπορεί να είναι στόχος για τη παρεμπόδιση της αντίστασης της ινσουλίνης (113).

Στην παρούσα εργασία στην προσπάθεια να μελετηθεί η επίδραση του PAF στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης έγινε μελέτη της ενεργοποίησης (φωσφορυλίωσης) της πρωτεΐνης PKC θ με ανοσοτύπωση κατά western η οποία έδειξε αύξηση της φωσφορυλίωσης της PKC θ μετά από πρόκληση της συσσώρευσης από προεπώαση με PAF (1670 nM) + ινσουλίνη (200,5 μ M) για 5 λεπτά και πρόκληση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων με TRAP .

Η PAF σχετίζεται με την δράση της PKC θ καθώς επάγει την μεταφορά της πρωτεΐνης αυτής από το κυτταρόπλασμα στην πλασματική μεμβράνη (114).

Η απουσία της PKC θ έχει σαν αποτέλεσμα την διαταραχή της αιμόστασης, την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και το σχηματισμού του θρόμβου. Ωστόσο, επιπλέον μελέτες δείχνουν ότι οι λειτουργίες των αιμοπεταλίων ρυθμίζονται από αρκετές διακριτές ισομορφές PKC, η οποίες μπορεί να συνεργούν ή να ανταγωνίζονται (115).

Η PKC θ είναι μια εξαρτώμενη από τα φωσφολιπίδια, αλλά Ca²⁺ ανεξάρτητη, κινάση της σερίνης / θρεονίνης η οποία βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα ανενεργών κυττάρων. Ωστόσο, κατά την κυτταρική ενεργοποίηση, μετατοπίζεται στη πλασματική μεμβράνη όπου αλληλεπιδρά με την διακυλογλυκερόλη (DAG), ένα παροδικό προϊόν της υδρόλυσης του φωσφολιπίδιου της πλασματικής μεμβράνης φωσφατιδυλινοσιτόλη 3,4-διφωσφορικής, υδρόλυση που διαμεσολαβείτε από τη φωσφολιπάση C γ 1 (116).

Η PKC θ έχει βρεθεί να προάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, την μικροσυσσωμάτωση και την προσκόλληση τους στην θέση της αγγειακής βλάβης. Επιπλέον, προάγει τον πολυμερισμό της ακτίνης και του κυτταροσκελετού απαραίτητες αλλαγές για να διασφαλιστεί η αποτελεσματική συσσώρευση των αιμοπεταλίων

Η δράση των αγωνιστών των GPVI η/και PAR υποδοχέων προκαλεί την ενεργοποίηση της μεταγωγής σήματος που έχει σαν αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της φωσφολιπάσης C (PLC). Η PLC, με τη σειρά της, δημιουργεί δύο αγγελιοφόρους την 1,2-διακυλογλυκερόλη (DAG) και την 1,4,5-trisphosphate (IP3), η οποίοι ενεργοποιούν διακριτές isoμορφές της PKC και κινητοποιεί τα ιόντα ασβεστίου από ενδοκυτταρικές αποθήκες, αντίστοιχα.

Το σχηματισμός DAG από θρομβίνη προάγει την μετατόπιση του PKC θ στη μεμβράνη, όπου μπορεί να υποβληθεί σε μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις (που μπορεί να ποικίλουν ανάλογα με το σήμα που προκαλείται από αγωνιστή), συμπεριλαμβανομένα φωσφορυλίωση σε Thr538, Tyr90, και άλλα σε κατάλοιπα.

Η PKC θ συνδέεται με τον υποδοχέα aPb3, και ύστερα συνδέεται το ινωδογόνο με τον aPb3, η PKC θ ενώνεται με τις πρωτεϊνικές κινάσες της τυροσίνης Btk και Syk, και προωθεί την φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης WIP (Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-interacting protein). Η PKC θ φωσφορυλιώνει επίσης την πρωτεΐνη tSNARE και την syntaxin-4, οι οποίες μπορεί να επηρεάσουν την έκκριση κοκκίων, να ενεργοποιήσουν την πρωτεΐνη ERK και ως εκ τούτου να προωθήσουν την παραγωγή της θρομβοξάνης A2, και να συμβάλλουν στη ρύθμιση της aPb3-συνδεδεμένων «έξω-μέσα» σηματοδότησης, και ενδεχομένως να επηρεάσει το «μέσα-έξω» μονοπατιού σηματοδότησης.

Όλα τα PKC θ εξαρτώμενη γεγονότα φωσφορυλίωσης είτε άμεσα προκαλούνται από την PKC θ , είτε έμμεσα μέσω των PKC θ ρυθμιζόμενων κινασών. Τελικά η PKC θ φαίνεται

να εμπλέκεται στην ρύθμιση της έκκρισης των α -κοκκίων στην προσκόλληση των αιμοπεταλίων, την εξάπλωση, και της συσσωμάτωσή τους (117).

Ο ρόλος της PKC θ ωστόσο είναι περίπλοκος. Από την άλλη έχει βρεθεί ότι PKC θ είναι ένας σημαντικός αρνητικός ρυθμιστής του σχηματισμού θρόμβου σε κολλαγόνο, ενδεχομένως με τη μεσολάβηση της έκκρισης κοκκίων και την ενεργοποίηση α IIb β 3. Ως εκ τούτου, PKC θ μπορεί να δράσει για να περιορίσει την ανάπτυξη του θρόμβου (118).

Σχετικά με την σχέση της PKC θ με την μετάδοση σήματος της ινσουλίνης, έχει αποδειχτεί ότι η PKC θ παίζει σημαντικό ρόλο στην ινσουλινο-αντίσταση σε κύτταρα ινσουλίνου ευαίσθητα.

Η PKC θ αναστέλλει την σηματοδότηση της ινσουλίνης μέσω της φωσφορυλίωσης του IRS1 σε κατάλοιπα σερίνης /1101. Η φωσφορυλίωση αυτή (Ser1101) σε μυϊκά κύτταρα διεγείρεται από την ινσουλίνη, από εστέρες της φορβόλης, από τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, και από το TNF α και συμβάλλει στην μείωση της φωσφορυλίωσης σε κατάλοιπα τυροσίνης της IRS1 αναστέλλοντας την σηματοδότηση του PI3K / Akt μονοπτιού.

Άλλος ένας πιθανός μηχανισμός που πρέπει να εξεταστεί, είναι το γεγονός ότι, η PKC θ ρυθμίζει αρνητικά την ενεργοποίηση της PDK-1 μέσω της φωσφορυλίωσης του PDK-1 σε κατάλοιπα σερίνης (S504/332). Αυτό οδηγεί στην αναστολή της φωσφορυλίωσης της Akt και της μη ενεργοποίησης του σήματος της PI3K.

Η φωσφορυλίωση του PDK-1 σε S504/332 μειώνει την δραστηριότητα του αναστέλλοντας το διμερισμό του και την αυτό-φωσφορυλίωση του. Επίσης η φωσφορυλίωση σε S504/332 μειώνει την ικανότητα του PDK-1 να ενεργοποιεί την Akt αναστέλλοντας την μεταφορά της στην μεμβράνη γεγονός απαραίτητο για την φωσφορυλίωση της (119).

Συμπερασματικά τα υψηλά επίπεδα μεταγευματικής γλυκόζης σε συγκέντρωσης παρόμοιες του προδιαβήτη και του ΣΔΙΙ προκαλούν αύξηση της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Τα υψηλά επίπεδα μεταγευματικής γλυκόζης προκαλούν και αύξηση της ινσουλίνης και πιθανά να προκαλούν παροδική αντίσταση στην ινσουλίνη αίροντας την φυσιολογική ανασταλτική δράση της ινσουλίνης στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων. Φάνηκε ο PAF να έχει ανασταλτικό ρόλο στην αντιαιμοπεταλιακή δράση της ινσουλίνης μέσω της ενεργοποίησης του μεταγωγικού μονοπατιού του.

Συγκεκριμένα, υπάρχουν ενδείξεις της εμπλοκής της ενεργοποίησης της PKC θ .
Περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για την εύρεση του μοριακού αυτού μηχανισμού.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



Βιβλιογραφία

1. Senzel L, Gnatenko DV, Bahou WF. The platelet proteome. *Curr Opin Hematol* 2009; 16:329-33.
2. Bunting S, Moncada S, Vane JR. Antithrombotic properties of vascular endothelium. *Lancet* 1977; 2:1075-6.
3. Randriamboavonjy V. Mechanisms Involved in Diabetes-Associated Platelet Hyperactivation, The Non-Thrombotic Role of Platelets in Health and Disease, Dr. Steve W. Kerrigan (Ed.), 2015. InTech, DOI: 10.5772/60539.
4. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, et al. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30:2341-9.
5. Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, et al. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1:S12-S18.
6. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 1979; 254:9355-9358.
7. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; 40:643-72.
8. Venable ME, Zimmerman GA., McIntyre TM., and Prescott SM. Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions *Journal of Lipid Research* 1993 Volume 34, 691-702.
9. Marcus AJ, Safier LB, Ullman HL, Wong KT, Broekman MJ, Weksler BB, Kaplan K. Effects of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine on human platelet function in vitro. *Blood* 1981; 58:1027-1031.
10. Iwamoto S, Kawasaki T, Kambayashi J, Ariyoshi H, Monden M. Platelet microparticles: A carrier of platelet-activating factor?. *Biochem Biophys Res Comm* 1996; 218:940-944.

11. Shattil SJ, Kashiwagi H, Pampori N. Integrin signaling: the platelet paradigm. *Blood* 1998; 91:2645-57.
12. Klinger MH. Platelets and inflammation. *Anat Embryol* 1997; 196:1-11.
13. Robert BM, Matthew LN. Ορμόνες των νησιδίων του παγκρέατος. Αρχές Φυσιολογίας, Τόμος II. 3η Έκδοση. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. 2004; 223-236
14. Aronoff SL, Berkowitz K, Shreiner B, Want L. Glucose Metabolism and Regulation: Beyond Insulin and Glucagon, *Diabetes Spectrum* 2004; Vol. 17. Number 3.
15. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;106(2):165-169.
16. Zaid, H., Antonescu CN., Randhawa VK, & Klip, A. Insulin action on glucose transporters through molecular switches, tracks and tethers. *Biochemical Journal*. 2008; 413(2), 201-215.
17. Moore SF, Roger W, Hunter RW, and Hers I. mTORC2 Protein-mediated Protein Kinase B (Akt) Serine 473 Phosphorylation Is Not Required for Akt1 Activity in Human Platelets. *J Biol Chem*. 2011; 15; 286(28): 24553–24560.
18. Bhattacharya S, Dey D. and Roy S.S. Molecular mechanism of insulin resistance *Journal of Biosciences* 2007; Volume 32, Issue 2, pp 405–413.
19. Chiang SH, Baumann CA, Kanzaki M, Thurmond DC, Watson RT, Neudauer CL, Macara IG, Pessin JE, Saltiel AR. Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature*. 2001; Apr 19;410(6831):944-8.
20. Menon S, Dibble CC, Talbott G1, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD. Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome. *Cell*. 2014; 13;156(4):771-85.
21. Kaddai V, Le Marchand-Brustel Y. Cormont Rab proteins in endocytosis and Glut4 trafficking . *M Acta Physiol (Oxf)*. 2008; 192(1):75-88.
22. Tripathi BK, Srivastava A K. Diabetes mellitus: Complications and therapeutics. *Med Sci Monit* 2006; 12(7): RA130-147.

23. Reaven G. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals *Endocrinol Metab Clin N Am* 33 2004; 283-303.
24. DeFronzo R. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus *Med Clin N Am* 88 2004; 787-835.
25. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Current opinion in lipidology* 2003;14:281-287.
26. Matthaie S et al. Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance *Endocrine Reviews* 2000; 21(6): 585–618.
27. Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin Receptor Signaling in Normal and Insulin-Resistant States. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2014;6(1):a009191.
28. Draznin B. Molecular Mechanisms of Insulin Resistance: Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Increased Expression of p85 α . *Diabetes* Aug 2006; 55 (8) 2392-2397.
29. Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase mediated signaling in human muscle. *J Clin Invest* 2000; 105:311-320.
30. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328:1676-85.
31. Stamler J, Vaccaro O, Neaton JD, Wentworth D. Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial. *Diabetes Care* 1993;16:434-44.
32. Kim JH, Bae HY, Kim SY. Clinical Marker of Platelet Hyperreactivity in Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J* 2013;37:423-428.
33. Randriamboavonjy V, Fleming I. Platelet function and signaling in diabetes mellitus. *Curr Vasc Pharmacol* 2012;10:532-8.

34. Riccardi G, Rivellese AA, Giacco R. Role of glycemic index and glycemic load in the healthy state, in prediabetes, and in diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2008 1;87(1):269S – 274S.
35. A. Mikellidi, T. Nomikos Postprandial activation of platelets as a possible mechanism for the development of atherosclerosis. *Hell J Atheroscler* 2016; 7:13-26.
36. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295:1681-1687.
37. Akkerman, JWN. Carbohydrate metabolism. In Holmsen, H., editor. *Platelet responses and metabolism*, CRC Press, Boca Raton, FL. 1987.
38. Sorbara LR, Davies-Hill TM, Koehler-Stec EM, Vannucci SJ, Horne MK, Simpson IA. Thrombin-induced translocation of GLUT3 glucose transporters in human platelets. *Biochem J* 1997; 328,511±516.
39. Kroner C1, Eybrechts K, Akkerman JW. Dual regulation of platelet protein kinase B. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27790-8.
40. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001 Dec 13; 414(6865):799-806.
41. Ferreira Andrade IE, Mocking AIM., Urbanus R T., Varlack S, Wnuk M and Akkerman JW. Glucose uptake via GLUT3 by human platelets is regulated by Protein Kinase B. *J Biol Chem.* 2005 Sep 23;280(38):32625-33.
42. Ferreira IA, Eybrechts KL, Mocking AI, Kroner C, Akkerman JW. IRS-1 mediates inhibition of Ca²⁺ mobilization by insulin via the inhibitory G-protein Gi. *J Biol Chem.* 2004 Jan 30;279(5):3254-64.
43. Ferreira IA, Mocking AIM., Feijge MAH, Gorter G, van Haefen TW, Heemsker JWM, Akkerman JWN. Platelet Inhibition by Insulin Is Absent in Type 2 Diabetes Mellitus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:417-422;
44. Noé L, Peeters K, Izzi B, Van Geet C, Freson K. Regulators of platelet cAMP levels: clinical and therapeutic implications. *Curr Med Chem.* 2010; 17(26):2897-905.

45. Trovati M, Anfossi G. Insulin, insulin resistance and platelet function: similarities with insulin effects on cultured vascular smooth muscle cells. *Diabetologia* 1998; 41:609-622.
46. Offermanns S. Activation of Platelet Function Through G Protein–Coupled Receptors. *Circulation Research*. 2006; 99:1293-1304.
47. Hunter RW, MacKintosh C, Hers I. Protein Kinase C-mediated Phosphorylation and Activation of PDE3A Regulate cAMP Levels in Human Platelets. *The Journal of Biological Chemistry*. 2009; 284(18):12339-12348.
48. Trovati M, Anfossi G. Influence of insulin and of insulin resistance on platelet and vascular smooth muscle cell function. *Journal of Diabetes and its Complications* 2002; 16:35-40.
49. Suslova TE, Sitorchevskii AV, Ogurkova ON, et al. Platelet hemostasis in patients with metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus: cGMP- and NO-dependent mechanisms in the insulin-mediated platelet aggregation. *Frontiers in Physiology*. 2014; 5:501.
50. M Tamminen, R Lassila, J Westerbacka, S Vehkavaara and H Yki-Järvinen. Obesity is associated with impaired platelet-inhibitory effect of acetylsalicylic acid in nondiabetic subjects. *International Journal of Obesity*. 2003; 27, 907–911.
51. Yan SF, Ramasamy R, Naka Y, Schmidt AM. Glycation, inflammation, and RAGE: A scaffold for the macrovascular complications of diabetes and beyond. *Circ Res* 2003; 93:1159-1169.
52. Lorant DE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion. *Semin Cell Biol* 1995; 6:295-303.
53. Li Z, Delaney MK, O'Brien KA, Du X. Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2010; 30(12):2341-2349.
54. Menezes-Garcia Z, Oliveira MC, Lima RL, Soriani FM, Cisalpino D, Botion LM, Teixeira MM, Souza DG, Ferreira AV. Lack of platelet-activating factor receptor

protects mice against diet-induced adipose inflammation and insulin-resistance despite fat pad expansion. *Obesity* (Silver Spring). 2014 Mar; 22(3):663-72.

55. Matsumoto K, Sera Y, Nakamura H, Ueki Y, Miyake S. Serum concentrations of soluble adhesion molecules are related to degree of hyperglycemia and insulin resistance in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*. 2002 Feb; 55(2):131-8.

56. Koedam, J.A., et al., P-selectin, a granule membrane protein of platelets and endothelial cells, follows the regulated secretory pathway in AtT-20 cells. *J Cell Biol*, 1992. 116(3): p. 617-25.

57. Marshall, B.T., et al., Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature*, 2003;. 423(6936): p. 190-3.

58. Ferroni, P., et al., Soluble P-selectin as a marker of in vivo platelet activation. *Clin Chim Acta*, 2009; 399(1-2): p. 88-91.

59. Semenov, A.V., et al., Production of soluble P-selectin by platelets and endothelial cells. *Biochemistry (Mosc)*, 1999. 64(11): p. 1326-35.

60. Sabor M., Moinuddin. and Ilyas S. Platelets structural, functional and metabolic alterations in diabetes mellitus. *Pak. J. Physiol*. 20128, 40-43

61. Fereiro J.L., Gómez-Hospital J.A. and Angiolillo D.J. Platelet abnormalities in diabetes mellitus. *Diab. Vasc. Dis. Res*. 2010 7, 251-9.

62. Chappey O., Dosquet C., Wautier M.P. and Wautier J.L. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *Eur. J. Clin. Invest*. 1997; 27, 97-108.

63. Wang Y., Beck W., Deppisch R., Marshall N.A., Hoenich N.A. and Thompson M.G. Advanced glycation end products elicit externalization of phosphatidylserine in a subpopulation of platelets via 5-HT_{2A/2C} receptors. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 2007; 293, C328-C336.

64. Watala C., Boncler M. and Gresner P. Blood platelet abnormalities and pharmacological modulation of platelet reactivity in patients with diabetes mellitus. *Pharmacol. Rep*. 2005; 57, 42-58

65. Santilli F, Simeone P, Liani R and Davi G. Platelets and diabetes mellitus. *Prostagl. Lipid. Med.* 2015; 120, 28-39.
66. Akinsegun A, Olusola DA, Sarah JO, Olajumoke O, Adewumi A, Majeed O, Anthonia O, Ebele U, Olaitan O, Olanrewaju A. et al. Mean platelet volume and platelet counts in type 2 Diabetes: Mellitus on treatment and non-diabetic controls in Lagos, Nigeria. *The Pan. Afr. Med. J.* 2014; 18, 42.
67. Almer L and Nilsson IM. On fibrynolysis in diabetes mellitus. *Acta. Med. Scand.* 1975; 198, 101-106.
68. Juhan-Vague I, Roul C, Alessi MC, Ardisson JP, Heim M. and Vague P. Increased plasminogen activator inhibitor activity in non-insulin-dependent diabetic patients: relationship with plasma insulin. *Thromb. Haemost.* 1989; 61, 370-373.
69. Vinik PI, Erbas T, Park TS, Nolan R. and Pittenger GL. Platelet dysfunction in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2001; 24, 1476-1485.
70. Santilli F, Simeone P, Liani R. and Davi G. Platelets and diabetes mellitus. *Prostagl. Lipid. Med.* 2015;120, 28-39.
71. Juhan I, Buonocore M, Jouve R, Vague PH, Moulin JP and Vialettes B. Abnormalities of erythrocyte deformability and platelet aggregation in insulin dependent diabetics corrected by insulin in vivo and in vitro. *The Lancet.* 1982; 1, 535-536.
72. Schneider DJ. Factors contributing to increased platelet reactivity in people with diabetes. *Diabetes Care.* 2009 Apr;32(4):525-7.
73. Gerrits AJ, Koekman CA, van Haeften TW. and Akkerman JWW. Platelet tissue factor synthesis in type 2 diabetic patients is resistant to inhibition by insulin. *Diabetes.* 2010; 59, 1487-1495.
74. Shlomain G, Haran-Appel T, Sella T, Grossman Y, Hauschner H, Rosenberg N. and Grossman E. High-risk type-2 diabetes mellitus patients, without prior ischemic events have normal blood platelet functionality profiles: a cross-sectional study. *Cardiovasc. Diabetol.* 2015; DOI 10.1186/s12933-015-0244-x.

75. Szablewski L. and Sulima A. The structural and functional changes of blood cells and molecular components in diabetes mellitus. *Biol Chem.* 2016 Dec 9; pii: /j/bchm.ahead-of-print/hsz-2016-0196/hsz-2016-0196.xml. doi: 10.1515/hsz-2016-0196.
76. Malachowska B, Tomasik B, Szadkowska A, Baranowska-Jazwiecka A, Wegner O, Młynarski W, and Fendler W. Altered platelets' morphological parameters in children with type 1 diabetes – a case control study. *BMC Endocrine. Disord.* 2015; 15, 17 DOI 10.1186/s12902-015-0011-8.
77. Pula G, Crosby D, Baker J, and Kim JH, Alastair W. Functional Interaction of Protein Kinase C a with the Tyrosine Kinases Syk and Src in Human Platelets. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; vol. 280, No. 8, Issue of February 25, pp. 7194–7205.
78. Antonopoulou S, Nomikos, T, Fragopoulou, E. and Karantonis, HC. 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.
79. Schuerholz T, Lösche W, Keil O, Friedrich L, Simon T, Marx G. Acute short-term hyperglycemia impairs platelet receptor expression even in healthy adults in vitro. *Med Sci Monit* 2008; 14(12): BR294-298.
80. Siess W. Molecular mechanisms of platelet activation. *Physiol. Rev* 1989; 70:159-178.
81. Bye AP, Unsworth AJ, Gibbins JM. Platelet signaling: a complex interplay between inhibitory and activatory networks. *J Thromb Haemost* 2016; 14: 918–30.
82. Ishida M, Ishida T, Ono N, Matsuura H, Watanabe M, Kajiyama G, Kambe M, Oshima T. Effects of insulin on calcium metabolism and platelet aggregation. *Hypertension.* 1996 Aug; 28(2):209-12.
83. Dereli D, Ozgen G, Buyukkececi F, Guney E, Yilmaz C. Platelet Dysfunction in Lean Women with Polycystic Ovary Syndrome and Association with Insulin Sensitivity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2003 May; 88(5):2263–2268).

84. McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PW, Jacques PF. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. *Diabetes Care*. 2004 Feb;27(2):538-46.
85. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J-P, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295:1681-1687.
86. Ceriello A. Postprandial Hyperglycemia and Cardiovascular Disease: Is the HEART2D study the answer? *Diabetes Care*. 2009; 32(3):521-522. doi:10.2337/dc08-2209.
87. O'Keefe JH, Bell DSH. Postprandial Hyperglycemia/Hyperlipidemia (Postprandial Dysmetabolism) Is a Cardiovascular Risk Factor. *The American Journal of Cardiology* 2007; 100(5 Suppl 1):899-904.
88. Vaidyula VR, Boden G, Rao AK. Platelet and monocyte activation by hyperglycemia and hyperinsulinemia in healthy subjects. *Platelets* 2006;17(8):577-585.
89. Yamagishi SI, Edelstein D, Du XL, Brownlee M. Hyperglycemia potentiates collagen-induced platelet activation through mitochondrial superoxide overproduction. *Diabetes*. 2001 Jun; 50(6):1491-4.
90. Sudic D, Razmara M, Forslund M, Ji Q, Hjemdahl P, and Li N. High glucose levels enhance platelet activation: involvement of multiple mechanisms. *British Journal of Haematology* 2006; 133: 315-322.
91. Barcellos CR, Rocha MP, Hayashida SA, Nery M, Marcondes JA. Prevalence of abnormalities of glucose metabolism in patients with polycystic ovary syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007 Jun;51(4):601-5.
92. Trovati M, Anfossi G, Cavalot F, Massucco P, Mularoni E, Emanuelli G. Insulin directly reduces platelet sensitivity to aggregating agents. *Studies in vitro and in vivo*. *Diabetes*. 1988 Jun;37(6):780-6.
93. Fleming I, Schulz C, Fichtlscherer B, Kemp BE, Fisslthaler B, Busse R. AMP-activated Protein Kinase (AMPK) Regulates the Insulin-Induced Activation of the Nitric Oxide Synthase in Human Platelets. *Thromb Haemost* 2003; 90 (5), 863-871. 11.

94. Kakouros N, Rade JJ, Kourliouros A, and Resar JR. Platelet Function in Patients with Diabetes Mellitus: From a Theoretical to a Practical Perspective. *International Journal of Endocrinology* 2011; Volume 2011. Article ID 742719, 14 pages.
95. Rao AK, Freishtat RJ, Jalagadugula G, et al. Alterations in Insulin-Signaling and Coagulation Pathways in Platelets during Hyperglycemia-Hyperinsulinemia in Healthy Non-Diabetic Subject. *Thrombosis research*. 2014;134(3):704-710.
96. J. Westerbacka, H. Yki-Järvinen, A. Turpeinen et al., “Inhibition of platelet-collagen interaction: an in vivo action of insulin abolished by insulin resistance in obesity,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2002; vol. 22, no. 1, pp. 167–172,
97. Dav`i G, Guagnano MT, Ciabattini G, et al. “Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress,” *Journal of the American Medical Association* 2002; vol. 288, no. 16, pp. 2008–2014.
98. Murakami T, Horigome H, Tanaka K, et al. Impact of weight reduction on production of platelet-derived microparticles and fibrinolytic parameters in obesity. *Thrombosis Research* 2007; vol. 119, no. 1, pp. 45–53.
99. Ueno M, Fujita K, Yamamoto H, Ikeda T, Suga T, Yamaji K, et al. Impact of impaired glucose tolerance on clopidogrel response in patients with coronary artery disease. *J Thromb Thrombolysis* 2015; 40:174-181.
100. Spectre G, Stålesena R, Östensson CG, Hjemdahl P. Induced platelet activation in diabetes mellitus type 1 or type 2 is related to postprandial insulin rather than glucose levels *Thrombosis Research* 2016; 141 93–97.
101. Anfossi G, Mularoni EM, Burzacca S et al. Platelet resistance to nitrates in obesity and obese NIDDM, and normal platelet sensitivity to both insulin and nitrates in lean NIDDM, *Diabetes Care*, 1998; vol. 21, no. 1, pp. 121–126.
102. Angiolillo DJ, Bernardo E, Ramírez C, et al. Insulin therapy is associated with platelet dysfunction in patients with type 2 diabetes mellitus on dual oral antiplatelet treatment. *Journal of the American College of Cardiology* 2006; vol. 48, no. 2, pp. 298–304.

103. Betteridge DJ, El Tahir KEH, Reckless JPD, and Williams K. Platelets from diabetic subjects show diminished sensitivity to prostacyclin. *European Journal of Clinical Investigation*. 1982; vol. 12, no. 5, pp. 395–398.
104. De Pergola G, Pannacciulli N, Coviello M, Scarangella A, Di Roma P, Caringella M, Venneri MT, Quaranta M, Giorgino R. sP-selectin plasma levels in obesity: association with insulin resistance and related metabolic and prothrombotic factors. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008; Mar;18(3):227-32.
105. Gokulakrishnana K, Deepaa R, Mohana V, Myron D. GrossSoluble P-selectin and CD40L levels in subjects with prediabetes, diabetes mellitus, and metabolic syndrome—the Chennai Urban Rural Epidemiology Study. *Metabolism* 2006; Volume 55, Issue 2, Pages 237–242.
106. Russo I, Traversa M, Bonomo K, De Salve A, Mattiello L, Del Mese P, Doronzo G, Cavalot F, Trovati M, Anfossi G. In Central Obesity, Weight Loss Restores Platelet Sensitivity to Nitric Oxide and Prostacyclin. *Obesity* 2010; 18, 788–797.
107. Nomikos T, Detopoulou P, Fragopoulou E, Pliakis E, Antonopoulou S. Boiled wild artichoke reduces postprandial glycemic and insulinemic responses in normal subjects but has no effect on metabolic syndrome patients. *Nutrition Research* 2007; 27:741–749
108. Chau LY, Hu CY. Platelet-activating factor receptor-mediated calcium influx in NG 108-15 cells. *Chin J Physiol*. 1993; 36(1):57-63.
109. Gerald P, King GL. Activation of Protein Kinase C Isoforms & Its Impact on Diabetic Complications. *Circulation research*. 2010; 106(8):1319-1331.
110. Franklin RA, Tordai A, Mazer B, Terada N, Lucas J, Gelfand EW. Platelet activating factor activates MAPK and increases in intracellular calcium via independent pathways in B lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Apr 26; 209(3):1111-8.
111. Hirosumi J, Tuncman G, Chang L, Görgün CZ, Teoman Uysal K., Maeda K, Karin M& Hotamisligil G S. A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 2002; 420, 333-336 (21).

112. Guo S. Insulin Signaling, Resistance, and the Metabolic Syndrome: Insights from Mouse Models to Disease Mechanisms. *The Journal of endocrinology*. 2014; 220(2):T1-T23.
113. Yan H, Gao Y, Zhang Y. Inhibition of JNK suppresses autophagy and attenuates insulin resistance in a rat model of nonalcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep*. 2017 Jan; 15(1):180-186.
114. Wang F, Naik UP, Ehrlich YH, Freyberg Z, Osada S, Ohno S, Kuroki T, Suzuki K, Kornecki E. A new protein kinase C, nPKC eta', and nPKC theta are expressed in human platelets: involvement of nPKC eta' and nPKC theta in signal transduction stimulated by PAF. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 Feb 26; 191(1):240-6.
115. Atkinson BT, Stafford MJ, Pears CJ and Watson SP. Signalling events underlying platelet aggregation induced by the glycoprotein VI agonist convulxin. *Eur. J. Biochem*. 2001; 268, 5242–5248.
116. Zhang EY, Kong KF, and Altman A. The yin and yang of protein kinase C- θ (PKC θ): a novel drug target for selective immunosuppression. *Adv. Pharmacol*. 2013; 66, 267–312.
117. Cohen S, Braiman A, Shubinsky G, Isakov N. Protein kinase C-theta in platelet activation *FEBS Letters*. 2011; 585, 3208–3215.
118. Hall KJ, Harper MT, Gilio K, Cosemans JM, Heemskerk JWM, Poole AW. Genetic Analysis of the Role of Protein Kinase Ch in Platelet Function and Thrombus Formation *PLoS ONE*. 2008; Volume 3, Issue 9, e3277.
119. Wang C, Liu M, Riojas RA, Xin X, Gao Z, Zeng R, Wu J, Dong L Q, and Liu F. Protein Kinase C Θ (PKC Θ)-dependent Phosphorylation of PDK1 at Ser504 and Ser532 Contributes to Palmitate-induced Insulin Resistance. *JBC*. 2009; Vol. 284, No. 4, pp. 2038 –2044.

