



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

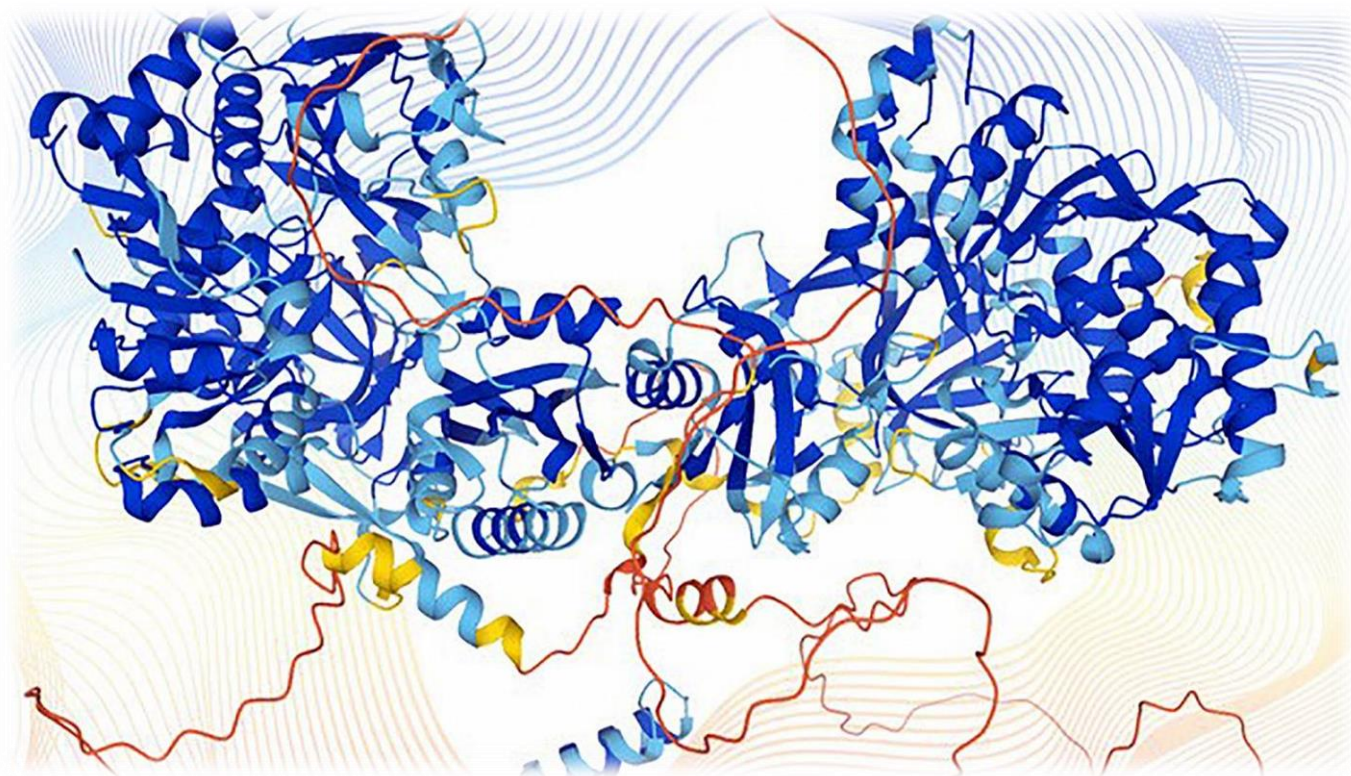
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**Επίδραση της υπεργλυκαιμίας, μετά από φόρτιση γλυκόζης, σε δείκτες οξειδωτικού στρες
στον ορό νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών**

Πτυχιακή εργασία

Θεοδωρακοπούλου Αικατερίνη



Αθήνα, 2022

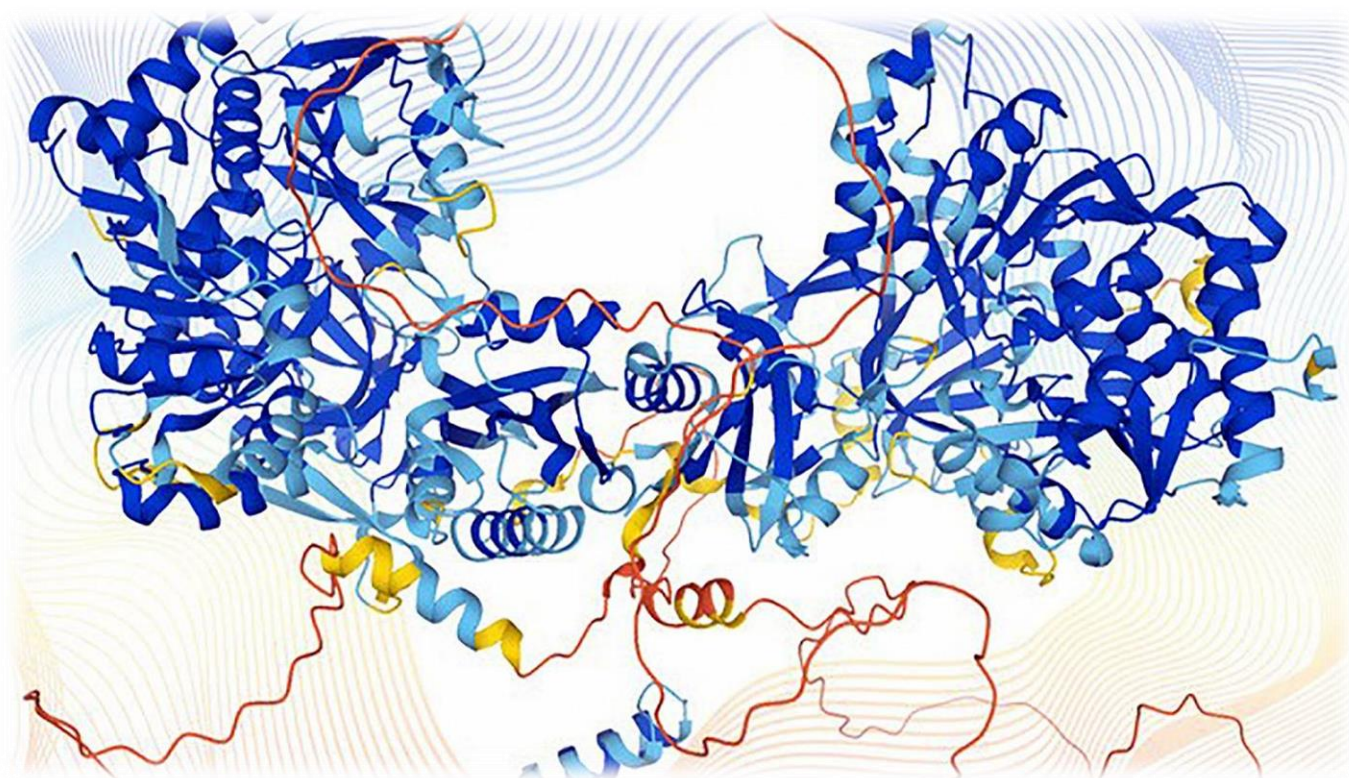


HAROKOPIO UNIVERSITY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE AND EDUCATION
NUTRITION AND DIETETICS

Effect of hyperglycemia, after glucose loading, on oxidative stress markers in the serum of normal and obese volunteers

Bachelor thesis

Theodorakopoulou Aikaterini



Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Νομικός Τζώρτζης (Επιβλέπων)

**Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής , Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Αντωνοπούλου Σμαραγδή

**Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Σχολή
Επιστημών Υγείας και Αγωγής , Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Φραγκοπούλου Ελισάβετ

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Τμήμα
Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής ,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Η Θεοδωρακοπούλου Αικατερίνη

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.
- 3) Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

Στην οικογένειά μου

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου κ. Νομικό Τζώρτζη που με εμπιστεύθηκε και μου ανέθεσε την παρούσα πτυχιική μελέτη που τόσο επιθυμούσα. Με έκανε να αναπτύξω ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το πεδίο της επιστημονικής έρευνας, ενώ παράλληλα με βοήθησε να κατανοήσω σε βάθος γνώσεις που απέκτησα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου. Το πιο σημαντικό, ωστόσο, για εμένα είναι το γεγονός ότι ήταν πάντα διαθέσιμος και πρόθυμος να με βοηθήσει σε ό,τι χρειαζόμουν ώστε να ολοκληρώσω την εργασία μου και κατ' επέκταση τις σπουδές μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την Καθηγήτρια κα. Σμαραγδή Αντωνοπούλου και την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια κα. Ελισάβετ Φραγκοπούλου, για την πολύτιμη παρουσία τους στην αξιολόγηση της εργασίας μου.

Ακόμα, νιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Βιολογίας-Βιοχημείας και Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών του Τμήματος Διαιτολογίας-Διατροφής του Χαροκοπέιου Πανεπιστημίου για τη δυνατότητα να πραγματοποιήσω το ερευνητικό μέρος της εργασίας μου στον χώρο αυτό.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τους γονείς και την αδελφή μου που είναι πάντα δίπλα μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	10
ABSTRACT.....	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	13
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	16
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	18
A) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: Οξειδωτικό Στρες.....	19
1.1 Ελεύθερες Ρίζες.....	19
1.1.1 Ορισμός.....	19
1.1.2 Ιστορική αναδρομή.....	19
1.1.3 Επιπτώσεις σε κυτταρικό επίπεδο.....	20
1.2 Βασικότερες κατηγορίες ελευθέρων ριζών.....	21
1.2.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου.....	23
1.2.2 Δραστικές μορφές αζώτου.....	24
1.3 Οξειδωτικό στρες και υγεία.....	25
1.3.1 Προοξειδωτικοί παράγοντες.....	25
1.3.2 Αντιοξειδωτικά συστήματα.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: Μεταγευματική Κατάσταση.....	28
2.1 Ορισμός.....	28
2.2 Φυσιολογικός Μεταβολισμός.....	29
2.2.1 Μεταγευματική γλυκόζη.....	29
2.2.1.1 Ορμονική ρύθμιση μεταγευματικής γλυκόζης	30
2.2.2 Μεταγευματικά λιπίδια αίματος.....	32
2.3 Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός.....	33
2.3.1 Ινσουλινοαντίσταση.....	34
2.3.2 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία.....	36
2.3.3 Μεταγευματική δυσλιπιδιαμία.....	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: Μεταγευματική Υπεργλυκαιμία και Οξειδωτικό Στρες.....	38
3.1 Πρωτεϊνικά καρβονύλια.....	38
3.1.1 Η οξείδωση των πρωτεϊνών.....	38
3.1.2 Καρβονυλίωση πρωτεϊνών και στρες.....	40
3.2 Μηχανισμοί υπεργλυκαιμίας που προκαλούν οξειδωτικό στρες.....	41
B) ΣΚΟΠΟΣ.....	44
Γ) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	45
1. Επιλογή εθελοντών.....	45
2. Σχεδιασμός της μελέτης.....	46
3. Ανθρωπομετρία.....	47

4. Απομόνωση και επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων	48
4.1 Συνολική περιγραφή.....	48
4.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε δείγματα ορού.....	49
4.2.1 Απομόνωση πλάσματος και ορού.....	49
4.2.2 Αρχή της μεθόδου.....	49
4.2.3 Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια.....	49
4.2.4 Αναλυτική πορεία.....	49
4.2.5 Υπολογισμοί.....	50
4.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm.....	51
4.3.1 Αρχή της μεθόδου.....	51
4.3.2 Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια.....	51
4.3.3 Αναλυτική πορεία.....	51
4.4 Στατιστική ανάλυση.....	53
Δ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	54
1. Εισαγωγή.....	54
2. <u>ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Ι</u>	55
2.1 Οι νορμοβαρείς εθελοντές της μελέτης.....	55
2.2 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης και τριγλυκεριδίων.....	56
2.3 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων	61
2.4 Συσχέτιση των επιπέδων σε πρωτεϊνικά καρβονύλια με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την παρέμβαση.....	63
2.5 Συσχέτιση των επιπέδων σε πρωτεϊνικά καρβονύλια με ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά των εθελοντών μετά τις φορτίσεις.....	64
3. <u>ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΙΙ</u>	65
3.1 Σύγκριση των δύο ομάδων εθελοντών.....	65
3.2 Επίδραση της φόρτισης γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές.....	66
3.3 Επίδραση της φόρτισης γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές.....	70
Ε) ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	73
1. Εισαγωγή.....	73
2. Εθελοντές και κριτήρια επιλογής.....	74
3. Δεδομένα άλλων μελετών	75
4. Πρωτόκολλο Ι.....	77
5. Πρωτόκολλο ΙΙ.....	78
Βιβλιογραφία.....	80

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φαινόμενο της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας έχει πλέον συσχετιστεί ισχυρά τόσο με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και τη φλεγμονή, όσο και με την αύξηση του οξειδωτικού στρες. Πρόκειται για ένα σύνολο παθολογικών καταστάσεων που είναι ικανές να συντελέσουν άμεσα στην εμφάνιση μικροαγγειακών και μακροαγγειακών επιπλοκών σε άτομα με ή χωρίς εγκατεστημένο Σακχαρώδη Διαβήτη και κατ' επέκταση να αποτελέσουν προδιαθεσικούς παράγοντες για την εμφάνιση αθηρωμάτωσης.

Σκοπός: Επιλέγοντας τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ως έναν ευαίσθητο δείκτη οξειδωτικού στρες, εξετάσθηκε αρχικά το κατά πόσο διαφορετικά επίπεδα υπεργλυκαιμίας μπορούν να οδηγήσουν σε αυξημένο οξειδωτικό στρες στον ίδιο οργανισμό, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε η ύπαρξη διαφοροποίησης της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας και του οξειδωτικού στρες σε νέους, φαινομενικά υγιείς παχύσαρκους εθελοντές.

Μεθοδολογία: Πραγματοποιήθηκαν δύο ερευνητικά πρωτόκολλα κατά τα οποία οι εθελοντές υποβλήθηκαν σε δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη (OGTT). Στο πρώτο πρωτόκολλο χορηγήθηκαν ποσότητες γλυκόζης 75, 100 και 150 γραμ. σε νορμοβαρείς εθελοντές, ενώ στο δεύτερο πρωτόκολλο χορηγήθηκαν μόνο 75 γραμ. γλυκόζης σε νορμοβαρείς και φαινομενικά υγιείς παχύσαρκους εθελοντές. Λήφθηκε ορός πλάσματος, πριν και για 7 χρονικές στιγμές μετά τις φορτίσεις, έως και τις 4 ώρες, όπου προσδιορίστηκαν τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων με φωτομετρική μέθοδο που βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων των πρωτεϊνών με τη χρωστική δινιτροφαινυλδραζίνη και τον σχηματισμό έγχρωμου προϊόντος.

Αποτελέσματα: Το πρωτόκολλο της αυξανόμενης χορήγησης γλυκόζης κατάφερε να οδηγήσει σε δοσοεξαρτώμενες αυξήσεις της υπεργλυκαιμίας και υπερινσουλιναϊμίας γενικότερα, ενώ φάνηκε ότι μόνο η φόρτιση των 150 γραμ. γλυκόζης κατάφερε να οδηγήσει σε αυξήσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, οι οποίες εμφανίστηκαν στις 4 ώρες από τη φόρτιση γλυκόζης. Στο πρωτόκολλο της σύγκρισης υπήρχε μία τάση αύξησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους παχύσαρκους εθελοντές στις 4 ώρες, όχι όμως και στους νορμοβαρείς εθελοντές.

Συζήτηση: Η ποσότητα της προσλαμβανόμενης γλυκόζης, και κατ' επέκταση η υπερινσουλιναϊμία και η υπεργλυκαιμία που προκαλεί η πρόσληψη αυτή, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μονάχα σε πολύ μεγάλες προσλήψεις γλυκόζης. Τα άτομα με παχυσαρκία φαίνεται να έχουν μία διαταραγμένη παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων, η οποία εμφανίζεται κυρίως στις 4 ώρες μετά τη φόρτιση γλυκόζης.

Λέξεις κλειδιά: πρωτεϊνικά καρβονύλια, οξειδωτικό στρες, μεταγευματική υπεργλυκαιμία, ινσουλινοαντίσταση

ABSTRACT

Postprandial hyperglycemia has now been strongly associated with both endothelial dysfunction and inflammation, as well as increased oxidative stress. It is a set of pathological conditions that are capable of directly contributing to the appearance of microvascular and macrovascular complications in people with or without established Diabetes Mellitus, thus being predisposing factors for the appearance of atherosclerosis.

Purpose: By choosing protein carbonyls as a sensitive indicator of oxidative stress, it was initially investigated whether different levels of hyperglycemia can lead to increased oxidative stress in the same person, while at the same time investigating the existence of differentiation of postprandial hyperglycemia and oxidative stress in young, apparently healthy obese volunteers.

Methodology: Two research protocols were performed in which volunteers underwent an oral glucose tolerance test (OGTT). In the first protocol, amounts of glucose of 75, 100 and 150 g were administered in normal weight volunteers, while in the second protocol only 75 g of glucose were administered in both normal weight and healthy obese volunteers. Plasma serum was obtained before and for 7 time points after the loadings, up to 4 hours, where the levels of protein carbonyls were determined by a photometric method based on the reaction of the carbonyl groups of the proteins with the dye dinitrophenylhydrazine and the formation of a colored product.

Results: The protocol of increasing glucose administration was able to lead to dose-dependent increases in hyperglycemia and hyperinsulinemia in general, while it appeared that only the 150 g loading of glucose was able to lead to increases in protein carbonyls, which appeared at 4 hours after glucose loading. In the comparison protocol there was a trend towards an increase in protein carbonyls in the obese volunteers at 4 hours, but not in the normal weight volunteers.

Discussion: The amount of glucose ingested, and by extension the hyperinsulinemia and hyperglycemia caused by this intake, can lead to an increase in protein carbonyls only in very large glucose intakes. Obese subjects appear to have an impaired production of protein carbonyls, which occurs mainly at 4 hours after the glucose load.

Key words: protein carbonyls, oxidative stress, postprandial hyperglycemia, insulin resistance

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1: Γενική ταξινόμηση προοξειδωτικών παραγόντων	26
Εικ.2: Ομοιόσταση μεταγευματικής γλυκόζης πλάσματος.....	30
Εικ.3: Σημαντικές πηγές λιπαρών οξέων ήπατος	33
Εικ.4: Συσχέτιση μεταξύ ινσουλινοαντίστασης και ανάπτυξης καρδιομεταβολικής νόσου: Ένα απλοποιημένο μοντέλο ινσουλινοαντίστασης.....	35
Εικ.5: Καρβονυλικός κύκλος.....	41

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου.....	22
Πίν.2: Βιολογικά δείγματα.....	48
Πίν.3: Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της πρωτεΐνης.....	52
Πίν.4: Βασικά χαρακτηριστικά νορμοβαρών εθελοντών.....	55
Πίν.5: Σύγκριση νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών.....	65

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχ.1: Διαδοχικές αιμοληψίες μετά από τη φόρτιση γλυκόζης.....	47
Σχ.2: Μεταβολή των απόλυτων τιμών γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις	56
Σχ.3: Μεταβολή των απόλυτων τιμών ινσουλίνης συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις	57
Σχ.4: Μεταβολή των απόλυτων τιμών τριγλυκεριδίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις.....	57
Σχ.5: Ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου.....	58
Σχ.6: Ποσοστιαία μεταβολή της ινσουλίνης συναρτήσει του χρόνου.....	59
Σχ.7: Ποσοστιαία μεταβολή των τριγλυκεριδίων συναρτήσει του χρόνου.....	59
Σχ.8: Συγκριτική παράθεση των iAUC της γλυκόζης.....	60
Σχ.9: Συγκριτική παράθεση των iAUC της ινσουλίνης.....	60
Σχ.10: Συγκριτική παράθεση των iAUC των τριγλυκεριδίων.....	61
Σχ.11: Μεταβολή των απόλυτων τιμών πρωτεϊνικών καρβονυλίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις	62
Σχ.12: Ποσοστιαία μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων συναρτήσει του χρόνου.....	62
Σχ.13: Συγκριτική παράθεση των iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	63
Σχ.14: Συσχέτιση iAUC πρωτεϊνικών καρβονυλίων και iAUC τριγλυκεριδίων.....	64
Σχ.15: Μεταβολή των απόλυτων τιμών γλυκόζης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης.....	66
Σχ.16: Ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης.....	67

Σχ.17: Μεταβολή των απόλυτων τιμών ινσουλίνης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης.....	67
Σχ.18: Ποσοστιαία μεταβολή της ινσουλίνης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης.....	68
Σχ.19: Συγκριτική παράθεση των iAUC της γλυκόζης μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών.....	69
Σχ.20: Συγκριτική παράθεση των iAUC της ινσουλίνης μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών.....	69
Σχ.21: Μεταβολή των απόλυτων τιμών πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης.....	70
Σχ.22: Ποσοστιαία μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης.....	71
Σχ.23: Συγκριτική παράθεση των iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών.....	71

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ/ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

	ΑΓΓΛΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΜΕΤΑΦΡΑΣΗ
AGEs	Advanced Glycation End Products	Τελικά Προϊόντα Γλυκοζυλίωσης
ALEs	Advanced Lipoxidation End Products	Τελικά Προϊόντα Λιποξειδωσης
ATP	Adenosine Triphosphate	Τριφωσφορική Αδενοσίνη
AUCs	Area Under the Curves	Εμβαδόν κάτω από την καμπύλη
CAT	Catalase	Καταλάση
CML	Carboxymethyllysine	Καρβοξυ-μεθυλολυσίνη
CRP	C-Reactive Protein	C-Αντιδρώσα Πρωτεΐνη
CoA	Coenzyme A	Συνένζυμο Α
cGMP	Cyclic Guanosine Monophosphate	Κυκλική Μονοφωσφορική Γουανοσίνη
DBP	Diastolic Blood Pressure	Διαστολική Αρτηριακή Πίεση
DNA	Deoxyribonucleic acid	Δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DNPH	2,4-Dinitrophenylhydrazine	2,4-δινιτροφαινυλδραζίνη
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
FADH₂	Dihydroflavine-adenine dinucleotide	Διυδροφλαβίνο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο
FeSO₄	Iron Sulfate	Θειικός Σίδηρος
GLP-1	Glucagon-like peptide-1	Γλυκαγονοειδές πεπτίδιο-1
GLUT4	Glucose transporter type 4	Μεταφορέας γλυκόζης τύπου 4
GMP	Guanosine Monophosphate	Μονοφωσφορική Γουανοσίνη
GPx	Glutathione Peroxidase	Υπεροξειδάση της Γλουταθειόνης
GTP	Guanosine Triphosphate	Τριφωσφορική Γουανοσίνη
GSH	Glutathione	Γλουταθειόνη
H₂O₂	Hydrogen Peroxide	Υπεροξείδιο του Υδρογόνου
HCT	Hematocrit	Αιματοκρίτης
HDL	High Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Υψηλής Πυκνότητας
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment – Insulin Resistance	Εκτίμηση Μοντέλου Ομοιόστασης – Αντίσταση στην Ινσουλίνη
IL-6	Interleukin-6	Ιντερλευκίνη-6
LDL	Low Density Lipoprotein	Λιποπρωτεΐνη Χαμηλής Πυκνότητας
MDA	Malondialdehyde	Μηλονουλο-διαλδεΰδη
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Oxidase	Οξειδάση του Φώσφο Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου
NF-κB	Nuclear Factor-κB	Πυρηνικός Παράγοντας-κΒ
NO	Nitric Oxide	Μονοξείδιο του αζώτου
O₂^{•-}	Superoxide anion	Ανιόν του Υπεροξειδίου
•OH	Hydroxyl Radical	Ρίζα Υδροξυλίου
ONOO⁻	Peroxynitrite	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test	Από του Στόματος Δοκιμασία Ανοχής Γλυκόζης

¹ O₂	Singlet oxygen	Μονήρες Οξυγόνο
PKC	Protein Kinase C	Πρωτεϊνική Κινάση C
PLT	Platelet counts	Αριθμός Αιμοπεταλίων
POS	Postprandial Oxidative Stress	Μεταγευματικό Οξειδωτικό Στρες
PUFAs	Polyunsaturated Fatty Acid	Πολυακόρεστα Λιπαρά Οξέα
RAGEs	Advanced Glycation End Products Receptors	Υποδοχείς των Προϊόντων Προχωρημένης Γλυκοζυλίωσης
RCS	Reactive Carbonyl Species	Ενεργές Μορφές Καρβονυλίου
ROS	Reactive Oxygen Species	Ενεργές Μορφές Οξυγόνου
RNS	Reactive Nitrogen Species	Ενεργές Μορφές Αζώτου
SBP	Systolic Blood Pressure	Συστολική Αρτηριακή Πίεση
SOD	Superoxide Dismutase	Υπεροξειδική Δισμουτάση
TG	Triglycerides	Τριγλυκερίδια
TRAP	Total Reactive Antioxidant Potential	Ολικό δραστικό αντιοξειδωτικό δυναμικό
TNF-α	Tumor Necrosis Factor α	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων α
Trx	Thioredoxin	Θειορεδοξίνη
VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule	Μόριο Προσκόλλησης Αγγειακών Κυττάρων
VLDL	Very Low-Density Lipoprotein	Πολύ Χαμηλής Πυκνότητας Λιποπρωτεΐνη
WBC	White Blood Cell count	Αριθμός Λευκοκυττάρων
XO	Xanthine Oxidase	Οξειδάση της Ξανθίνης
ΔΜΣ	Body Mass Index	Δείκτης Μάζας Σώματος
ΕΔ	Endoplasmic Reticulum	Ενδοπλασματικό Δίκτυο
ΣΔ	Diabetes Mellitus	Σακχαρώδης Διαβήτης
ΥΓΔ	High Glycemic Index	Υψηλός Γλυκαιμικός Δείκτης
ΧΓΔ	Low Glycemic Index	Χαμηλός Γλυκαιμικός Δείκτης
4-HHE	4-Hydroxy-2-hexenal	4-υδροξυ-2-εξενάλη
4-HNE	4-Hydroxy-2-nonenal	4-υδροξυ-2-εννεάλη

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το οξειδωτικό στρες έχει πλέον δικαίως κατηγορηθεί για την ανάπτυξη διαφόρων επιπλοκών στην ανθρώπινη υγεία, ενώ πιο συγκεκριμένα φαίνεται να παίζει καθοριστικό ρόλο στην εμφάνιση ινσουλινοαντίστασης και Σακχαρώδους Διαβήτη. Εξαιτίας της μεγάλης παραγωγής ελεύθερων ριζών στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων, ο οργανισμός οδηγείται σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, ενεργοποίηση των πηκτικών μηχανισμών και της φλεγμονής, τα οποία αποτελούν εναρκτήρια εναύσματα για πολλές παθολογικές καταστάσεις. Η παρατεταμένη έκθεση σε πολύ υψηλά επίπεδα γλυκόζης είναι εκείνη που, επάγοντας το οξειδωτικό στρες, καταλήγει τελικά σε αγγειακές επιπλοκές σε ασθενείς με ή και χωρίς Σακχαρώδη Διαβήτη. Σε αυξημένη, λοιπόν, υπεργλυκαιμία και υπερινσουλιναίμία και εξαιτίας της υπέρμετρης ποσότητας ενδοκυτταρικών αντιδραστικών μορφών οξυγόνου, οι οποίες είναι αποτέλεσμα του υπερβάλλοντος οξειδωτικού στρες, ενεργοποιούνται βασικές οδοί μέσω των οποίων είναι πιθανό να καταλήξουμε τελικά σε σοβαρές καρδιαγγειακές επιπλοκές.

Στην παρούσα εργασία εξετάζεται η σχέση μεταξύ αυξημένης υπεργλυκαιμίας και αυξημένου οξειδωτικού στρες σε υγιείς εθελοντές φυσιολογικού σωματικού βάρους, ένα αντικείμενο έρευνας το οποίο έχει απασχολήσει πληθώρα μελετών μέχρι τώρα. Η ιδιαιτερότητα του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου βρίσκεται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές διαδοχικές φορτίσεις γλυκόζης, προκειμένου η συσχέτιση να είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβής. Παράλληλα, επιλέχθηκε μία ομάδα εθελοντών με παχυσαρκία ώστε να γίνει σύγκριση μεταξύ των δύο ομάδων παρέμβασης. Και εδώ, χαρακτηριστικό της μελέτης είναι η επιλογή φαινομενικά υγιών παχύσαρκων ατόμων, που σκοπό είχε την ανάδειξη του μεταγευματικού δυσμεταβολισμού ως έναν σημαντικό προδιαθεσικό παράγοντα κινδύνου αθηρωμάτωσης, ακόμα και σε άτομα χωρίς εγκατεστημένη νόσο.

Α) ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.1 Ελεύθερες ρίζες

1.1.1 Ορισμός

Θέλοντας κανείς να αναλύσει τον όρο οξειδωτικό στρες, δεν γίνεται παρά να ξεκινήσει εξηγώντας τη σημασία των ελεύθερων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά και πώς μέσω αυτών οδηγούμαστε τελικά σε οξειδωτικό στρες.

Ελεύθερες ρίζες (free radicals) ονομάζονται άτομα ή μόρια τα οποία διαθέτουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στα εξωτερικά τους τροχιακά και μπορούν να σχηματιστούν μέσω οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων ή με ομολυτικές διασπάσεις ομοιοπολικών δεσμών, όπου κάθε ένα από τα δύο τμήματα του μορίου παραλαμβάνει κι από ένα ηλεκτρόνιο. Το γεγονός ότι οι ελεύθερες ρίζες έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια τις καθιστά μόρια κυρίως ασταθή ηλεκτρικά, αλλά με αρκετά μεγάλη δραστηριότητα λόγω της τάσης τους να συμπληρώσουν τα τροχιακά τους αποσπώντας ηλεκτρόνια από άλλα μόρια [1].

1.1.2 Ιστορική αναδρομή

Το 1832 οι Liebig και Wöhler μιλώντας για το πικραμύγδαλο εισήγαγαν για πρώτη φορά τον όρο ελεύθερη ρίζα στην επιστημονική κοινότητα. Συγκεκριμένα, απέδειξαν ότι κατά τον μετασχηματισμό μίας ουσίας του πικραμύγδαλου, της βενζοϊκής αλδεΐδης, και διάφορων άλλων παραγώγων με χλώριο και βρώμιο, η ρίζα με τον τύπο $C_{14}H_{10}O_2$ παραμένει αμετάβλητη.

Μέχρι και τα τέλη του 19^{ου} αιώνα, δεν είχε γίνει δυνατή η απομόνωση ελεύθερων ριζών και γι' αυτό δεν θεωρούνταν ακόμη ανεξάρτητα στοιχεία.

Το 1894 ο καθηγητής H.J.H Fenton περιέγραψε για πρώτη φορά μία αντίδραση στην οποία συμμετείχαν ελεύθερες ρίζες, χωρίς να είναι ακόμη γνωστή η ύπαρξή τους, ενώ ύστερα από κάποια χρόνια καθιερώθηκε και ο όρος “αντίδραση Fenton”. Κατά την πραγματοποίηση της συγκεκριμένης αντίδρασης, στην οποία μάλιστα ο σίδηρος φαίνεται ότι είχε καταλυτική δράση, αναμειγνύεται σε αλκαλικό περιβάλλον μία σταγόνα υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) με μία σταγόνα αραιωμένου δισθενούς θειϊκού σιδήρου ($FeSO_4$) και προκύπτει ένα μοναδικό βιολετί (ιώδες) χρώμα [1]. Ύστερα από 30 χρόνια, οι Haber και Wilstätter πρότειναν για πρώτη φορά τη συμμετοχή της ρίζας υδροξυλίου ($\bullet OH$).

Η οριστική ανακάλυψη, ωστόσο, της ύπαρξης των ελεύθερων ριζών δεν χρονολογείται στο μακρινό παρελθόν. Στα μέσα του 20^{ου} αιώνα υπήρξαν οι πρώτες ενδείξεις των ελεύθερων ριζών στα βιολογικά συστήματα, όμως για πολλά χρόνια ο ρόλος τους θεωρούνταν αποκλειστικά καταστροφικός και ανεπιθύμητος για τον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς είχε φανεί ότι οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούσαν να αντιδράσουν με όλα τα μακρομόρια του οργανισμού και να τα μεταβάλλουν οξειδώνοντάς τα και οδηγώντας τα σε απώλεια της λειτουργικής τους ικανότητας [2].

1.1.3 Επιπτώσεις σε κυτταρικό επίπεδο

Οι δραστικές ελεύθερες ρίζες αποτελούν σημαντικά μόρια οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης. Φυσικά, όπως πολλά από τα συστατικά του οργανισμού μας, έτσι και οι ελεύθερες ρίζες αν βρεθούν σε αυτόν σε τεράστια ποσά, χάνουν τις ευεργετικές τους ιδιότητες ως προς την ανθρώπινη υγεία και ακολουθούν σημαντικά προβλήματα εξαιτίας της οξειδωτικής δράσης τους αντιδρώντας, όπως ήδη αναφέρθηκε, με όλα τα κύρια συστατικά των κυττάρων μας, δηλαδή τόσο με τους υδατάνθρακες όσο και τα λιπίδια, τις πρωτεΐνες αλλά και το ίδιο το DNA.

Κατά την αντίδραση μίας ελεύθερης ρίζας με ένα άλλο μόριο, ένα από τα παραγόμενα προϊόντα θα είναι μία νεοσυντιθέμενη ελεύθερη ρίζα η οποία θα συνεχίσει να αντιδράει και να δημιουργεί με τη σειρά της κι άλλες ρίζες, οδηγώντας έτσι σε έναν φαύλο κύκλο δημιουργίας νέων ριζών που, ανεξέλεγκτες, είναι ικανές να επιφέρουν καταστροφικές συνέπειες στον οργανισμό προκαλώντας βιολογική καταστροφή των ιστών. Υπάρχουν δύο πιθανές περιπτώσεις κατά τις οποίες είναι εφικτό

να αποτραπεί ένα τέτοιο συμβάν και να γίνει αναστολή των πολλαπλών εκείνων αντιδράσεων που δημιουργούν τις ελεύθερες ρίζες. Στην πρώτη και λιγότερο πιθανή περίπτωση, έχουμε σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού μετά από αντίδραση δύο ελεύθερων ριζών, γεγονός αρκετά σπάνιο καθώς δύο μόρια ελεύθερων ριζών είναι, φυσικά, εξαιρετικά δραστικά, γεγονός που σημαίνει ότι δεν υπάρχουν σε πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις ώστε να μπορούν να αντιδράσουν μεταξύ τους. Στην άλλη περίπτωση, η οποία φαίνεται να είναι και η συνηθέστερη, μία ελεύθερη ρίζα αντιδρά με ένα άλλο μόριο (που δεν είναι ελεύθερη ρίζα), αποσπά από αυτό ένα ηλεκτρόνιο ώστε να συμπληρώσει τις στιβάδες της και το προϊόν που παράγεται είναι μία νέα ελεύθερη ρίζα, χωρίς όμως να διαθέτει και την δραστικότητα των ελεύθερων ριζών, γεγονός που οδηγεί στην παύση των αλυσιδωτών αντιδράσεων. Στα πιο χαρακτηριστικά μη δραστικά μόρια που παράγονται μέσω αυτών των αντιδράσεων ανήκουν η υδατοδιαλυτή βιταμίνη C και η λιπόφιλη βιταμίνη E [1].

1.2 Βασικότερες κατηγορίες ελεύθερων ριζών

Πρωταγωνιστές στις αντιδράσεις παραγωγής των ελεύθερων ριζών δεν είναι άλλοι από το οξυγόνο και το άζωτο. Ωστόσο, πέρα από τις ελεύθερες ρίζες υπάρχουν ορισμένα βιολογικά μόρια με εξίσου ισχυρή οξειδωτική δράση, τα οποία συμμετέχουν στις ίδιες αντιδράσεις με τις ελεύθερες ρίζες. Πρόκειται για μη ριζικά είδη που για να συμπεριληφθούν στην κατηγορία των ελεύθερων ριζών, αναφέρονται με τον γενικότερο όρο «Δραστικές μορφές» ή «Αντιδραστικά είδη» οξυγόνου και αζώτου αντίστοιχα [2].

Στον παρακάτω πίνακα διαχωρίζονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου στα ριζικά και μη ριζικά είδη μορίων:

Πίνακας 1. Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου [3]

	Radical	Non-Radical
Reactive Oxygen Species (ROS)	Superoxide ($O_2^{\cdot-}$)	Hydrogen peroxide (H_2O_2)
	Hydroxyl ($OH^{\cdot}$)	Singlet oxygen (O_2)
	Peroxyl ($RO_2^{\cdot}$)	Hypochlorous acid ($HClO$)
	Alkoxy ($RO^{\cdot}$)	Ozone (O_3)
		Hypobromous acid ($HBrO$)
Reactive Nitrogen Species (RNS)	Radical	Non-Radical
	Nitric oxide ($NO^{\cdot}$)	Peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$)
	Nitrogen dioxide (NO_2)	Nitrosyl cation (NO^+)
		Nitrosyl anion (NO^-)
		Nitrogen trioxide (NO_3)
		Nitrogen tetroxide (NO_4)
		Nitrous acid (HNO_2)

1.2.1 Δραστικές μορφές οξυγόνου

Οι δραστικές ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται κατά βάση όταν το οξυγόνο αναχθεί με ένα μονό ηλεκτρόνιο σε ανιόν του υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), το οποίο μεταβολίζεται σε οξυγόνο και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) από το ένζυμο δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) [1].

Με τη βοήθεια του οξυγόνου, το οποίο λόγω του πολύ υψηλού δυναμικού οξειδοαναγωγής μπορεί να δεχθεί με ευκολία ηλεκτρόνια από διάφορα υποστρώματα τα οποία έχουν αναχθεί, τα κύτταρα του ανθρώπου μπορούν να λειτουργούν φυσιολογικά, καθώς έτσι παράγεται η απαραίτητη ενέργεια με τη μορφή ATP μέσω της αναπνευστικής αλυσίδας [4].

Στις δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) συμπεριλαμβάνονται εκτός από το ανιόν υπεροξειδίου ($O_2^{\bullet -}$), οι ρίζες υδροξυλίου ($\bullet OH$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), το μονήρες οξυγόνο ($^1 O_2$)¹ κ.α. Πρόκειται για βραχύβια μόρια του μιτοχονδριακού κυρίως μεταβολισμού, τα οποία αν και παρεξηγημένα στην αρχή, φάνηκε αργότερα ότι παίζουν βασικό ρόλο σε τομείς όπως η κυτταρική ανοσία, ο μεταβολισμός, η σηματοδότηση μεταβολικών μονοπατιών, η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση. Μπορούν να παραχθούν από [5], [6]:

- i. Τη μιτοχονδριακή αναπνευστική αλυσίδα, η οποία αποτελεί και βασική πηγή παραγωγής κυτταρικών ROS
- ii. Την NADPH οξειδάση στην κυτταρική μεμβράνη, και μάλιστα τα ROS μπορούν να παραχθούν σε όλα τα διαφορετικά είδη κυττάρων χάρη στην ύπαρξη του NADPH και NADH στην αναπνευστική αλυσίδα και τον μεταβολισμό των κυττάρων
- iii. Υπεροξεισώματα, τα οποία διαθέτουν ένζυμο που παράγουν H_2O_2
- iv. Το ενδοπλασματικό δίκτυο
- v. Την οξειδάση της ξανθίνης (XO), ένα ένζυμο του κυτταροπλάσματος το οποίο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή των $O_2^{\bullet -}$ και H_2O_2 σε καταστάσεις υποξίας [4]

¹ Σύμφωνα με τον ορισμό «Ελεύθερη ρίζα (free radical) ονομάζεται κάθε άτομο ή μόριο με ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στιβάδα, σε αντίθεση με τις μη-ελεύθερες ρίζες, οι εξωτερικές στιβάδες των οποίων καλύπτονται από ζεύγη ηλεκτρονίων με αντίθετη στροφορμή (spin)» ορισμένα από τα μόρια αυτά, καλούνται συχνά λανθασμένα ως ελεύθερες ρίζες [1].

1.2.2 Δραστικές μορφές αζώτου

Το μονοξείδιο του αζώτου (NO) συμπεριλαμβάνεται στην κατηγορία των ελεύθερων ριζών αζώτου και πρόκειται για ένα υδρόφοβο, μη πολικό μόριο με δυνατότητα εύκολης μετακίνησης διαμέσου των μεμβρανών. Ωστόσο, καθώς είναι σχετικά αδρανές, συναντάται πολλές φορές στη βιβλιογραφία χωρίς την χαρακτηριστική τελεία των ελεύθερων ριζών, ενώ δεν αντιδρά εύκολα με την πλειοψηφία των υπόλοιπων κυτταρικών μορίων. Πρόκειται, επομένως, για ένα μόριο με την ικανότητα να μεταδίδει σήματα στα διάφορα είδη κυττάρων χωρίς την ανάγκη ύπαρξης κάποιου βοηθητικού υποδοχέα. Το NO συμμετέχει σε τρεις βασικές αντιδράσεις [1]:

- i. Με το ένζυμο γουανυλική κυκλάση, που μετατρέπει το GTP σε cGMP, και ευθύνεται για τη μετάδοση σημάτων μεταξύ ενδοθηλιακών και λείων μυϊκών κυττάρων, οδηγώντας σε αγγειακή χάλαση και μειωμένη πίεση
- ii. Με την οξυ-αιμοσφαιρίνη, όπου προκαλείται παραγωγή νιτρικού οξέος και απομάκρυνση του NO
- iii. Με το $O_2^{\bullet-}$, το οποίο οδηγεί σε παραγωγή περοξυνιτρικού (ONOO-) που είναι υπεύθυνο και για την τοξικότητα του NO

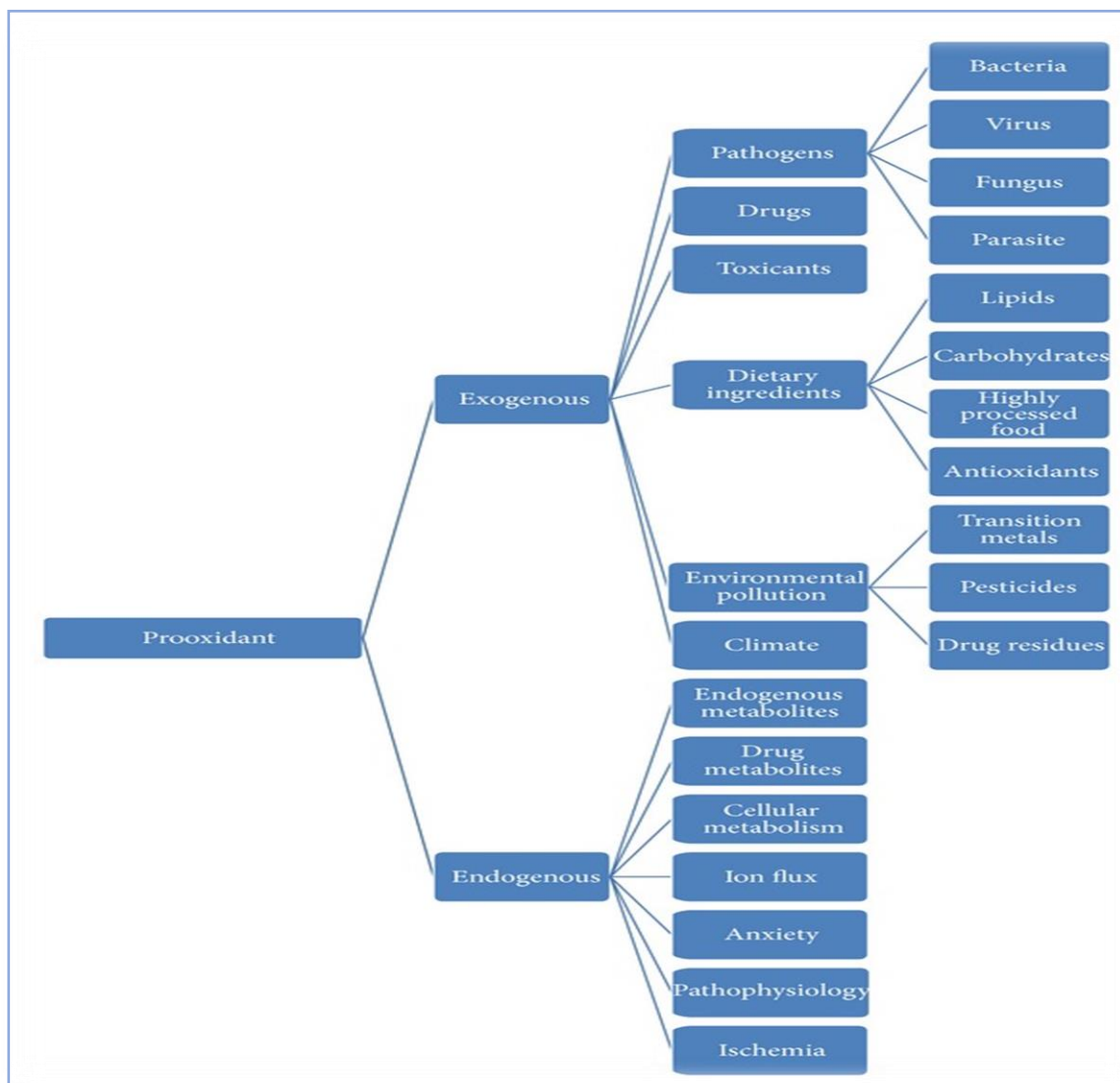
Το NO διαδραματίζει διάφορους και σημαντικούς ρόλους στην ομαλή λειτουργία του οργανισμού μας. Ρυθμίζει, αρχικά, την αιματική ροή και τη θρόμβωση, καθώς έχει την ικανότητα να ενώνεται μαζί με τον αιμικό σίδηρο στο ένζυμο κυκλάση του GMP, καταλύοντας την παραγωγή του cGMP απ' το GTP και οδηγώντας εν τέλει στη πτώση της πίεσης του αίματος. Παράλληλα, συμμετέχει τόσο στη λειτουργία του νευρικού όσο και του ανοσοποιητικού συστήματος, ενώ και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων όπως και η γονιδιακή έκφραση είναι διεργασίες που επωφελούνται από την ύπαρξη του NO. Ωστόσο, υπερβολικά μεγάλες συγκεντρώσεις του στον ανθρώπινο οργανισμό είναι ικανές να προκαλέσουν τοξικότητα εξαιτίας ορισμένων προϊόντων που συντίθενται από τις αντιδράσεις του NO με διάφορες άλλες ενώσεις [1].

1.3 Οξειδωτικό στρες και υγεία

1.3.1 Προοξειδωτικοί παράγοντες

Αφού αναφέρθηκαν ορισμένα βασικά στοιχεία σχετικά με τις ελεύθερες ρίζες, θέλοντας πλέον να δώσουμε έναν ορισμό για την κατάσταση στην οποία μας οδηγούν οι τελευταίες, θα μπορούσαμε να ορίσουμε το οξειδωτικό στρες ως εξής: «Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών εις βάρος του δευτέρου σκέλους.» (Sies, 2015) [1].

Προοξειδωτικοί ονομάζονται όλοι οι ενδοβιοτικοί ή ξеноβιοτικοί μηχανισμοί που είναι ικανοί να επιφέρουν οξειδωτικό στρες στον οργανισμό δημιουργώντας ελεύθερες ρίζες οξυγόνου ή ακόμη αναστέλλοντας τη δράση των αντιοξειδωτικών συστημάτων. Εκτός των ενδογενών προοξειδωτικών παραγόντων, υπάρχουν ακόμη και ορισμένοι εξωγενείς προοξειδωτικοί παράγοντες (Εικόνα 1) οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία ελεύθερων ριζών και κατ' επέκταση οξειδωτικού στρες, όπως η ακτινοβολία, ορισμένα φάρμακα και τοξίνες, η περιβαλλοντική ρύπανση, η τροφή, το κάπνισμα, το ηλιακό φως, η κλιματική αλλαγή κλπ. [7].



Εικόνα 1. Γενική ταξινόμηση προοξειδωτικών παραγόντων [7]

Οι παράγοντες αυτοί στο σύνολό τους αποτελούν τους βασικούς ρυθμιστές της ομοιόστασης των κυττάρων, επομένως και ολόκληρου του οργανισμού. Όταν, λοιπόν, η ομοιόσταση αυτή δεν επιτυγχάνεται και ως αποτέλεσμα ακολουθεί η ανεξέλεγκτη παραγωγή ελεύθερων ριζών η οποία δεν μπορεί να αντισταθμιστεί από την άμυνα του οργανισμού, έχουμε και την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες.

Θα πρέπει να τονιστεί ότι το οξειδωτικό στρες είναι αρκετά περίπλοκο όχι μόνο όσον αφορά την θεωρητική του κατανόηση, αλλά και σχετικά με την ίδια την δράση του στα κύτταρά μας η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με τον τύπο του οξειδωτικού, τη θέση και την έντασή του, τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών συστημάτων και την ικανότητά τους να επιδιορθώσουν τις προκαλούμενες βλάβες [7].

1.3.2 Αντιοξειδωτικά συστήματα

Γνωρίζουμε ήδη ότι ο ίδιος ο οργανισμός φέρει διάφορους μηχανισμούς άμυνας προκειμένου να προστατεύεται από εξωγενείς, ενδογενείς βλάβες και ανεπιθύμητους ξενιστές. Την ίδια, λοιπόν, αμυντική ικανότητα διαθέτει αναφορικά και με το οξειδωτικό στρες, μέσω αντιοξειδωτικών μηχανισμών.

Το ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα περιλαμβάνει αντιοξειδωτικά ένζυμα που δρουν στα ευκαρυωτικά κύτταρα, με κύριο εκπρόσωπό τους την υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), μέσω της οποίας δύο $O_2^{\bullet-}$ αντιδρούν μεταξύ τους οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό H_2O_2 και O_2 . Στις πιο σημαντικές λειτουργίες του ενζύμου αυτού συμπεριλαμβάνεται η ρύθμιση της αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού, καθώς φαίνεται πως σε μειωμένη απόκρισή του, τις οξειδωτικές βλάβες στις οποίες υπόκειται ο τελευταίος, ακολουθούν και η υπεροξειδωση των μεμβρανικών λιπιδίων αλλά και η καρβονυλίωση των πρωτεϊνών και η καταστροφή του DNA [8]. Άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η καταλάση (CAT) που μεταβολίζει το H_2O_2 σε H_2O και O_2 , η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) η οποία μπορεί να ανάγει το H_2O_2 κι άλλα οργανικά υπεροξείδια στον οργανισμό, η θειορεδοξίνη (Trx) κλπ. Εξαιτίας, λοιπόν, της ικανότητάς τους αυτής, τα ενζυματικά αντιοξειδωτικά είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικά όσον αφορά την προστασία του οργανισμού και γι' αυτό παίζουν μείζονα ρόλο στην αντιμετώπιση καταστάσεων οξέων τραυματισμών, ακτινοβολιών, σε περιπτώσεις μεταμόσχευσης πνευμόνων αλλά και σε οξεία φλεγμονή.

Ωστόσο, στο ενδογενές αντιοξειδωτικό σύστημα ανήκουν και μη ενζυματικά αντιοξειδωτικά που παράγονται ενδογενώς ή προσλαμβάνονται μέσω της διατροφής, όπως η γλουταθειόνη (GSH), το NADPH, η χολερυθρίνη, διάφορα ιχνοστοιχεία, οι βιταμίνες C και E που αναφέρθηκαν νωρίτερα κ.α., τα οποία παίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο, και σε συνεργασία με τα αντιοξειδωτικά ένζυμα καταπολεμούν στο μέγιστο δυνατό τις οξειδωτικές βλάβες που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες. Μάλιστα, η βιταμίνη C μπορεί και καταπολεμά μεγάλο αριθμό ελεύθερων ριζών όπως οι $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, $^1 O_2$ αλλά και το NO. Η βιταμίνη E εμφανίζεται σε 8 ισομορφές κι έχει την ικανότητα να διακόψει την υπεροξειδωση των λιποειδών μεταφέροντας στις $\bullet OH$ το φαινολικό υδρογόνο που διαθέτει και μετατρέποντας έτσι τις ρίζες αυτές σε ρίζες τοκοφεροξυλίου με αποτέλεσμα να σταματά η οξειδωτική αλυσιδωτή αντίδραση. Τέλος, μέσω της βιταμίνης C, η βιταμίνη E αναγεννάται κι έτσι διατηρεί σταθερό το αντιοξειδωτικό της δυναμικό [7], [9].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΜΕΤΑΓΕΥΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΣΤΑΣΗ

2.1 Ορισμός

Ο όρος μεταγευματική κατάσταση αντικατοπτρίζει τη χρονική στιγμή ύστερα από την κατανάλωση ενός γεύματος και ορίζει την έναρξη και την πορεία που θα ακολουθήσει ο οργανισμός ώστε να μεταβολίσει την τροφή στα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά της και να εφοδιάσει με αυτά, μέσω της κυκλοφορίας, ολόκληρο το ανθρώπινο σώμα. Φυσικά, για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία του μεταβολισμού της τροφής, ξεκινώντας από την πέψη και συνεχίζοντας ύστερα με την απορρόφησή της, ο οργανισμός έχει τη δυνατότητα να ελέγχει και να καθορίζει τις διάφορες μεταβολικές πορείες που εκτελούνται συνεχώς, μέσω εξειδικευμένων ορμονών και υποστρωμάτων, ανάλογα με τις εκάστοτε ανάγκες του.

Φυσιολογικά, ανάμεσα στα γεύματα που καταναλώνουν τα άτομα παρεμβάλλονται μικρές ή άλλες φορές μεγαλύτερες περίοδοι νηστείας, δηλαδή περίοδοι όπου δεν καταναλώνεται καθόλου τροφή. Αυτή η κατάσταση, φυσικά, δημιουργεί έναν φαύλο κύκλο γεύματος-νηστείας μέσα στην ημέρα με τον οποίο μπορεί να γίνει κατανοητή η διεργασία του μεταβολισμού αλλά και ο ρόλος των μακροθρεπτικών συστατικών της τροφής σε αυτόν. Ο κύκλος διακρίνεται σε τρία χρονικά στάδια, ξεκινώντας από το μεταγευματικό το οποίο έχει μέση διάρκεια 3 ωρών ύστερα από την κατανάλωση τροφής. Ακολουθεί το μεταπορροφητικό στάδιο (ή στάδιο πρώιμης νηστείας) το οποίο αντιστοιχεί σε ένα χρονικό πλαίσιο 3 μέχρι και 12-18 ωρών μετά από την κατανάλωση κάποιου γεύματος. Τέλος, υπάρχει και το στάδιο του λιμού, δηλαδή της απουσίας σίτισης για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα, το οποίο ωστόσο δεν πρέπει να αποτελεί τμήμα του φυσιολογικού μεταβολισμού καθώς δεν συμβαδίζει με την υγεία και την επιβίωση του ανθρώπου [10].

2.2 Φυσιολογικός μεταβολισμός

2.2.1 Μεταγευματική γλυκόζη

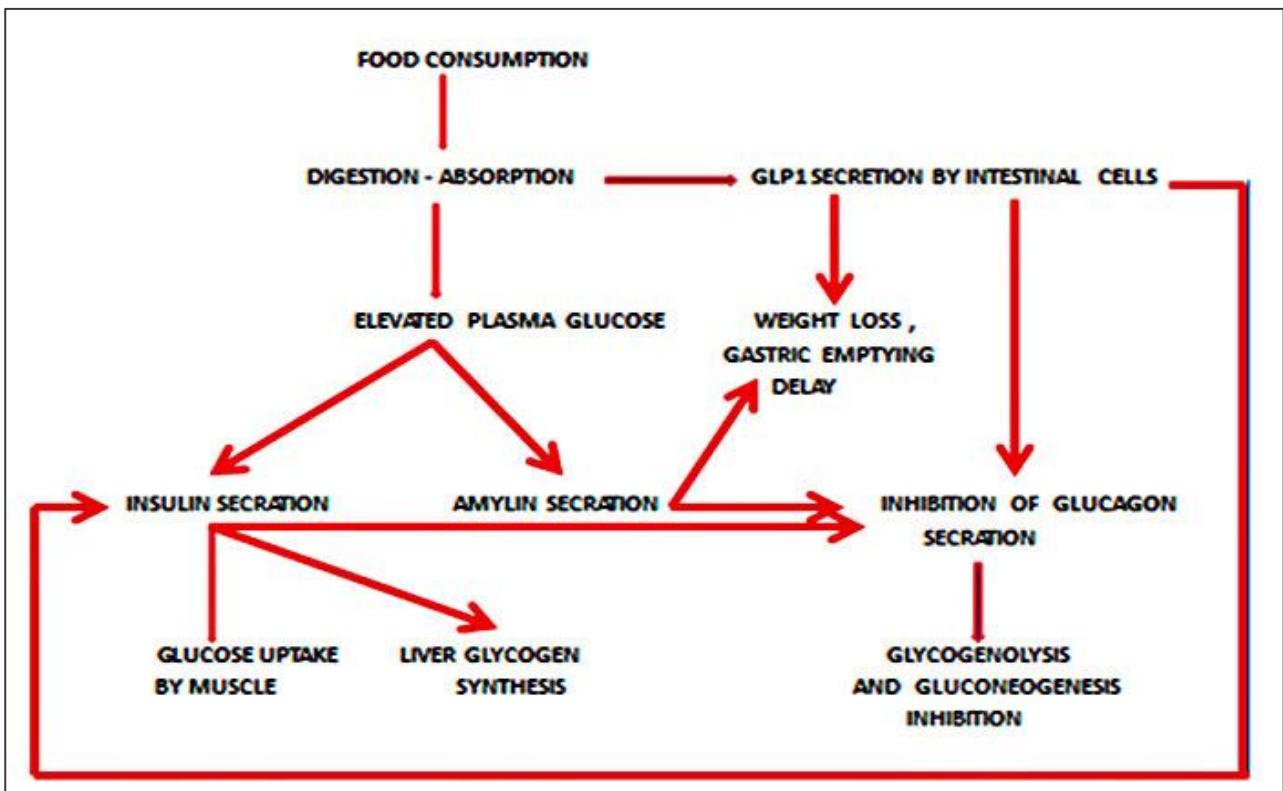
Η κύρια πηγή ενέργειας του ανθρώπου, μέσω της τροφής, είναι οι υδατάνθρακες. Συναντώνται κυρίως με τη μορφή πολυσακχαριτών (π.χ. άμυλο, γλυκογόνο) και δισακχαριτών και λιγότερο ως ελεύθερα σάκχαρα όπως η φρουκτόζη και η γλυκόζη, η οποία αποτελεί το βασικό ενεργειακό υπόστρωμα όλων των ιστών, γι' αυτό και θα πρέπει να βρίσκεται σε ομοιοστασία ύστερα από τα γεύματα αλλά και στις περιόδους νηστείας.

Κατά την είσοδο της τροφής στον οργανισμό, τα κύτταρα των ιστών μπορούν να προσλάβουν υδατάνθρακες μόνο υπό τη μορφή μονοσακχαριτών, επομένως όλοι οι δισακχαρίτες και πολυσακχαρίτες θα πρέπει να διασπαστούν σε απλά σάκχαρα. Επιπλέον, η γλυκόζη λόγω αυξημένης πολικότητας δεν έχει την ικανότητα να διαπερνά την κυτταροπλασματική μεμβράνη έτσι ώστε να χρησιμοποιηθεί από τα κύτταρα του σώματος. Απαιτούνται ειδικές πρωτεΐνες μεταφορείς (GLUT) ή αντλίες πρωτονίων (αντλία Na^+/K^+ -ATPάση) για ορισμένα είδη κυττάρων, που βοηθούν τα μόρια της γλυκόζης να εισέλθουν στο εσωτερικό τους.

Το ήπαρ είναι ο κύριος ρυθμιστής της συγκέντρωσης γλυκόζης στο αίμα και κατ' επέκταση σε ολόκληρο τον οργανισμό. Όταν, λοιπόν, εισέλθει η γλυκόζη στα ηπατικά κύτταρα (αντίστοιχα και στα μυϊκά κύτταρα και τα κύτταρα του λιπώδους ιστού), φωσφορυλιώνεται σε 6-φωσφο-γλυκόζη με τη βοήθεια του ATP έτσι ώστε να παραμείνει στο εσωτερικό τους. Ύστερα, η 6-φωσφο-γλυκόζη, σε υψηλές συγκεντρώσεις γλυκόζης πλάσματος, θα ακολουθήσει την πορεία της γλυκογονογένεσης, προκειμένου να αποθηκευτεί η πλεονάζουσα γλυκόζη ως γλυκογόνο και να απελευθερωθεί στην κυκλοφορία με τη μορφή αυτή όταν δεν προσλαμβάνεται από την τροφή αλλά είναι απαραίτητη για τον οργανισμό. Διαφορετικά, μπορεί να οξειδωθεί με σκοπό την παραγωγή ενέργειας. Μέσω της γλυκόλυσης, που είναι και η κύρια οδός του μεταβολισμού της γλυκόζης, η τελευταία μετατρέπεται σε έναν πολύ σημαντικό μεταβολίτη των υδατανθράκων, το πυροσταφυλικό οξύ, το οποίο είτε οξειδώνεται πλήρως στο εσωτερικό των μιτοχονδρίων κατά τον κύκλο του Krebs (ή κύκλος του κιτρικού οξέος) παράγοντας ταυτόχρονα ATP και NADH, είτε, πιο σπάνια, ακολουθεί την αναερόβια οδό προς σχηματισμό γαλακτικού οξέος.

Σε περιόδους νηστείας ή και έντονης σωματικής άσκησης, καθώς το γλυκογόνο που είναι αποθηκευμένο στο ήπαρ και τους μύες δεν μπορεί να εξασφαλίσει στον άνθρωπο την απαραίτητη

ποσότητα γλυκόζης, ο οργανισμός έχει τη δυνατότητα να συνθέσει τη γλυκόζη που χρειάζεται de novo (υπ' εξαρχής) με την πορεία της γλυκονεογένεσης. Έτσι, κατά την πορεία αυτή μπορεί να συντεθεί γλυκόζη από μη υδατανθρακικά μόρια (όπως τα αμινοξέα και λιγότερο η γλυκερόλη), μέσω μίας σειράς αντιδράσεων που θεωρούνται αντίστροφες της γλυκόλυσης. Τα κύρια υποστρώματα της πορείας αυτής είναι το γαλακτικό οξύ, η γλυκερίνη, η αλανίνη και η γλουταμίνη. Η γλυκονεογένεση πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ και σε ένα μικρότερο ποσοστό στους νεφρούς [10], [11].



Εικόνα 2. Ομοιόσταση μεταγευματικής γλυκόζης πλάσματος [12]

2.2.1.1 Ορμονική ρύθμιση μεταγευματικής γλυκόζης

Όλες οι μεταβολικές διεργασίες ρυθμίζονται κατά βάση από τις ενδοκρινείς παγκρεατικές ορμόνες ινσουλίνη και γλυκαγόνη. Μεταγευματικά, καθώς αυξάνονται τα επίπεδα της γλυκόζης πλάσματος, πραγματοποιείται απελευθέρωση ινσουλίνης και παράλληλα αναστέλλεται η έκκριση της γλυκαγόνης, ενώ οι αντίστροφες διαδικασίες παρατηρούνται σε μειωμένες συγκεντρώσεις

γλυκόζης στο αίμα [4]. Φυσικά, υπάρχουν κι άλλες ορμόνες οι οποίες συμβάλλουν καθοριστικά στον μεταβολισμό της γλυκόζης στον οργανισμό όπως το πεπτίδιο 1 (GLP1), η αμυλίνη, οι ινκρετίνες κ.α. [12].

Η ινσουλίνη είναι ένα πολυπεπτίδιο από 51 αμινοξέα το οποίο παράγεται με τη μορφή ενός πρόδρομου μορίου, την προ-ινσουλίνη, από τα β-κύτταρα του παγκρέατος και στη συνέχεια διασπάται σε ινσουλίνη και πεπτίδιο C. Δρα αναβολικά στο ήπαρ, τους μύες και τον λιπώδη ιστό. Η μεταγευματική της δράση μπορεί να συμβεί άμεσα, μέσα σε λίγα λεπτά ή ακόμη και δευτερόλεπτα, όπως για παράδειγμα στις κυτταρικές μεμβράνες όπου ενεργοποιεί ή αναστέλλει διάφορα ένζυμα, ή αντίθετα να διαρκέσει περισσότερες ώρες, μέχρι και ολόκληρες ημέρες, ανάλογα κάθε φορά με το γλυκαιμικό φορτίο της τροφής. Πρόκειται για μία ορμόνη που φέρει κυρίαρχο ρόλο στην ομοιοστασία, όχι μόνο της γλυκόζης αλλά και όλων των υποστρωμάτων του μεταβολισμού. Ύστερα από την κατανάλωση γεύματος, η ινσουλίνη διεγείρει στο ήπαρ τη σύνθεση των λιπαρών οξέων (de novo λιπογένεση) και προάγει την αποθήκευση της περίσσειας όλων των ενεργών υποστρωμάτων (υδατάνθρακες, λιποειδή και αμινοξέα) σε τριακυλογλυκερόλες.

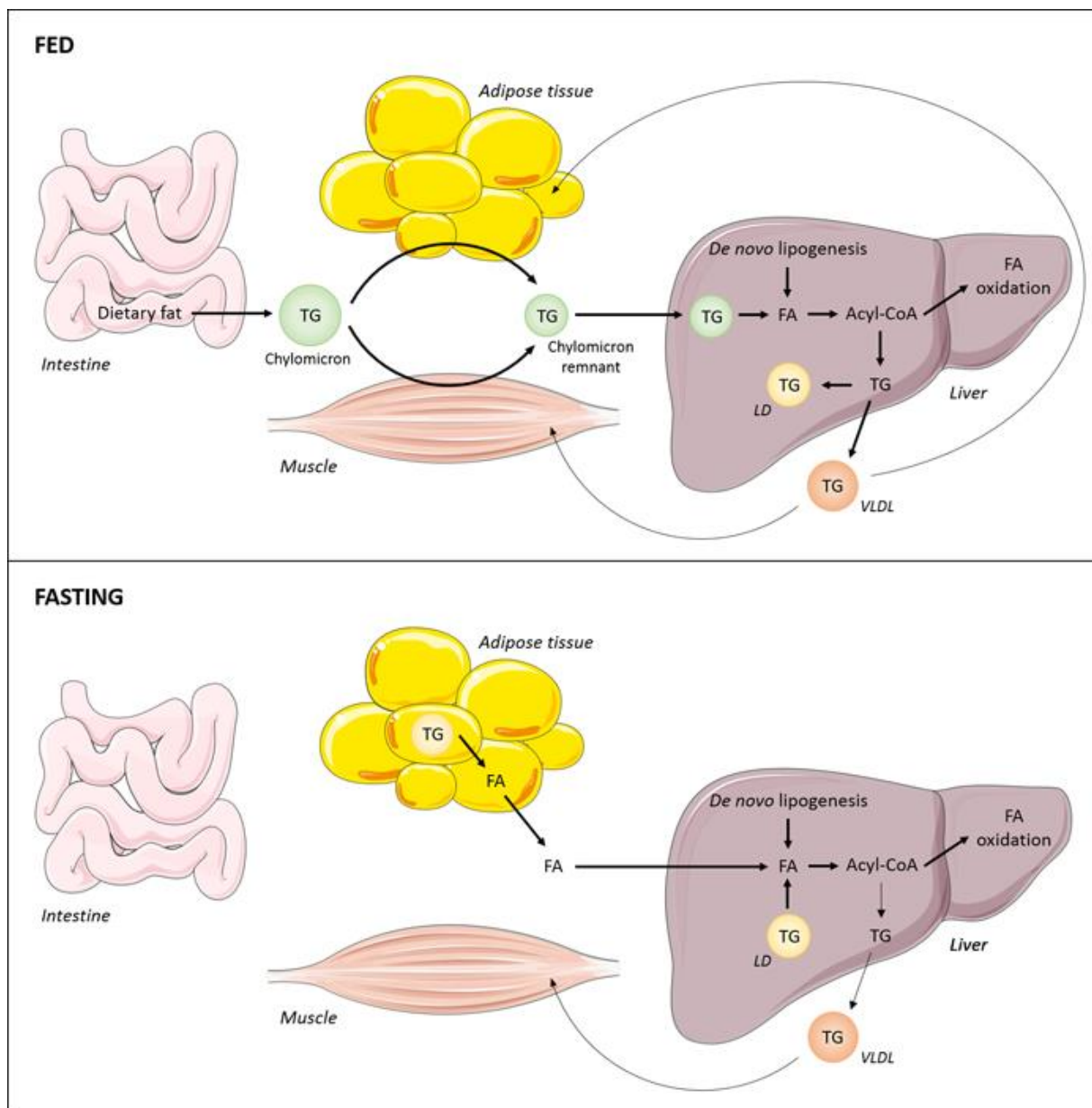
Τα β-παγκρεατικά κύτταρα παράγουν επίσης και την αμυλίνη, η οποία μαζί με την ινσουλίνη απελευθερώνεται στην κυκλοφορία μετά την κατανάλωση τροφής, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων γλυκόζης στον οργανισμό όπως και στη ρύθμιση του κορεσμού [4].

Από τα α-παγκρεατικά κύτταρα παράγεται η γλυκαγόνη, η οποία εκκρίνεται στην πυλαία φλέβα και σε αντίθεση με την ινσουλίνη προωθεί με τη δράση της τη μεταβολική πορεία της γλυκονεογένεσης, όπως επίσης και της κετογένεσης και της οξειδωσης των λιπαρών οξέων. Μετά από την κατανάλωση γεύματος, η ινσουλίνη καταστέλλει την έκκριση της γλυκαγόνης με τη βοήθεια της αμυλίνης και του GLP1 [3]. Ωστόσο, όταν απαιτείται, η γλυκαγόνη μαζί με την επινεφρίνη, ελαχιστοποιούν την χρήση της γλυκόζης από το ήπαρ ώστε να εκκριθεί από αυτό και να εξοικονομηθεί για άλλους ιστούς όπως τα ερυθρά αιμοσφαίρια ή ο εγκέφαλος, ο οποίος δεν έχει την ικανότητα αξιοποίησης των λιπαρών οξέων για ενέργεια, αφού αυτά δεν μπορούν να διαπεράσουν τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό κι επομένως απαιτεί συνεχή παροχή γλυκόζης την οποία και οξειδώνει μέσω αναερόβιας γλυκόλυσης [11].

2.2.2 Μεταγευματικά λιπίδια αίματος

Τα λιποειδή βρίσκονται στην τροφή κυρίως με τη μορφή τριακυλογλυκερολών. Πρόκειται για μη πολικά, υδρόφοβα μόρια απλών λιποειδών που αποτελούνται από τρία λιπαρά οξέα συνδεδεμένα με ένα μόριο γλυκερόλης το καθένα. Καθώς είναι αδιάλυτα στο υδατικό περιβάλλον του εντερικού σωλήνα, έχουν την τάση να συναθροίζονται και να σχηματίζουν μεγάλα σφαιρίδια τα οποία υφίστανται αργότερα διάσπαση μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται γαλακτωματοποίηση, ώστε να μπορέσουν τα πεπτικά ένζυμα να δράσουν σε αυτά και να τα μεταβολίσουν. Έτσι, οι ανασχηματισμένες τριακυλογλυκερόλες της τροφής, η χοληστερόλη και τα φωσφολιποειδή ενσωματώνονται μαζί με πρωτεΐνες και σχηματίζουν στα κύτταρα του εντέρου τα χυλομικρά, τα οποία αποτελούν και τη βασικότερη μορφή της διαιτητικής λιποπρωτεΐνης. Μέσω της κυκλοφορίας του αίματος, μεταφέρουν τις τριακυλογλυκερόλες και τη χοληστερόλη της τροφής στα κύτταρα των ιστών και συγκεκριμένα κυρίως στον μυϊκό και τον λιπώδη ιστό. Με την υδρόλυσή τους προκύπτουν τα ελεύθερα λιπαρά οξέα τα οποία παραλαμβάνονται άμεσα από τα κύτταρα, ενώ παράλληλα έχουμε μετατροπή των χυλομικρών σε υπολείμματα, που είναι λιγότερο πλούσια σε τριακυλογλυκερόλες, και μεταφέρονται με τη σειρά τους στο ήπαρ. Η μεταφορά των νεοσυντιθέμενων λιποειδών στους ιστούς μέσω της κυκλοφορίας γίνεται και μέσω των VLDL λιποπρωτεϊνών, οι οποίες μετά από υδρόλυση διασπώνται σε ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη.

Μεταγευματικά, παρατηρείται αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στο ήπαρ, τα οποία αφού ενεργοποιηθούν με το συνένζυμο A (CoA), είτε αποικοδομούνται μέσω β-οξειδωσης είτε συμμετέχουν στον σχηματισμό λιπαρών οξέων. Η β-οξειδωση αναστέλλεται όταν οι ενεργειακές ανάγκες του ήπατος καλυφθούν. Παρόμοια είναι και η οδός μεταβολισμού των λιποειδών στον λιπώδη ιστό και τους σκελετικούς μύες, οι οποίοι ωστόσο δεν μπορούν να συνθέσουν de novo λιπαρά οξέα εξαιτίας της έλλειψης του ενζύμου της συνθάσης των λιπαρών οξέων [10], [11].



Εικόνα 3. Σημαντικές πηγές λιπαρών οξέων ήπατος [13]

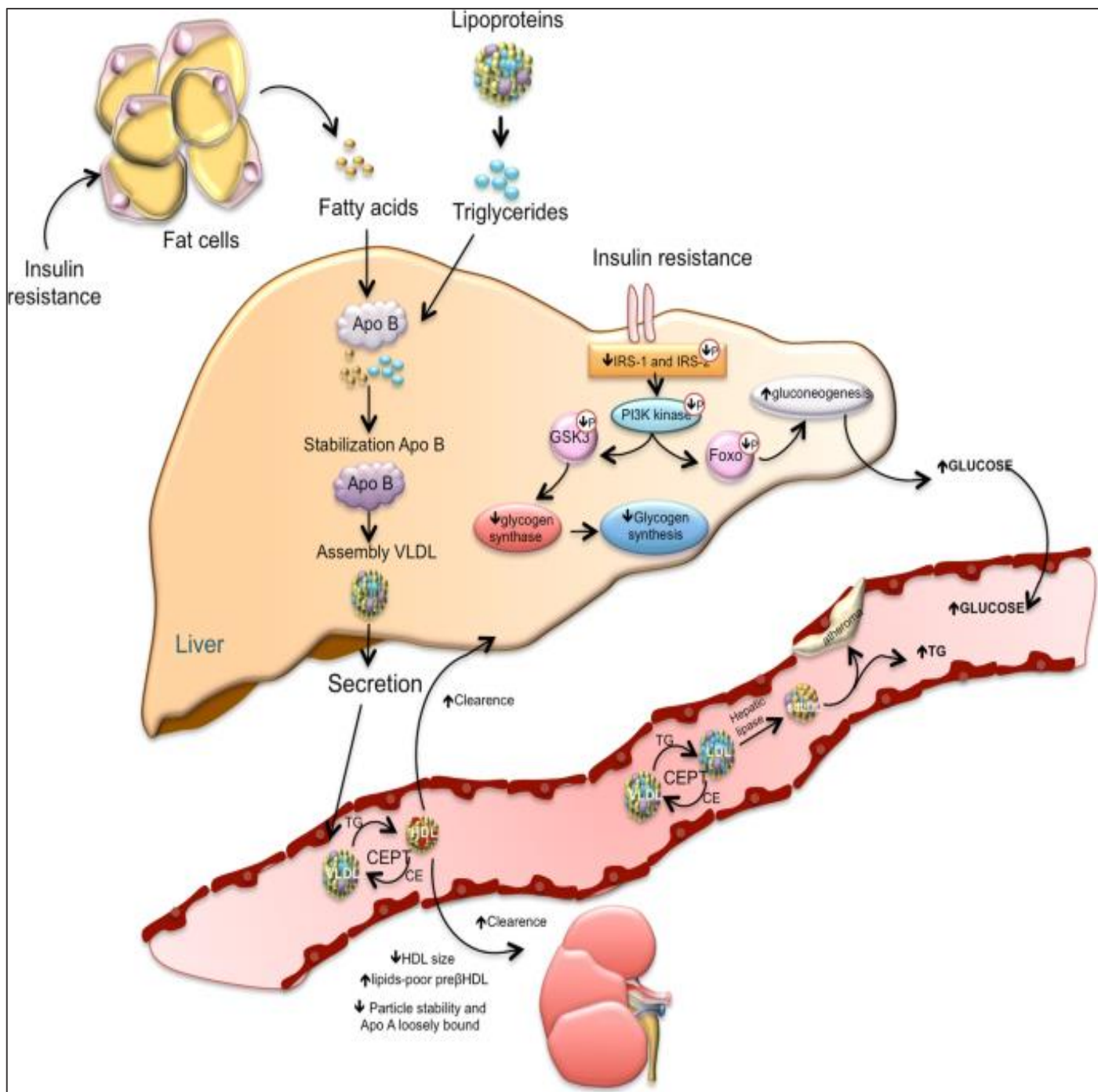
2.3 Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός

Σε καταστάσεις μη φυσιολογικού μεταβολισμού, τόσο των υδατανθράκων όσο και των λιπαρών οξέων, εντοπίζονται επίπεδα γλυκόζης πλάσματος και λιπιδίων στην κυκλοφορία σε πολύ μεγαλύτερες τιμές από τις αναμενόμενες, γεγονός που πλέον αποτελεί από μόνο του έναν ξεχωριστό δείκτη για την αξιολόγηση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου [12].

2.3.1 Ινσουλινοαντίσταση

Η γλυκόζη στις φάσεις νηστείας διατηρείται σταθερή μέσω των διεργασιών της ηπατικής γλυκογονόλυσης και γλυκονεογένεσης, αλλά και της ταυτόχρονης διάθεσής της στα κύτταρα των σκελετικών μυών και του λιπώδους ιστού μέσω της γλυκογονοσύνθεσης. Η αναστολή της γλυκονεογένεσης στο ήπαρ και η προαγωγή της πρόσληψης γλυκόζης στα μυϊκά και τα λιπώδη κύτταρα μέσω του GLUT4 ελέγχονται από την ινσουλίνη. Η αντίσταση στην ινσουλίνη ορίζεται ως «η μείωση της μεταβολικής απόκρισης ενός κυττάρου-στόχου στην ινσουλίνη ή, σε επίπεδο ολόκληρου του οργανισμού, ως μια μειωμένη επίδραση της κυκλοφορούσας ή της ενέσιμης ινσουλίνης στη μείωση της γλυκόζης στο αίμα» (Reaven G. M., 2005). Με λίγα λόγια, ο οργανισμός των ατόμων με ινσουλινοαντίσταση δεν είναι ικανός να διεγείρει τη διάθεση της γλυκόζης λόγω χαμηλότερης ευαισθησίας στην ινσουλίνη, γεγονός που λειτουργεί ως σημαντικός προδιαθεσικός παράγοντας ανάπτυξης υπερινσουλιναϊμίας, μειωμένης ανοχής στη γλυκόζη και Σακχαρώδους Διαβήτη (ΣΔ). Κατ' επέκταση, υπάρχει μεγάλη συσχέτιση της ινσουλινοαντίστασης με την παχυσαρκία, ενώ έχει αποδειχθεί ότι σχετίζεται και με υψηλότερο επιπολασμό δυσλιπιδαιμίας, καρδιαγγειακής νόσου, με το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών και άλλες ενδοκρινικές διαταραχές. Πρόκειται, επομένως, για μία κατάσταση οφειλόμενη σε διάφορους πιθανούς παράγοντες όπως το φύλο και η ηλικία των ατόμων, ο τρόπος ζωής, το σωματικό βάρος και η φυσική δραστηριότητα, η γενετική προδιάθεση, η ύπαρξη φλεγμονής, το στρες κ.α. [14], [15].

Εξαιτίας της ινσουλινοαντίστασης, ο οργανισμός συνθέτει λιγότερο γλυκογόνο από ότι πραγματικά χρειάζεται ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται και αυξημένος πρωτεϊνικός καταβολισμός στα κύτταρα των σκελετικών μυών. Η λιπόλυση διακόπτεται κι έτσι η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων στα λιποκύτταρα του ήπατος αυξάνεται, οδηγώντας αντίστοιχα σε αυξημένη έκκριση των VLDL και υπερτριγλυκεριδαιμία. Παράλληλα, παράγονται μεγάλες ποσότητες ορισμένων φλεγμονωδών κυτταροκινών όπως η IL-6, ο TNF-α και η λεπτίνη, ενώ στο ήπαρ παρατηρείται επίσης και μειωμένη παραγωγή γλυκόζης. Ως αποτέλεσμα όλων των παραπάνω, οδηγούμαστε σε δυσλειτουργικά ενδοθηλιακά κύτταρα τα οποία δεν έχουν τη δυνατότητα να παράγουν NO σε επαρκείς για τον οργανισμό ποσότητες, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αιμοπεταλιακή συσσώρευση [16].



Εικόνα 4. Συσχέτιση μεταξύ ινσουλινοαντίστασης και ανάπτυξης καρδιομεταβολικής νόσου:
Ένα απλοποιημένο μοντέλο ινσουλινοαντίστασης [16]

2.3.2 Μεταγευματική υπεργλυκαιμία

Η υπεργλυκαιμία γενικά παρατηρείται σε περιπτώσεις όπου ο οργανισμός είτε δεν παράγει ινσουλίνη στην απαιτούμενη ποσότητα είτε αδυνατεί να χρησιμοποιήσει σωστά την παραγόμενη ινσουλίνη. Σύμφωνα με την Αμερικανική Διαβητολογική Εταιρία (ADA - American Diabetes Association) υπάρχουν αρκετοί παράγοντες οι οποίοι μπορεί να επιφέρουν καταστάσεις υπεργλυκαιμίας στον οργανισμό του ανθρώπου όπως η υπερβολική κατανάλωση φαγητού με υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, η αφυδάτωση, η μειωμένη σωματική δραστηριότητα, παρενέργειες ορισμένων φαρμάκων, το στρες κ.α.

Μετά το πέρας περίπου 10 λεπτών από την κατανάλωση ενός γεύματος, τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα αρχίζουν φυσιολογικά να αυξάνονται. Σε καταστάσεις όπου η αύξηση αυτή ξεπερνάει τα ανώτατα επιτρεπτά όρια, τότε γίνεται λόγος για υπεργλυκαιμία. Μεταγευματικά, η υπεργλυκαιμία αντιστοιχεί στη γλυκόζη πλάσματος ύστερα από 1-2 ώρες από την κατανάλωση τροφής, ενώ υπάρχει και η υπεργλυκαιμία μετά από νηστεία όπου αναφέρεται σε υψηλά επίπεδα σακχάρου στο αίμα όταν το άτομο δεν έχει καταναλώσει τροφή για τουλάχιστον 8 ώρες [17]. Η μεταγευματική υπεργλυκαιμία αποτελεί πολύ σημαντικό τμήμα της συνολικής υγείας των ατόμων καθώς στην κατάσταση αυτή περνάμε και το μεγαλύτερο μέρος της ζωής μας. Συγκεκριμένα, μόνο από τις 4 π.μ. έως και τις 8 π.μ. ο οργανισμός του ανθρώπου βρίσκεται σε νηστεία [18].

2.3.3 Μεταγευματική δυσλιπιδαιμία

Στο κομμάτι του μεταγευματικού δυσμεταβολισμού, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, κεντρικό ρόλο παίζουν και τα λιπίδια του αίματος εκτός από τη γλυκόζη. Αυτός ο δυσμεταβολισμός αντιστοιχεί σε επίπεδα τριγλυκεριδίων (TG), λιποπρωτεϊνών (LP) και των παραγώγων τους, μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά [13], [17]. Αφού καταναλωθεί κάποια λιπαρή τροφή παρατηρείται αύξηση των χυλομικρών στο αίμα τα οποία χρειάζονται, μάλιστα, περισσότερη ώρα από ότι η γλυκόζη για να φτάσουν στα μέγιστα επίπεδα (3 έως 7 ώρες). Σε μη φυσιολογικές καταστάσεις, όπως σε μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη, έχουμε αυξημένη παραγωγή μορίων VLDL τα οποία αναγκάζονται να ανταλλάξουν τα TG αυτά με εστεροποιημένα μόρια χοληστερόλης. Σχηματίζονται, έτσι, μικρά και πυκνά μόρια HDL και LDL χοληστερόλης τα οποία είναι τελικά μη λειτουργικά και αθηρογόνα [19].

Η εκτίμηση της δυσλιπιδαιμίας μπορεί να γίνει είτε με τα λιπίδια νηστείας, τα οποία αντιστοιχούν σε κάποια παθολογική κατάσταση όταν υπολογίζονται >150 mg/dL, είτε με τα λιπίδια μετά από γεύμα, σε τιμές >175 mg/dL. Τα τελευταία μετρούνται σε περιπτώσεις ασθενών που, πριν τη μέτρηση, έχουν καταναλώσει τα γεύματά τους ως συνήθως. Σε ασθενείς με τιμές TG μεταξύ 90-175 mg/dL πραγματοποιείται εξέταση μεταγευματικής λιπαιμίας ύστερα από ειδικό γεύμα φόρτισης λίπους 75 γρ., και όταν τα TG είναι ≥ 220 mg/dL, τότε πλέον μπορούμε να μιλάμε για παθολογική κατάσταση μεταγευματικής λιπαιμίας [19].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΜΕΤΑΓΕΥΜΑΤΙΚΗ ΥΠΕΡΓΛΥΚΑΙΜΙΑ ΚΑΙ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

3.1 Πρωτεϊνικά καρβονύλια

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια συγκαταλέγονται πλέον στους πιο αξιόπιστους και ευαίσθητους βιοδείκτες όσον αφορά το οξειδωτικό στρες, ενώ σημαντική είναι και η ευκολία με την οποία μπορούν να ληφθούν πρωτεϊνικά δείγματα, όπως επίσης και ο μεγάλος χρόνος ημιζωής τους. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι ποσοτικού προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, με την πιο συνηθισμένη να περιλαμβάνει τη μέθοδο της 2,4-δινιτροφαινυλδραζίνης (DNPH), που απομονώνει τις αλδεΐδες και τις κετόνες χωρίς να αντιδρά με άλλες ομάδες που περιέχουν καρβονύλια, όπως είναι τα καρβοξυλικά οξέα και οι εστέρες. Από το DNPH σχηματίζεται ένα σταθερό προϊόν προσθήκης 2,4-δινιτροφαινυλδραζόνης (DNP) το οποίο μπορεί και απορροφά το υπεριώδες φως, δίνοντας έτσι τη δυνατότητα φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία προκύπτουν από το DNPH είναι δυνατό να ανιχνευθούν και μέσω ειδικών αντισωμάτων anti-DNP, συνδεδεμένα με βιοτίνη με ενζυμική ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (ELISA) και Western blot [20].

3.1.1 Η οξείδωση των πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε αφθονία στον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ παράλληλα μπορούν και αντιδρούν πολύ γρήγορα με διάφορα οξειδωτικά μέσα, γι' αυτό και αποτελούν τους βασικούς στόχους των οξειδωτικών αντιδράσεων. Το φαινόμενο της οξείδωσης των πρωτεϊνών χρήζει ιδιαίτερης προσοχής, καθώς προκαλεί τροποποιήσεις στη διαμόρφωσή τους οι οποίες είναι πιθανό να οδηγήσουν σε κυτταρική δυσλειτουργία και κατ' επέκταση σε παθολογικές καταστάσεις, εφόσον είναι μη αναστρέψιμες. Υπάρχουν διάφοροι μηχανισμοί κατά τους οποίους προκύπτουν πολλαπλές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις από την οξείδωση των πρωτεϊνών.

Ένα παράδειγμα προκύπτει από τη σουλφυδρυλική ομάδα της κυστεΐνης και την ομάδα του θειοαιθέρα της μεθειονίνης, οι οποίες περιέχουν θείο (S), και σχηματίζουν με μη αναστρέψιμο τρόπο τις ασταθείς ρίζες της κυστεΐνης θειωλίου και του σουλφενικού οξέος, όπου χρησιμοποιούνται ως πρόδρομα μόρια της οξειδωμένης κυστεΐνης. Μία από αυτές τις τροποποιήσεις αποτελεί και η κυστίνη, που προκύπτει ύστερα από αντίδραση δύο μορίων κυστεΐνης μεταξύ τους, και η οποία έχει τη δυνατότητα σταθεροποίησης των πρωτεϊνικών δομών μέσω των δισουλφιδικών δεσμών που δημιουργούνται. Αντίστοιχα, και τα αρωματικά αμινοξέα με τις φαινολικές πλευρικές αλυσίδες, όπως είναι η τυροσίνη, αποτελούν σημαντικούς στόχους της πρωτεϊνικής οξείδωσης.

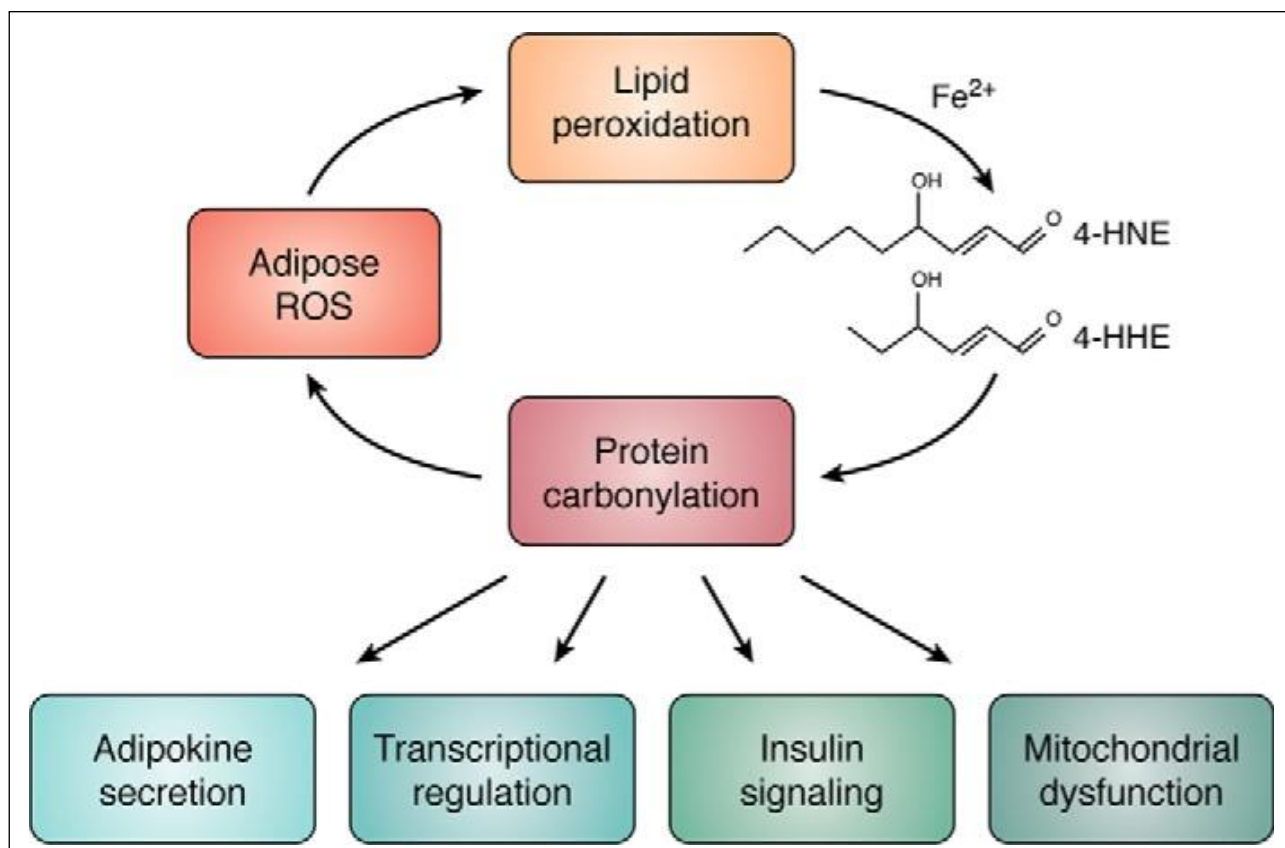
Σε αμινοξέα όπως η αργινίνη και η λυσίνη παρατηρείται το φαινόμενο της γλυκοζυλίωσης η οποία έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης (AGEs - Advanced Glycation End Products), όπως για παράδειγμα την καρβοξυ-μεθυλολυσίνη (CML). Παρόλα αυτά, δεν είναι απαραίτητη η ύπαρξη οξειδωτικών συνθηκών για όλα τα AGEs. Αυτά που παράγονται αποκλειστικά σε συνθήκες οξείδωσης, αποτελούν προϊόντα ενός φαινομένου που ονομάζεται γλυκοξείδωση και το οποίο πρόκειται για έναν συνδυασμό γλυκοζυλίωσης και οξείδωσης. Η CML αποτελεί το πρώτο προϊόν γλυκοξείδωσης που βρέθηκε και είναι ένα από τα πιο άφθονα AGEs (in vivo), ενώ μπορεί να σχηματιστεί και μέσω μη οξειδωτικού μηχανισμού, με αντίδραση μεταξύ της ένωσης γλυοξάλης με τη λυσίνη. Ένα ακόμη προϊόν γλυκοξείδωσης είναι η φθορίζουσα πεντοσιδίνη, που προκύπτει από τα υπολείμματα λυσίνης και αργινίνης. Εκτός από τα AGEs, έχουμε και τα τελικά προϊόντα λιποξείδωσης (ALEs - Advanced Lipoxidation End Products), ένα από τα οποία θεωρείται και η CML (εκτός από AGE). Αυτά αφορούν τροποποιήσεις που προκύπτουν μέσω αντίδρασης των πρωτεϊνών με ενεργές μορφές καρβονυλίου (RCS) τα όποια χωρίζονται σε α/β ακόρεστα, κετοαλδεΐδες και διαλδεΐδες όπως η 4-υδροξυ-2-εννεάλη (4-HNE) η οποία προέρχεται από την οξείδωση των ω -6 λιπαρών οξέων, η 4-υδροξυ-2-εξενάλη (4-HHE) που προέρχεται από την οξείδωση των ω -3 λιπαρών οξέων, η μηλουλο-δεαλδεΐδη (MDA) κ.α. [15], [21]. Οι $\bullet\text{OH}$ - του λιπώδους ιστού στοχεύουν σε μεγάλο βαθμό στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs), τα οποία υπάρχουν σε αφθονία στις μεμβράνες, κι έτσι η λιποξείδωση μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των μεμβρανών και κατ' επέκταση σε μιτοχονδριακή βλάβη [21].

3.1.2 Καρβονυλίωση πρωτεϊνών και στρες

Τα πρωτεϊνικά καρβονύλια αποτελούν τον βασικότερο δείκτη οξειδωσης των πρωτεϊνών. Η καρβονυλίωση αποτελεί μία μη αναστρέψιμη μέθοδο οξειδωτικής τροποποίησης η οποία συμβαίνει με τους εξής τρόπους: είτε εξαιτίας του οξειδωτικού στρες που ασκείται στα αμινοξέα των πρωτεϊνών, είτε εξαιτίας οξειδωτικής διάσπασης της πρωτεΐνης και ενσωμάτωση των καρβονυλίων μέσω γλυκοξείδωσης ή λιποξείδωσης, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Έχει ως στόχο την ποσοτικοποίηση των ελεύθερων ριζών και των παραγόμενων από αυτές προϊόντων στα κύτταρα, με σκοπό τον εντοπισμό της καταστροφής που προκαλεί το οξειδωτικό στρες στα διάφορα βιομόρια. Σε αντίθεση με άλλες μεθόδους, όπως αυτή του κατακερματισμού του DNA, η μέθοδος της καρβονυλίωσης των πρωτεϊνών μαζί με την υπεροξείδωση των λιπιδίων, αποτελούν τις πιο αποτελεσματικές μεθόδους εκτίμησης των επιπτώσεων των ROS στα βιομόρια.. Οι καρβονυλικές ομάδες των πρωτεϊνών (αλδεΐδες και κετόνες) σχηματίζονται κατά την οξείδωση των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων κι εμφανίζουν μεγάλη χημική σταθερότητα, γεγονός που τις κάνει πολύ σημαντικές για πληθώρα εργαστηριακών αναλύσεων [22].

Έχει φανεί ότι σε παχύσαρκα άτομα, τα επίπεδα 4-HNE και 4-HHE αυξάνονται όσο αυξάνεται και ο Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) και ο λιπώδης ιστός, ενώ ύστερα από διάφορες προκαλούμενες μεταβολικές καταστάσεις όπως η δίαιτα, η εξάντληση των αντιοξειδωτικών παραγόντων, η φλεγμονή, το στρες και η γήρανση, η καρβονυλίωση είναι ιδιαίτερα αυξημένη, γεγονός που επιβεβαιώνει μία αιτιώδη συσχέτιση με το οξειδωτικό στρες από το οποίο επηρεάζονται βασικές μεταβολικές λειτουργίες όπως η γονιδιακή έκφραση, η έκκριση των πρωτεϊνών και η δράσης της ινσουλίνης [21].

Η παραγωγή όλων αυτών των καρβονυλικών ενώσεων που αναφέρθηκαν έως τώρα (γλυοξάλη, 4-HNE, 4-HHE) αλλά και πολλών ακόμα, οδηγεί σε μία κατάσταση που ονομάζεται καρβονυλικό στρες, το οποίο προάγεται από το ίδιο το οξειδωτικό στρες που προκύπτει ύστερα από τον σχηματισμό των προαναφερθέντων προϊόντων. Ορισμένες πρωτεΐνες του ενδοπλασματικού δικτύου (ΕΔ) με τροποποιημένη δομή, συσσωρεύονται και ακολουθεί εκτεταμένη παραγωγή H_2O_2 , ενώ παράλληλα υπάρχει μεγάλη εκροή ασβεστίου από το ΕΔ και εισροή προς τα μιτοχόνδρια που οδηγεί σε στρες εντός του ΕΔ. Το γεγονός αυτό εντείνει τον σχηματισμό μιτοχονδριακών ROS και προκαλείται οξειδωτικό στρες, υποδηλώνοντας ότι αναπόφευκτα θα δημιουργείται συνεχώς ένας φαύλος κύκλος στρες στον οργανισμό [23].



Εικόνα 5. Καρβονυλικός κύκλος [21]

3.2 Μηχανισμοί υπεργλυκαιμίας που προκαλούν οξειδωτικό στρες

Ύστερα από ένα γεύμα πλούσιο σε λιπίδια και υδατάνθρακες ο οργανισμός έρχεται σε κατάσταση προσωρινής υπερλιπιδαιμίας και υπεργλυκαιμίας αντίστοιχα. Οι καταστάσεις αυτές επιφέρουν οξειδωτικό στρες στον οργανισμό, ένα φαινόμενο που τείνει να είναι πιο έντονο σε άτομα με παχυσαρκία και ινσουλινοαντίσταση.

Το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες (Postprandial Oxidative Stress – POS) συνδέεται με την υπεργλυκαιμία με τους εξής τρόπους:

- i. Μέσω αυξημένης ροής του μονοπατιού της πολυόλης (σορβιτόλης)
- ii. Μέσω αυξημένου σχηματισμού των τελικών προϊόντων προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)
- iii. Μέσω ενεργοποίησης ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC)
- iv. Μέσω αυξημένης ροής της οδού της εξοζαμίνης

Και οι τέσσερις αυτές διαδικασίες οδηγούν σε ανεξέλεγκτη παραγωγή ROS διαμέσου της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων του μιτοχονδρίου, ενώ έχει φανεί ότι το μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες συνδέεται άμεσα με το στρες που προκαλείται στο ΕΔ, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο.

Το μονοπάτι ή αλλιώς η οδός της πολυόλης ή της σορβιτόλης, είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της γλυκόζης σε φρουκτόζη. Το αρχικό ένζυμο που συμμετέχει στην αντίδραση αυτή είναι η αναγωγάση της αλδόζης, η οποία εμπλέκεται ελάχιστα στον μεταβολισμό της γλυκόζης σε άτομα χωρίς διαταραχές γλυκόζης, καθώς εμφανίζει πολύ χαμηλή συγγένεια με αυτή. Αντιθέτως, σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, μέσω του ενζύμου της εξοκινάσης, η περίσσεια της γλυκόζης μπορεί να εισέλθει στο μονοπάτι της πολυόλης και με την αναγωγάση της αλδόζης να μετατραπεί σε σορβιτόλη. Με τον τρόπο αυτό, το NADPH οξειδώνεται σε NADP^+ και η αφυδρογονάση της σορβιτόλης οξειδώνει τη σορβιτόλη σε φρουκτόζη, η οποία παράγει NADH μέσω του NAD^+ . Όταν, λοιπόν, επικρατεί πολύ υψηλή υπεργλυκαιμία, όπως για παράδειγμα σε άτομα με μη ελεγχόμενο ΣΔ, ο οργανισμός καταλήγει να παράγει σορβιτόλη. Οι επιπτώσεις που προκύπτουν κι έχουν δυσμενή αποτελέσματα στον οργανισμό είναι, μεταξύ άλλων, το ωσμωτικό στρες εξαιτίας της σορβιτόλης, η μειωμένη δραστηριότητα της αντλίας Na^+/K^+ -ATPάση, η αύξηση του κυτοσολικού NADH και NAD^+ , όπως και η μείωση του κυτταροπλασματικού NADPH το οποίο είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς εξυπηρετεί πολλούς ρόλους, όπως η ανατροφοδότηση των αντιοξειδωτικών συστημάτων που βασίζονται σε πρωτεΐνες και ανακυκλώνουν την οξειδωμένη γλουταθειόνη κ.α.

Πρωτεϊνικά μόρια και λιπίδια τα οποία εκτίθενται σε σάκχαρα αποτελούν τα τελικά μη αναστρέψιμα προϊόντα της προηγμένης γλυκοζυλίωσης (AGEs) τα οποία μέσω διαφόρων μηχανισμών ενεργοποιούν τελικά την παραγωγή ROS. Σε συνθήκες υπεργλυκαιμίας, και ειδικά σε χρόνιες καταστάσεις, τα προϊόντα αυτά συσσωρεύονται σε μεγάλες ποσότητες στους ιστούς οδηγώντας σε αγγειακές επιπλοκές. Ορισμένοι υποδοχείς της πλασματικής μεμβράνης (RAGEs) έρχονται σε αλληλεπίδραση με τα AGEs με αποτέλεσμα να προκαλούν μεταβολές στη σηματοδότηση, τη γονιδιακή έκφραση και την απελευθέρωση προφλεγμονωδών μορίων και ελεύθερων ριζών. Επιπλέον, τα AGEs αντιδρούν με τις LDL λιποπρωτεΐνες μεταβάλλοντας τη δομή τους και καταστρέφοντας μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την απομάκρυνση επιβλαβών μορίων, ενώ μπορούν να προκαλέσουν συσσώρευση αιμοπεταλίων και θρόμβωση των αγγείων οδηγώντας έτσι σε οξεία στεφανιαία σύνδρομο.

Η πρωτεϊνική κινάση C (PKC) αποτελείται από 11 ισομορφές, όπου οι 9 από αυτές δέχονται μηνύματα από μία διακυλογλυκερόλη που ενισχύεται μέσω ενδοκυτταρικής υπεργλυκαιμίας, ενώ παράλληλα το μιτοχονδριακό υπεροξειδίο που προκύπτει ύστερα από αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης, είναι επίσης ικανό να πυροδοτήσει την PKC επιφέροντας πληθώρα αγγειακών επιπλοκών στον οργανισμό μέσω μεταβολών στην έκφραση συγκεκριμένων μορίων. Εκτός αυτού, η PKC συνδέεται και με την ενεργοποίηση του NF- κ B, μέσω του οποίου το προκαλούμενο από την υπεργλυκαιμία οξειδωτικό στρες συνδέεται με καταστάσεις φλεγμονής. Ορισμένα αποτελέσματα που προκύπτουν είναι η αύξηση της διαπερατότητας και συσταλτικότητας των αγγείων, η ανάπτυξη και απόπτωση των κυττάρων, η αναστολή της κυτοκίνης κ.α., οδηγώντας μετέπειτα σε αθηροσκλήρωση, μυοκαρδιοπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια, ΣΔ.

Η βιοσυνθετική οδός της εξοζαμίνης δεν συμμετέχει παρά μόνο ελάχιστα στο μονοπάτι του μεταβολισμού της γλυκόζης υπό φυσιολογικές συνθήκες. Ωστόσο, σε καταστάσεις υπεργλυκαιμίας, προκαλούνται τροποποιήσεις στην πρωτεΐνη και σχηματίζονται διάφορα γλυκολιπίδια, πρωτεογλυκάνες κ.α. Η 6-φωσφο-φρουκτόζη μετατρέπεται σε 6-φωσφο-γλυκοζαμίνη μέσω του ενζύμου γλουταμίνη:αμιδοτρανσφεράση. Η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι το τελικό προϊόν που παράγεται και λειτουργεί σαν υπόστρωμα για τη σύνθεση πρωτεογλυκανών και γλυκοπρωτεϊνών. Αυτό το μονοπάτι μπορεί να μεταβάλει τη γονιδιακή έκφραση και συνδέεται άμεσα με αγγειακές επιπλοκές που προκαλούνται λόγω της υπεργλυκαιμίας στον ΣΔ.

Η δράση, επομένως, και των τεσσάρων αυτών παθολογικών μηχανισμών που αναφέρθηκαν και οι οποίοι είναι αποτέλεσμα της υπεργλυκαιμίας, ξεκινάει ουσιαστικά ύστερα από εκτεταμένη παραγωγή ROS εντός των κυττάρων με αυξημένη συγκέντρωση γλυκόζης, από την οποία σχηματίζεται πυροσταφυλικό οξύ που οξειδώνεται και οδηγεί στην παρατεταμένη ροή των NADH και FADH₂ στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων. Έπειτα, ένα ηλεκτρόνιο από την αλυσίδα αυτή αποσπάται και συνδέεται με το O₂, οδηγώντας έτσι στον σχηματισμό H₂O₂.

Φυσικά, όπως ήδη αναφέρθηκε σε προηγούμενο κεφάλαιο, τα ROS όπως και όλες οι ελεύθερες ρίζες, είναι φυσιολογικό να υπάρχουν στον οργανισμό μας ως ένα βαθμό. Αυτό που θα επιφέρει ανεπιθύμητα αποτελέσματα είναι ο σχηματισμός πολλών περισσότερων ROS, ο οποίος ακολουθείται από δυσλειτουργία των μιτοχονδριακών μηχανισμών αλλά και μειωμένη παραγωγή ATP, γεγονότα που με τη σειρά τους θα οδηγήσουν σε όσα αναφέρθηκαν [6], [24].

B) ΣΚΟΠΟΣ

Ο μεταγευματικός δυσμεταβολισμός και συγκεκριμένα η αυξημένη μεταγευματική υπεργλυκαιμία αποτελεί ένα φαινόμενο ισχυρά συνδεδεμένο με την εμφάνιση οξειδωτικού στρες στον οργανισμό και πρόκειται για ένα πεδίο συνεχούς έρευνας, καθώς έχει πλέον συσχετιστεί με πληθώρα παθολογικών καταστάσεων όπως και με την εμφάνιση αθηρωμάτωσης.

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη αποσκοπεί στην κατανόηση της επίδρασης που ασκεί η αύξηση της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας σε δείκτες οξειδωτικού στρες, τόσο σε υγιείς όσο και σε παχύσαρκους εθελοντές. Με άλλα λόγια, επιχειρήθηκε αρχικά ο προσδιορισμός ενός κατωφλικού επιπέδου στο οποίο εξαιτίας της υπεργλυκαιμίας και της υπερινσουλιναϊμίας, που προκαλούνται ύστερα από διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, θα σταματήσουν οι προσαρμοστικοί μηχανισμοί του οργανισμού ενάντια στο επαγόμενο οξειδωτικό στρες. Έπειτα, έγινε σύγκριση μεταξύ δύο ομάδων εθελοντών, στη μία εκ των οποίων συμμετείχαν υγιείς ενήλικες φυσιολογικού σωματικού βάρους και στην άλλη φαινομενικά υγιείς παχύσαρκοι ενήλικες με πρώιμη ινσουλινοαντίσταση, ώστε να διερευνηθεί το κατά πόσο η παχυσαρκία, χωρίς την ύπαρξη εγκατεστημένης νόσου, μπορεί να επηρεάσει τα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε καταστάσεις οξείας υπεργλυκαιμίας. Για τον σκοπό αυτό, επιλέχθηκαν και μελετήθηκαν ως οξειδωτικοί δείκτες πρωτεϊνικά καρβονύλια, τα οποία απομονώθηκαν από τον ορό των συμμετεχόντων.

Γ) ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

1. Επιλογή εθελοντών

Στα πλαίσια της έρευνας που πραγματεύεται η παρούσα πτυχιακή μελέτη, επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές ομάδες εθελοντών. Στη μία ομάδα ανήκαν υγιείς εθελοντές φυσιολογικού σωματικού βάρους, άνδρες και γυναίκες, με ηλικιακό εύρος 20-40 ετών. Η άλλη ομάδα αποτελούταν επίσης από άνδρες και γυναίκες 20-40 ετών, οι οποίοι ήταν παχύσαρκοι και εμφάνιζαν πρώιμη ινσουλινοαντίσταση, χωρίς ωστόσο να υπάρχουν συνοδά νοσήματα.

Στους εθελοντές πραγματοποιήθηκαν αιμοληψίες. Η αιμοληψία για τις γυναίκες πραγματοποιούνταν κατά τις πρώτες 7-10 ημέρες του εμμηνορρυσιακού τους κύκλου. Κριτήρια επιλογής των υγιών εθελοντών ήταν ο φυσιολογικός ΔΜΣ=18-25 kg/m², η φυσιολογική αρτηριακή πίεση (Συστολική Αρτηριακή Πίεση ≤130 mmHg και Διαστολική Αρτηριακή Πίεση ≤85 mmHg), επίπεδα γλυκόζης νηστείας ≤100 mg/dL, επίπεδα γλυκόζης 2 ώρες μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης <140 mg/dL, επίπεδα ολικής χοληστερόλης ≤200 mg/dL, επίπεδα τριακυλογλυκερολών ≤150 mg/dL και απουσία ιστορικού καρδιαγγειακής νόσου. Επιπλέον, οι εθελοντές δεν ήταν καπνιστές. Αντίστοιχα, κοινά ήταν και τα κριτήρια επιλογής για τους παχύσαρκους εθελοντές με μοναδική διαφορά τον ΔΜΣ ο οποίος έπρεπε να είναι ≥30 kg/m².

Για την καταγραφή των εθελοντών χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένο ερωτηματολόγιο. Συμπληρωματικά, πριν την είσοδο των εθελοντών στο πρωτόκολλο πραγματοποιήθηκε βιοχημικός έλεγχος, ώστε να εξακριβωθεί ότι οι εθελοντές πληρούσαν τα παραπάνω κριτήρια. Οι εθελοντές προτιμήθηκε να είναι είτε μη ενεργά άτομα είτε κατ' ελάχιστο ενεργά άτομα, σύμφωνα με την κατάταξη του ερωτηματολογίου IPAQ. Επιπρόσθετα, όφειλαν να μη λαμβάνουν ασπιρίνη, ορμόνες, συμπληρώματα διατροφής, αντιυπερτασικά φάρμακα ή άλλη φαρμακευτική αγωγή για τουλάχιστον 2 μήνες.

Το χρησιμοποιηθέν ερευνητικό πρωτόκολλο έχει εγκριθεί από την επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Παράλληλα, απαραίτητη προϋπόθεση για τη 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. Σχεδιασμός της μελέτης

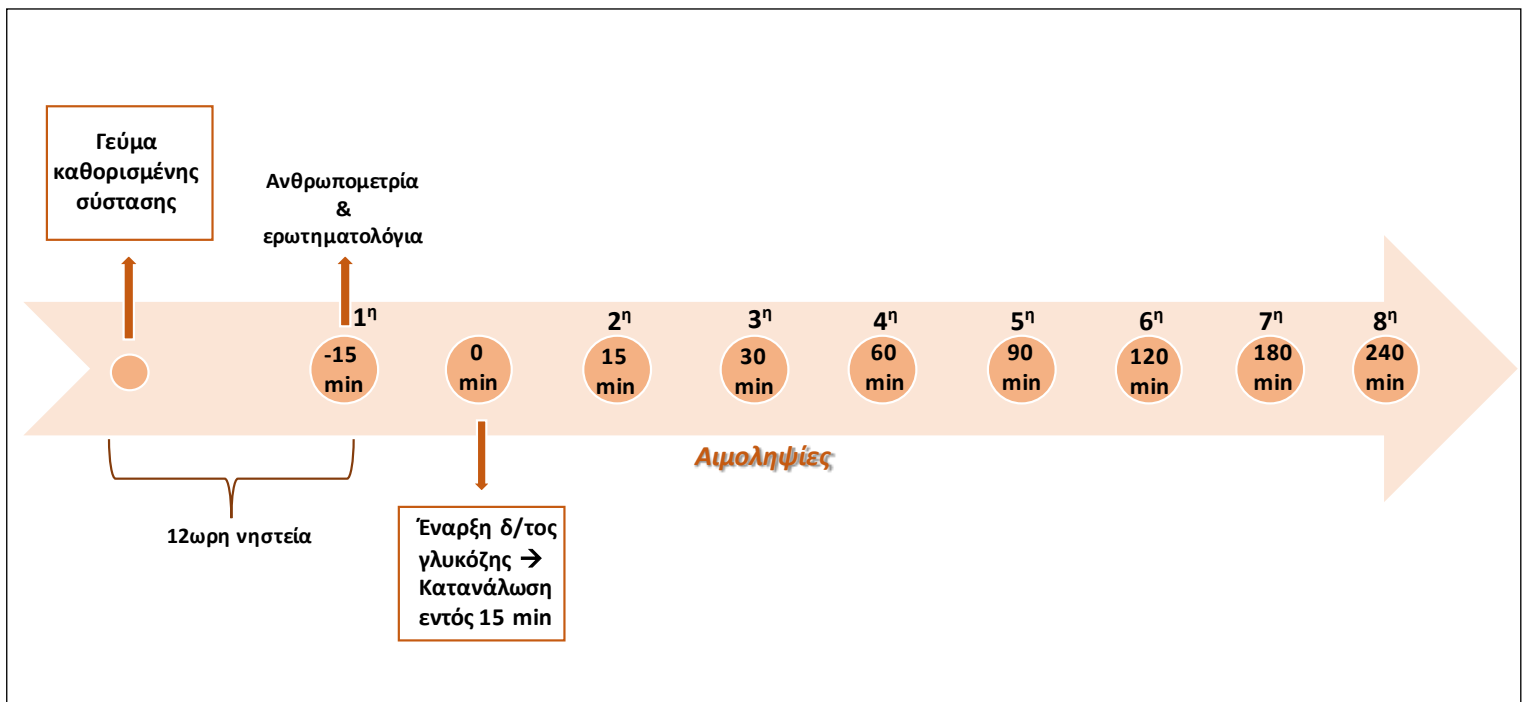
Οι εθελοντές, εφόσον είχαν ενημερωθεί για τους σκοπούς της μελέτης και είχαν υπογράψει το πρωτόκολλο εθελοντικής συμμετοχής, προσέρχονταν στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο τρεις διαφορετικές ημέρες για τις διαφορετικές φορτίσεις του πρώτου πρωτοκόλλου, οι οποίες απείχαν μεταξύ τους χρονικά τουλάχιστον 2 εβδομάδες για τους άνδρες και κατά ένα μήνα για τις γυναίκες.

Κάθε φορά που ερχόταν ένας από τους εθελοντές, έπρεπε να καταναλώσει ένα διάλυμα γλυκόζης. Το διάλυμα αυτό επιλεγόταν τυχαία από μία σειρά τριών διαλυμάτων διαφορετικής συνολικής ποσότητας. Αναλυτικότερα, 75, 100 και 150 γρ. γλυκόζης είχαν διαλυθεί σε 200 mL νερού αντίστοιχα, για να παρασκευαστούν τα τρία είδη διαλυμάτων. Για το δεύτερο πρωτόκολλο, οι παχύσαρκοι εθελοντές έπρεπε να καταναλώσουν μία φορά ένα διάλυμα γλυκόζης 75 γρ.

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

Αρχικά, πραγματοποιήθηκαν οι ανθρωπομετρίες (βάρος, ύψος, περιφέρεια μέσης) και μετρήθηκε η αρτηριακή πίεση. 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 ή το μοναδικό διάλυμα των 75 γρ. κατά το δεύτερο πρωτόκολλο, εντός ενός χρονικού διαστήματος 3 λεπτών. Από εκείνη τη στιγμή κι 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.

Σχήμα 1. Διαδοχικές αιμοληψίες μετά από τη φόρτιση γλυκόζης



3. 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 cm. Οι μετρήσεις αυτές έγιναν εις διπλούν. Ακόμη, υπολογίστηκαν ο μέσος όρος του σωματικού βάρους και ο μέσος όρος του ύψους κάθε εθελοντή, σύμφωνα με τους οποίους υπολογίστηκε έπειτα ο ΔΜΣ 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 ισχίου, όπως και υπολογισμός για το πηλίκο της περιφέρειας μέσης ως προς την περιφέρεια ισχίου.

4. Απομόνωση και επεξεργασία βιολογικών δειγμάτων

4.1 Συνολική περιγραφή

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

Τα βιολογικά δείγματα που απομονώθηκαν και το είδος των αναλύσεων ανά βιολογικό δείγμα φαίνονται παρακάτω:

Πίνακας 2. Βιολογικά δείγματα

Βιολογικό δείγμα	Αναλύσεις
Ορός	-Γλυκόζη -Ινσουλίνη -Τριγλυκερίδια -Πρωτεϊνικά καρβονύλια
Ολικό αίμα σε αντιπηκτικό EDTA	Γενική αίματος
Πλάσμα	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)
Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)
Ομογενοποίημα αιμοπεταλίων	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)
Ομογενοποίημα λευκοκυττάρων	(για άλλες ερευνητικές εργασίες)

4.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε δείγματα ορού

4.2.1 Απομόνωση ορού

Αρχικά, 4 mL ληφθέντος αίματος μεταφέρθηκαν σε vacutainers ορού τα οποία παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Η παραλαβή του ορού έγινε με φυγοκέντρηση στα 1500 g επί 20 λεπτά, στους 15°C. Έπειτα, ο ορός μοιράστηκε σε errendorfs και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

4.2.2 Αρχή της μεθόδου

Ο προσδιορισμός των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίζεται στην αντίδραση των καρβονυλικών ομάδων που έχουν δημιουργηθεί στις πρωτεΐνες με τη χρωστική DNPH και στη φωτομέτρηση του έγχρωμου συμπλόκου που δημιουργείται στα 375 nm. Η ποσότητα πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκφράζεται σε nmol/mg πρωτεΐνης.

4.2.3 Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια

- 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazine σε HCl 2,5 M
- HCl 2,5 M
- TCA 100%
- Ακετόνη
- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης 6 M σε 20 mM buffer φωσφορικών pH 2,3: 0,2722 g KH_2PO_4 και 57,32 g στα 100 mL H_2O . Ρύθμιση pH με πυκνό HCl → Guanidine 6 M (αποθήκευση στους 2-8°C)

4.2.4 Αναλυτική πορεία

1. Φέρονται από 15 μL ορού και 85 μL απιονισμένου νερού σε δύο errendorffs (το δείγμα πρέπει να περιέχει 0,5-2 mg πρωτεΐνης/mL).
2. Στο ένα errendorff προστίθενται 100 μL δ/τος DNPH 10 mM (S) και στο άλλο 100 μL HCl 2,5M (C). Πραγματοποιείται ανάδευση με VORTEX και ύστερα γίνεται επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Γίνεται προσθήκη 30 μL 100% παγωμένου TCA solution σε κάθε δείγμα και ακολουθεί ανάδευση με VORTEX.
4. Τα δείγματα επωάζονται σε πάγο για 5 λεπτά και έπειτα γίνεται φυγοκέντρηση 10.000 g για 10 λεπτά στους 4°C.
5. Πραγματοποιείται απόχυση του υπερκειμένου και αναδιάλυση του ιζήματος σε 500 μL κρύας ακετόνης. Πραγματοποιείται ανάδευση με VORTEX.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται σε λουτρό Sonication για 5 λεπτά.
7. Γίνεται επώαση των δειγμάτων στους -20°C για 10 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρηση 10.000 g για 10 λεπτά στους 4°C.
8. Πραγματοποιείται ξανά απόχυση του υπερκειμένου.
9. Στο ίζημα κάθε δείγματος προστίθενται 200 μL διαλύματος γουανιδίνης 6M και πραγματοποιείται ανάδευση με VORTEX.
10. Τα δείγματα επωάζονται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου προτού τοποθετηθούν στις κυψελίδες.
11. Μεταφέρονται 100 μL του S και C σε δύο κυψελίδες φωτομέτρου και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης (A) στα 375 nm.

4.2.5 Υπολογισμοί

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

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

$$C (\text{nmol/well}) = A_s - A_c * 100/6,363$$

όπου **As**: Απορρόφηση δείγματος που περιέχει DNPH

και **Ac**: Απορρόφηση δείγματος που δεν περιέχει DNPH

4.3 Προσδιορισμός πρωτεΐνης με μέτρηση της απορρόφησης στα 280nm

4.3.1 Αρχή της μεθόδου

Σε καθαρά διαλύματα πρωτεϊνών η Α στα 280 nm οφείλεται στην παρουσία αρωματικών αμινοξέων και είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης.

4.3.2 Εξοπλισμός – Αντιδραστήρια

ΟΡΓΑΝΑ

- Πιπέτες εύρους 1-10, 10-100 και 100-1000 μL
- Πολυπιπέτα 10-100 μL
- Ειδικό φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- Φυσιολογικός ορός
- Πρότυπο διάλυμα BSA (Bovine Serum Albumin) – 0,1 mg/mL
- Διάλυμα υδροχλωρικής γουανιδίνης

4.3.3 Αναλυτική πορεία

Τα αρχικά βήματα που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης ήταν κοινά με την αναλυτική πορεία που αναφέρθηκε παραπάνω, μέχρι και το στάδιο πριν τη φωτομέτρηση. Πραγματοποιήθηκε δηλαδή:

- Προσθήκη 15 μL ορού και 85 μL απιονισμένου νερού σε 1 eppendorff (εδώ δεν χρησιμοποιήθηκε τυφλό δείγμα)
- Προσθήκη 100 μL DNPH 10 mM (S) στο eppendorff
- Ανάδευση με VORTEX και επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Προσθήκη 30 μL 100% παγωμένου TCA solution σε κάθε δείγμα και ανάδευση με VORTEX

- Επώαση σε πάγο για 5 λεπτά και έπειτα φυγοκέντρηση 10.000g για 10 λεπτά στους 4°C
- Απόχυση υπερκλειμένου και αναδιάλυση ιζήματος σε 500 μL κρύας ακετόνης και ανάδευση με VORTEX
- Τοποθέτηση δειγμάτων σε λουτρό Sonication για περίπου 5 λεπτά
- Επώαση δειγμάτων στους -20°C για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση 10.000g για 10 λεπτά στους 4°C
- Απόχυση του υπερκλειμένου
- Προσθήκη 200 μL 6M υδροχλωρικής γουανιδίνης στο κάθε ίζημα και ανάδευση με VORTEX
- Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και ύστερα τοποθέτηση στις κυψελίδες
- Μεταφορά 90 μL του δείγματος σε μία κυψελίδα φωτομέτρου
- Προσθήκη πρότυπου διαλύματος BSA αναδιαλυμένο σε υδροχλωρική γουανιδίνη και δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς της πρωτεΐνης
- Μέτρηση της απορρόφησης στα 280 nm για τον προσδιορισμό της συνολικής πρωτεΐνης

Πίνακας 3. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς της πρωτεΐνης

Δείγματα	BSA		Γουανιδίνη
	Πυκνό (20mg/dL)	Αραιό (2mg/dL)	
A	-	10μL	80μL
B	-	30μL	60μL
C	-	50μL	40μL
D	-	70μL	20μL
E	-	90μL	-
F	20μL	-	70μL
G	40μL	-	50μL
H	-	-	90μL

4.4 Στατιστική Ανάλυση

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

Όλες οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσος όρος $\pm$ SD (Standard Deviation, Τυπική Απόκλιση). Οι συσχετίσεις μεταξύ των συνεχών μεταβλητών έγιναν με τη χρήση του συντελεστή συσχέτισης Pearson, ενώ μεταξύ μεταβλητών που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή με το συντελεστή συσχέτισης Spearman. Η σύγκριση των τιμών των παραμέτρων, πριν και σε διαφόρους χρόνους μετά την παρέμβαση, έγινε με τη Friedman Rank ανάλυση. Το iAUC υπολογίσθηκε από το εμβαδό που περικλείεται μεταξύ της καμπύλης μεταβολής μίας μετρούμενης παραμέτρου και της νοητής ευθείας παράλληλης στον άξονα χ, η οποία ξεκινά από την τιμή της παραμέτρου σε χρόνο 0. Οι συσχετίσεις των iAUC, μεταξύ των 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).

Δ) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Εισαγωγή

Το πειραματικό σκέλος της μελέτης αυτής, όπως προαναφέρθηκε, βασίστηκε σε δύο βασικά ερωτήματα: Μπορεί, αρχικά, η μεταγευματική υπεργλυκαιμία να επηρεάσει τη δημιουργία πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως δείκτες οξειδωτικού στρες και αν ναι, σε ποιες τιμές γλυκόζης ο οργανισμός θα αδυνατεί να ανταπεξέλθει λόγω του επαγόμενου αυτού οξειδωτικού στρες; Παράλληλα, τέθηκε και το ζήτημα της σύγκρισης μεταξύ παχύσαρκων και νορμοβαρών εθελοντών, προκειμένου να ανακαλύψουμε εάν σε ένα πολύ πρώιμο στάδιο ινσουλινοαντίστασης είναι δυνατό η μεταγευματική υπεργλυκαιμία να οδηγήσει σε αυξημένο οξειδωτικό στρες, προκαλώντας πληθώρα καρδιαγγειακών επιπλοκών.

Έτσι, με σκοπό να επιλυθούν τα ερωτήματα αυτά και να βρεθεί η συσχέτιση μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών, πραγματοποιήθηκαν δύο πειραματικά πρωτόκολλα. Το πρώτο αφορούσε τους εθελοντές φυσιολογικού σωματικού βάρους, στους οποίους χορηγήθηκαν αυξανόμενες φορτίσεις γλυκόζης με σκοπό να επάγουν στα άτομα μεταγευματική υπεργλυκαιμία και υπερινσουλιναίμία, καθώς είναι γνωστό, από την υπάρχουσα βιβλιογραφία, ότι πρόκειται για δύο καταστάσεις που μπορεί να οδηγήσουν σε οξειδωτικό στρες. Κατά το δεύτερο πρωτόκολλο, έγινε μοναδική χορήγηση 75 γρ. γλυκόζης και στις δύο ομάδες εθελοντών. Για τη διεξαγωγή της συγκεκριμένης έρευνας, απομονώθηκαν και μετρήθηκαν από τον ορό των εθελοντών πρωτεϊνικά καρβονύλια τα οποία αποτελούν ισχυρό δείκτη οξείδωσης των πρωτεϊνών. Στο παρόν κεφάλαιο παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα που συλλέχθηκαν καθ' όλη την πειραματική διαδικασία.

2. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ Ι

2.1 Οι νορμοβαρείς εθελοντές της μελέτης

Στη μελέτη συμμετείχαν 10 εθελοντές φυσιολογικού σωματικού βάρους. Τα ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και κλινικά χαρακτηριστικά που συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση είναι η ηλικία, ο ΔΜΣ, η συστολική και η διαστολική αρτηριακή πίεση, ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, ο αιματοκρίτης, ο αριθμός αιμοπεταλίων, η γλυκόζη αίματος, η ινσουλίνη, ο δείκτης ινσουλινοαντίστασης HOMA- IR, τα τριγλυκερίδια και το ουρικό οξύ. Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση στα χαρακτηριστικά των εθελοντών πριν την εφαρμογή της παρέμβασης

Πίνακας 3. Βασικά χαρακτηριστικά νορμοβαρών εθελοντών

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ (t=0)	N	75 γρ.	100 γρ.	150 γρ.	P
Ηλικία	10	28 ± 5,6	28 ± 5,6	28 ± 5,6	NS
BMI (kg/m ²)	10	22,8 ± 2,3	22,5 ± 2,2	22,7 ± 2,1	NS
DBP (mmHg)	10	74,1 ± 7,7	69,1 ± 8,4	70,5 ± 12,4	NS
SBP (mmHg)	10	121,2 ± 14,7	119 ± 7,4	122,1 ± 17,3	NS
WBC (10 ³ /μL)	10	4,6 ± 0,95	5,7 ± 1,9	4,9 ± 0,93	NS
HCT	10	37,7 ± 4,3	39,1 ± 3,3	37,1 ± 3,6	NS
PLT (10 ³ /μL)	10	235,1 ± 53,8	205,5 ± 41,5	212,5 ± 51,5	NS
GLU (mg/dL)	10	83,8 ± 4,1	82,8 ± 5,7	81,1 ± 6,7	NS
INS (μIU/mL)	10	7,5 ± 3,2	7,6 ± 3,2	5,9 ± 3,6	NS
HOMA_IR (mg/dL x mU/L)	10	1,5 ± 0,69	1,5 ± 0,65	1,1 ± 0,68	NS
TAG (mg/dL)	10	53,9 ± 11,3	46,6 ± 12,5	50,9 ± 17,7	NS
URIC (mg/dL)	10	4 ± 1,1	4,2 ± 0,98	3,6 ± 1	NS

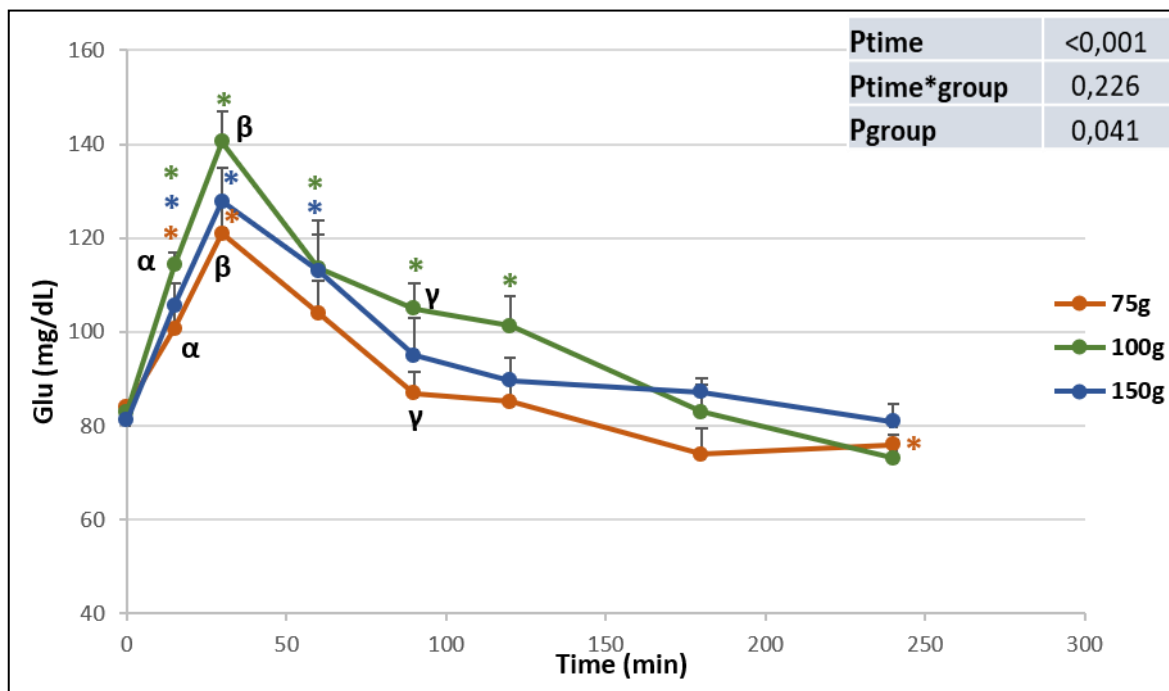
(*NS: μη στατιστικά σημαντικό)

2.2 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης, ινσουλίνης και τριγλυκεριδίων

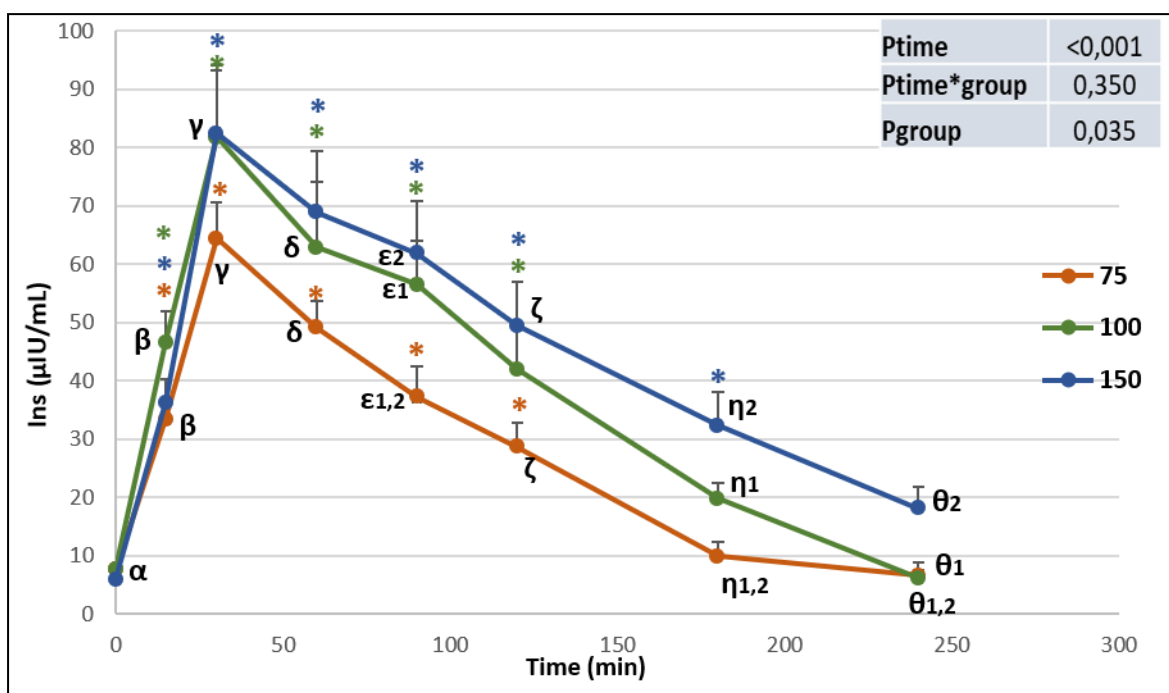
Παρακάτω απεικονίζονται τα διαγράμματα των μεταβολών της γλυκόζης, της ινσουλίνης και των τριγλυκεριδίων των εθελοντών μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, στις απόλυτες τιμές τους.

Σε όλα τα διαγράμματα που ακολουθούν, ο αστερίσκος (*) αντιστοιχεί σε $p < 0,05$ σε σχέση με τη χρονική στιγμή 0, ενώ τα γράμματα (α, β, γ κ.ο.κ) δείχνουν μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των διαφορετικών φορτίσεων στον ίδιο χρόνο.

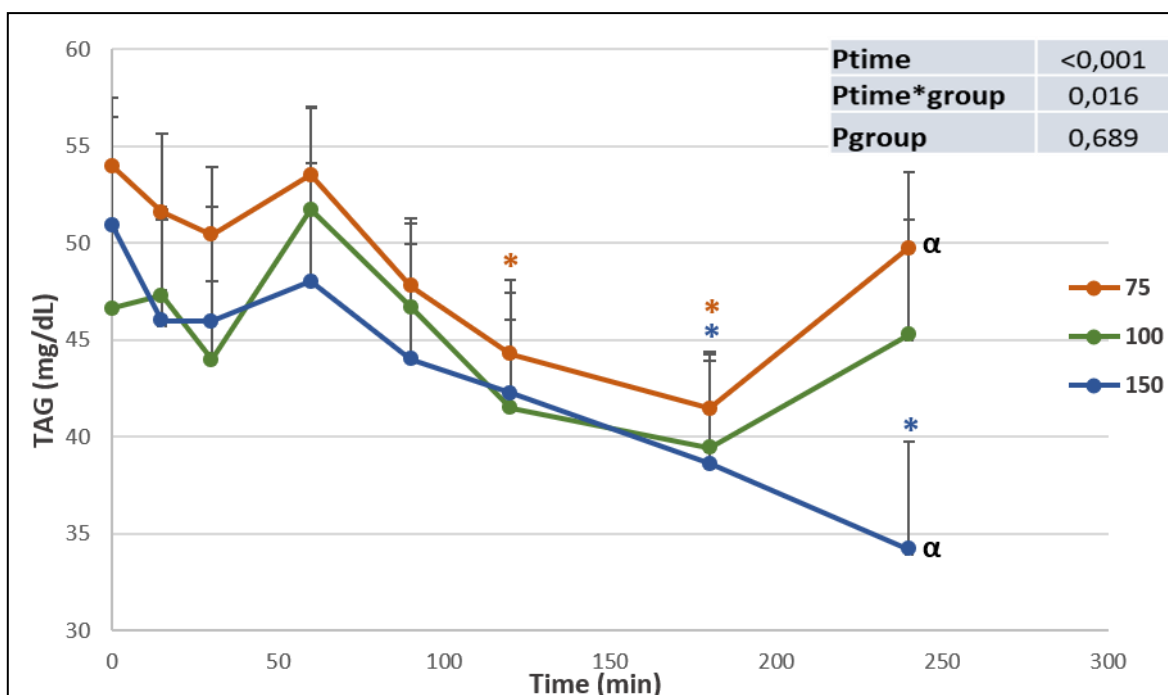
Σχήμα 2. Μεταβολή των απόλυτων τιμών γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις



Σχήμα 3. Μεταβολή των απόλυτων τιμών ινσουλίνης συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις



Σχήμα 4. Μεταβολή των απόλυτων τιμών τριγλυκεριδίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις

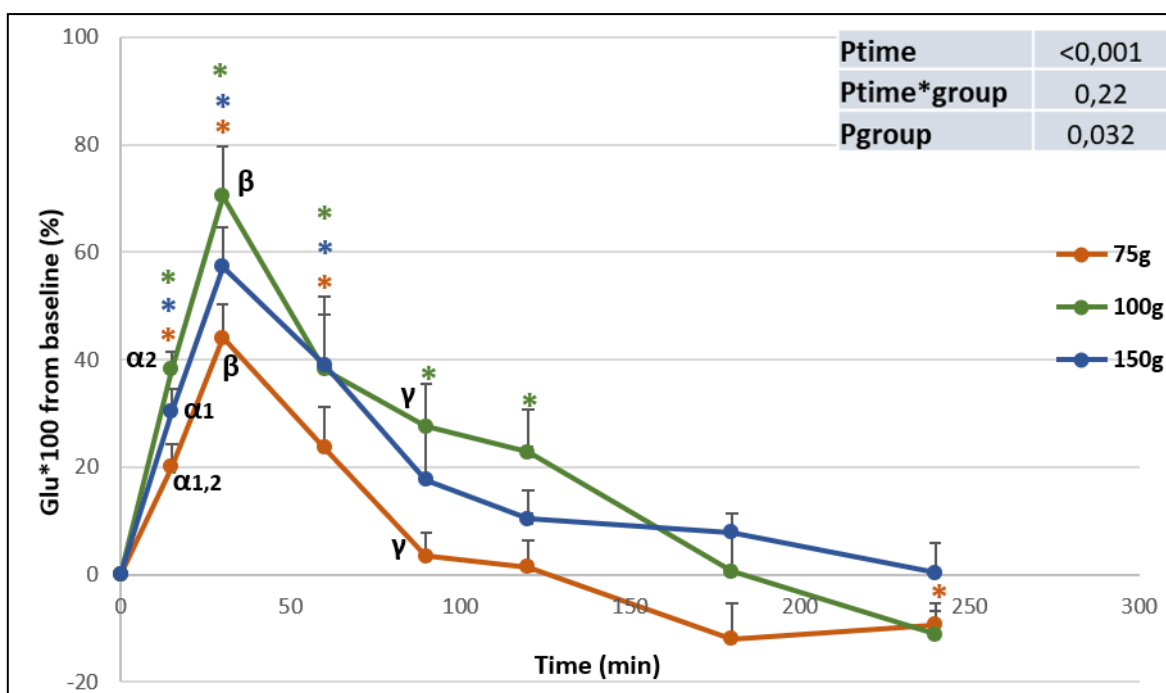


Αναλύοντας τα παραπάνω διαγράμματα, φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης ως προς τον χρόνο και για τα τρία επίπεδα φόρτισης με $p < 0,001$. Αντιστοίχως, φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση και για τα τριγλυκερίδια ως προς τον χρόνο, για τα τρία επίπεδα φόρτισης με 75 γρ: $p = 0,003$, 100 γρ: $p = 0,037$, 150 γρ: $p < 0,001$.

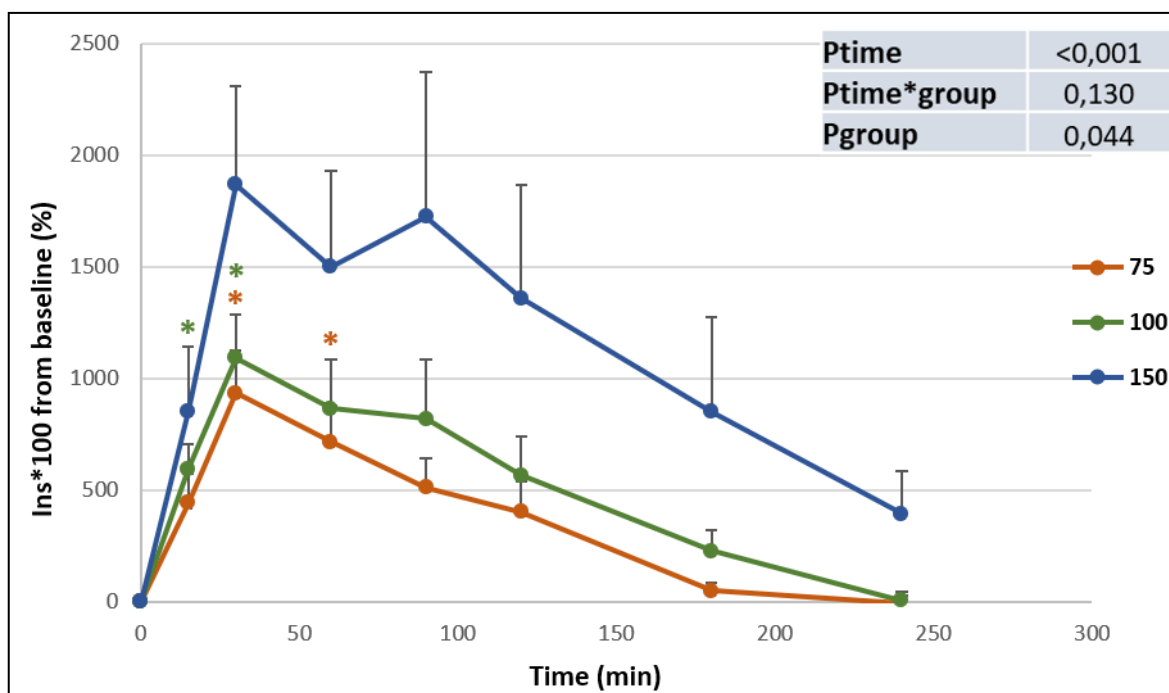
Όσον αφορά τη γλυκόζη, παρατηρείται ότι παρά τις αυξανόμενες φορτίσεις, δεν υπήρξαν σταδιακά επαγόμενες αυξήσεις γλυκόζης. Η υπεργλυκαιμία αυξάνει από τα 75gr στα 100gr και από κει και πέρα σταθεροποιείται. Ωστόσο, στο διάγραμμα της ινσουλίνης διαπιστώνεται η ύπαρξη μίας γραμμικής σχέσης μεταξύ της αυξημένης ποσότητας γλυκόζης και της ινσουλίνης που εκκρίνει αναδραστικά ο οργανισμός. Τα τριγλυκερίδια εμφάνισαν μία δοσοεξαρτώμενη μειωτική τάση, ειδικά μετά τη φόρτιση των 150 γρ. γλυκόζης.

Στη συνέχεια, παρατίθενται τα αντίστοιχα διαγράμματα ποσοστιαίας μεταβολής της γλυκόζης, της ινσουλίνης και των τριγλυκεριδίων σε σχέση με τον χρόνο 0.

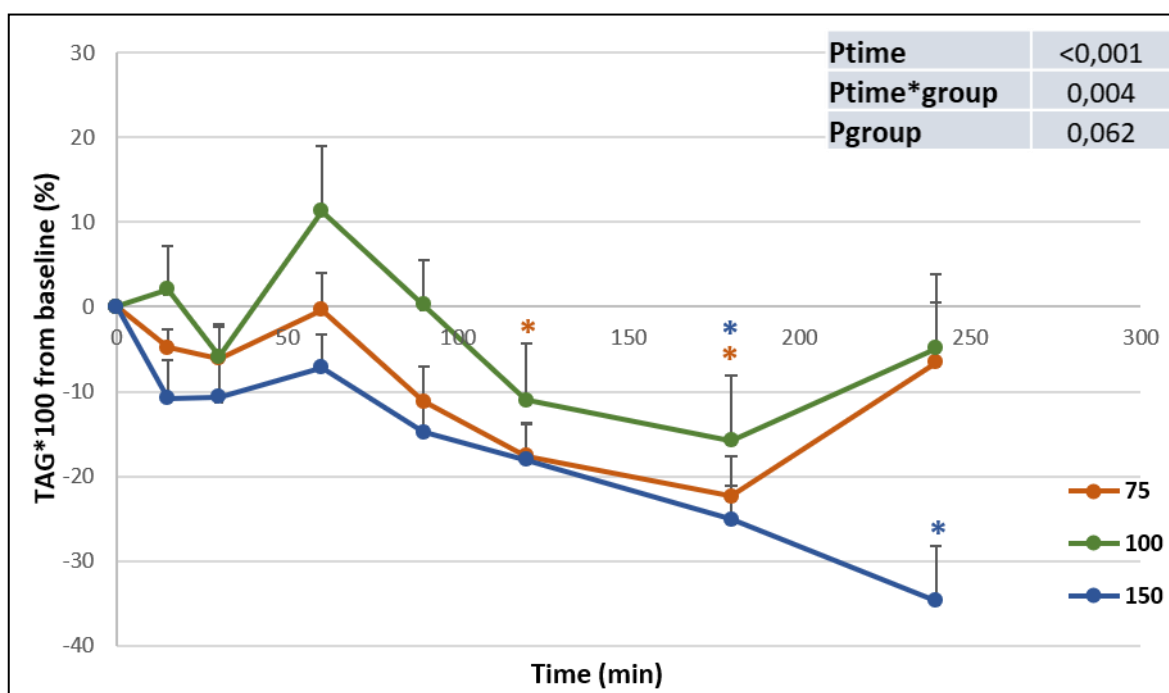
Σχήμα 5. Ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης συναρτήσει του χρόνου



Σχήμα 6. Ποσοστιαία μεταβολή της ινσουλίνης συναρτήσει του χρόνου



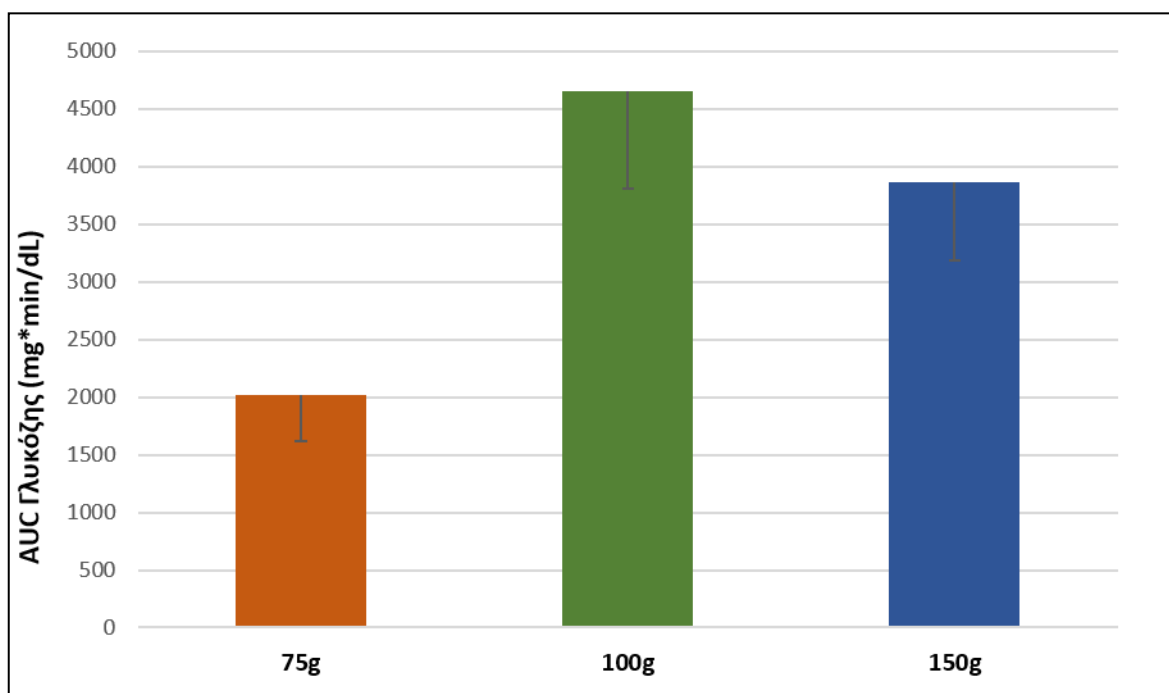
Σχήμα 7. Ποσοστιαία μεταβολή των τριγλυκεριδίων συναρτήσει του χρόνου



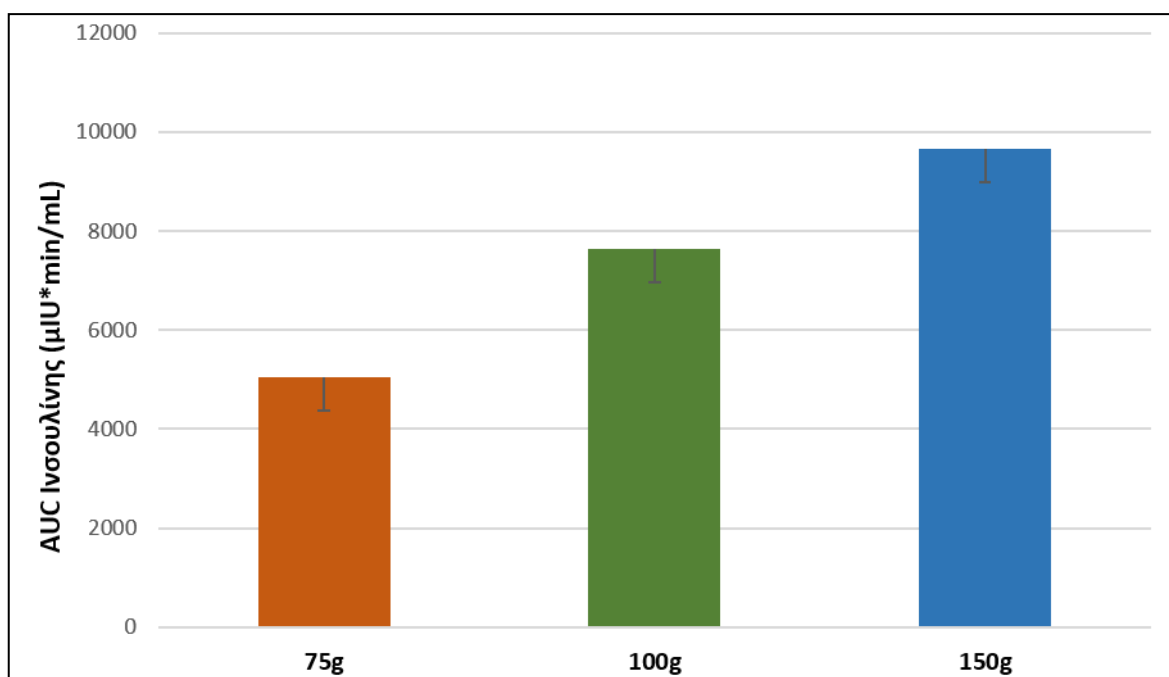
Και στις ποσοστιαίες μεταβολές φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης ως προς τον χρόνο και για τα τρία επίπεδα φόρτισης με $p < 0,001$, όπως και για τα τριγλυκερίδια με 75 γρ: $p = 0,007$, 100 γρ: $p = 0,058$, 150 γρ: $p < 0,001$.

Τέλος, τα αποτελέσματα για τη γλυκόζη, την ινσουλίνη και τα τριγλυκερίδια, ολοκληρώνονται με τα ραβδογράμματα, στα οποία εμφανίζονται τα “εμβαδά για την περιοχή κάτω από την καμπύλη” (Areas Under the Curve ή AUC), υπολογισμένα με βάση τις απόλυτες τιμές κάθε μέτρησης.

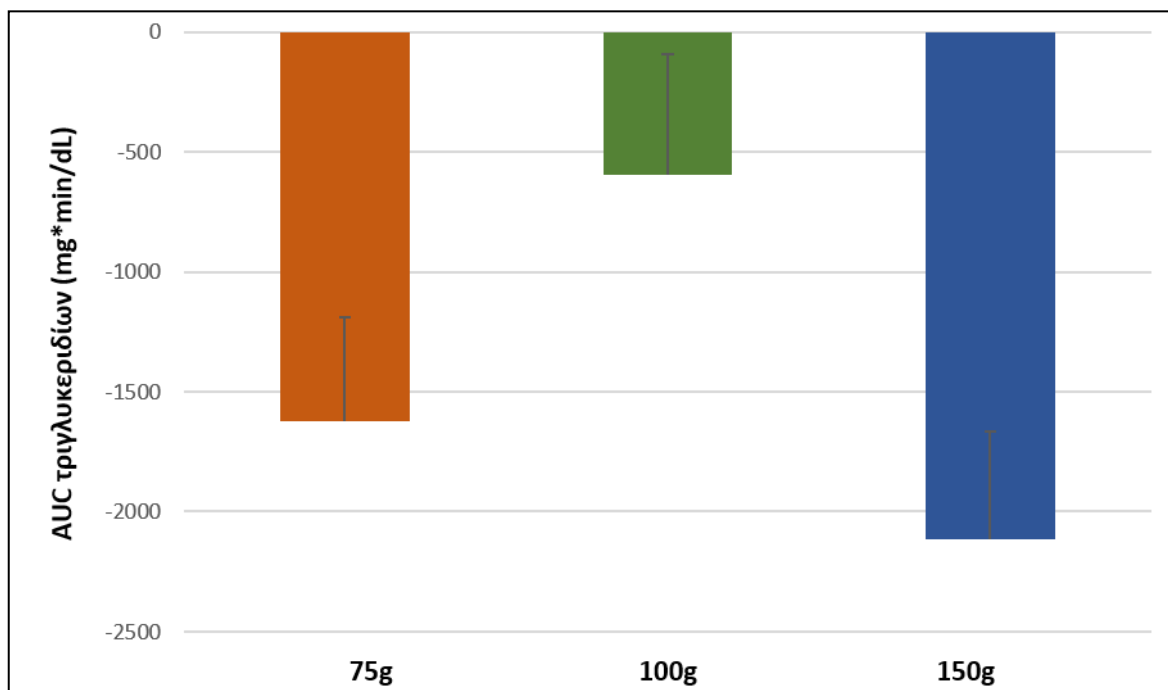
Σχήμα 8. Συγκριτική παράθεση των iAUC της γλυκόζης



Σχήμα 9. Συγκριτική παράθεση των iAUC της ινσουλίνης



Σχήμα 10. Συγκριτική παράθεση των iAUC των τριγλυκεριδίων

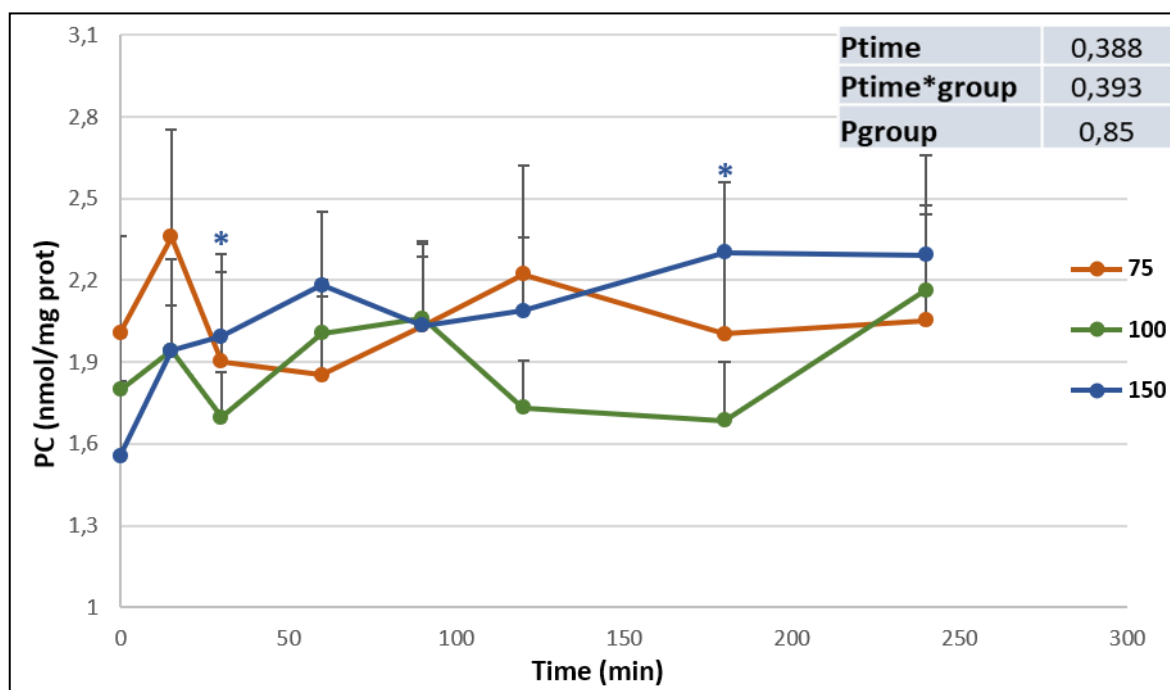


2.3 Επίδραση των διαφορετικών φορτίσεων γλυκόζης στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων

Συνεχίζοντας, παρατίθεται το διάγραμμα μεταβολής των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης, στις απόλυτες τιμές τους. Ακολουθεί το διάγραμμα ποσοστιαίας μεταβολής των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με τον χρόνο 0 και το ραβδόγραμμα iAUC, το οποίο είναι υπολογισμένο με βάση τις απόλυτες τιμές.

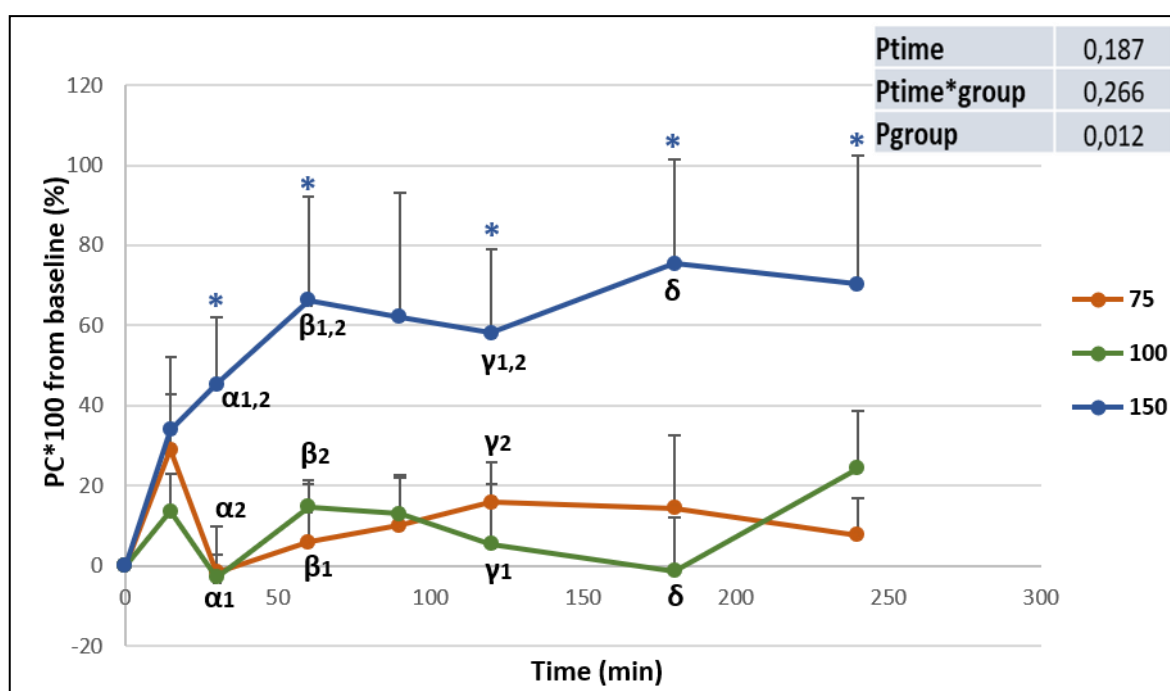
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των απόλυτων τιμών για τα πρωτεϊνικά καρβονύλια έδειξε ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως προς τον χρόνο για κανένα από τα τρία επίπεδα φόρτισης με 75 γρ: $p=0,401$, 100 γρ: $p=0,330$, 150 γρ: $p=0,342$.

Σχήμα 11. Μεταβολή των απόλυτων τιμών πρωτεϊνικών καρβονυλίων συναρτήσει του χρόνου, μετά από τις διαφορετικές φορτίσεις



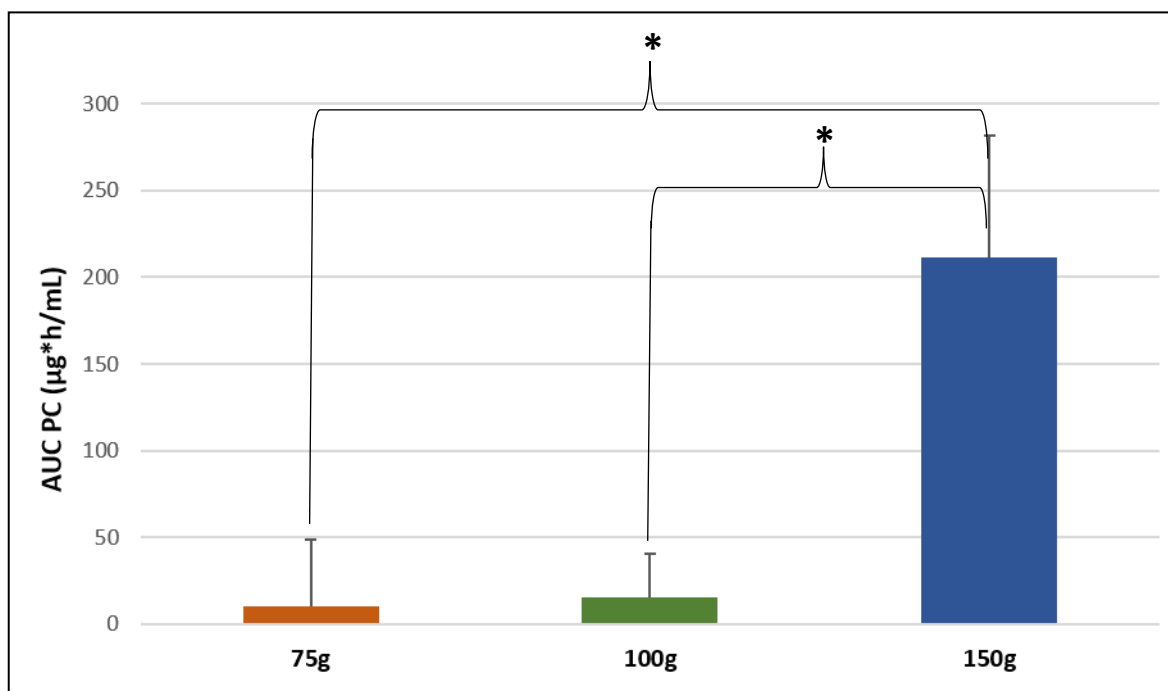
Επιπλέον, ούτε κατά την ποσοστιαία μεταβολή τους βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως προς τον χρόνο, για κανένα από τα τρία επίπεδα φόρτισης με 75 γρ: $p=0,401$, 100 γρ: $p=0,378$, 150 γρ: $p=0,150$.

Σχήμα 12. Ποσοστιαία μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων συναρτήσει του χρόνου



Ωστόσο, συγκρίνοντας τα iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon, παρατηρείται μία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της φόρτισης των 75 γρ. και 150 γρ., όπως και μεταξύ των 100 γρ. και 150 γρ. Επομένως, γίνεται ξεκάθαρο ότι υπάρχει μία πραγματική ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως απάντηση στο αυξημένο οξειδωτικό στρες που προκαλείται στα 150 γρ. γλυκόζης

Σχήμα 13. Συγκριτική παράθεση των AUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων



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

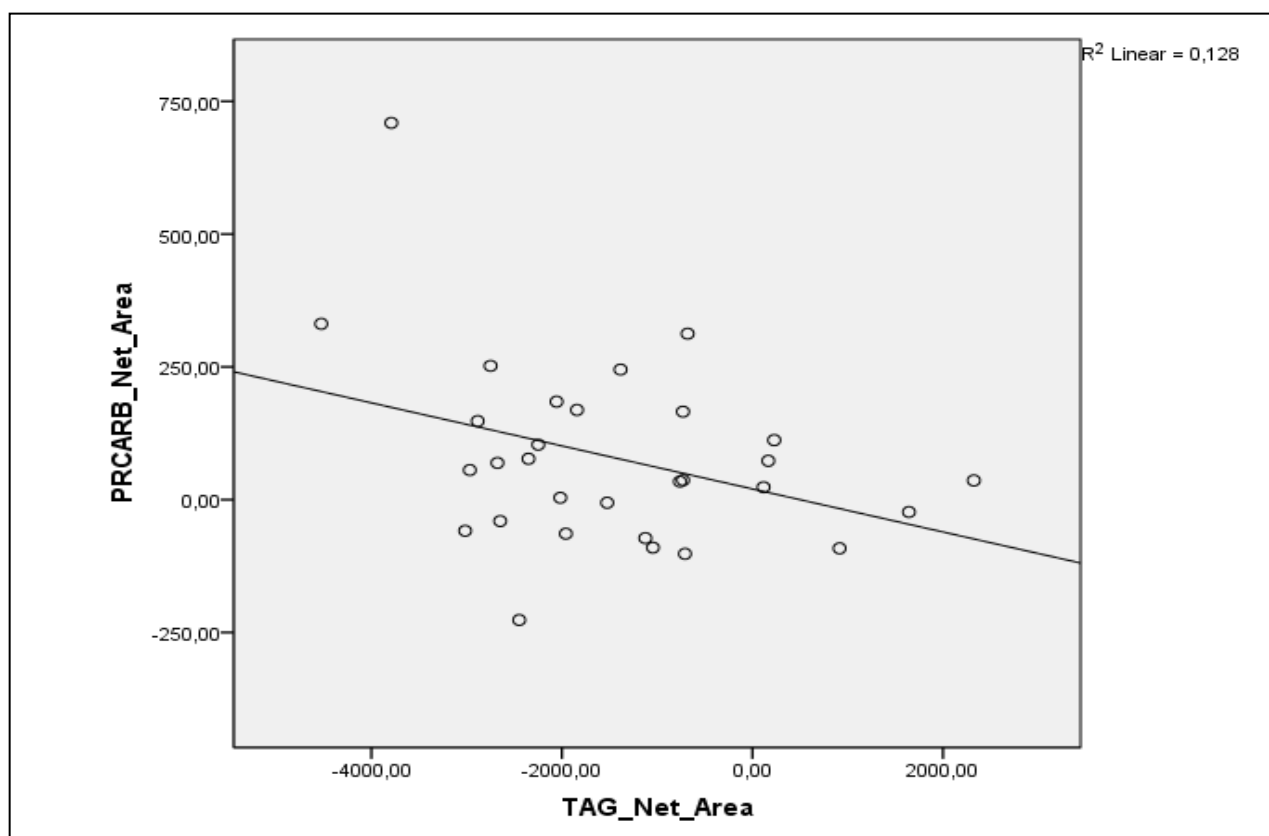
Θέλοντας να ελέγξουμε αν τυχόν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο αίμα των εθελοντών με ορισμένα ανθρωπομετρικά, βιοχημικά και αιματολογικά χαρακτηριστικά κατά τη χρονική στιγμή 0, πραγματοποιήθηκε ανάλυση συσχετίσεων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στον χρόνο 0 με τον ΔΜΣ, τη Διαστολική και Συστολική πίεση, την Σελεκτίνη P (P-Selectin, GMP-140), τον αριθμό λευκοκυττάρων, ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων, τον μέσο όγκο αιμοπεταλίων, τη γλυκόζη, την ινσουλίνη και τα τριγλυκερίδια. Τα αποτελέσματα των συσχετίσεων έδειξαν ότι δεν υπήρχε καμία στατιστικά

σημαντική συσχέτιση μεταξύ πρωτεϊνικών καρβονυλίων και δεικτών σε χρόνο 0, με μοναδική εξαίρεση μία τάση προς τη διαστολική πίεση ($p=0,065$).

2.5 Συσχέτιση της μεταβολής των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις φορτίσεις με τις αντίστοιχες μεταβολές βιοχημικών δεικτών

Στη συνέχεια, συσχετίστηκε το iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με το iAUC της sP-Σελεκτίνης, του αριθμού λευκοκυττάρων, ερυθροκυττάρων και αιμοπεταλίων, του μέσου όγκου αιμοπεταλίων, της γλυκόζης, της ινσουλίνης και των τριγλυκεριδίων, όπου βρέθηκε μία οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα τριγλυκερίδια ($r=-0,358$ και $p=0,052$).

Σχήμα 14. Συσχέτιση iAUC πρωτεϊνικών καρβονυλίων και AUC τριγλυκεριδίων



3. ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ II

3.1 Σύγκριση των δύο ομάδων εθελοντών

Παρακάτω παρατίθενται συγκριτικά τα βασικά χαρακτηριστικά των νορμοβαρών και των παχύσαρκων εθελοντών. Μετρήθηκε η ηλικία, ο ΔΜΣ, η συστολική και η διαστολική αρτηριακή πίεση, ο αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, ο αιματοκρίτης, ο αριθμός αιμοπεταλίων, η γλυκόζη αίματος, η ινσουλίνη, ο δείκτης ινσουλινοαντίστασης HOMA-IR, τα τριγλυκερίδια, οι υδατάνθρακες, η HDL και η LDL χοληστερόλη, το ουρικό οξύ, η ιντερλευκίνη-6 και το μόριο προσκόλλησης αγγειακών κυττάρων (VCAM), το οποίο αποτελεί έναν δείκτη φλεγμονής και ενδοθηλιακής λειτουργίας.

Πίνακας 5. Σύγκριση νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΣ (t=0)	Νορμοβαρείς	Παχύσαρκοι	P
Ηλικία	29,3 ± 6	26,5 ± 7,1	NS
BMI (kg/m ²)	23,4 ± 2,5	35 ± 4,5	<0,001
DBP (mmHg)	74,1 ± 7,7	77,5 ± 12,6	NS
SBP (mmHg)	121,2 ± 14,7	125,7 ± 14,2	NS
WBC (103/μL)	4,6 ± 0,95	6,9 ± 1,4	0,001
HCT	37,7 ± 4,3	38,9 ± 3	NS
PLT (103/μL)	235,1 ± 53,8	250,3 ± 45,3	NS
GLU (mg/dL)	85,6 ± 6,9	86,4 ± 6,7	NS
INS (μIU/mL)	7,2 ± 3	28,9 ± 21,8	0,003
HOMA_IR (mg/dL x mU/L)	1,5 ± 0,64	5,9 ± 4,8	0,006
TAG (mg/dL)	56,7 ± 14,4	95,5 ± 28,3	NS
hsIL6 (ng/mL)	1,04 ± 1,05	0,9 ± 1,1	NS
VCAM (ng/mL)	606,8 ± 259,1	439,3 ± 135,1	NS

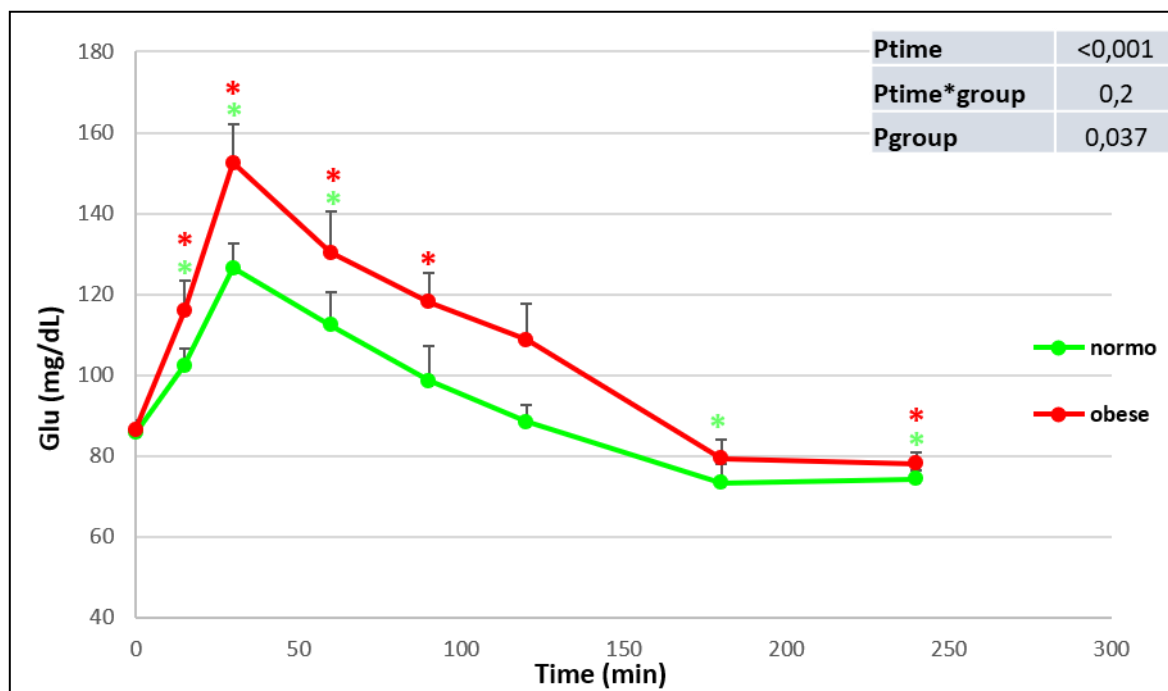
(*NS: μη στατιστικά σημαντικό)

Τελικά, μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών βρέθηκε μία στατιστικά σημαντική διαφορά στον ΔΜΣ ($p < 0,001$), γεγονός που είναι φυσιολογικό μιας και πρόκειται για το κύριο χαρακτηριστικό διαχωρισμού των νορμοβαρών με τους παχύσαρκους εθελοντές. Επιπλέον, στα άτομα με παχυσαρκία φάνηκε ότι τα επίπεδα των λευκοκυττάρων και η ινσουλίνη νηστείας ήταν υψηλότερα από τα άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους, καθώς επίσης και ο δείκτης ινσουλινοαντίστασης HOMA-IR, εμφάνισε μία στατιστικά σημαντική αύξηση στους παχύσαρκους εθελοντές. Επομένως, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα άτομα με παχυσαρκία, ακόμη κι αν δεν πάσχουν από διαταραγμένη ανοχή στη γλυκόζη, ωστόσο μπορεί να εμφανίζουν αυξημένη υποκλινική φλεγμονή αλλά και αυξημένη ινσουλινοαντίσταση.

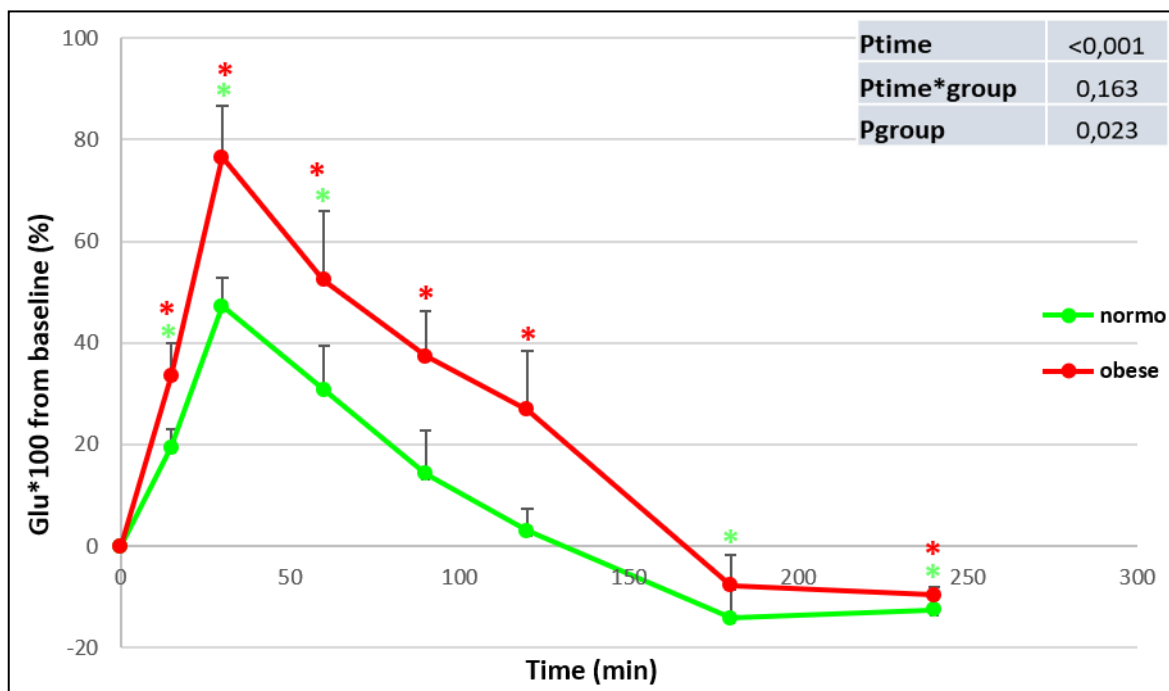
3.2 Επίδραση της φόρτισης γλυκόζης στα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές

Και το πρωτόκολλο αυτό συνεχίζει με τα διαγράμματα γλυκόζης και ινσουλίνης των απόλυτων και ποσοστιαίων μεταβολών σε σχέση με τον χρόνο 0, όπως και με τα διαγράμματα των iAUC για τις δύο ομάδες εθελοντών.

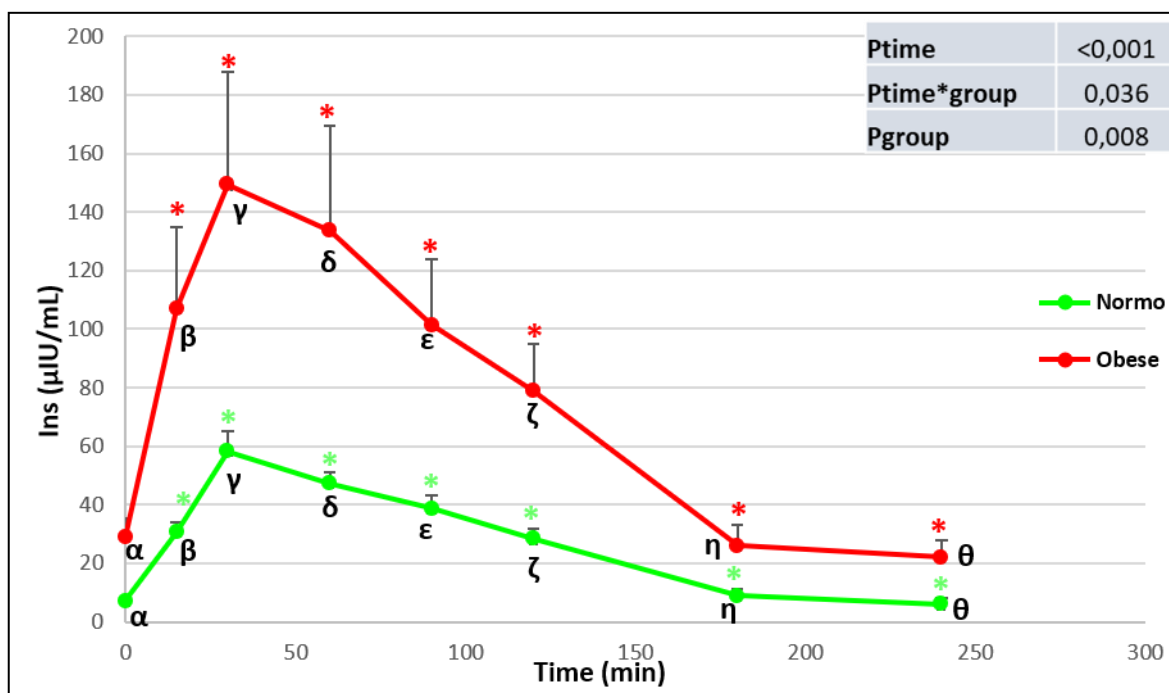
Σχήμα 15. Μεταβολή των απόλυτων τιμών γλυκόζης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης



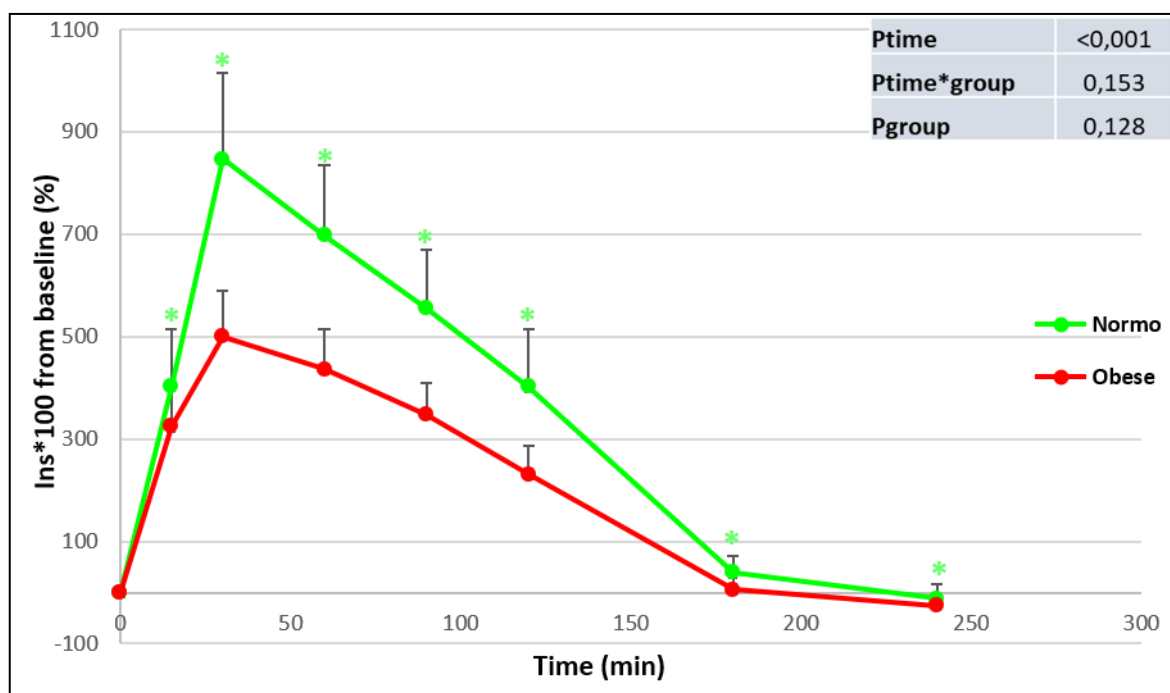
Σχήμα 16. Ποσοστιαία μεταβολή της γλυκόζης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης



Σχήμα 17. Μεταβολή των απόλυτων τιμών ινσουλίνης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης



Σχήμα 18. Ποσοστιαία μεταβολή της ινσουλίνης σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης

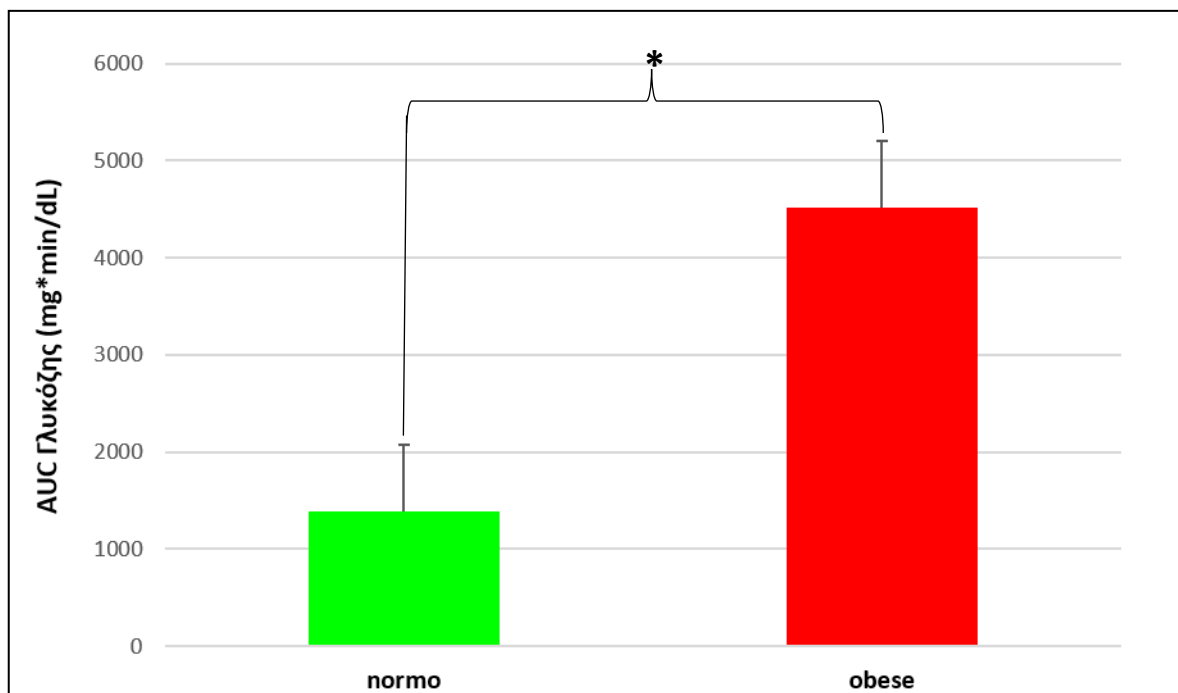


Φάνηκε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων γλυκόζης και ινσουλίνης ως προς τον χρόνο και στις δύο ομάδες παρέμβασης με $p < 0,001$ για τους εθελοντές φυσιολογικού σωματικού βάρους και $p = 0,005$ για τους παχύσαρκους εθελοντές. Είναι φανερό ότι η ομάδα των παχύσαρκων εθελοντών είχε αρκετά μεγαλύτερες τιμές και στα δύο αυτά χαρακτηριστικά σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους, εξαιτίας της αυξημένης ινσουλινοαντίστασης που εμφανίζουν.

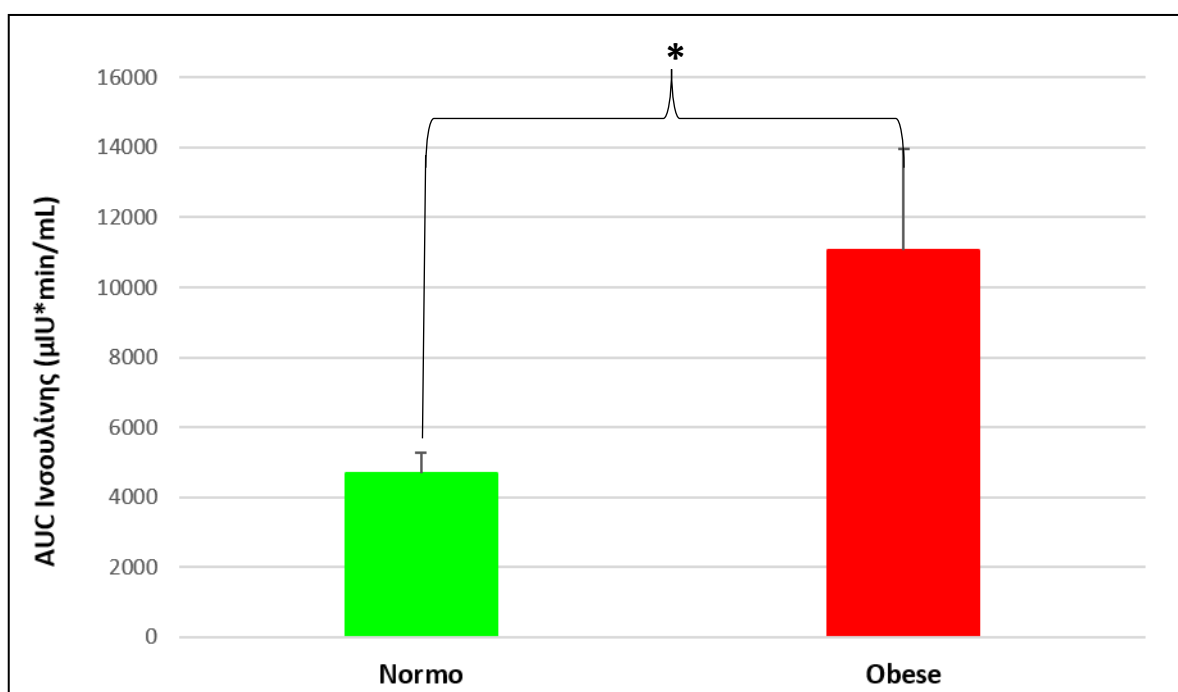
Αξίζει να τονισθεί ότι στην ποσοστιαία μεταβολή της ινσουλίνης, διακρίνεται μεγαλύτερη αύξηση στην καμπύλη των νορμοβαρών εθελοντών, γεγονός που, όμως, είναι λογικό καθώς η ινσουλίνη στα παχύσαρκα άτομα έχει ήδη πολύ υψηλότερες τιμές κατά τον χρόνο 0.

Τα αποτελέσματα ολοκληρώνονται και εδώ με τα ραβδογράμματα των iAUC, τα οποία είναι υπολογισμένα με βάση τις απόλυτες τιμές γλυκόζης και ινσουλίνης.

Σχήμα 19. Συγκριτική παράθεση των iAUC της γλυκόζης μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών



Σχήμα 20. Συγκριτική παράθεση των iAUC της ινσουλίνης μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών

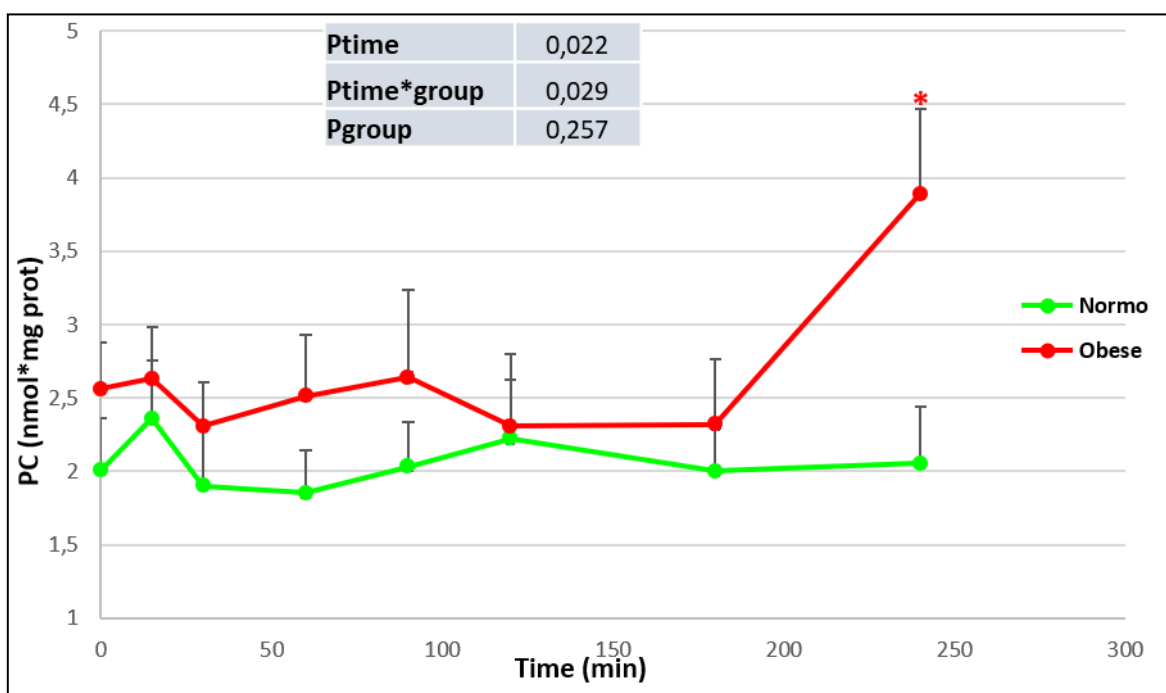


Σύμφωνα με την ανάλυση Wilcoxon, παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων εθελοντών και για τη γλυκόζη με $p=0,034$, αλλά και για την ινσουλίνη με $p=0,035$, με τα παχύσαρκα άτομα να εμφανίζουν, προφανώς, πολύ υψηλότερες τιμές.

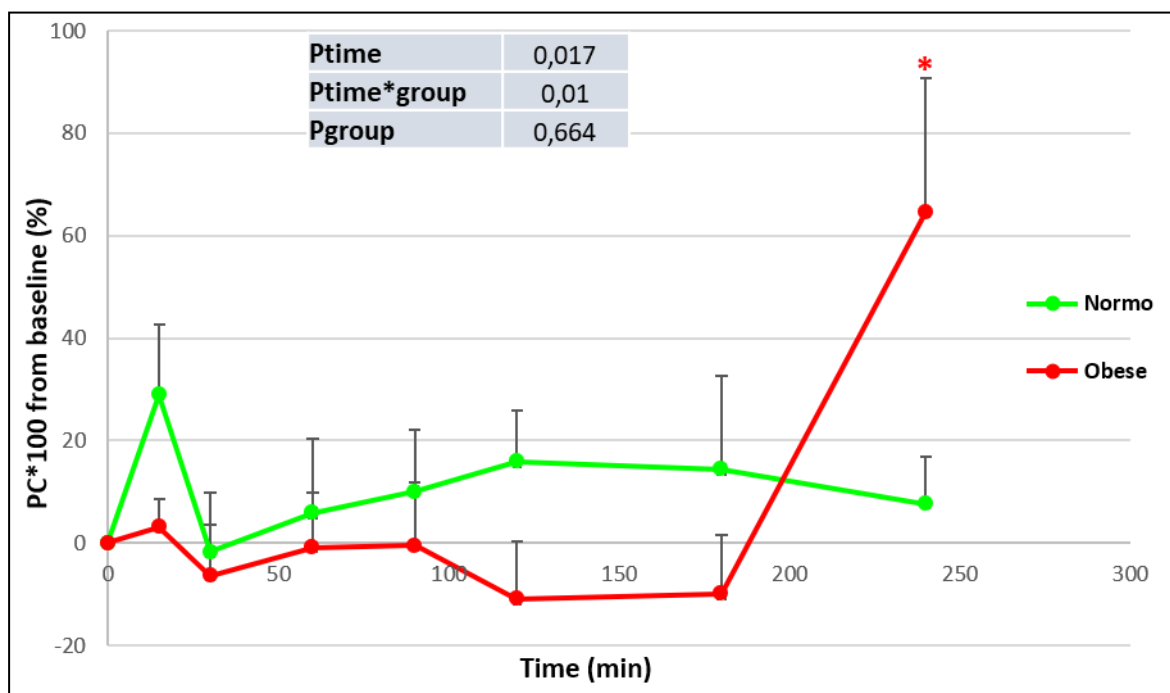
3.3 Επίδραση της φόρτισης γλυκόζης στα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές

Τέλος, ακολουθώντας την ίδια σειρά, παρουσιάζονται τα διαγράμματα των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων για τις δύο ομάδες εθελοντών.

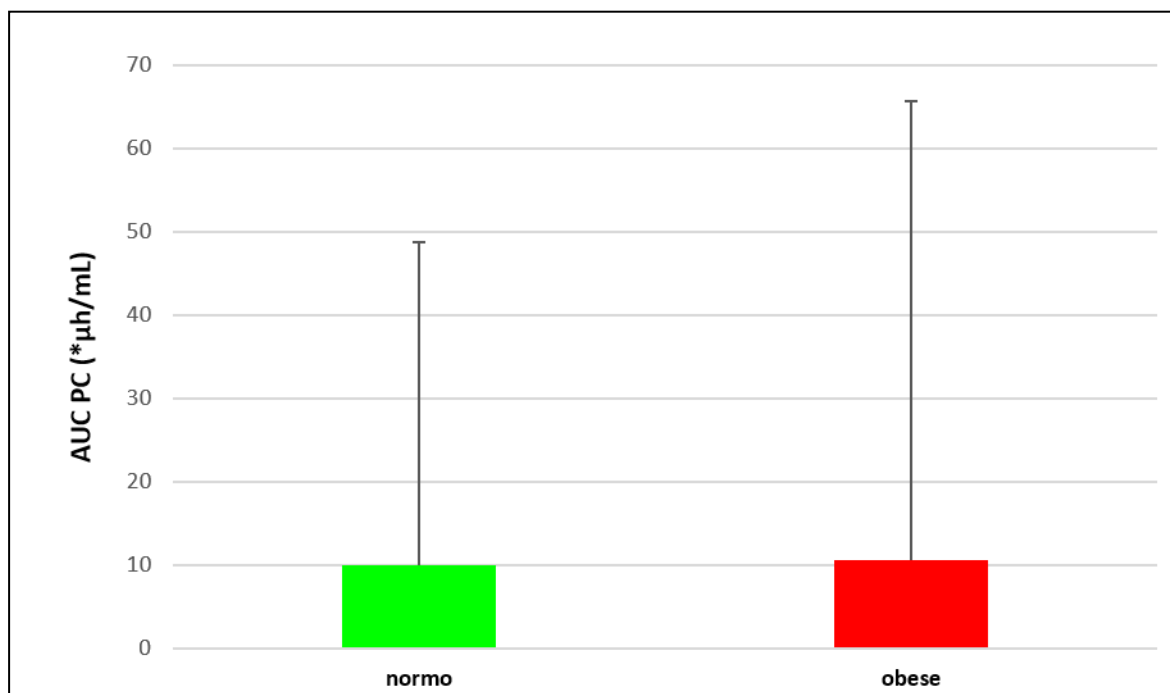
Σχήμα 21. Μεταβολή των απόλυτων τιμών πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης



Σχήμα 22. Ποσοστιαία μεταβολή των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε νορμοβαρείς και παχύσαρκους εθελοντές μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης



Σχήμα 23. Συγκριτική παράθεση των iAUC των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μεταξύ νορμοβαρών και παχύσαρκων εθελοντών



Η ανάλυση έδειξε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων ως προς τον χρόνο μόνο στην ομάδα των παχύσαρκων εθελοντών. Παράλληλα, παρά τη μεγάλη μεταβλητότητα στην απόκλιση των εθελοντών, φάνηκε μία μεγάλη αύξηση των επιπέδων πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις 4 ώρες μόνο στους παχύσαρκους εθελοντές.

Ε) ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Εισαγωγή

Ο μεταγευματικός δυσμεταβολισμός χαρακτηρίζεται από αυξημένη υπεργλυκαιμία και υπερλιπιδαιμία που μπορούν να επιφέρουν μία σειρά επιπλοκών και παθολογικών καταστάσεων, καταλήγοντας τελικά στην αθηρωματική νόσο για την οποία αποτελεί, μάλιστα, και ανεξάρτητο προδιαθεσικό παράγοντα κινδύνου σε ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη αλλά και σε υγιή άτομα. Παράλληλα, μία ακόμα σχετιζόμενη με την υπεργλυκαιμία κατάσταση που συνδέεται ισχυρά με τις καρδιαγγειακές παθήσεις είναι και η ινσουλινοαντίσταση, μέσω της οποίας προκαλούνται δυσλειτουργίες στην ενδοθηλιακή ικανότητα των κυττάρων και κατ' επέκταση ο οργανισμός οδηγείται σε αιμοπεταλιακή συσσώρευση και θρόμβωση. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες που προκαλείται σε καταστάσεις μη φυσιολογικής μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας, φαίνεται να είναι υπεύθυνο για τις μικροαγγειακές και μακροαγγειακές επιπλοκές που προκύπτουν έπειτα από τη συσσώρευση ελεύθερων ριζών στο εσωτερικό των κυττάρων καταστρέφοντας έτσι τους ιστούς.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αναζήτηση της συσχέτισης μεταξύ καταστάσεων οξείας υπεργλυκαιμίας και αυξημένου οξειδωτικού στρες σε υγιή άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους μετά από διαφορετικές φορτίσεις γλυκόζης. Επιπλέον, η εργασία αυτή εξέτασε και το κατά πόσο ο οργανισμός αδυνατεί να αντιμετωπίσει το αυξημένο οξειδωτικό στρες που προκύπτει ύστερα από αυξημένη υπεργλυκαιμία ακόμη και σε ένα πρώιμο προδιαβητικό στάδιο σε παχύσαρκα άτομα.

2. Εθελοντές και κριτήρια επιλογής

Απαραίτητο κριτήριο επιλογής των εθελοντών αποτέλεσε η απουσία διαγνωσμένου ΣΔ, δηλαδή τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας να είναι $\leq 100 \text{ mg/dL}$ και τα επίπεδα μεταγευματικής γλυκόζης να είναι $< 140 \text{ mg/dL}$, να μην χαρακτηρίζονται από υπερλιπιδαιμίες (επίπεδα ολικής χοληστερόλης $\leq 200 \text{ mg/dL}$ και επίπεδα τριακυλογλυκερολών $\leq 150 \text{ mg/dL}$), να έχουν φυσιολογική αρτηριακή πίεση (Συστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 130 \text{ mmHg}$ και Διαστολική Αρτηριακή Πίεση $\leq 85 \text{ mmHg}$), ενώ σημαντικό ήταν να έχουν και ιστορικό ελεύθερο καρδιαγγειακής νόσου αλλά και να μην είναι καπνιστές.

Θα πρέπει, φυσικά, να τονιστεί το γεγονός ότι και οι δύο ομάδες εθελοντών είχαν εξομοιωμένα βιοχημικά, κλινικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, με εξαίρεση το κύριο χαρακτηριστικό διαχωρισμού των δύο ομάδων, τον ΔΜΣ, ο οποίος ήταν $18\text{-}25 \text{ kg/m}^2$ για τους νορμοβαρείς εθελοντές και $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ για τους παχύσαρκους εθελοντές, όπως και τα επίπεδα των λευκοκυττάρων, την ινσουλίνη νηστείας και τον δείκτη ινσουλινοαντίστασης HOMA-IR που εμφάνιζαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές στους παχύσαρκους εθελοντές, γεγονός που ήταν λογικό, καθώς τα παχύσαρκα άτομα εμφάνιζαν αυξημένη ινσουλινοαντίσταση. Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικό ήταν και το νεαρό της ηλικίας των εθελοντών και στις δύο ομάδες παρέμβασης (20-40 ετών), αλλά και το γεγονός ότι δεν λάμβανε κανείς οποιαδήποτε φαρμακευτική αγωγή. Παρόλο που αποδείχθηκε δύσκολη η ένταξη στην μελέτη νέων και παράλληλα υγιών παχύσαρκων εθελοντών, ωστόσο τα άτομα βρέθηκαν κι έτσι καταφέραμε να απομονώσουμε μία μικρή ομάδα του γενικού πληθυσμού που δεν πάσχουν από πολυετή παχυσαρκία (λόγω της νεαρής ηλικίας) και ταυτόχρονα χαρακτηρίζεται από πολύ πρώιμη ινσουλινοαντίσταση.

Η υπάρχουσα βιβλιογραφία περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό αντίστοιχων μελετών που αξιολογούν το αντιοξειδωτικό προφίλ, κυρίως σε ασθενείς με προδιαβήτη ή/και εγκατεστημένο ΣΔ ή Μεταβολικό Σύνδρομο, σε σχέση με υγιή άτομα, μέσω μίας δοκιμασίας ανοχής 75 γρ. γλυκόζης, ενώ σε πολλές μελέτες συμπεριλαμβάνονται κι άλλοι παράγοντες όπως η φυσική δραστηριότητα, στοιχεία της διατροφής των ατόμων, άλλα νοσήματα κλπ. Η διαφοροποίηση της συγκεκριμένης εργασίας βασίζεται στα εξής στοιχεία: Αρχικά, επιχειρήσαμε να προκαλέσουμε στους νορμοβαρείς εθελοντές μας διαφορετικές υπεργλυκαιμίες, χωρίς να περιοριστούμε στη συνηθισμένη ποσότητα των 75 γρ. Μάλιστα, και οι τρεις διαφορετικές φορτίσεις που πραγματοποιήσαμε, έγιναν σε κάθε εθελοντή προκειμένου να διαπιστώσουμε τελικά από ποια

ποσότητα γλυκόζης κι έπειτα, μπορεί η υπεργλυκαιμία να οδηγήσει σε αυξημένο οξειδωτικό στρες.

3. Δεδομένα άλλων μελετών

Κατά τη διαδικασία αναζήτησης της βιβλιογραφίας, διαπιστώθηκε ότι οι μελέτες που συμπεριλαμβάνουν φορτίσεις γλυκόζης και χρησιμοποιούν παράλληλα τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ως δείκτες οξειδωτικού στρες ήταν περιορισμένες. Υπήρχαν αρκετές έρευνες που σχετίζονταν με πειραματικά πρωτόκολλα εφαρμοσμένα σε πειραματόζωα, οι οποίες αποκλίνουν από τον πληθυσμό-στόχο της παρούσας εργασίας, που δεν ήταν άλλος από τον ίδιο τον άνθρωπο. Ωστόσο, ακολουθεί μία σύντομη αναφορά των σημαντικότερων ευρημάτων από άλλες μελέτες κι έρευνες με παρόμοιο ερευνητικό αντικείμενο.

Στη μελέτη των Gordon Fisher et al. [25], εξετάστηκαν τα πρωτεϊνικά καρβονύλια ως δείκτες οξειδωτικού στρες σε σχέση με την ινσουλινοαντίσταση, σε πληθυσμούς υγιών γυναικών με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης ΣΔ τύπου II, αλλά φυσιολογικούς δείκτες ανοχής στη γλυκόζη. Στις συμμετέχουσες πραγματοποιήθηκε ενδοφλέβια δοκιμασία ανοχής γλυκόζης, την οποία ακολούθησε και έγχυση ινσουλίνης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, ανάλογα με την εθνικότητα των γυναικών, τα πρωτεϊνικά καρβονύλια συσχετίστηκαν και με έναν δείκτη ευαισθησίας στην ινσουλίνη, όπως και με το ποσοστό σωματικού λίπους και τον ενδοκοιλιακό λιπώδη ιστό. Παράλληλα, υπήρξε μία θετική συσχέτιση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και με την συγκέντρωση ελεύθερων λιπαρών οξέων, ενώ γυναίκες με υψηλότερες συγκεντρώσεις γλυκόζης-ελευθέρων λιπαρών οξέων είχαν σημαντικά μεγαλύτερη συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σχέση με εκείνες που είχαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Τα ευρήματα της συγκεκριμένης μελέτης, παρόλο που συγκρίνονται μεταξύ συγκεκριμένων πληθυσμών, μας επιβεβαιώνουν ότι το οξειδωτικό στρες είναι πιθανό να επηρεάζει σημαντικά το φαινόμενο της ινσουλινοαντίστασης.

Σε μία αντίστοιχη μελέτη των Ikonomidis et al. [26], η οποία δημοσιεύθηκε το 2022, εξετάστηκε το οξειδωτικό στρες σε 40 άτομα που ήταν συγγενείς πρώτου βαθμού διαβητικών ασθενών με φυσιολογικά αποτελέσματα δοκιμασίας ανοχής γλυκόζης από το στόμα (OGTT), 40 άτομα με μη φυσιολογικά αποτελέσματα OGTT και 20 άτομα με φυσιολογικά αποτελέσματα OGTT. Διάφοροι δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, αξιολογήθηκαν ανά 30 λεπτά, από τον χρόνο 0, έως και 120 λεπτά μετά από φόρτιση 75 γρ. γλυκόζης. Τελικά, φάνηκε ότι μετά

τη φόρτιση γλυκόζης δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές στα πρωτεϊνικά καρβονύλια σε καμία από τις τρεις ομάδες της μελέτης. Οι ερευνητές στηρίζουν το γεγονός αυτό στο ότι είναι πιθανό μετά την πρόκληση της υπεργλυκαιμίας, να μειώθηκαν τα επίπεδα αντιοξειδωτικών, όπως η γλουταθειόνη, αντανakλώντας έτσι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από την αύξηση της γλυκόζης.

Μία ενδιαφέρουσα μελέτη με παιδιά και εφήβους, επιχείρησε να συσχετίσει το οξειδωτικό στρες και τη φλεγμονή ως μηχανισμούς ινσουλινοαντίστασης συνδεόμενους με την παχυσαρκία, μέσω μίας από του στόματος δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη (OGTT), με την τυπική δόση των 75 γρ. γλυκόζης. Τελικά, υποστήριξε ότι η μεταγευματική υπεργλυκαιμία που προκαλείται μετά τη φόρτιση δεν είναι ικανή να επιφέρει σοβαρή ενδοθηλιακή βλάβη και κατ' επέκταση αυξημένο οξειδωτικό στρες και φλεγμονή σε αυτές τις ηλικιακές ομάδες, ακόμη και σε παχύσαρκα άτομα. Βέβαια, υπογραμμίστηκε ότι ο βαθμός της μεταγευματικής υπεργλυκαιμίας που φυσιολογικά συνδέεται άμεσα με την ενδοθηλιακή λειτουργία και το οξειδωτικό στρες, μπορεί να έχει επιπτώσεις σε νέους που αντιμετωπίζουν μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη ή/και ΣΔ τύπου II [27].

Σε μία διαφορετική προσέγγιση, με εθελοντές υγιείς άνδρες νεαρής ηλικίας, δόθηκαν 4 διαφορετικά γεύματα ή ποτά με υδατάνθρακες ή λίπος: 75 γρ. δεξτρόζης, 150 γρ. δεξτρόζης, 33 γρ. λιπιδίων και 66 γρ. λιπιδίων και συλλέχθηκαν δείγματα αίματος στους χρόνους 0, 30, 60, 120 και 180 λεπτά. Τα δείγματα προσδιορίστηκαν με βάση τη γλυκόζη, τα τριγλυκερίδια, τη μηλουλο-δεαλδεΰδη (MDA) και το H_2O_2 . Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες που προκαλείται μετά την πρόσληψη των 75 γρ. ή των 150 γρ. δεξτρόζης, αλλά και των 33 γρ. λιπιδίων ήταν σε πολύ μικρό ποσοστό, ενώ μόνο στα 66 γρ. λιπιδίων φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες στον οργανισμό στον συγκεκριμένο πληθυσμό. Επομένως, σύμφωνα με αυτά τα ευρήματα και με τους συγκεκριμένους δείκτες οξειδωτικού στρες, βρέθηκε ότι ακόμα και με ένα πολύ υψηλό φορτίο απλού σακχάρου, η υπεργλυκαιμία που προκαλείται δεν οδηγεί σε σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες [28].

4. Πρωτόκολλο Ι

Όσον αφορά το πρώτο πρωτόκολλο, από την ανάλυση των αποτελεσμάτων φάνηκε ότι όντως καταφέραμε, μέσω των διαφορετικών φορτίσεων, να επιτύχουμε αυξημένες μεταγευματικές υπεργλυκαιμίες, αλλά κυρίως αυξημένες υπερινσουλιαιμίες. Παρατηρώντας τις τιμές των δεικτών στα διαγράμματα μπορούμε να διαπιστώσουμε ότι μετά 75 γρ. και τα 100 γρ. γλυκόζης, η γλυκόζη αίματος δεν αυξάνεται δραματικά, καθώς εξαιτίας της προκαλούμενης από τη φόρτιση υπεργλυκαιμίας, ενεργοποιείται αυτομάτως μεγαλύτερη έκκριση της ινσουλίνης από τα β-κύτταρα του παγκρέατος, προκειμένου να διατηρηθεί η γλυκόζη σε όσο το δυνατόν πιο σταθερά επίπεδα γίνεται και να αποφευχθεί η πρόκληση οξείας υπεργλυκαιμίας.

Η γλυκόζη φαίνεται να παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αύξηση στα 30 λεπτά και στις τρεις διαφορετικές φορτίσεις, με τη φόρτιση των 100 γρ. να εμφανίζει την υψηλότερη τιμή γλυκόζης (140 mg/dL) σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες συγκρίσεις. Παρατηρούμε, επίσης, ότι σε όλες τις φορτίσεις, στις 4 ώρες από την έναρξη της παρέμβασης, η τιμή της γλυκόζης είναι περίπου ίδια με την τιμή στον χρόνο 0, ωστόσο στατιστική σημαντικότητα στη σχέση αυτή υπήρχε μόνο στα 75 γρ. Οι αρχικές απόλυτες τιμές της ινσουλίνης ξεκίνησαν από περίπου 5 μIU/ml σε όλες τις φορτίσεις και εμφάνισαν τη μεγαλύτερη τιμή τους στα 30 λεπτά, όπως ακριβώς συνέβη και με τη γλυκόζη. Εδώ, ωστόσο, η αύξηση είναι αρκετά μεγαλύτερης κλίμακας απ' ό,τι στη γλυκόζη, κάτι που περιμέναμε να συμβεί, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Στα 30 λεπτά, στις φορτίσεις των 100 γρ. και των 150 γρ. γλυκόζης, εμφανίζεται η υψηλότερη τιμή της ινσουλίνης (80 μIU/ml). Επομένως, καταφέραμε να προκαλέσουμε μία γραμμική δοσοεξαρτώμενη αύξηση της υπερινσουλιαιμίας.

Τέλος, όσον αφορά τα τριγλυκερίδια, οι τιμές τους εμφάνισαν μία τάση ελάττωσης, ειδικά μετά τα 150 γρ. γλυκόζης. Είναι ευρέως γνωστό ότι η περίσσεια γλυκόζης αποθηκεύεται στο ήπαρ με τη μορφή λίπους καθώς μετατρέπεται σε λιπαρά οξέα και έπειτα σε τριγλυκερίδια, τα οποία με τη σειρά τους εισχωρούν στις VLDL και βγαίνουν στην κυκλοφορία. Παρόλη την περίσσεια της γλυκόζης όμως, τα τριγλυκερίδια άρχισαν να μειώνονται μετά τις φορτίσεις, χάρη στη δράση της ινσουλίνης, η οποία παράγοντας τη λιποπρωτεϊνική λιπάση, οδηγεί σε υδρόλυση των τριγλυκεριδίων σε λιπαρά οξέα και αποθήκευσή τους στον λιπώδη ιστό. Με λίγα λόγια, φάνηκε ότι η εκκαθάριση των τριγλυκεριδίων από την ινσουλίνη ήταν ισχυρότερη από την έξοδό τους από το ήπαρ.

Εξετάζοντας τις τιμές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τις διαφορετικές φορτίσεις, διαπιστώσαμε ότι μόνο η φόρτιση των 150 γρ. γλυκόζης κατάφερε να οδηγήσει σε αυξήσεις των πρωτεϊνικών καρβονυλίων, οι οποίες εμφανίστηκαν στις 3-4 ώρες από τη φόρτιση γλυκόζης, γεγονός που μας αποδεικνύει ότι η ποσότητα της προσλαμβανόμενης γλυκόζης, και κατ' επέκταση η υπερινσουλιναμία και η υπεργλυκαιμία που προκαλεί η πρόσληψη αυτή, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μονάχα σε πολύ μεγάλες προσλήψεις γλυκόζης.

Τέλος, κατά τη συσχέτιση των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με διάφορους ανθρωπομετρικούς, βιοχημικούς και αιματολογικούς δείκτες, βρέθηκε μία οριακά στατιστικά σημαντική συσχέτιση με τα τριγλυκερίδια ($p=0,052$), η οποία όμως δεν πρόκειται για μία αιτιολογική συσχέτιση, παρά για μία απλή λογική σχέση.

5. Πρωτόκολλο II

Όπως ήταν αναμενόμενο, τα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης στα άτομα με παχυσαρκία ήταν σημαντικά υψηλότερα μετά τη φόρτιση γλυκόζης σε σχέση με τα άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους. Και εδώ ισχύει ότι η ανοχή στη γλυκόζη επάγει αντιδραστικά την υπερέκκριση ινσουλίνης, η οποία παραμένει σε αρκετά υψηλά επίπεδα στο αίμα για μεγάλο χρονικό διάστημα ακόμα και μετά τη λήψη τροφής. Επομένως, θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι ο παράγοντας της παχυσαρκίας αρκεί για να θεωρήσουμε ότι ένα άτομο μπορεί να εμφανίσει ινσουλινοαντίσταση.

Εξετάζοντας τις τιμές των πρωτεϊνικών καρβονυλίων μετά τη φόρτιση γλυκόζης στις δύο ομάδες εθελοντών, φάνηκε ότι υπήρχε μία τάση αύξησης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στους παχύσαρκους εθελοντές στις 4 ώρες, όχι όμως και στους νορμοβαρείς εθελοντές. Μπορούμε, επομένως, να θεωρήσουμε ότι τα άτομα με παχυσαρκία φαίνεται να έχουν μία διαταραγμένη παραγωγή πρωτεϊνικών καρβονυλίων, η οποία εμφανίζεται κυρίως στις 4 ώρες μετά από φόρτιση γλυκόζης.

Εν κατακλείδι, η παχυσαρκία φάνηκε πως μπορεί να επηρεάσει το μεταγευματικό οξειδωτικό στρες και αυτό να αποτελέσει με τη σειρά του προδιαθεσικό μηχανισμό εξήγησης της βλαπτικής επίδρασης της παχυσαρκίας στα καρδιαγγειακά νοσήματα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Γάλαρης, Δ. (2015). *Ελεύθερες ρίζες και οξειδωτικό στρες*. [ηλεκτρονικό βιβλίο] Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/5113>
2. Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the Knowledge of Free Radicals and Other Oxidants. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 9829176. <https://doi.org/10.1155/2020/9829176>
3. Oliveira, T., Gusmão, N. B., Silva, L., & Coelho, L. (2021). Free Radicals and Actinobacteria as a Misexplored Goldmine of Antioxidant Compounds. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 93 (suppl 3), 20201925. <https://doi.org/10.1590/0001-3765202120201925>
4. Obeagu Emmanuel Ifeanyi. (2018). A Review on Free Radicals and Antioxidants. *Int. J. Curr. Res. Med. Sci.*, 4(2): 123-133. <http://dx.doi.org/10.22192/ijcrms.2018.04.02.019>
5. Srinivas, U. S., Tan, B., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
6. Yang, S., Lian, G. (2020) ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03667-9>
7. Rahal, A., Kumar, A., Singh, V., Yadav, B., Tiwari, R., Chakraborty, S., & Dhama, K. (2014). Oxidative stress, prooxidants, and antioxidants: the interplay. *BioMed research international*, 761264. <https://doi.org/10.1155/2014/761264>
8. Eleutherio, E., Silva Magalhães, R. S., de Araújo Brasil, A., Monteiro Neto, J. R., & de Holanda Paranhos, L. (2021). SOD1, more than just an antioxidant. *Archives of biochemistry and biophysics*, 697, 108701. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108701>
9. He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., & Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 44(2), 532–553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
10. Συντώσης, Λ., Σκενδέρη, Α. (2016). Όργανα και ιστοί που διαχειρίζονται μεταβολικά υποστρώματα, *Διατροφή & Μεταβολισμός* (σ.102-120). Λευκωσία: Broken Hill Publishers LTD

11. Συντώσης, Λ., Σκενδέρη, Α. (2016). Σύνδεση και ρύθμιση του μεταβολισμού των μακροθρεπτικών συστατικών, *Διατροφή & Μεταβολισμός* (σ.213-221). Λευκωσία: Broken Hill Publishers LTD
12. Pappas, C., Kandaraki, E. A., Tsirona, S., Kountouras, D., Kassi, G., & Diamanti-Kandarakis, E. (2016). Postprandial dysmetabolism: Too early or too late?. *Hormones* (Athens, Greece), 15(3), 321–344. <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1697>
13. Alves-Bezerra, M., & Cohen, D. E. (2017). Triglyceride Metabolism in the Liver. *Comprehensive Physiology*, 8(1), 1–8. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170012>
14. Czech MP. (2017) Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes. *Nat Med.*, 23(7), 804-814. <https://doi.org/10.1038/nm.4350>
15. Gołębek, K. D., & Regulska-Ilow, B. (2019). Dietary support in insulin resistance: An overview of current scientific reports. *Advances in clinical and experimental medicine: official organ Wroclaw Medical University*, 28(11), 1577–1585. <https://doi.org/10.17219/acem/109976>
16. Ormazabal, V., Nair, S., Elfeky, O., Aguayo, C., Salomon, C., & Zuñiga, F. A. (2018). Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. *Cardiovascular diabetology*, 17(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12933-018-0762-4>
17. American Diabetes Association: Hyperglycemia (High Blood Glucose). Ανακτήθηκε στις 12 Ιουνίου, 2022, από: <https://www.diabetes.org/healthy-living/medication-treatments/blood-glucose-testing-and-control/hyperglycemia>
18. Μελιδώνης, Α. Μεταγευματική Υπεργλυκαιμία και διακύμανση επιπέδων γλυκόζης – Ελληνικό Κολέγιο Μεταβολικών Νοσημάτων. Ε.ΚΟ.ΜΕ.Ν. Ανακτήθηκε: <https://www.ekomen.net/%CE%BC%CE%B5%CF%84%CE%B1%CE%B3%CE%B5%CF%85%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%B9%CE%BA%CE%AE%CF%85%CF%80%CE%B5%CF%81%CE%B3%CE%BB%CF%85%CE%BA%CE%B1%CE%B9%CE%BC%CE%AF%CE%B1%CE%BA%CE%B1%CE%B9%CE%B4%CE%B9%CE%B1/>
19. Κολοβού, Γ. (2021). *Μεταγευματικός δυσμεταβολισμός - Μεταγευματική λιπαιμία: Διάγνωση, κλινική σημασία, θεραπευτικές παρεμβάσεις*. Ημερίδες Μεταβολισμού ΑΠΟ ΤΗΝ ΤΕΚΜΗΡΙΩΜΕΝΗ ΓΝΩΣΗ ΣΤΗΝ ΟΡΘΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΠΡΑΞΗ. Αθήνα, Δεκέμβρης, 16-18
20. Colombo, G., Reggiani, F., Angelini, C., Finazzi, S., Astori, E., Garavaglia, M. L., Landoni, L., Portinaro, N. M., Giustarini, D., Rossi, R., Santucci, A., Milzani, A., Badalamenti, S., & Dalle-Donne, I. (2020). Plasma Protein Carbonyls as Biomarkers of Oxidative Stress in Chronic

- Kidney Disease, Dialysis, and Transplantation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020, 2975256. <https://doi.org/10.1155/2020/2975256>
21. Hauck, A. K., Huang, Y., Hertz, A. V., & Bernlohr, D. A. (2019). Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *The Journal of biological chemistry*, 294(4), 1083–1088. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003214>
 22. Kehm, R., Baldensperger, T., Raupach, J., & Höhn, A. (2021). Protein oxidation - Formation mechanisms, detection and relevance as biomarkers in human diseases. *Redox biology*, 42, 101901. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101901>
 23. Onyango A. N. (2018). Cellular Stresses and Stress Responses in the Pathogenesis of Insulin Resistance. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018, 4321714. <https://doi.org/10.1155/2018/4321714>
 24. Papachristoforou, E., Lambadiari, V., Maratou, E., & Makrilakis, K. (2020). Association of Glycemic Indices (Hyperglycemia, Glucose Variability, and Hypoglycemia) with Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Journal of diabetes research*, 2020, 7489795. <https://doi.org/10.1155/2020/7489795>
 25. Fisher, G., Alvarez, J. A., Ellis, A. C., Granger, W. M., Ovalle, F., Man, C. D., Cobelli, C., & Gower, B. A. (2012). Race differences in the association of oxidative stress with insulin sensitivity in African- and European-American women. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 20(5), 972–977. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.355>
 26. Ikonomidis, I., Pavlidis, G., Tsoumani, M., Kousathana, F., Katogiannis, K., Tsilivarakis, D., Thymis, J., Kountouri, A., Korakas, E., Pliouta, L., Raptis, A., Parissis, J., Andreadou, I., & Lambadiari, V. (2022). Endothelial Dysfunction Is Associated with Decreased Nitric Oxide Bioavailability in Dysglycaemic Subjects and First-Degree Relatives of Type 2 Diabetic Patients. *Journal of clinical medicine*, 11(12), 3299. <https://doi.org/10.3390/jcm11123299>
 27. Lechuga-Sancho, A. M., Gallego-Andujar, D., Ruiz-Ocaña, P., Visiedo, F. M., Saez-Benito, A., Schwarz, M., Segundo, C., & Mateos, R. M. (2018). Obesity induced alterations in redox homeostasis and oxidative stress are present from an early age. *PloS one*, 13(1), e0191547. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191547>
 28. Bloomer, R. J., Kabir, M. M., Marshall, K. E., Canale, R. E., & Farney, T. M. (2010). Postprandial oxidative stress in response to dextrose and lipid meals of differing size. *Lipids in health and disease*, 9 (79). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-9-79>