



# **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**«Διερεύνηση Της Λιπιδικής Σύστασης Των HDL  
Λιποπρωτεϊνών Του Αίματος Σε  
Προδιαβητικούς Και Διαβητικούς Ασθενείς»**

**ΚΑΡΑΚΙΤΣΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:  
**ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**





# **ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Μεταπτυχιακό Πρόγραμμα «Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες (ΒΒΕ)»

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

**«Διερεύνηση Της Λιπιδικής Σύστασης Των HDL  
Λιποπρωτεϊνών Του Αίματος Σε  
Προδιαβητικούς Και Διαβητικούς Ασθενείς»**

**ΚΑΡΑΚΙΤΣΟΥ ΚΥΡΙΑΚΗ**

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια  
ΜΠΑΪΡΑΚΤΑΡΗ ΕΛΕΝΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**

«Η έγκριση της Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Όνοματεπώνυμο: *Καρακίτσου Κυριακή*

Τίτλος του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης: *Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες – «Διερεύνηση Της Λιπιδικής Σύστασης Των HDL Λιποπρωτεϊνών Του Αίματος Σε Προδιαβητικούς Και Διαβητικούς Ασθενείς.»*

Ημερομηνία Παρουσίασης: 16/04/2021

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: *Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας*

Εξεταστική επιτροπή:

- 1. Μπαϊρακτάρη Ελένη, Καθηγήτρια Κλινικής Χημείας*
- 2. Σακκάς Ηρακλής, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας*
- 3. Κωσταρά Χριστίνα, Λέκτορας (Π.Δ. 407/80)*

**Στους γονείς μου, Ελένη και Σταύρο**

# **ΠΡΟΛΟΓΟΣ**

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών “Βασικές Βιοϊατρικές Επιστήμες”, του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2019-2020.

Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλαν στο να φέρω σε πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα της εργασίας αυτής και Διδάσκουσα του Μ.Π.Σ. κα Μπαϊρακτάρη Ελένη, για την πολύτιμη βοήθειά της και τη διαρκή υποστήριξή της, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πρακτικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, καθώς και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Σακκά Ηρακλή και την κα Κωσταρά Χριστίνα για τις συμβουλές τους και τη βοήθειά τους. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους δικούς μου ανθρώπους, οικογένεια και φίλους, για την αμέριστη συμπαράσταση, ποικιλότροπη βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ’ όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου, γεγονός που οδήγησε στην πραγματοποίηση αυτού του μεταπτυχιακού προγράμματος.

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ</b> .....	<b>8</b>
I.1 Το μόριο της γλυκόζης.....	8
I.2 Ορμόνες ρύθμισης της γλυκόζης.....	8
<b>II. ΠΡΟΔΙΑΒΗΤΗΣ</b> .....	<b>11</b>
II.1 Εισαγωγή.....	11
II.2 Διάγνωση IFG και IGT, δύο διαφορετικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις.....	12
II.3 Παθοφυσιολογία.....	14
II.4 Έλεγχος, πρόληψη και εξέλιξη σε σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.....	15
<b>III. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II</b> .....	<b>16</b>
III.1 Εισαγωγή.....	16
III.2 Επιδημιολογία.....	16
III.3 Διάγνωση.....	17
III.4 Παθοφυσιολογία.....	18
<b>IV. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ</b> .....	<b>20</b>
IV.1 Εισαγωγή στα λιπίδια.....	20
IV.2 Λιποπρωτεΐνες του πλάσματος.....	22
<b>V. HDL</b> .....	<b>24</b>
V.1 Εισαγωγή.....	24
V.2 Μεταβολισμός των HDL λιποπρωτεϊνών και η αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης.....	24
V.3 Λιπιδική σύσταση των HDL.....	27
V.4 Ιδιότητες των HDL.....	32
V.5 Ευεργετικές ιδιότητες των HDL λιποπρωτεϊνών έναντι στην παθογένεια του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.....	34
V.6 Ποιότητα VS ποσότητα των HDL και σακχαρώδης διαβήτης τύπου II.....	35
<b>VI. LIPIDOMICS</b> .....	<b>37</b>
VI.1 Εισαγωγή.....	37
VI.2 Μέθοδοι εκχύλισης και ανάλυσης λιπιδίων.....	38
<b>VII. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΥΝΗΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)</b> .....	<b>40</b>
VII.1 Βασικές Αρχές.....	40



VII.2 Χαρακτηριστικά του φάσματος NMR.....	42
<b>VIII. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ.....</b>	<b>45</b>
<b>IX. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>46</b>
IX.1 Πληθυσμός μελέτης και λήψη δειγμάτων.....	46
IX.2 Διαχωρισμός των HDL από τις non-HDL λιποπρωτεΐνες.....	46
IX.3 Απαιτούμενος εργαστηριακός εξοπλισμός και αντιδραστήρια.....	47
IX.4 Παρασκευή αντιδραστηρίων.....	47
IX.5 Πειραματική διαδικασία.....	48
IX.6 Ανάλυση φάσματος $^1\text{H}$ NMR λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών.....	50
IX.7 Λήψη και επεξεργασία των φασμάτων.....	54
<b>X. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>55</b>
<b>XI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>62</b>
<b>XII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>67</b>
<b>XIII. SUMMARY.....</b>	<b>71</b>
<b>XV. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....</b>	<b>74</b>
<b>XVI. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>75</b>



## **I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ - ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ**

---

### **I.1 ΤΟ ΜΟΡΙΟ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

Η γλυκόζη είναι ένας μονοσακχαρίτης με μοριακό τύπο  $C_6H_{12}O_6$ . Στους έμβριους οργανισμούς, όπως και στον άνθρωπο, αποτελεί την κύρια πηγή ενέργειας για τα κύτταρα, κατάσταση που την καθιστά αναγκαία για την επιβίωση των οργανισμών. Γι' αυτό και ο ανθρώπινος οργανισμός λειτουργεί με τέτοιο τρόπο ώστε σε φυσιολογικές καταστάσεις να διατηρεί τα επίπεδά της στο πλάσμα σταθερά, με τις τιμές της σε καταστάσεις θωρης νηστείας να μην ξεπερνούν τα 100 mg/dl, ενώ κατά τη διάρκεια των ημερήσιων γευμάτων οι τιμές αυτές μπορούν να φτάσουν μέχρι και τα 120 mg/dl. [1] [2]

Ο ανθρώπινος οργανισμός είναι σε θέση να προσλάβει τη γλυκόζη από τις τροφές, αλλά και να τη συνθέσει μόνος του. Όταν την προσλαμβάνει από τις τροφές, κατά την πέψη, η γλυκόζη απορροφάται από το έντερο και μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος ώστε να φτάσει στα κύτταρα τα οποία την έχουν ανάγκη. Η επιπλέον ποσότητα γλυκόζης, η οποία δεν είναι αναγκαία για τα κύτταρα, αποθηκεύεται υπό τη μορφή πολυμερούς, συγκεκριμένα του γλυκογόνου, κυρίως στους μυς και στο ήπαρ. Στους μυς η αποδόμηση του γλυκογόνου προσδίδει γλυκόζη η οποία χρησιμοποιείται αποκλειστικά ως καύσιμο για τη μυϊκή συστολή, ενώ στο ήπαρ απελευθερώνεται στην κυκλοφορία του αίματος για να εξισορροπήσει τα μειωμένα επίπεδά της και να καλύψει τις ενεργειακές ανάγκες.

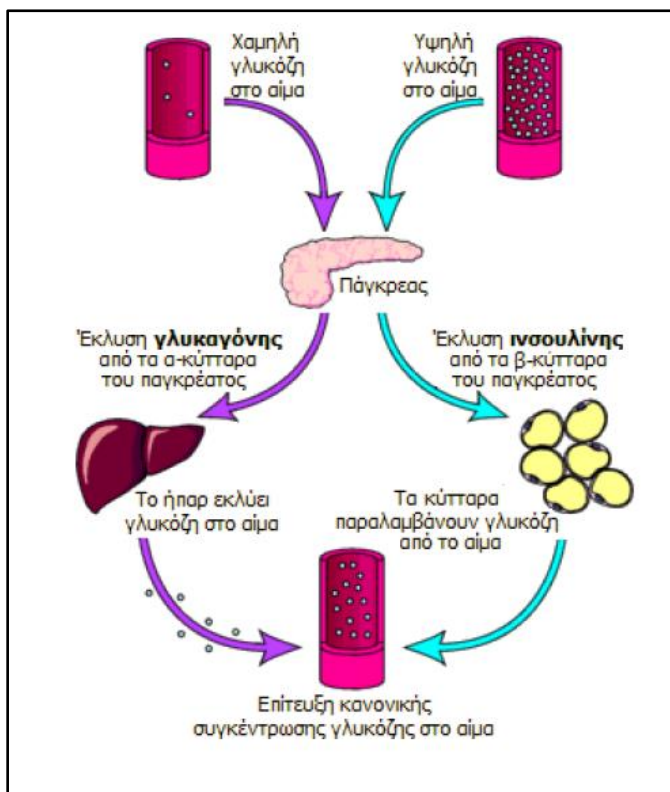
Σε περίοδο νηστείας, όπου τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι χαμηλά και οι αποθήκες γλυκογόνου εξαντλημένες, πραγματοποιείται ενδογενής σύνθεση της γλυκόζης για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών, μέσω της νεογλυκογένεσης, η οποία πραγματοποιείται κατά το μεγαλύτερο ποσοστό της στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στους νεφρούς. Η γλυκόζη που παράγεται περνά στην κυκλοφορία του αίματος και εφοδιάζει τους ιστούς που δεν είναι σε θέση να τη συνθέσουν και βρίσκονται σε ενεργειακή ανάγκη, όπως είναι πχ. οι μυς και ο εγκέφαλος. [3]

### **I.2 ΟΡΜΟΝΕΣ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

Σε συνδυασμό των όσων αναφέρθηκαν προηγουμένως, μετά από ένα γεύμα, κατά την απορρόφηση της γλυκόζης, οι αλλαγές που εμφανίζονται στα επίπεδά της καθορίζονται από τρεις διαφορετικές διεργασίες: α) την εντερική απορρόφησή της, β) την καταστολή της ενδογενούς παραγωγής της και τέλος γ) τη συνολική προσρόφησή της από τους ιστούς.

Η ρύθμιση των διεργασιών αυτών και κατά συνέπεια των επιπέδων της γλυκόζης πραγματοποιείται από διάφορες ορμόνες, συμπεριλαμβανομένου της ινσουλίνης, η οποία εκκρίνεται από τα β παγκρεατικά κύτταρα ως απάντηση στα υψηλά επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος και η οποία βοηθάει στην πρόσληψη της γλυκόζης από τους διάφορους ιστούς και της, αντίθετης σε δράση, γλυκαγόνης, η οποία

εκκρίνεται από τα α παγκρεατικά κύτταρα ως απάντηση στα χαμηλά επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος και η οποία είναι υπεύθυνη για τη διέγερση της παραγωγής της από το ήπαρ.[1]



**Εικόνα 1:** Η επίδραση της ινσουλίνης και της γλυκαγόνης στα επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος

Η αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα έχει ως αποτέλεσμα την έκκριση της ινσουλίνης η οποία πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Κατά το πρώτο στάδιο, εμφανίζεται μία απότομη έκκριση για περίπου 10 λεπτά η οποία στοχεύει τους ιστούς που είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης, με κύριο στόχο το ήπαρ. Το δεύτερο στάδιο ακολουθεί αμέσως μετά από το πρώτο, όπου η έκκριση της ινσουλίνης πραγματοποιείται σταδιακά και φτάνει σε μία σταθερή κατάσταση μετά από 1 με 2 ώρες, ανάλογα με το βαθμό της υπεργλυκαιμίας. [4]

Η δράση της ινσουλίνης πραγματοποιείται μέσω ενός σηματοδοτικού μονοπατιού, το οποίο ξεκινάει με την πρόσδεση της ινσουλίνης στον υποδοχέα της και συνεχίζει με το αποτέλεσμα αυτής της πρόσδεσης, που είναι η ενεργοποίηση μίας αλυσίδας αντιδράσεων, φωσφορυλιώσεων και αποφωσφορυλιώσεων, οι οποίες έχουν ως τελικό αποτέλεσμα τη διέγερση της μεταφοράς της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα μέσω πέντε ειδικών μεταφορέων της, των: Glucose Transporter 1, GLUT1, στα ερυθρά αιμοσφαίρια και Glucose Transporter 3, GLUT3, στον εγκέφαλο (οι οποίοι, όμως, μεταφέρουν τη γλυκόζη μέσα στα κύτταρα χωρίς να είναι αναγκαίο το ερέθισμα της ινσουλίνης),-Glucose

Transporter 2, GLUT2, στο ήπαρ και στα β παγκρεατικά κύτταρα, Glucose Transporter 4, GLUT4, στους μυς και στα λιποκύτταρα και Glucose Transporter 5, GLUT5, στο έντερο. [3]

Όταν η ινσουλίνη βρίσκεται σε φυσιολογικές συγκεντρώσεις στην κυκλοφορία του αίματος, στους μυς η σύνθεση του γλυκογόνου προς αποθήκευση ενέργειας και η οξείδωση της γλυκόζης προς παραγωγή ενέργειας, συμβάλλουν σχεδόν ισότιμα στη διάθεση της γλυκόζης. Ωστόσο, με την αύξηση της ινσουλίνης, η σύνθεση του γλυκογόνου γίνεται η κυρίαρχη οδός που ακολουθεί η γλυκόζη, καθώς η ινσουλίνη ρυθμίζει τη συνθετάση του γλυκογόνου διεγείροντας τη δράση της.

Επομένως, τα άτομα τα οποία δεν παρουσιάζουν κάποια βλάβη στο μεταβολισμό της γλυκόζης, μετά από ένα γεύμα, παρουσιάζουν αυξημένη πρόσληψη της από τους διάφορους ιστούς και μειωμένη ηπατική παραγωγή της, καθώς η ινσουλίνη “ενημερώνει” το ήπαρ ότι ο οργανισμός διαθέτει γλυκόζη και δεν είναι αναγκαία η επιπλέον παραγωγή της. [1]

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η γλυκόζη κατέχει κυρίαρχο ρόλο στην επιβίωση ενός κυττάρου και κατ’ επέκταση του ανθρώπινου οργανισμού. Γι’ αυτό το λόγο η παρουσία κάποιας διαταραχής σε οποιοδήποτε σημείο του μεταβολικού μονοπατιού της μπορεί να έχει πολύ σημαντικό αντίκτυπο στην υγεία ενός ανθρώπου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατάστασης αποτελεί ο σακχαρώδης διαβήτης καθώς και η κατάσταση πριν την εμφάνιση αυτού, ο προδιαβήτης.

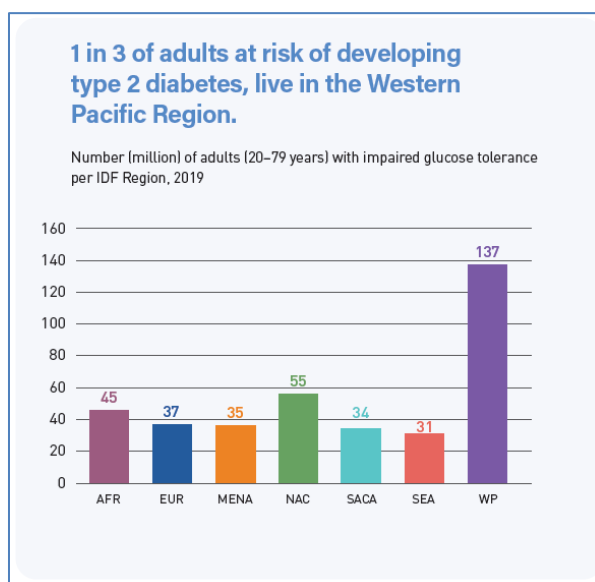
## II. ΠΡΟΔΙΑΒΗΤΗΣ

### II.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με την Αμερικάνικη Ένωση Διαβήτη (American Diabetes Association: ADA), η κατάσταση του Προδιαβήτη αναφέρεται στα άτομα εκείνα που δεν πληρούν τα διαγνωστικά κριτήρια για το σακχαρώδη διαβήτη, όμως τα εργαστηριακά αποτελέσματά τους για τα επίπεδα της γλυκόζης στο αίμα είναι πάνω από τα φυσιολογικά (σε κατάσταση νηστείας > 100mg/dl) αλλά κάτω από αυτά που παρουσιάζουν οι διαβητικοί. (σε κατάσταση νηστείας ≤ 125 mg/dl).

Σήμερα είναι γνωστό πως ο Προδιαβήτης αποτελεί μία σύνθετη πολυπαραγοντική μεταβολική διαταραχή που εκτείνεται πέρα από τον έλεγχο της γλυκόζης, καθώς τα άτομα με Προδιαβήτη μπορεί να έχουν ταυτόχρονα βλάβη σε διάφορα όργανα όπως είναι τα μάτια, τους νεφρούς, τα αιμοφόρα αγγεία και την καρδιά. Οι σημαντικότερες επιπλοκές που σχετίζονται ιδιαίτερα με τον προδιαβήτη είναι: οι νεφροπάθειες, οι νευροπάθειες, η διαβητική αμφιβληστρο-ειδοπάθεια και οι μακροαγγειακές παθήσεις οι οποίες οδηγούν σε αυξημένα ποσοστά καρδιαγγειακής νόσου, εγκεφαλικού επεισοδίου και περιφερικής αγγειακής νόσου. Επίσης έχει συσχετιστεί με την αυξημένη αρτηριακή πίεση, την αποφρακτική άπνοια ύπνου, τον ανδρικό υπογοναδισμό και τον καρκίνο. [4-6]

Σύμφωνα με στοιχεία της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη, (International Diabetes Federation: IDF), για το 2019, παγκοσμίως 374 εκατομμύρια άνθρωποι ζουν με Προδιαβήτη, συγκεκριμένα με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, (Impaired Glucose Tolerance: IGT), από τους οποίους τα 37 εκατομμύρια ζουν στην Ευρώπη. Αντίστοιχα στοιχεία για την Ελλάδα δεν βρέθηκαν (Εικόνα 2). [7]



**Εικόνα 2:** Παγκόσμια επιδημιολογικά στοιχεία από τον IDF για τον Προδιαβήτη [7]

## II.2 ΔΙΑΓΝΩΣΗ IFG ΚΑΙ IGT, ΔΥΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ

Στην κατάσταση του Προδιαβήτη, ο ασθενής μπορεί να παρουσιάζει είτε διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, (Impaired Fasting Glucose: IFG), είτε μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IGT, είτε και τα δύο μαζί.

Η διάγνωση των δύο αυτών καταστάσεων, σύμφωνα με την ADA, πραγματοποιείται με την από του στόματος δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, (Oral Glucose Tolerance Test: OGTT), και την μέτρηση του ποσοστού της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, HbA1c, στο αίμα (με τις τιμές αυτής να κυμαίνονται μεταξύ του 5,7 - 6,4%). Κατά τη δοκιμασία OGTT, αρχικά, λαμβάνεται δείγμα αίματος του ασθενή μετά από 12ωρη νηστεία για τη μέτρηση των επιπέδων της γλυκόζης νηστείας. Στη συνέχεια ο ασθενής καταναλώνει ένα διάλυμα 75 g γλυκόζης και μετά από 2 ώρες συλλέγεται δείγμα αίματος και μετρούνται τα επίπεδα γλυκόζης. Εάν ο ασθενής παρουσιάζει επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των τιμών 100 - 125 mg/dl, τότε παρουσιάζει διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, IFG. Ενώ, εάν ο ασθενής παρουσιάζει επίπεδα γλυκόζης μεταξύ των τιμών 144 - 199 mg/dl 2 ώρες μετά από τη δοκιμασία, τότε παρουσιάζει μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IGT. [4]

**Πίνακας 1:** Κριτήρια διάγνωσης του προδιαβήτη [4]

<b>Διάγνωση του Προδιαβήτη</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Επίπεδα γλυκόζης νηστείας μεταξύ των τιμών <i>100 mg/dl</i> και <i>125 mg/dl</i></li><li>• Επίπεδα της γλυκόζης μετά από 2 ώρες από την διεξαγωγή της από του στόματος δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη μεταξύ των τιμών <i>144 mg/dl</i> και <i>199 mg/dl</i></li><li>• Ποσοστό της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης μεταξύ των τιμών <i>5,7%</i> και <i>6,4%</i>.</li></ul>

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τόσο η μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IGT, όσο και η μειωμένη γλυκόζη νηστείας, IFG, είναι δύο στάδια του Προδιαβήτη, τα οποία, όμως, παρουσιάζουν διαφορετικές παθοφυσιολογικές διαταραχές.

Τα άτομα με IFG και αυτά με IGT εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη, όμως το κύριο ζωτικό όργανο αντίστασης στα άτομα με IFG είναι το ήπαρ, με αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή γλυκόζης, ανεξάρτητα από τις τιμές της στην κυκλοφορία του αίματος. Οι σκελετικοί μυς στα άτομα αυτά παρουσιάζουν σχεδόν φυσιολογική αντίσταση. Στα άτομα με IGT το κύριο ζωτικό όργανο αντίστασης είναι οι σκελετικοί μυς, με αποτέλεσμα τη μειωμένη διάθεση της γλυκόζης στους ιστούς αυτούς. Το ήπαρ στα άτομα αυτά παρουσιάζει μία μέτρια αλλαγή στην ευαισθησία του προς την ινσουλίνη. [5]

Όσον αναφορά τη λειτουργικότητα των β κυττάρων, και στις δύο περιπτώσεις φαίνεται πως εμφανίζουν μειωμένη ευαισθησία στη γλυκόζη, με αποτέλεσμα να είναι δυσλειτουργικά.

Αυτές οι διαφορές στη παθοφυσιολογία των IFG και των IGT ασθενών εξηγεί και τη διαφορετική ανταπόκρισή τους στην OGTT. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το πρώτο στάδιο έκκρισης της ινσουλίνης έχει ως κύριο στόχο το ήπαρ, επίσης οι IFG ασθενείς παρουσιάζουν κυρίως ηπατική αντίσταση, έτσι κατά τη δοκιμασία ανοχής στη γλυκόζη, τα άτομα αυτά, εκδηλώνουν ελάττωμα στην πρώτη αντίδραση της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα η γλυκόζη του πλάσματος να αυξάνεται νωρίς στη διάρκεια της δοκιμασίας. Επειδή όμως, το δεύτερο στάδιο της έκκρισης δεν εμφανίζει ελαττώματα, καθώς τα σημεία τα οποία στοχεύει, όπως οι μυς, δεν παρουσιάζουν μειωμένη ευαισθησία στην ινσουλίνη στα άτομα αυτά, η συγκέντρωση της γλυκόζης στο πλάσμα μετά από 2 ώρες έχει επιστρέψει σ' ένα βασικό, αλλά υψηλό, επίπεδο.

Αντίθετα, οι ασθενείς με IGT, οι οποίοι παρουσιάζουν μέτρια αλλαγή της ηπατικής αντίστασης και υψηλή μυϊκή αντίσταση, εμφανίζουν ελαττώματα τόσο κατά το πρώτο όσο και κατά το δεύτερο στάδιο έκκρισης της ινσουλίνης κατά τη διάρκεια της δοκιμασίας, με αποτέλεσμα, ενώ, η γλυκόζη νηστείας να μην εμφανίζεται αυξημένη μετά τη χορήγηση του διαλύματος γλυκόζης, η συγκέντρωσή της στο πλάσμα αυξάνεται προοδευτικά και παραμένει αυξημένη μετά τις 2 ώρες. [3]

**Πίνακας 2:** Διαφορές των ασθενών που παρουσιάζουν IFG και IGT

<b>Διαφορές μεταξύ των IFG και IGT ασθενών</b>	
<i>Ασθενείς με μειωμένη γλυκόζη νηστείας IFG</i>	<i>Ασθενείς με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη IGT</i>
❖ Σημείο αντίστασης στην ινσουλίνη:	
Κυρίως στο ήπαρ (μειωμένη παραγωγή γλυκόζης) Σχεδόν φυσιολογική αντίσταση στους σκελετικούς μυς	Μέτρια αλλαγή στην ηπατική ευαισθησία Κυρίως στους σκελετικούς μυς (μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης)
❖ Ανταπόκριση στην OGTT:	
Αύξηση των επιπέδων της γλυκόζης από νωρίς στη δοκιμασία Βασικά, αλλά αυξημένα επίπεδα γλυκόζης μετά από 2 ώρες από τη δοκιμασία	Φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης νηστείας Μετά από τη χορήγηση του διαλύματος, τα επίπεδα της γλυκόζης αυξάνονται προοδευτικά. Μετά από 2 ώρες παραμένουν αυξημένα.

Τα παραπάνω είναι σύμφωνα με ευρήματα που δείχνουν πως η ολική διάθεση της γλυκόζης στο σώμα βαθμιαία επιδεινώνεται από τα άτομα με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη, (Normal Glucose Tolerance: NGT), στα άτομα με μειωμένη γλυκόζη νηστείας, IFG, στα άτομα με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IGT και τελικά στα άτομα με διαβήτη τύπου II. [5]



## II.3 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Στην παθοφυσιολογία του προδιαβήτη εμπλέκεται **α)** η δυσλειτουργία των  $\beta$  παγκρεατικών κυττάρων, δηλαδή των κυττάρων που εκκρίνουν την ινσουλίνη, **β)** η αντίσταση στην ινσουλίνη, στους υπεύθυνους ιστούς για τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα και **γ)** τα αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. [4]

Γνωρίζουμε πως η ινσουλίνη αποτελεί την ορμόνη ενημέρωσης των περιφερικών ιστών, όπως είναι το ήπαρ, οι μυς και ο λιπώδης ιστός, για την ποσότητα της γλυκόζης στο αίμα. Όταν τα επίπεδα της γλυκόζης είναι χαμηλά, η ινσουλίνη διεγείρει την παραγωγή της, ενώ όταν είναι υψηλά διεγείρει την αποθήκευση και το μεταβολισμό της προς παραγωγή ενέργειας.

Κατά την αντίσταση στην ινσουλίνη, κατάσταση που χαρακτηρίζει τον προδιαβήτη, η φυσιολογική συγκέντρωση της ινσουλίνης στην κυκλοφορία δεν επαρκεί για την ενημέρωση αυτή, με αποτέλεσμα η γλυκόζη να μην προσλαμβάνεται από αυτούς τους ιστούς και τα επίπεδα της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος να παραμένουν αυξημένα. Στο ήπαρ, σε περίοδο νηστείας, η αντίσταση εκδηλώνεται με υπερβολική παραγωγή γλυκόζης μέσω της νεογλυκογένεσης, καθώς τα  $\alpha$ -παγκρεατικά κύτταρα συνεχίζουν να παράγουν γλυκαγόνη παρά τα αυξημένα επίπεδα της ινσουλίνης, ενώ μετά από ένα γεύμα, εκδηλώνεται με μειωμένη καταστολή της παραγωγής αυτής. Στους μυς η αντίσταση εκδηλώνεται με μειωμένη πρόσληψη της γλυκόζης μετά από την πέψη υδατανθράκων, κάτι που προκαλεί υπεργλυκαιμία μετά το γεύμα. [3,4]

Η υπεργλυκαιμία που παρουσιάζεται λόγω της αντίστασης της ινσουλίνης, προκαλεί τα  $\beta$ -παγκρεατικά κύτταρα να αυξήσουν την έκκριση της ινσουλίνης ώστε να υπερσχύσουν αυτής της αντίστασης, ώσπου τελικά να είναι ικανά να διατηρήσουν τα φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος. Όμως, με την πάροδο του χρόνου, η συνεχής επιπλέον διέγερση των  $\beta$ -κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα την εξάντλησή τους και τη μείωση της λειτουργικότητάς τους με αποτέλεσμα τα επίπεδα της γλυκόζης να ξεκινάνε να αυξάνονται. Η αύξηση αυτή αρχικά γίνεται ορατή σε καταστάσεις μετά από το γεύμα και στη συνέχεια ακολουθούν οι μεταβολές στα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας. [4]

Μελέτες έχουν δείξει πως η μειωμένη λειτουργικότητα των  $\beta$ -κυττάρων μπορεί να παρατηρηθεί πριν την εμφάνιση του προδιαβήτη. Ασθενείς με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη μπορεί να έχουν χάσει μέχρι και τα 2/3 της λειτουργικότητας των  $\beta$  κυττάρων τους, ενώ ασθενείς με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη μέχρι και το 80-85%. Γι' αυτό το λόγο η έκκριση της ινσουλίνης και η ανοχή στην ινσουλίνη δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάκριση των NGT από τους IGT και των IGT απ' τους διαβητικούς. [3]

## **II.4 ΕΛΕΓΧΟΣ, ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΠΡΟΔΙΑΒΗΤΗ ΣΕ ΣΑΚΧΑΡΩΣΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ II**

Ο κυριότερος στόχος για την πρόληψη του Προδιαβήτη είναι η αποτροπή ή έστω η καθυστέρηση της εξέλιξης του προς σακχαρώδη διαβήτη τύπου II. Από μελέτες έχει γίνει φανερό πως οι αλλαγές στον τρόπο ζωής είναι ο κυριότερος στόχος για την πρόληψη του προδιαβήτη, στοχεύοντας, έτσι, την παχυσαρκία και την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας με παρότρυνση για μία υγιεινή διατροφή. Αυτό αποτελεί θέμα υψίστης σημασίας καθώς πολλές μελέτες έχουν καταδείξει ποσοστά καρδιαγγειακής θνησιμότητας σε προδιαβητικούς ασθενείς κοντά σε εκείνα του σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, μια πτυχή που απαιτεί επιθετική διαχείριση του παράγοντα κινδύνου σε αυτόν τον πληθυσμό. [5,6]

Ετησίως, περίπου το 5 με 10% των ατόμων με Προδιαβήτη αναπτύσσουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, αν και το ποσοστό αυτό διαφέρει ανάλογα με τα χαρακτηριστικά του πληθυσμού. Σύμφωνα με την ADA, περισσότερο από το 70% των ατόμων με προδιαβήτη, τελικά, θα αναπτύξουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, ενώ οι γυναίκες με ιστορικό διαβήτη κύησης έχει προταθεί ότι παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο κατά 20 με 60% ανάπτυξης διαβήτη στα επόμενα 5 με 10 χρόνια μετά την εγκυμοσύνη. [5]

Μέσα από όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, γίνεται φανερό το πόσο σημαντική είναι η έρευνα του προδιαβήτη όχι μόνο για το ενδεχόμενο εξέλιξής του προς το σακχαρώδη διαβήτη τύπου II αλλά και λόγω των επιπλοκών που αυτός παρουσιάζει.

## III. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II

---

### III.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελεί μία παθολογική κατάσταση η οποία προκαλείται από ανεπάρκεια έκκρισης ή δράσης της ινσουλίνης και ταξινομείται σε **α)** σακχαρώδη διαβήτη τύπου I, **β)** σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, (Type 2 Diabetes Mellitus: T2DM), και **γ)** σακχαρώδη διαβήτη κύησης.

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου I εκδηλώνεται σε μικρή ηλικία και οφείλεται στην ανεπάρκεια των β παγκρεατικών κυττάρων να παράξουν επαρκή ποσότητα ινσουλίνης. [1] Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II εκδηλώνεται σε μεγαλύτερη ηλικία, και τέλος, ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται περίπου στο 2-10% όλων των κυήσεων και μπορεί να βελτιωθεί ή να εξαφανιστεί μετά τη γέννηση. Ωστόσο, μετά την εγκυμοσύνη περίπου το 5-10% των γυναικών με διαβήτη κύησης βρέθηκε να εξελίσσουν T2DM. [1,8]

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου II είναι μία χρόνια ασθένεια η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλές τιμές γλυκόζης στο αίμα, οι οποίες μπορούν να ξεπεράσουν τα 200 mg/dl, τιμή, δηλαδή, πολύ μεγαλύτερη από τις φυσιολογικές τιμές που έχουν ήδη αναφερθεί. Η ασθένεια αυτή αφορά το 90% των περιπτώσεων του σακχαρώδη διαβήτη. [1]

Μερικές από τις επιπλοκές του T2DM είναι οι καρδιακές παθήσεις, τα εγκεφαλικά επεισόδια, η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια που μπορεί να οδηγήσει σε τύφλωση, η νεφρική ανεπάρκεια και οι διαταραχές στη ροή του αίματος. [5]

Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση του T2DM μπορούν να χωριστούν σε 3 κατηγορίες:

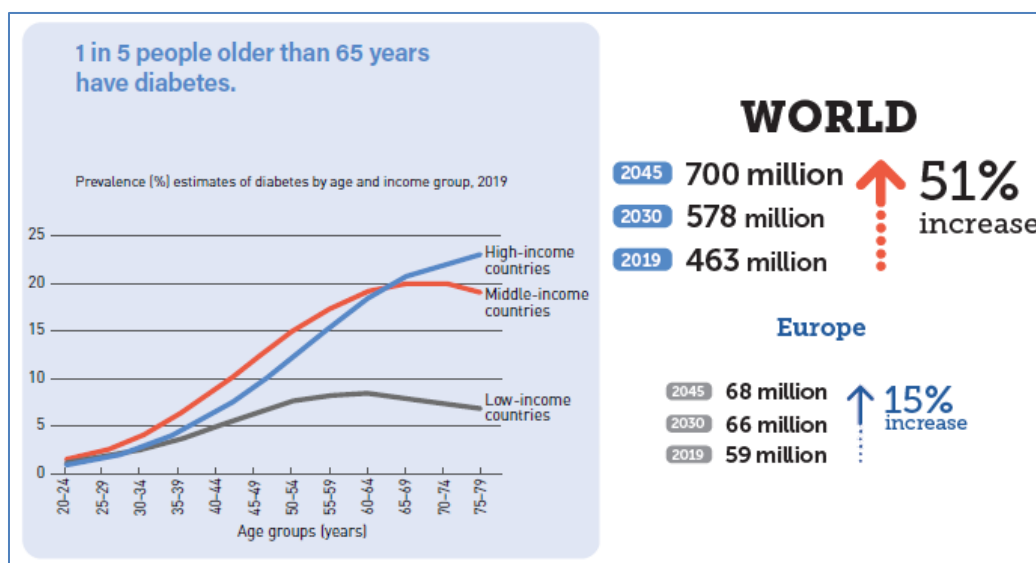
- 1) Τους μη τροποποιήσιμους, όπως είναι το οικογενειακό ιστορικό (καθώς η αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη κληρονομείται απ' τους γονείς), η εθνικότητα και η ηλικία,
- 2) Τους τροποποιήσιμους, όπως είναι η παχυσαρκία, ο δείκτης μάζας σώματος, μεγαλύτερος από 25kg/m<sup>2</sup> (με τιμές μεγαλύτερες από 35kg/m<sup>2</sup>, η πιθανότητα ανάπτυξης του T2DM να φτάνει μέχρι και το 93%) καθώς και η έλλειψη φυσικής άσκησης, και
- 3) Τους λοιπούς, όπως είναι το ιστορικό για το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών, του διαβήτη εγκυμοσύνης, τη γέννηση παιδιού βάρους μεγαλύτερου από 4,1kg, την υπέρταση και τη δυσλιπιδαιμία. Προφανώς, ο προδιαβήτης αποτελεί τον κυριότερο παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση του T2DM. [3,6]

### III.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ

Μέσα στα τελευταία 50 χρόνια η αύξηση των περιστατικών του διαβήτη ήταν ραγδαία, κατάσταση που μπορεί να αναφερθεί, πλέον, και ως επιδημία του διαβήτη. Η σημερινή αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στη παχυσαρκία και την καθιστική ζωή, τα οποία, σε

συνδυασμό με τους κληρονομικούς παράγοντες για την αντίσταση στην ινσουλίνη, επιδεινώνουν την κατάσταση. [3]

Σύμφωνα με στοιχεία της Διεθνούς Ομοσπονδίας Διαβήτη, IDF για το 2019, παγκοσμίως 463 εκατομμύρια άνθρωποι νοσούν από σακχαρώδη διαβήτη, με τον αριθμό αυτό να εκτιμάται ότι θα φτάσει τα 578 εκατομμύρια μέχρι το 2030 (Εικόνα 3). Ο πληθυσμός αυτός αντανακλά σε όλο το εύρος των ηλικιών, με το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών να βρίσκεται μεταξύ των ηλικιών 60-69. Επίσης σημαντικό εύρημα αποτελεί το γεγονός ότι στις χώρες χαμηλού και μεσαίου οικονομικού εισοδήματος τα 4/5 των ασθενών είναι μη διαγνωσμένοι. Πάλι σύμφωνα με στοιχεία της IDF, στην Ευρώπη 59 εκατομμύρια άτομα πάσχουν από σακχαρώδη διαβήτη, αριθμός που μεταφράζεται ως ο 1/11 ευρωπαίους πολίτες να νοσεί από σακχαρώδη διαβήτη, με τον αριθμό αυτόν να εκτιμάται ότι θα φτάσει τα 66 εκατομμύρια μέχρι το 2030. [7]



**Εικόνα 3:** Επιδημιολογικά στοιχεία από τον IDF για το Διαβήτη [7]

Σε αντίθεση με τον προδιαβήτη, για τον οποίο δεν έχουμε επιδημιολογικά στοιχεία για τη χώρα μας, μελέτη του 2016 έδειξε πως στην Ελλάδα νοσούν από σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 694 χιλιάδες. [8]

### III.3 ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Για τη διάγνωση του T2DM είναι αναγκαίο να πληρούνται κάποια συγκεκριμένα κριτήρια, τα οποία συμπεριλαμβάνουν: επίπεδα της HbA1c  $\geq 6,5\%$ , τιμές γλυκόζης νηστείας μεγαλύτερες από 126 mg/dl, τιμές γλυκόζης μετά από 2 ώρες από τη OGTT μεγαλύτερες από 200 mg/dl, όπως επίσης και σε τυχαία έλεγχο, η γλυκόζη του αίματος να είναι μεγαλύτερη ή ίση των 200 mg/dl. [1]

**Πίνακας 3:** Κριτήρια διάγνωσης του T2DM [4]

<b>Διάγνωση του Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου II</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Επίπεδα γλυκόζης νηστείας μεγαλύτερα από <i>126 mg/dl</i></li><li>• Επίπεδα της γλυκόζης μετά από 2 ώρες από την διεξαγωγή της από του στόματος δοκιμασίας ανοχής στη γλυκόζη μεγαλύτερες από <i>200 mg/dl</i></li><li>• Ποσοστό της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης μεγαλύτερο από <i>6,5%</i>.</li></ul>

### III.4 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ

Στα υγιή άτομα η ενδογενής παραγωγή της γλυκόζης τις πρωινές ώρες πραγματοποιείται με ρυθμό ~2 mg/kg ανά λεπτό, ενώ στους διαβητικούς ασθενείς αυτός ο ρυθμός αυξάνεται στα ~2,5 mg/kg. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάλογη αύξηση και της συγκέντρωσης της γλυκόζης, ανεξάρτητα από την αύξηση των επιπέδων της ινσουλίνης στο πλάσμα, κάτι που υποδεικνύει την αντίσταση στη δράση της ινσουλίνης στην ενδογενή παραγωγή της γλυκόζης. Επίσης, ακόμα και μετά από ένα γεύμα η ενδογενής παραγωγή της γλυκόζης δεν καταστέλλεται όπως θα έπρεπε. [3,5]

Έχει ήδη αναφερθεί πως οι δυο κυριότεροι ιστοί για τη διατήρηση των επιπέδων της γλυκόζης σε φυσιολογικά επίπεδα στον οργανισμό, το ήπαρ και οι μυς, παρουσιάζουν σημαντική αντίσταση στην ινσουλίνη σε άτομα με T2DM. Αντίσταση, όμως, παρουσιάζουν και τα β παγκρεατικά κύτταρα, ο λιπώδης ιστός, τα νεφρά, και ο γαστρεντερικός σωλήνας.

Όσων αναφορά τους σκελετικούς μυς, το κύριο μέρος διάθεσης της γλυκόζης, έχειδειχθεί ότι στα άτομα που πάσχουν από T2DM η αντίσταση στην ινσουλίνη που παρουσιάζουν αντιπροσωπεύει το 85-90% του ελαττώματος στη διάθεση της γλυκόζης στο σώμα. Συμπεραίνουμε, λοιπόν, πως οι μυς είναι οι κύριοι υπεύθυνοι ιστοί για την αντίσταση αυτή.

Άλλο χαρακτηριστικό ελάττωμα των ασθενών με T2DM είναι η ανικανότητα των β παγκρεατικών κυττάρων να αντιληφθούν την αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης του πλάσματος. Αυτή η μείωση στην ευαισθησία είναι συνεχής κατά την πορεία της ασθένειας και ξεκινάει από τη φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη, NGT, και επιδεινώνεται προοδευτικά καθώς οι ασθενείς προχωρούν προς το στάδιο της μειωμένης ανοχής στη γλυκόζη, IGT, και τέλος στο στάδιο της εγκατάστασης του T2DM. Γι' αυτό και αποτελεί μία καλή ένδειξη για την εξέλιξη του διαβήτη χωρίς να σχετίζεται με την αντίσταση στην ινσουλίνη και την έκκριση της ινσουλίνης. [3]

Όπως αναφέρθηκε και στον προδιαβήτη, έτσι και στο διαβήτη, τα β παγκρεατικά κύτταρα αναπτύσσουν μία αντισταθμιστική δράση στα αυξημένα επίπεδα της γλυκόζης και στην αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη, που επιτρέπει τη συνεχή ή αυξημένη παραγωγή και έκκριση της ινσουλίνης για ένα μεγάλο συνεχόμενο χρονικό διάστημα.

Αυτό το συνεχόμενο στρες, όμως, έχει και ένα κόστος, καθώς οδηγεί στη β κυτταρική δυσλειτουργία και τελικά στο θάνατό τους.[6]

Σύμφωνα με μελέτη που έγινε σε Άγγλους ασθενείς (White hall study ) η αντίσταση στην ινσουλίνη και η ανά διαστήματα υπεργλυκαιμία κάνουν την εμφάνισή τους ακόμα και 13 χρόνια πριν τη διάγνωση του διαβήτη τύπου II. [9]

Κατά το πρώτο στάδιο του T2DM οι τιμές της γλυκόζης στην κυκλοφορία του αίματος διατηρούνται στα φυσιολογικά επίπεδα, καθώς ειδικοί αντισταθμιστικοί μηχανισμοί, παρατηρώντας την αντίσταση των ιστών στην ινσουλίνη, αυξάνουν το ρυθμό παραγωγής και έκκρισής της από τα β παγκρεατικά κύτταρα.

Αυτή η κατάσταση παραμένει σταθερή μέχρι 2 έως και 6 χρόνια πριν τη διάγνωσή του. Στη συνέχεια ακολουθεί μία σταθερή περίοδος προσαρμογής κατά την οποία τα β παγκρεατικά κύτταρα δεν είναι πλέον σε πλήρη θέση να αντισταθμίσουν την αυξημένη αντίσταση στην ινσουλίνη, με αποτέλεσμα οι τιμές της γλυκόζης νηστείας και/ή της γλυκόζης μετά από το γεύμα να μην διατηρούνται. Αυτή η περίοδος είναι πιθανό να ξεκινήσει όταν τα επίπεδα της γλυκόζης νηστείας και της γλυκόζης μετά από το γεύμα είναι σε φυσιολογικά επίπεδα και συνήθως συνοδεύεται από μία μείωση στην έκκριση της ινσουλίνης.

Επομένως, μεγάλο μέρος του πρώτου και του δεύτερου σταδίου πραγματοποιούνται πριν την εμφάνιση ακόμα και της προδιαβητικής φάσης.

Τέλος, κατά το τρίτο στάδιο, παρατηρείται μία πιο απότομη πτώση στη λειτουργία των β παγκρεατικών κυττάρων, καθώς πλέον είναι ανίκανα να αντισταθμίσουν την αντίσταση στην ινσουλίνη με αποτέλεσμα η υπεργλυκαιμία να εμφανίζεται σε μόνιμη κατάσταση. Σε αυτό το σημείο μπορεί να πραγματοποιηθεί και η κλινική διάγνωση του διαβήτη. [5,6]

Το US Diabetes Prevention Program έδειξε ότι η αλλαγή στον τρόπο ζωής, μαζί με την παρακολούθηση από ειδικούς μπορεί να μειώσει την εξέλιξη του διαβήτη μέχρι και 58%. Μέσα από τις μελέτες αυτές έχει δειχθεί ότι το μεγαλύτερο αποτέλεσμα στην πρόληψη του διαβήτη είναι η έγκαιρη παρέμβαση με αλλαγές στον τρόπο ζωής, η επιθετική αντιμετώπιση άλλων παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η υπέρταση και η υπερλιπιδαιμία και, στις υψηλότερου κινδύνου περιπτώσεις, φαρμακολογική θεραπεία. [6]

Ο T2DM παρουσιάζει πολλές επιπλοκές, με κυριότερη την καρδιαγγειακή νόσο, η οποία είναι υπεύθυνη για το 80% της θνησιμότητας αυτών των ατόμων. Από μελέτες έχει βρεθεί πως ο διαβήτης θα ανήκει στις 5 κυριότερες αιτίες θανάτου στις χώρες με υψηλό εισόδημα μέχρι το 2030 και στις 10 κυριότερες αιτίες παγκοσμίως. [5]

Η διάρκεια αυτής της ασθένειας, η οποία είναι χρόνια, και οι επιπλοκές της θα συνεχίσουν να προκαλούν αύξηση των συνολικών δαπανών για την περίθαλψη των ασθενών. Εάν η τωρινή κατάσταση δεν επιβραδυνθεί ή αντιστραφεί, οι κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις που θα προκύψουν θα είναι ανησυχητικές.

## IV. ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

### IV.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΑ ΛΙΠΙΔΙΑ

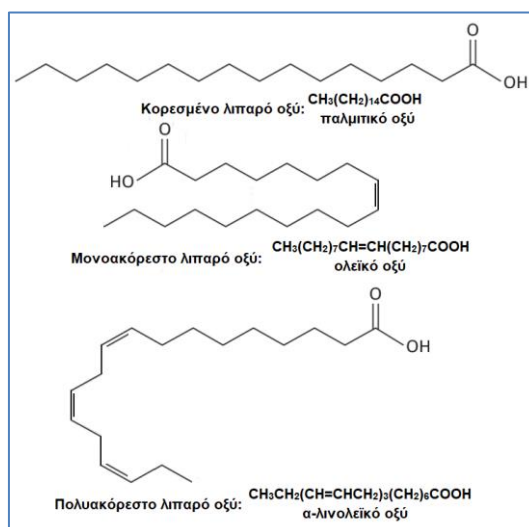
Τα λιπίδια είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες για την επιβίωσή του οργανισμού, όπως είναι η αποθήκευση ενέργειας, η εμπλοκή τους σε διάφορα σηματοδοτικά βιολογικά μονοπάτια καθώς και η λειτουργία τους ως δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών.

Με βάση τη χημική τους δομή τα λιπίδια ταξινομούνται σε 8 κατηγορίες:

- α) τα λιπαρά οξέα, (Fatty Acids: FA)
- β) τα γλυκερολιπίδια ή γλυκερίδια, (Glycerolipids: GL)
- γ) τα γλυκεροφωσφολιπίδια, (Glycerophospholipids: GP)
- δ) τα σφιγγολιπίδια, (Sphingolipids: SP)
- ε) τα στεροειδή, (Sterolipids: ST)
- στ) τα λιπίδια πρενόλης, (Prenolipids: PR)
- ζ) τα σακχαρολιπίδια, (Sacharolipids: SL) και
- η) τα πολυκετίδια, (Polyketides: PK)

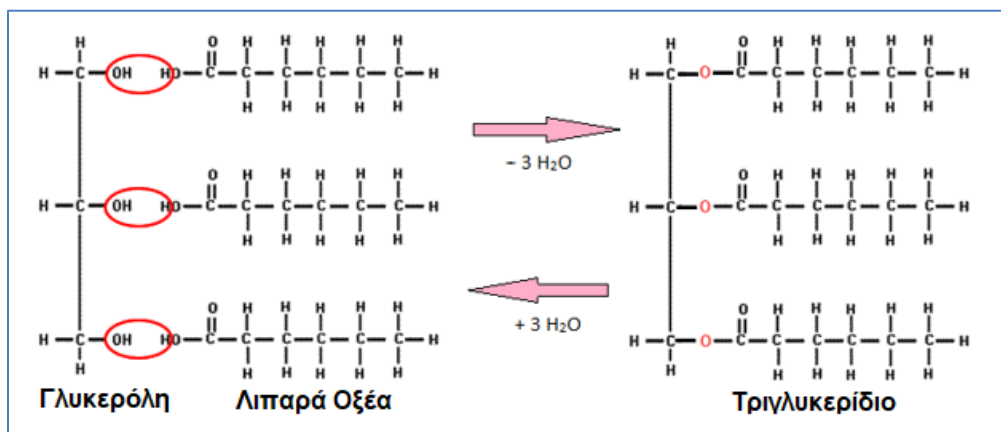
Στο πλάσμα βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα τα λιπαρά οξέα, τα τριγλυκερίδια, τα φωσφολιπίδια και η χοληστερόλη.

Τα *λιπαρά οξέα* είναι λιπίδια τα οποία είτε τα συνθέτει ο οργανισμός από μόνος του, είτε τα προσλαμβάνει μέσα από τη διατροφή. Τα λιπαρά οξέα έχουν πάντα ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα και ανάλογα με την ύπαρξη διπλού δεσμού στο μόριό τους διακρίνονται στα κορεσμένα και στα ακόρεστα. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς, ενώ τα κορεσμένα περιέχουν έναν ή περισσότερους κυρίως με *cis* γεωμετρία και σπάνια με *trans*. Επίσης, αυτά που περιέχουν μόνο έναν διπλό δεσμό χαρακτηρίζονται ως μονοακόρεστα, ενώ αυτά που έχουν δύο ή περισσότερους διπλούς δεσμούς πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.



Εικόνα 4: Δομές λιπαρών οξέων

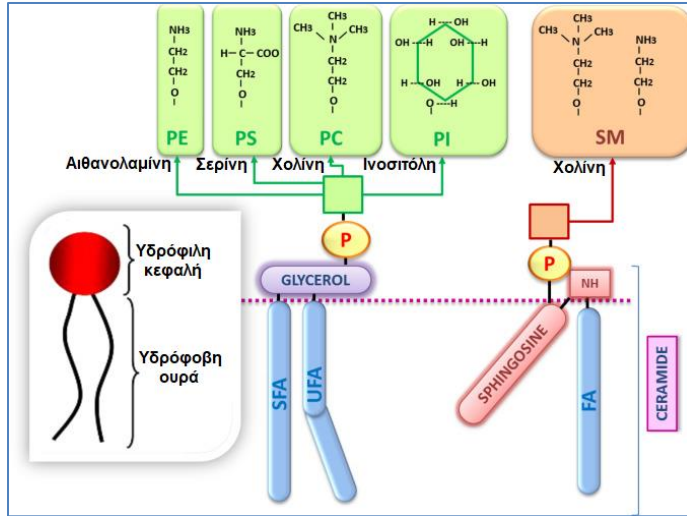
Τα *γλυκερολιπίδια* ή γλυκερίδια είναι εστέρες που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της γλυκερόλης με μονοκαρβοξυλικά οξέα. Η γλυκερόλη περιέχει στο μόριό της τρεις υδροξυλομάδες (-OH), γι' αυτό και μπορεί να σχηματίσει μονοεστέρες, διεστέρες και τριεστέρες. Τα *τριγλυκερίδια*, τα οποία βρίσκονται σε μεγαλύτερες ποσότητες στο πλάσμα του αίματος, αποτελούν τριεστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα.



**Εικόνα 5:** Αντίδραση σχηματισμού τριγλυκερίδιων

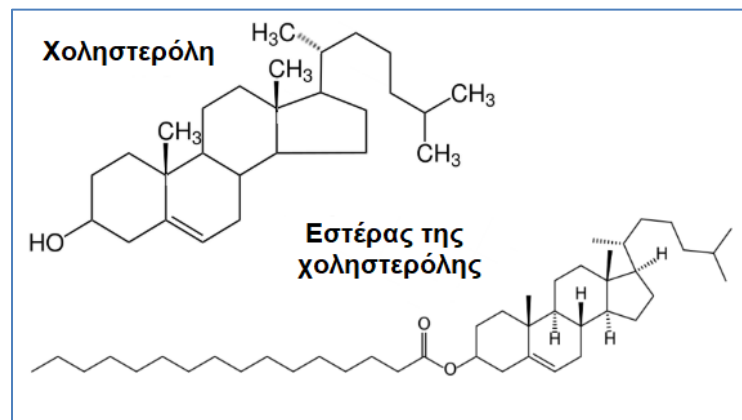
Τα *φωσφολιπίδια* είναι λιπίδια τα οποία αποτελούν κύρια συστατικά των μεμβρανών. Παράγονται από καρβοξυλικά οξέα και μία φωσφορική ομάδα και μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες: τα *γλυκεροφωσφολιπίδια*, και τα *σφιγγολιπίδια*. Τα πρώτα αποτελούνται από τη γλυκερόλη, η οποία στα δύο γειτονικά της -OH έχει εστεροποιηθεί με λιπαρά οξέα, το ένα κορεσμένο και το άλλο ακόρεστο, και το τρίτο -OH της έχει μετατραπεί σε μία ομάδα φωσφορικού εστέρα που φέρει άλλον έναν υποκαταστάτη που προέρχεται από μία μικρού μοριακού βάρους αλκοόλη. Τα σφιγγολιπίδια είναι παρόμοια με τα γλυκεροφωσφολιπίδια με τη διαφορά τους να είναι ότι δεν περιέχουν γλυκερόλη αλλά σφιγγοσίνη η οποία περιέχει στο μόριό της δύο -OH. Έτσι, στα σφιγγολιπίδια, το ένα -OH τους εστεροποιείται με ένα λιπαρό οξύ και το άλλο, όπως και στα γλυκεροφωσφολιπίδια, μετατρέπεται σε μία φωσφορική ομάδα που φέρει τον υποκαταστάτη που προέρχεται από μία αλκοόλη.





**Εικόνα 6:** Δομή γλυκεροφωσfolιπιδίων (αριστερά) και σφιγγολιπιδίων (δεξιά)

Τα *στεροειδή* είναι λιπίδια τα οποία συχνά λειτουργούν ως ορμόνες στον ανθρώπινο οργανισμό, αλλά αποτελούν και σημαντικά συστατικά της λιπιδικής μεμβράνης μαζί με τα φωσfolιπίδια. Χαρακτηριστικό της δομής τους αποτελεί η συμπίκνωση τριών κυκλοεξανικών δακτυλίων, με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζουν γωνία. Το κύριο στεροειδές στον ανθρώπινο οργανισμό είναι η *χοληστερόλη* η οποία αποτελεί απαραίτητο συστατικό των μεμβρανών και πρόδρομη ένωση των στεροειδών ορμονών, της βιταμίνης D καθώς και των χολικών οξέων. Τα 2/3 της χοληστερόλης του πλάσματος βρίσκονται με τη μορφή εστέρων της. [10,11]



**Εικόνα 7:** Δομή της χοληστερόλης στην ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή της

## IV.2 ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΤΟΥ ΠΛΑΣΜΑΤΟΣ

Τα λιπίδια, ως οργανικές ενώσεις είναι σχεδόν αδιάλυτα στο νερό, κατάσταση που καθιστά απαραίτητη την παρουσία μορίων ικανών να τα μεταφέρουν μέσα στην κυκλοφορία του αίματος με τελικό στόχο τη μεταφορά και απορρόφησή τους από

συγκεκριμένους ιστούς ώστε να μεταβολιστούν, αποθηκευτούν ή να χρησιμοποιηθούν με οποιονδήποτε άλλο τρόπο που κρίνεται απαραίτητος για την επιβίωση και τη σωστή λειτουργία του κυττάρου.





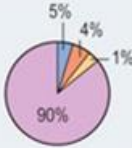
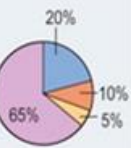
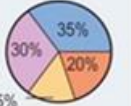
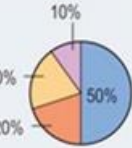
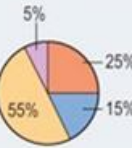
Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα μεταφέρονται μέσα στην κυκλοφορία του αίματος, κυρίως, μέσω της αλβουμίνης, ενώ τα υπόλοιπα λιπίδια μεταφέρονται μέσω συμπλόκων τα οποία καλούνται λιποπρωτεΐνες. Οι λιποπρωτεΐνες είναι σφαιρικά σύμπλοκα τα οποία αποτελούνται από έναν μη πολικό, υδρόφοβο πυρήνα λιπιδίων, κυρίως τριγλυκεριδίων και εστέρων της χοληστερόλης, ο οποίος περιβάλλεται από μία πολική επιφανειακή στιβάδα η οποία αποτελείται, κυρίως, από φωσφολιπίδια, απολιποπρωτεΐνες και χοληστερόλη. [1]

Οι λιποπρωτεΐνες διαφέρουν ως προς το μέγεθος και την πυκνότητα, με τη διαφορά στην πυκνότητά τους να χρησιμοποιείται για την ταξινόμησή τους σε 6 κατηγορίες. Με σειρά αύξουσας πυκνότητας οι 6 κατηγορίες λιποπρωτεϊνών είναι οι εξής:

- 1) Τα χυλομικρά, με πυκνότητα  $d < 0,096$  g/ml
- 2) Οι λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλής πυκνότητας, (Very Low Density Lipoproteins: VLDL), με πυκνότητα  $d = 0,096 - 1,006$  g/ml
- 3) Οι λιποπρωτεΐνες ενδιάμεσης πυκνότητας, (Intermediate Density Lipoproteins: IDL), με πυκνότητα  $d = 1,006 - 1,019$  g/ml
- 4) Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας, (Low Density Lipoproteins: LDL), με πυκνότητα  $d = 1,019 - 1,063$  g/ml
- 5) Η λιποπρωτεΐνη (α), Lp(a), με πυκνότητα  $d = 1,060 - 1,100$  g/ml, και
- 6) Οι λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας, (High Density Lipoproteins: HDL), με πυκνότητα  $d = 1,063 - 1,210$  g/ml.

Με τη σειρά που αναφέρθηκαν, τα χυλομικρά είναι οι μεγαλύτερες, σε μέγεθος, λιποπρωτεΐνες και περιέχουν τη μεγαλύτερη ποσότητα λιπιδίων και τη μικρότερη ποσότητα πρωτεϊνών. Ενώ, οι HDL αποτελούν τις μικρότερες, σε μέγεθος, λιποπρωτεΐνες, και αντίστροφα με τα χυλομικρά, περιέχουν τη μικρότερη ποσότητα λιπιδίων και τη μεγαλύτερη ποσότητα πρωτεϊνών (Πίνακας 4). [12]

**Πίνακας 4:** Σύσταση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος

<b>Σύσταση των λιποπρωτεϊνών</b>					
	<i>Χυλομικρά</i>	<i>VLDL</i>	<i>IDL</i>	<i>LDL</i>	<i>HDL</i>
 Τριγλυκερίδια  Χοληστερόλη  Φωσφολιπίδια  Πρωτεΐνες					
Απολιποπρωτεΐνες	C, B-48, E, A	B-100, C, E	B-100, E	B-100	A, C, E

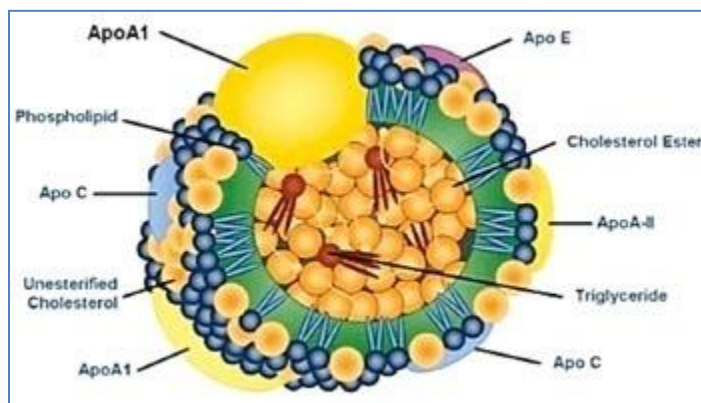
## V. HDL

### V.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι HDL είναι οι μικρότερες και οι πυκνότερες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος με διάμετρο 7,4-12nm και πυκνότητα 1,063-1,21g/mL. Είναι συμπλέγματα λιπιδίων και πρωτεϊνών τα οποία συντίθενται, κυρίως, στο ήπαρ και σε μικρότερο βαθμό στα κύτταρα του λεπτού εντέρου, ως δισκοειδή σωματίδια τα οποία περιέχουν αρχικά φωσφολιπίδια, χοληστερόλη και τις απολιποπρωτεΐνες apoE και apoA.

Καθώς εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, προσλαμβάνουν ελεύθερη χοληστερόλη τόσο από εξωηπατικούς ιστούς όσο και από άλλες λιποπρωτεΐνες καθώς, επίσης, και τις απολιποπρωτεΐνες apoC και επιπλέον apoA με αποτέλεσμα να ωριμάζουν και να αποκτούν ένα σφαιρικό σχήμα.

Οι HDL στην ώριμη μορφή τους παρουσιάζουν μεγάλη ετερογένεια, με τα σωματίδια να αποτελούνται από έναν υδροφοβικό λιπιδικό πυρήνα που περιέχει κυρίως τριγλυκερίδια και εστεροποιημένη χοληστερόλη και μία εξωτερική στιβάδα, η οποία περιβάλλει τον πυρήνα αυτόν, αποτελούμενη από φωσφολιπίδια και ελεύθερη χοληστερόλη. Εκτός από τα λιπίδια αυτά, η επιφάνεια των HDL περιέχει και τις απολιποπρωτεΐνες που έχουν αναφερθεί παραπάνω, με την apoA-I να βρίσκεται σε μεγαλύτερη ποσότητα. [12]



Εικόνα 8: Σωματιδιακή μορφή των HDL λιποπρωτεϊνών

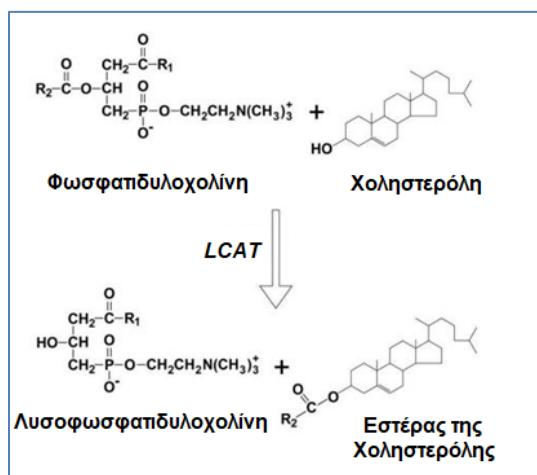
### V.2 ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΚΑΙ Η ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΗΣ ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗΣ

Μόλις σχηματιστούν οι ώριμες HDL, υπόκεινται σε συνεχή και εκτεταμένη αναδιαμόρφωση από ένα πλήθος ενζύμων τα οποία εμπλέκονται στο μεταβολισμό τους και επηρεάζουν τη σύσταση, το σχήμα, το μέγεθος και το επιφανειακό φορτίο τους. Επίσης, η αναδιαμόρφωση παίζει σημαντικό ρόλο και στις διάφορες λειτουργικές ιδιότητες των σωματιδίων αυτών.

Τα κυριότερα ένζυμα τα οποία αναδιαμορφώνουν τις HDL είναι:

- α)** Η λεκιθινο-χοληστερόλυο-ακυλοτρανσφεράση (Lecithin – Cholesterol Acyltransferase: *LCAT*),
- β)** Η πρωτεΐνη μεταφοράς των εστέρων της χοληστερόλης (Cholesteryl Ester Transfer Protein: *CETP*),
- γ)** Η πρωτεΐνη μεταφοράς των φωσφολιπιδίων (Phospholipid Transfer Protein: *PLTP*),
- δ)** Η ηπατική λιπάση (Hepatic Lipase: *HL*), και
- ε)** Η φωσφολιπάση<sub>2</sub>, (Phospholipase A<sub>2</sub>: *PLA<sub>2</sub>*).

Η **LCAT** είναι ένα υδροφοβικό ένζυμο το οποίο αποτελεί τη μεγαλύτερη πηγή εστέρων της χοληστερόλης των HDL στο πλάσμα, καθώς είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό τους. Το ένζυμο αυτό καταλύει τη μεταφορά μίας ακυλο-ομάδας από τη φωσφατιδυλοχολίνη στην χοληστερόλη παράγοντας τον αντίστοιχο εστέρα της χοληστερόλης και λυσοφωσφατιδυλοχολίνη. Η αντίδρασή αυτή πραγματοποιείται στην επιφάνεια των HDL σωματιδίων, και οι εστέρες της χοληστερόλης που παράγονται παραμένουν στα HDL σωματίδια, συγκεκριμένα ενσωματώνονται στον πυρήνα των σωματιδίων, ενώ η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη είτε προσδένεται στην αλβουμίνη του πλάσματος, είτε δρα ως ομάδα αποδοχής μίας άλλης ακυλο-ομάδας ώστε να μετατραπεί και πάλι σε φωσφατιδυλοχολίνη.



**Εικόνα 9:** Σχηματισμός εστέρων της χοληστερόλης μέσω της δράσης της LCAT

Η **CETP** είναι μία υδροφοβική γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος η οποία είναι υπεύθυνη για ένα μεγάλο μέρος της αναδιμόρφωσης των HDL καθώς αναδιανέμει τους εστέρες της χοληστερόλης και τα τριγλυκερίδια μεταξύ των διαφορετικών λιποπρωτεϊνικών κλασμάτων. Συγκεκριμένα, η CETP καταλύει τη μεταφορά των εστέρων της χοληστερόλης που συνθέτονται στις HDL από τη δράση της LCAT, προς τις πλούσιες σε τριγλυκερίδια λιποπρωτεΐνες (χυλομικρά, VLDL και LDL) με ταυτόχρονη μεταφορά των τριγλυκεριδίων προς την αντίθετη κατεύθυνση, δηλαδή από τα χυλομικρά, τις VLDL και τις LDL προς τις HDL.

Αξίζει να σημειωθεί πως η ανταλλαγή αυτή των εστέρων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων ανάμεσα στα δύο είδη λιποπρωτεϊνών δεν είναι πάντοτε ισομοριακή, καθώς μπορεί το μέγεθος της μεταφοράς των εστέρων της χοληστερόλης έξω από τις HDL να είναι μεγαλύτερο απ' ότι των τριγλυκεριδίων μέσα σε αυτές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ολική μείωση του λιπιδικού περιεχομένου του πυρήνα των HDL, οδηγώντας σε μείωση του μεγέθους του σωματιδίου.

Η **PLTP** είναι άλλη μία υδροφοβική γλυκοπρωτεΐνη του πλάσματος η οποία καταλύει τη μεταφορά των φωσφολιπιδίων από τις HDL στις άλλες λιποπρωτεΐνες αλλά και τη μεταφορά της μη εστεροποιημένης χοληστερόλης μεταξύ των λιποπρωτεϊνών.

Η **HL** είναι ένα λιπολυτικό ένζυμο το οποίο εμπλέκεται στην εκλεκτική πρόσληψη των HDL εστέρων της χοληστερόλης, αλλά και στην υδρόλυση κυρίως των τριγλυκεριδίων αλλά και των φωσφολιπιδίων τους.

Τέλος, η **PLA<sub>2</sub>** υδρολύει τα φωσφολιπίδια των HDL. [13]

**Πίνακας 5:** Επιρροή των ενζύμων στο μέγεθος και τη λιπιδιακή σύσταση των HDL

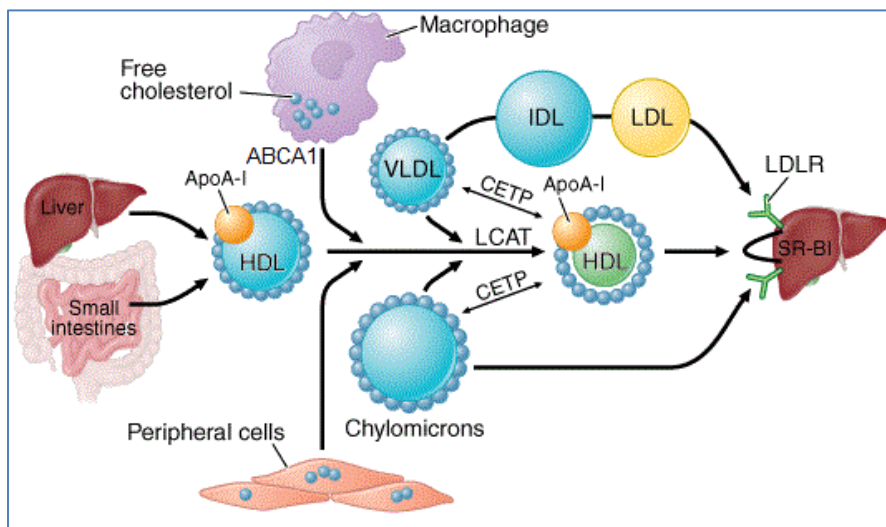
<i>Παράγοντες που αυξάνουν το μέγεθος των HDL</i>	<i>Παράγοντες που μειώνουν το μέγεθος των HDL</i>	<i>Παράγοντες που παράγουν φτωχές σε λιπίδια HDL</i>
LCAT	CETP	LCAT
	HL	CETP
PLTP		PLTP
	PLA <sub>2</sub>	HL

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, οι HDL παράγονται στο ήπαρ και στο λεπτό έντερο με τη μορφή σωματιδίων φτωχών σε λιπίδια. Όταν εισέρχονται στην κυκλοφορία του αίματος, η κύρια λειτουργία τους είναι να μεταφέρουν τη χοληστερόλη από τους περιφερικούς, εξωηπατικούς, ιστούς στο ήπαρ, μέσω μιας διαδικασίας που καλείται *αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης* και προστατεύει τον ανθρώπινο οργανισμό από τη συσσώρευσή της σε διάφορους ιστούς, βελτιώνοντας μ' αυτόν τον τρόπο και τη λειτουργία τους.

Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται ως εξής: Αρχικά μία μεμβρανική πρωτεΐνη των μακροφάγων, η ABCA1 (ATP Binding Cassette transporter A1) βοηθάει στη μεταφορά των φωσφολιπιδίων και της ελεύθερης χοληστερόλης από τα μακροφάγα των ιστών στις HDL. Στη συνέχεια η ελεύθερη χοληστερόλη που μεταφέρθηκε στις HDL εστεροποιείται με την επίδραση της LCAT, με το μηχανισμό που αναφέρθηκε προηγουμένως.

Οι ώριμες HDL που προκύπτουν είναι σε θέση τόσο να συνεχίσουν να απορροφούν επιπλέον χοληστερόλη από τους ιστούς όσο και να εμπλουτίζονται με τριγλυκερίδια από άλλες λιποπρωτεΐνες μέσω της δράσης της CETP.

Η συνεχόμενη αύξηση του λιπιδικού περιεχομένου των HDL έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του μεγέθους τους και την αλληλεπίδρασή τους με τον υποδοχέα της SR-BI, πρωτεΐνη η οποία βοηθάει τις HDL να εισέλθουν στο ήπαρ ώστε να μεταβολιστεί και να απεκκριθεί η χοληστερόλη τους. [14]



**Εικόνα 10:** Αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης

Η χοληστερόλη που βρίσκεται συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες μπορεί να απεκκριθεί μέσω δύο οδών: μέσω της χολής ή μέσω μίας ανεξάρτητης από τη χολή οδό. Η πρώτη οδός ξεκινάει από το ήπαρ, όπου τα ηπατοκύτταρα προσλαμβάνουν τη χοληστερόλη από τις HDL και μαζί με τη χοληστερόλη που δημιουργήθηκε de novo εκκρίνεται στη χολή και στη συνέχεια εκκρίνεται μέσω αυτής στα κόπρανα.

Εναλλακτικά, η χοληστερόλη μπορεί να απεκκριθεί μέσω των VLDL, με τις τελευταίες να προσλαμβάνονται από το λεπτό έντερο μέσω ειδικών υποδοχέων. Σ' αυτήν την οδό η χοληστερόλη μεταφέρεται διαμέσου των κυττάρων του εντέρου στη μεμβράνη με τελική εκροή εντός του εντερικού αυλού. [14]

### V.3 ΛΙΠΙΔΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΩΝ HDL

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι HDL αποτελούνται από μία εξωτερική λιπιδική στιβάδα και έναν υδροφοβικό λιπιδικό πυρήνα. Τα κυρίαρχα λιπίδια της εξωτερικής στιβάδας είναι τα φωσφολιπίδια, τα οποία περιέχονται σε ποσοστό 40-60%. Στην εξωτερική στιβάδα επίσης βρίσκεται και η ελεύθερη χοληστερόλη η οποία αποτελεί το 5-10% των λιπιδίων των HDL. Ο υδροφοβικός πυρήνας των HDL σωματιδίων αποτελείται από τους εστέρες της χοληστερόλης, οι οποίοι αποτελούν το 30-40% των λιπιδίων των HDL και από τα τριγλυκερίδια, το ποσοστό των οποίων κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 5-10%. [15]

## **I. Λιπίδια της στιβάδας**

Τα φωσφολιπίδια της λιπιδικής στιβάδας της επιφάνειας των HDL λιποπρωτεϊνών αποτελούν κυρίως τα γλυκεροφωσφολιπίδια: φωσφατιδυλοχολίνη, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, κ.ά., και τα σφιγγολιπίδια, με κύριο εκπρόσωπο τη σφιγγομυελίνη.

Το κυριότερο γλυκεροφωσφολιπίδιο, με ποσοστό 33-45% των ολικών λιπιδίων της στιβάδας είναι η *φωσφατιδυλοχολίνη* (phosphatidylcholine, *PC*), η οποία παίζει βασικό ρόλο στη δομή της εξωτερικής στιβάδας των HDL. Τα κυριότερα είδη φωσφατιδυλοχολίνης που βρίσκονται στις HDL είναι οι PC: 16:0/18:2, 18:0/18:2, 16:0/20:4 και 16:0/18:1. Συγκριτικά με τις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, οι HDL είναι εμπλουτισμένες κυρίως με μόρια φωσφατιδυλοχολίνης που περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Η *λυσοφωσφατιδυλοχολίνη* (lysophosphatidylcholine, *LPC*), αποτελεί, μετά τη φωσφατιδυλοχολίνη, ένα από τα βασικά γλυκεροφωσφολιπίδια των HDL. Βρίσκεται στην επιφάνεια των HDL καθώς αποτελεί προϊόν της υδρόλυσης της φωσφατιδυλοχολίνης από τη δράση της LCAT. Τα κυριότερα είδη λυσοφωσφατιδυλοχολίνης που βρίσκονται στις HDL είναι οι LPC που περιέχουν κορεσμένα λιπαρά οξέα κυρίως 16 και 18 ατόμων άνθρακα, δείχνοντας την προτίμηση της LCAT για μόρια φωσφατιδυλοχολίνης με 16 και 18 άτομα άνθρακα.

Η *φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη* (phosphatidylethanolamine, *PE*) αποτελεί μόλις το 1% των λιπιδίων της HDL, όμως και αυτή παίζει σημαντικό ρόλο στη δομή της επιφάνειάς της.

Η *φωσφατιδυλοϊνσιτόλη* (phosphatidylinositol, *PI*) είναι ένα αρνητικά φορτισμένο γλυκεροφωσφολιπίδιο το οποίο βρίσκεται σε μικρή ποσότητα στην επιφάνεια των HDL, όμως, λόγω του φορτίου της, παίζει σημαντικό ρόλο στο ολικό φορτίο της επιφάνειάς τους. Η ποσότητα της PI στην επιφάνεια των HDL μπορεί να ρυθμίσει τις αλληλεπιδράσεις των λιποπρωτεϊνών με λιπάσες, με πρωτεΐνες μεταφοράς λιπιδίων, κ.ά.. Η PI βρίσκεται στις HDL με παρόμοιο ποσοστό με την PE. Τα κυριότερα είδη φωσφατιδυλοϊνσιτόλης που βρίσκονται στις HDL είναι οι PI 18:0/20:3 και η 18:0/20:4.

Τα *πλασμαλογόνα* περιέχουν ένα λιπαρό οξύ συνδεδεμένο με βινυλαιθέρα, παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και αποτελούν περίπου το 1% των λιπιδίων των HDL. Τα PC-πλασμαλογόνα είναι τα πιο άφθονα είδη στις HDL αλλά αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 10% της συνολικής φωσφατιδυλοχολίνης. Αντίθετα, τα PE-πλασμαλογόνα βρίσκονται στις HDL σε παρόμοιες ποσότητες με τη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη. Τα πλασμαλογόνα των HDL περιέχουν κυρίως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, με τα PC-πλασμαλογόνα να αποτελούνται κυρίως από τα 38:5 και 36:2 είδη, ενώ τα PE-πλασμαλογόνα από τα 18:0/20:4 και 16:0/20:4 είδη.

Το κυριότερο σφιγγολιπίδιο των HDL είναι η *σφιγγομυελίνη* (sphingomyelin, *SM*) η οποία αποτελεί το 5-10% όλων των λιπιδίων των HDL. Η σφιγγομυελίνη είναι ένα δομικό λιπίδιο το οποίο ενισχύει την ακαμψία της επιφάνειας των HDL λιποπρωτεϊνών

επηρεάζοντας έτσι και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών που βρίσκονται στην επιφάνεια των HDL. Τα κυριότερα είδη σφιγγομυελίνης που βρίσκονται στις HDL είναι οι SM 18:1/16:0 και η 18:2/24:0.

Τα κεραμίδια είναι σφιγγολιπίδια τα οποία εμπλέκονται στην κυτταρική σηματοδότηση και απόπτωση, στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, τη μιτοχονδριακή λειτουργία καθώς και την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Το ποσοστό τους στις HDL είναι πολύ μικρό καθώς αποτελούν μόλις το 0,05% των λιπιδίων τους. Τα κυριότερα είδη κεραμιδίων που παρατηρούνται στις HDL είναι τα 24:0 και 24:1.

Τέλος, η *ελεύθερη χοληστερόλη* βρίσκεται στην επιφάνεια των HDL σωματιδίων, με ένα μέρος της να διεισδύει στον πυρήνα. Αποτελεί το 5-10% των ολικών λιπιδίων των σωματιδίων και συνεισφέρει στη ρύθμιση της ρευστότητας της λιπιδικής στιβάδας. [15,16]

## **II. Λιπίδια του πυρήνα**

Ο λιπιδικός πυρήνας των HDL αποτελείται κυρίως από εστέρες της χοληστερόλης και τριγλυκερίδια. Οι *εστέρες της χοληστερόλης* αποτελούν το 30-40% των λιπιδίων των HDL και σχηματίζονται στην επιφάνειά τους ως προϊόν της εστεροποίησης των φωσφολιπιδίων και της χοληστερόλης, αντίδραση που καταλύεται από την LCAT. Τα μόρια αυτά είναι εξαιρετικά υδρόφοβα, έτσι η αντίδραση αυτή έχει ως τελικό αποτέλεσμα τη μετατόπιση της χοληστερόλης των HDL από την επιφάνειά τους στο λιπιδικό πυρήνα. Το μεγαλύτερο μέρος των εστέρων της χοληστερόλης στις HDL περιέχουν λινελαϊκό οξύ στο μόριό τους. [15]

Τα *τριγλυκερίδια*, τα οποία αποτελούν το 5-12% των ολικών λιπιδίων των HDL, όπως και οι εστέρες της χοληστερόλης, είναι εξαιρετικά υδρόφοβα μόρια, γι' αυτό και απαντώνται στο λιπιδικό πυρήνα. Σε σχέση, όμως, με τους εστέρες, τα τριγλυκερίδια σχηματίζουν μία πιο ρευστή φάση στον πυρήνα. Τα τριγλυκερίδια των HDL περιέχουν κυρίως ελαϊκό, παλμιτικό και λινελαϊκό οξύ στο μόριό τους. [15,16]



**Πίνακας 6:** Κυριότερα λιπίδια των HDL λιποπρωτεϊνών [15]

<b>Λιπίδια</b>	<b>Περιεκτικότητα στις HDL (% των ολικών HDL λιπιδίων)</b>
<b>Φωσφολιπίδια</b>	40-60
Φωσφατιδυλοχολίνη	33-45
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	0,5-5
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη	0,5-1,5
Φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη	0,5-1,5
<b>Σφιγγολιπίδια</b>	5-10
Σφιγγομυελίνη	5-10
<b>Ελεύθερη Χοληστερόλη</b>	5-10
<b>Εστέρες της Χοληστερόλης</b>	30-40
<b>Τριγλυκερίδια</b>	5-12

Η λιπιδική σύσταση των HDL επηρεάζει σημαντικά την σταθερότητα των σωματιδίων, την εκροή της χοληστερόλης από τα μακροφάγα, καθώς και την ικανότητά τους να αλληλοεπιδρούν με διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες όπως είναι η LCAT, η CETP και η SR-BI. [17-21]

Μελέτες που έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας ανασυσταθέντα HDL, rHDL, σωματίδια, και έχουν επικεντρωθεί στην επιρροή της λειτουργικότητας των HDL από αλλοιώσεις στο φωσφολιπιδιακό περιεχόμενο των σωματιδίων, έχουν δείξει πως η μείωση της περιεκτικότητας των rHDL σε φωσφολιπίδια, PL:

**α)** *Ελαττώνει κατά πολύ τη δράση της CETP*, με τις rHDL να μην αποβάλλουν τους εστέρες της χοληστερόλης τους και να δέχονται τα τριγλυκερίδια με μειωμένο ρυθμό απ' ότι οι μη τροποποιημένες rHDL, και

**β)** *Μειώνει το ρυθμό* με τον οποίο πραγματοποιείται η *αποβολή της χοληστερόλης*, από τις HDL στα κύτταρα που εκφράζουν την SR-BI, όπως είναι τα ηπατοκύτταρα. [17,18]

**γ)** Επίσης, αναλυτικότερες μελέτες έχουν δείξει πως το φωσφολιπιδιακό περιεχόμενο των HDL *επηρεάζει και την ικανότητά τους να δέχονται χοληστερόλη από τα μακροφάγα* καθώς οι HDL που περιέχουν ακόρεστα φωσφολιπίδια είναι πιο αποτελεσματικές σε σχέση με τις HDL που περιέχουν κορεσμένα ανάλογα, [15] και

**δ)** Τέλος, η αύξηση της φωσφατιδυλοχολίνης προκαλεί αύξηση στην εκροή της χοληστερόλης από το σωματίδιο της HDL, ενώ η αύξηση της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης, δηλαδή του προϊόντος της αντίδρασης της φωσφατιδυλοχολίνης με τη LCAT φαίνεται να επιβαρύνει τη λειτουργικότητα του σωματιδίου, πιθανώς μέσω της αποσταθεροποίησης και απομάκρυνσης της apo-AI από την επιφάνεια της HDL. [19]

Όσον αναφορά τη σφιγγομυελίνη, SM των HDL έχει δειχθεί ότι:

**α)** Η αύξηση των επιπέδων της: **i)** Μειώνει τη δραστικότητα της *LCAT*, **ii)** μειώνει την ικανότητα των σωματιδίων να δέχονται χοληστερόλη, και **iii)** με την ταυτόχρονη μείωση της φωσφατιδυλοχολίνης στην επιφάνεια, προκαλεί αύξηση της ρευστότητας της επιφάνειας των *HDL*. [15,19,20] Ενώ,

**β)** Η μείωση των επιπέδων της προκαλεί: **i)** αποδιοργάνωση των φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια των *HDL*, καθώς ελαττώνονται οι δεσμοί υδρογόνου στους οποίους συμμετέχει, οδηγώντας σε μείωση των ενδομοριακών συνδέσεων που δημιουργεί στην επιφάνεια του σωματιδίου, και **ii)** μείωση των αλληλεπιδράσεων των φωσφολιπιδίων με την *apoA-I*, προκαλώντας την αποσταθεροποίηση του σωματιδίου. [19,20]

Τέλος, όσον αναφορά τον εμπλουτισμό των *HDL* με τριγλυκερίδια, *TG*, κατάσταση κοινή για τους ασθενείς με *T2DM*, έχει δειχθεί πως η αύξηση αυτή προκαλεί:

**α)** Μειωμένη επίδραση της *LCAT* στα *HDL* σωματίδια,

**β)** Αυξημένη εκροή της χοληστερόλης από τα μακροφάγα, [21] αλλά

**γ)** Μειωμένη ικανότητα των σωματιδίων αυτών να αποβάλλουν τη χοληστερόλη τόσο στα ηπατοκύτταρα, ώστε να μεταβολιστεί και να αποβληθεί από τον οργανισμό, όσο και στις υπόλοιπες λιποπρωτεΐνες μέσω της δράσης της *CETP*, [21] και

**δ)** Τέλος, αστάθεια του *HDL* σωματιδίου, καθώς έχει βρεθεί πως ο λόγος των *CE/TG* στον πυρήνα των *HDL* επηρεάζει τη διαμόρφωση της *apoA-I*. [15]

**Πίνακας 7:** Επίδραση της λιπιδικής σύστασης των *HDL* στο μεταβολισμό τους

<b>Επιρροή της λιπιδικής σύστασης των <i>HDL</i> στο μεταβολισμό τους</b>	
<b>Φωσφολιπίδια</b>	<p>↑ PL ⇒ ↓ δράση της <i>CETP</i>                      ↓ PL ⇒ ↓ αποβολή της C από τα μακροφάγα</p>
	<p>↑ Ακόρεστων PL ⇒ ↑ ικανότητα να δέχονται Chol, συγκριτικά με                      ↑ Κορεσμένων PL ⇒ ↓ ικανότητα να δέχονται Chol</p>
	<p>↑ PC ⇒ ↑ εκροής Chol                      ↑ LPC ⇒ ↓ λειτουργικότητας</p>
	<p>↑ SM ⇒ ↓ δραστικότητα της <i>LCAT</i>                      ↑ SM ⇒ ↓ ικανότητα να δέχονται Chol                      ↑ SM (με ταυτόχρονη ↓ της PC) ⇒ ↑ ρευστότητας επιφάνειας                      ↓ SM ⇒ ↓ οργάνωση στο πακετάρισμα των PL στην επιφάνεια                      ↓ SM ⇒ ↓ αλληλεπίδραση των PL με την <i>apoA-I</i></p>
<b>Τριγλυκερίδια</b>	<p>↑ TG ⇒ ↓ επίδραση της <i>LCAT</i>                      ↑ TG ⇒ ↑ πρόσληψη Chol από τα μακροφάγα                      ↑ TG ⇒ ↓ ικανότητα να αποβάλλουν Chol                      ↑ TG ⇒ Αστάθεια σωματιδίου</p>

Με βάση τις παραπάνω επιδράσεις του λιπιδικού προφίλ στο μεταβολισμό των HDL σωματιδίων, γίνεται πλέον αποδεκτό ότι η ποιότητα των HDL σωματιδίων είναι σημαντικότερη από την ποσότητά τους στην κυκλοφορία του αίματος. Γι' αυτό και τα τελευταία χρόνια η πορεία της έρευνας έχει αλλάξει, με τον κύριο στόχο να αποτελέσει η γνώση της σύστασης και της λειτουργίας των HDL, παρά η βελτίωση των επιπέδων τους, καθώς τα “δυσλειτουργικά” HDL σωματίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στο T2DM και στις επιπλοκές του.

## V.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ HDL

Οι HDL εμφανίζουν ένα ευρύ φάσμα αθηροπροστατευτικών, αντιφλεγμονωδών, αντιοξειδωτικών και αντιθρομβωτικών ιδιοτήτων. [22]

- Αθηροπροστατευτικές ιδιότητες

Οι HDL μέσω της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης απομακρύνουν την περίσσεια της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς προς το ήπαρ ώστε τελικά να μεταβολιστεί και να απεκκριθεί. Ο κυρίαρχος ρόλος των HDL στη διαδικασία αυτή τους προσδίδει τη σημαντικότερη αθηροπροστατευτική δράση τους, καθώς προστατεύουν τα αγγεία των διάφορων ιστών με το να εξασφαλίζουν ότι η κυτταρική χοληστερόλη δε θα αυξηθεί σε επίπεδα τα οποία μπορούν να δημιουργήσουν φλεγμονή και κυτταρική δυσλειτουργία. [22] Επίσης οι HDL αναστέλλουν μόρια προσκόλλησης, τα οποία μεσολαβούν στην πρόσληψη και στη διήθηση των μονοκυττάρων στα αρτηριακά τοιχώματα, κατάσταση που αποτελεί ένα στάδιο έναρξης της αθηροσκλήρωσης. [23]

- Αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες

Η μεσολάβηση των HDL στην εκροή των λιπιδίων από το εσωτερικό του τοιχώματος των αγγείων στους διάφορους ιστούς, βοηθάει στην πρόληψη έναντι της φλεγμονής, καθώς η παραμονή τους σε αυτά τα σημεία προκαλεί την οξειδωσή τους η οποία τελικά προάγει την αγγειακή φλεγμονή. [14]

- Αντιοξειδωτικές ιδιότητες

Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες των HDL, εμφανίζονται, κυρίως, λόγω των ενζύμων: παροξονάση 1, PLA<sub>2</sub> καθώς και LCAT. Τα ένζυμα αυτά είναι γνωστό πως υδρολύουν τα οξειδωμένα φωσφολιπίδια σε λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, μειώνοντας, μ' αυτόν τον τρόπο το οξειδωμένο λιπιδικό περιεχόμενο των κυττάρων. [14] Επίσης, έχει δειχθεί πως η ρευστότητα της επιφανειακής φωσφολιπιδιακής στιβάδας τους καθορίζει την ικανότητά τους να προσλαμβάνουν τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων, PLOOH, από τις LDL. Συγκεκριμένα, η ικανότητα των rHDL να προστατεύουν τις LDL από την οξειδωση καθώς και ο ρυθμός μεταφοράς των υδροϋπεροξειδίων των φωσφολιπιδίων από τις οξειδωμένες LDL αυξάνεται με την αύξηση της επιφανειακής λιπιδικής ρευστότητας. [24]

Γενικά, η ρευστότητα της επιφάνειας των HDL καθορίζεται κυρίως από το περιεχόμενο της **α)** σε σφιγγομυελίνη, σε σχέση με τη φωσφατιδυλοχολίνη, **β)** σε ελεύθερη χοληστερόλη, σε σχέση με τη φωσφατιδυλοχολίνη, και **γ)** σε κορεσμένα και

μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, σε σχέση με τα πολυακόρεστα. Η μείωση του περιεχομένου των λιπιδίων αυτών προκαλεί αύξηση στη ρευστότητα της επιφανειακής στιβάδας των HDL. [15]

- Αντιθρομβωτικές ιδιότητες

Μία ακόμα δράση των HDL είναι η αντιθρομβωτική, καθώς, είναι σε θέση να αναστέλλουν τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων. [23]

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, γνωρίζουμε πως οι αλλοιώσεις του λιπιδικού περιεχομένου των HDL επηρεάζουν κατά πολύ το μεταβολισμό τους στην κυκλοφορία του αίματος, οδηγώντας, μ' αυτόν τον τρόπο και στην επιρροή των παραπάνω ευεργετικών ιδιοτήτων των HDL σωματιδίων.

Συγκεκριμένα, οι αθηροπροστατευτικές ιδιότητες, οι οποίες εμφανίζονται κυρίως λόγω της συμμετοχής των HDL στην αντίστροφη μεταφορά της χοληστερόλης, επηρεάζονται τόσο από το φωσφολιπιδικό περιεχόμενό τους, όσο και από το περιεχόμενό τους σε τριγλυκερίδια, καθώς οι μεταβολές αυτές επηρεάζουν το βαθμό με τον οποίο οι HDL δέχονται και αποβάλλουν τη χοληστερόλη. [15,17-21]

Όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των HDL έχει δειχθεί πως η μείωση της σφιγγομυελίνης σε σχέση με τη φωσφατιδυλοχολίνη στην επιφάνεια των σωματιδίων, προκαλεί αύξηση της ρευστότητας με αποτέλεσμα τα HDL σωματίδια να παρουσιάζουν αυξημένες αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Επίσης ο λόγος των CE/TG στον πυρήνα των HDL φαίνεται να επηρεάζει τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες καθώς ο λόγος αυτός επηρεάζει τη διαμόρφωση της apoA-I, η οποία παίζει καθοριστικό ρόλο στην ικανότητα των HDL να προσλαμβάνουν τα υδροϋπεροξειδία των φωσφολιπιδίων. [15,24]

Όσον αφορά τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες η φωσφατιδυλοχολίνη είναι ικανή να αναστείλει προφλεγμονώδη σήματα μέσω του NFκB (nuclear factor kappa B) μονοπατιού, συνεισφέροντας, έτσι, στην ικανότητα των HDL να αναστέλλουν τη φλεγμονή στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, έχει δειχθεί πως η ικανότητα αυτή επηρεάζεται και από την σύσταση της φωσφατιδυλοχολίνης σε λιπαρά οξέα, καθώς τα rHDL σωματίδια που περιείχαν μόρια φωσφατιδυλοχολίνης με παλμιτικό και λινελαϊκό ή παλμιτικό και αραχιδονικό αναστέλλουν την έκφραση του VCAM-1 σε ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι τα rHDL σωματίδια που περιείχαν φωσφατιδυλοχολίνη με παλμιτικό και ολεϊκό. [14,15,25]

Τέλος, όσον αφορά τις αντιθρομβωτικές ιδιότητες, η φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη, με το αρνητικό φορτίο της, έχει δειχθεί πως παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση και στην απόπτωση των αιμοπεταλίων, μία ικανότητα που δείχνει πως το συγκεκριμένο φωσφολιπίδιο διαθέτει δυνατότητα ρύθμισης της λειτουργίας τους. [15]

## V.5 ΕΥΕΡΓΕΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΤΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΕΝΑΝΤΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΟΥ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II

Μελέτες έχουν δείξει πως σε μεταβολικές διαταραχές οι HDL εμφανίζουν δυσλειτουργική δράση, καθώς παρουσιάζουν μειωμένη ικανότητα: **α)** να προάγουν την εκροή της χοληστερόλης από τα μακροφάγα, **β)** να προστατεύουν τις LDL από την οξειδωση και **γ)** να αναστέλλουν την έκφραση διαφόρων μορίων προσκόλλησης. [14]

Ασθενείς με T2DM παρουσιάζουν μείωση του ρυθμού της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, η οποία, έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απομάκρυνση της χοληστερόλης από τους περιφερικούς ιστούς στο ήπαρ, τη συσσώρευση των λιπιδίων και τη δημιουργία φλεγμονής στους ιστούς που εμπλέκονται στην παθογένεια της ασθένειας αυτής, επηρεάζοντας επιπλέον τόσο την έκκριση της ινσουλίνης από τα β παγκρεατικά κύτταρα, όσο και την ευαισθησία των κυττάρων ως προς την ινσουλίνη αλλά και την πρόσληψη της γλυκόζης από αυτά. [22]

Στα β παγκρεατικά κύτταρα, η επίδραση των HDL στην αποβολή της περίσσειας της χοληστερόλης, βελτιώνει τη ρύθμιση της έκκρισης της ινσουλίνης, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο τη μείωση των γλυκαιμικών διαταραχών και τον κίνδυνο των διαβητικών επιπλοκών. Επίσης, έχειδειχθεί πως οι HDL παρουσιάζουν μεγάλη αποτελεσματικότητα στην αναστολή της απόπτωσης των κυττάρων αυτών. [23]

Έχειδειχθεί πως σε άλλους τύπους κυττάρων, οι HDL ενεργοποιούν τις Akt κινάσες, μία ομάδα κινασών η οποία παίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική επιβίωση, στο μεταβολισμό, καθώς και στη κυτταρική ανάπτυξη, συμμετέχοντας μ' αυτόν τον τρόπο στην επιβίωσή τους. Λόγω της παρουσίας των Akt κινασών και στα β παγκρεατικά κύτταρα, έχει δημιουργηθεί η υπόθεση πως οι HDL μπορεί να προστατεύουν τα κύτταρα αυτά, προτρέποντας την απόπτωσή τους, μέσω της ενεργοποίησης των Akt κινασών [23]

Επίσης, γνωρίζουμε πως κατά τη διαδικασία εξέλιξης του διαβήτη, η παρουσία στρες στο ενδοπλασματικό δίκτυο (ΕΔ) των β παγκρεατικών κυττάρων αποτελεί μία πολύ σημαντική παράμετρο στη δυσλειτουργία των κυττάρων αυτών, η οποία μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στο θάνατό τους. Μελέτες [23,26] έχουν δείξει πως οι HDL είναι ικανές να προστατεύουν έναντι των μορίων που προκαλούν το στρες στο ΕΔ και κατά συνέπεια την απόπτωση των β-κυττάρων, με το να αποτρέπουν τη διέγερσή των μορίων, διατηρώντας τη λειτουργικότητα του ΕΔ ακόμα και παρουσία συνθηκών στρες.

Εκτός από τις ευεργετικές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν οι HDL κατά της απόπτωσης, είναι πιθανό να εμφανίζουν επιπτώσεις στην επιβίωση και στη λειτουργικότητα των β κυττάρων μέσω της αύξησης του πολλαπλασιασμού τους ή την ικανότητά τους να εκκρίνουν ινσουλίνη. In vivo και in vitro μελέτες έδειξαν πως οι HDL εμπλέκονται άμεσα στην εκκριτική ικανότητα των β κυττάρων καθώς συνδέονται σε αυτά επιφανειακά, ενεργοποιούν τη μεταγραφή συγκεκριμένων γονιδίων που εμπλέκονται τόσο στην έκκριση της ινσουλίνης όσο και στην επιβίωσή τους, βοηθώντας έτσι στη σωστή λειτουργία τους και αποτρέποντας την απόπτωσή τους. Οι μοριακοί μηχανισμοί

με τους οποίους πραγματοποιούνται οι παραπάνω διαδικασίες δεν είναι πλήρως γνωστοί, γι' αυτό είναι αναγκαία η επιπλέον μελέτη. [23,26]

Εκτός από την ευεργετική δράση των HDL στα παγκρεατικά κύτταρα, η απομάκρυνση της χοληστερόλης μπορεί να είναι ιδιαίτερα σημαντική και για το ήπαρ αλλά και για τους σκελετικούς μυς, οι οποίοι αποτελούν το μέρος στο οποίο, υπό φυσιολογικές συνθήκες, πραγματοποιείται το μεγαλύτερο ποσοστό πρόσληψης της γλυκόζης στον οργανισμό, μετριάζοντας, μ' αυτόν τον τρόπο, τη φλεγμονή των κυττάρων αυτών και την αντίστασή τους στην ινσουλίνη που παρουσιάζουν στους ασθενείς με T2DM. [22]

Επομένως, γίνεται εύκολα κατανοητό, πως η ευεργετική επίδραση των HDL στα κύτταρα είναι αναμφισβήτητη, καθώς εμπλέκεται στην απομάκρυνση της περίσσειας χοληστερόλης σε οποιοδήποτε τύπο κυττάρου, βελτιώνοντας την κυτταρική λειτουργία του με αποτέλεσμα την αύξηση της πρόσληψης της γλυκόζης από τα κύτταρα αυτά, με αντίστοιχη μείωση των επιπέδων της στο πλάσμα. Επίσης προκαλούν ισχυρά αντιαποπρωτικά σήματα στα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου ίσως και των β κυττάρων, ευνοώντας μ' αυτόν τον τρόπο και την προαγωγή της έκκρισης της. [23,26]

## **V.6 ΠΟΙΟΤΗΤΑ VS ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΤΩΝ HDL ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ ΤΥΠΟΥ II**

Τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα επικεντρώνεται κυρίως στην έρευνα της ολικής σύστασης των HDL και όχι μόνο στην ποσότητά τους στην κυκλοφορία του αίματος, καθώς έχει δειχθεί πως είναι σημαντικότερο να βελτιώσουμε τη σύσταση των σωματιδίων παρά τα επίπεδά τους.

Όσον αναφορά τη μελέτη των τελευταίων χρόνων σχετικά με το σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, το μεγαλύτερο μέρος των ερευνών, έχει επικεντρωθεί στη ποσότητα της HDL-C και στη λειτουργικότητα του ίδιου του σωματιδίου στην κατάσταση αυτή.

Από τις μελέτες αυτές, λίγες είναι εκείνες στις οποίες εξετάστηκε εκτενέστερα η σύσταση των HDL στους ασθενείς με διαβήτη, με τον αριθμό αυτόν να μειώνεται ακόμα περισσότερο όσον αναφορά μελέτες που εμπεριείχαν στοιχεία και για προδιαβητικούς ασθενείς.

Συγκεκριμένα, στις μελέτες των Silva et al [27], Griffiths et al [28] και Garvey et al [29] έγινε σύγκριση των επιπέδων της HDL-C σε υγιείς και ασθενείς με T2DM και παρατηρήθηκε πως τα επίπεδά της παρουσιάζονται μειωμένα στους διαβητικούς ασθενείς. Η ίδια μελέτη πραγματοποιήθηκε και από τους Drexel et al [30] και Lorenzo et al [31], με τη διαφορά ότι σ' αυτές τις μελέτες προστέθηκαν και στοιχεία για προδιαβητικούς ασθενείς. Τα αποτελέσματα και των δύο αυτών μελετών έδειξαν πως η μείωση της HDL-C ξεκινάει από τους προδιαβητικούς ασθενείς και επιδεινώνεται στους διαβητικούς.

Εκτενέστερη μελέτη όσον αναφορά τη λιπιδική σύσταση της HDL διεξήγαγαν οι Gowri et al, Morgantini et al και Stahlamn et al , με τους πρώτους να δείχνουν πως τα επίπεδα τόσο της ελεύθερης όσο και της εστεροποιημένης χοληστερόλης μειώνονται στους

διαβητικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς και πως την ίδια μείωση παρουσιάζουν και τα φωσφολιπίδια [32]. Οι Morgantini επικεντρώθηκαν κυρίως στα λιπαρά οξέα των HDL και έδειξαν πως τα επίπεδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων αυξάνονται στις HDL των διαβητικών σε σχέση με τους υγιείς [33]. Τέλος, οι Stahlman διεξήγαγαν την εκτενέστερη μελέτη ως προς τη λιπιδική σύσταση, με τα αποτελέσματά τους να συμπεριλαμβάνουν τιμές για τη φωσφατιδυλοχολίνη, τη σφιγγομυελίνη και τα κεραμίδια, τα οποία παρουσίασαν μείωση στις HDL των διαβητικών, και για τη λυσοφωσφατιδυλοχολίνη και τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, τα οποία παρουσίασαν αύξηση στους διαβητικούς ασθενείς σε σχέση με τους υγιείς. [34]

Η μοναδική εκτενής μελέτη που περιείχε στοιχεία και για προδιαβητικούς ασθενείς ήταν αυτή των Wang et al οι οποίοι βρήκαν μείωση στην HDL-C, με τα επίπεδα της ολικής και της ελεύθερης χοληστερόλης να παρουσιάζουν αύξηση κατά την επιδείνωση του γλυκαιμικού ελέγχου. Επίσης, βρήκαν αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων και μειωμένα επίπεδα φωσφολιπίδιων πάλι προς την ίδια κατεύθυνση, δηλαδή οι διαβητικοί ασθενείς παρουσίασαν επιδεινωμένη εικόνα σε σχέση με τους προδιαβητικούς και οι προδιαβητικοί σε σχέση με τους υγιείς. [35]

## VI. LIPIDOMICS

---

### VI.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Γνωρίζουμε πως η κατάληξη -ωμα χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για να περιγράψει ένα σύνολο οποιουδήποτε είδους, π.χ, το σύνολο των γονιδίων καλείται γονιδίωμα, το σύνολο των πρωτεϊνών, πρωτέωμα κ.ο.κ.. Η αντικατάσταση της κατάληξης αυτής με την κατάληξη -ομική (-omics) αποδίδει τις τεχνολογίες με τις οποίες χαρακτηρίζεται και ποσοτικοποιείται το σύνολο αυτό.

Έτσι, τα -omics αποτελούν τεχνολογίες οι οποίες χαρακτηρίζουν και προσδιορίζουν συγκεκριμένα μόρια τα οποία ανήκουν σε μία γενική οικογένεια μορίων, όπως είναι τα γονίδια, οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια κ.ά. μέσω μόνο μίας ανάλυσης. Με τη χρήση των τεχνολογιών αυτών λαμβάνονται πληροφορίες για τη δομή, τη λειτουργία και τη δυναμική ενός σωματιδίου, κυττάρου, ιστού ή οργανισμού, ανάλογα με τον στόχο της κάθε έρευνας.

Οι τεχνολογίες, αυτές, συμπεριλαμβάνουν:

- Τα Genomics, η μελέτη των γονιδίων και των λειτουργιών τους.
- Τα Proteomics, η μελέτη των πρωτεϊνών.
- Τα Metabonomics, η μελέτη των μορίων που εμπλέκονται στον κυτταρικό μεταβολισμό.
- Τα Transcriptomics, η μελέτη των mRNA.
- Τα Glycomics, η μελέτη των κυτταρικών υδατανθράκων, και
- Τα Lipidomics, η μελέτη των λιπιδίων. [36]

Αντίστοιχα με όσα αναφέρθηκαν για τα -omics, τα lipidomics στοχεύουν στην καταγραφή και στην ανάλυση του συνολικού προφίλ των λιπιδίων που υπάρχουν σε ένα βιολογικό δείγμα. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιείται κυρίως σε ερευνητικό επίπεδο για τη μελέτη των διαταραχών των μονοπατιών στα οποία εμπλέκονται τα λιπίδια, την ανακάλυψη νέων βιοδεικτών για την πρόγνωση και έγκαιρη διάγνωση παθολογικών καταστάσεων καθώς και την παρακολούθηση της επίδρασης της θεραπευτικής αγωγής.

Με την ανάπτυξη των -omics, τα lipidomics προτάθηκαν για πρώτη φορά από τους Han και Gross [37] και ορίστηκαν από τους Spener et al. [38] ως "ο πλήρης χαρακτηρισμός των μορίων των λιπιδίων και των βιολογικών τους ρόλων σε σχέση με την έκφραση των πρωτεϊνών που εμπλέκονται στο μεταβολισμό και τη λειτουργία των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένης της γονιδιακής ρύθμισης".

Η προσέγγιση των lipidomics μπορεί να είναι στοχευμένη (targeted lipidomics) ή μη-στοχευμένη (untargeted lipidomics) με τα βήματα τα οποία ακολουθούνται σε μία ανάλυση να είναι τα εξής:

- α) Η συλλογή των βιολογικών δειγμάτων
- β) Η προεργασία των δειγμάτων,
- γ) Η απομόνωση των λιπιδίων στο δείγμα,
- δ) Η ανάλυση των λιπιδίων του δείγματος,



- ε) Η επεξεργασία των δεδομένων,  
στ) Η ανάλυση και η ερμηνεία των δεδομένων. [39,40]

## VI.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΛΙΠΙΔΙΩΝ

Για να πραγματοποιηθεί η ανάλυση των λιπιδίων είναι απαραίτητη η διαδικασία εκχύλισης κατά την οποία τα λιπίδια διαχωρίζονται και απομονώνονται από τα υπόλοιπα συστατικά του δείγματος. Το είδος των λιπιδίων που θα απομονωθούν εξαρτάται από τη μέθοδο εκχύλισης και ειδικά από το διαλύτη ή το μίγμα των διαλυτών που θα χρησιμοποιηθεί. Γενικά, η χρήση μη πολικών διαλυτών, όπως είναι ο πετρελαϊκός αιθέρας ή το εξάνιο προτιμάται κατά τη διαδικασία μίας απλής εκχύλισης ουδέτερων λιπιδίων όπως είναι οι ακυλογλυκερόλες και οι εστέρες των λιπαρών οξέων. Ενώ, όταν πραγματοποιείται εκχύλιση πιο πολικών λιπιδίων, όπως είναι τα φωσφολιπίδια, τα γλυκολιπίδια, οι λιποπρωτεΐνες και τα ελεύθερα λιπαρά οξέα, χρησιμοποιούνται πιο πολικοί διαλύτες, όπως είναι το  $\text{CH}_3\text{CN}$ , η  $\text{CH}_3\text{OH}$  και η  $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ . [39]

Οι πιο κοινές μέθοδοι εκχύλισης που χρησιμοποιούνται είναι:

α) Η τροποποιημένη μέθοδος των *Bligh και Dyer*, όπου χρησιμοποιείται χλωροφόρμιο, μεθανόλη και  $\text{H}_2\text{O}$  σε αναλογίες 1:1:0,9 (v/v/v) πραγματοποιείται για την εκχύλιση μιας μικρής ποσότητας βιολογικού δείγματος. Μετά το διαχωρισμό των φάσεων, το λιπιδικό περιεχόμενο βρίσκεται στη χλωροφορμική φάση.

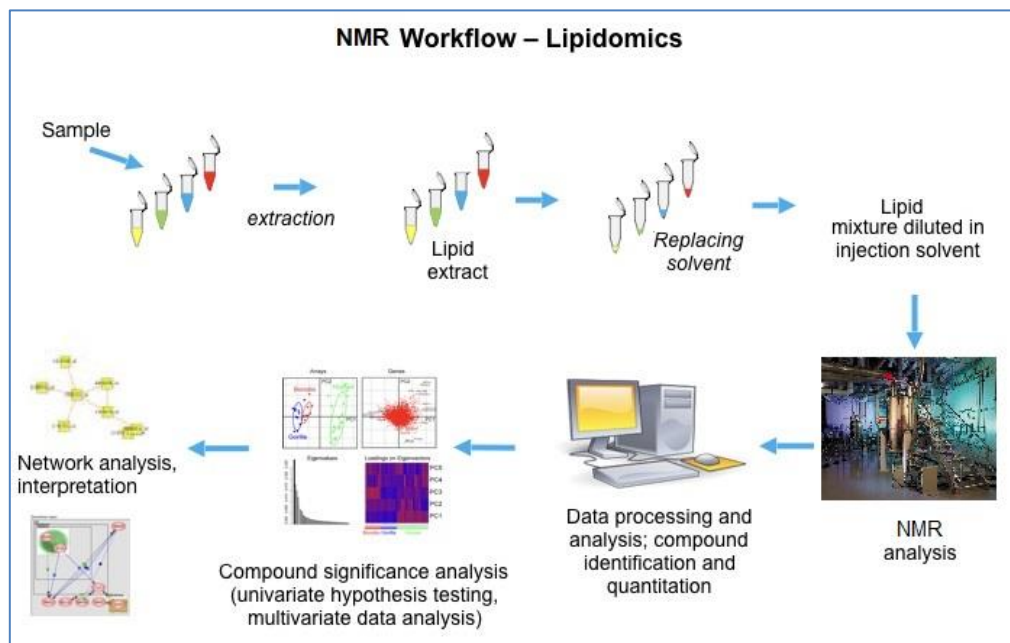
β) Η τροποποιημένη μέθοδος του *Folch*, όπου χρησιμοποιείται χλωροφόρμιο και μεθανόλη σε αναλογίες 2:1 (v/v): πραγματοποιείται για την εκχύλιση ενός βιολογικού ιστού.

γ) Η μέθοδος *MTBE*, όπου χρησιμοποιείται tert-βουτυλο-μεθυλαιθέρας (MTBE), μεθανόλη και νερό σε αναλογίες 5:1,5:1,45 (v/v/v): επιλύει μερικές από τις δυσκολίες που παρουσιάζονται στις μεθόδους που χρησιμοποιούν χλωροφόρμιο καθώς ο MTBE βρίσκεται στην πάνω στοιβάδα μετά το διαχωρισμό των φάσεων και ως εκ τούτου είναι πιο εύκολη η αυτοματοποίησή της.

δ) Η μέθοδος *BUME* όπου χρησιμοποιείται μία ποσότητα μείγματος βουτανόλης και μεθανόλης, (BUME), αναλογίας 3:1 v/v σε έναν μικρό όγκο υδατικής φάσης, προστίθεται ίσος όγκος επτανίου και οξικού αιθυλεστέρα με αναλογίες 3:1 ο/ο και τέλος προστίθεται 1% οξικού οξέος ίσου όγκου με το BUME για το διαχωρισμό των φάσεων. Το κύριο μειονέκτημά της είναι η δυσκολία εξάτμισης της βουτανόλης στην οργανική φάση. [40]

Οι κύριοι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των λιπιδίων είναι οι χρωματογραφικές, όπως η χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας, *TLC*, η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης, *HPLC*, η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής και η αέρια χρωματογραφία, *GC*, και οι φασματοσκοπικές, κυρίως η φασματομετρία μάζας, *MS*, και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, *NMR*. Οι τεχνολογίες *MS* μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες: εκείνες που χρησιμοποιούνται για τα λεγόμενα *shotgun lipidomics*, και εκείνες που χρησιμοποιούνται

σε συνδυασμό με μία χρωματογραφική μέθοδο, π.χ. ο συνδυασμός της MS με την υγρή χρωματογραφία, LC-MS, με την αέρια χρωματογραφία, GS-MS, με τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό, ESI-MS και με τον ιοντισμό εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας, MALDI-MS. [40]



**Εικόνα 11:** Βήματα ανάλυσης lipidomics με χρήση του NMR

Η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR είναι μια αναλυτική τεχνική το φαινόμενο της οποίας βασίζεται στις μαγνητικές ιδιότητες των πυρήνων όταν αυτοί τοποθετούνται εντός ενός ομογενούς, στατικού μαγνητικού πεδίου, και διεγείρονται από ένα δεύτερο ταλαντευόμενο μαγνητικό πεδίο. Μέσω αυτής της τεχνικής διερευνάτε η δομή στην περιοχή γύρω από κάθε ένα ξεχωριστό πυρήνα, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο σύνδεσης των ατόμων ενός μορίου. [11] Σε αυτή τη μέθοδο θα αναφερθούμε εκτενέστερα παρακάτω.

Μέσα από την ανάλυση των lipidomics λαμβάνεται ένας μεγάλος όγκος δεδομένων σε ένα σύντομο χρονικό διάστημα, γι' αυτό και απαιτούνται κατάλληλα εργαλεία επεξεργασίας για την ανάλυση των δεδομένων αυτών.

## VII. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΠΥΡΥΝΗΚΟΥ ΜΑΓΝΗΤΙΚΟΥ ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΥ (Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)

---

### VII.1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ

Όπως αναφέρθηκε, η φασματοσκοπία NMR είναι μια αναλυτική τεχνική η οποία χρησιμοποιείται στην ανάλυση βιολογικών υγρών. Λόγω της μεγάλης αφθονίας των πυρήνων πρωτονίου ( $^1\text{H}$ ) στα μόρια, η φασματοσκοπία πρωτονίου ( $^1\text{H}$ -NMR) είναι αυτή που χρησιμοποιείται κυρίως για την ανάλυση των δειγμάτων αυτών.

Όπως γνωρίζουμε, οι πυρήνες όλων των στοιχείων περιέχουν φορτία, με αποτέλεσμα όταν περιστρέφονται γύρω από έναν άξονα (spin), να συμπεριφέρονται ως μαγνητικά δίπολα και να δημιουργούν μαγνητικά πεδία κάθετα στο επίπεδο της περιστροφής τους. Η ένταση των μαγνητικών, αυτών, πεδίων εξαρτάται από την πυρηνική μαγνητική ροπή,  $\mu$ , η οποία αποτελεί μια θεμελιώδη ιδιότητα των πυρήνων.

Ανάλογα με το spin τους οι πυρήνες χωρίζονται σε 3 είδη:

**α)** Τους πυρήνες που έχουν άρτιο ατομικό ( $Z$ ) και μαζικό αριθμό ( $A$ ) και έχουν κβαντικό αριθμό πυρηνικού spin,  $I, I=0$ . Οι πυρήνες αυτοί δεν εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και επομένως δεν δίνουν σήματα NMR,

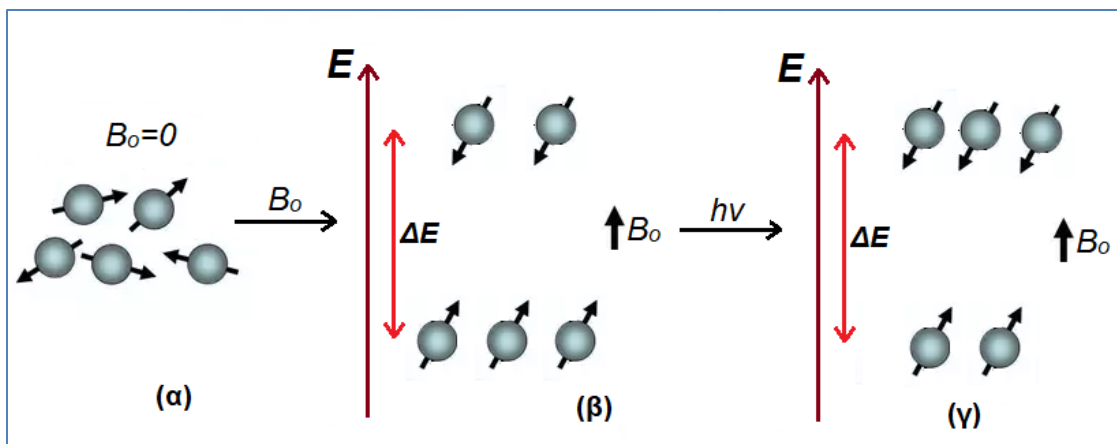
**β)** Τους πυρήνες που έχουν περιττό μαζικό αριθμό ( $A$ ) και περιττό ή άρτιο ατομικό αριθμό ( $Z$ ) και παρουσιάζουν ημιακέραιους αριθμούς spin,  $I=n(1/2)$ , όπως ο πυρήνας  $^1\text{H}$ , με γωνιακή στροφορμή  $I=1/2$ . Οι πυρήνες αυτοί εκδηλώνουν μαγνητικές ιδιότητες και επειδή παρουσιάζουν συμμετρική σφαιρική κατανομή του φορτίου τους παρουσιάζουν ενδιαφέρον στην φασματοσκοπία NMR, και τέλος

**γ)** Τους πυρήνες που έχουν άρτιο μαζικό αριθμό ( $A$ ) και περιττό ατομικό αριθμό ( $Z$ ). Οι πυρήνες αυτοί παρουσιάζουν ακέραιους αριθμούς spin. [41]

Μέσα σ' ένα μαγνητικό πεδίο οι πυρήνες μπορούν να προσανατολιστούν με  $2I+1$  τρόπους. Επομένως, για τον πυρήνα  $^1\text{H}$ , με  $I=1/2$  οι πιθανοί προσανατολισμοί είναι 2.

Απουσία ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου τα ανύσματα των πυρηνικών μαγνητικών ροπών προσανατολίζονται τυχαία στο χώρο. Με την παρουσία, όμως, ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου,  $B_0$ , οι πυρήνες τείνουν είτε να προσανατολιστούν παράλληλα με το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο  $B_0$ , ένας προσανατολισμός ενεργειακά ευνοϊκός, χαμηλότερης ενέργειας, είτε αντιπαράλληλα με αυτό, ένας προσανατολισμός ενεργειακά μη ευνοϊκός, υψηλότερης ενέργειας.

Όταν οι προσανατολισμένοι πυρήνες ακτινοβοληθούν με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας, οι πυρήνες που βρίσκονται σε κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας και έχουν spin παράλληλο προς το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, απορροφούν ενέργεια και μεταβαίνουν στην κατάσταση υψηλότερης ενέργειας με αναστροφή του spin τους. Τότε οι πυρήνες έχουν «συντονιστεί» με την εφαρμοζόμενη ακτινοβολία και λέμε ότι βρίσκονται σε κατάσταση συντονισμού.



**Εικόνα 12:** (α) Προσανατολισμός διανυσμάτων των μαγνητικών ροπών,  $\mu$ , απουσία εξωτερικού μαγνητικού πεδίου,  $B_0$ . (β) Προσανατολισμός με εφαρμογή του  $B_0$ . (γ) Ενεργειακή μετάβαση των πυρήνων μετά από ακτινοβόλησή τους με ακτινοβολία κατάλληλης συχνότητας.

Γενικά, ο παράλληλος προσανατολισμός αποτελεί τη βασική κατάσταση χαμηλής ενέργειας του πυρήνα, ενώ ο αντιπαράλληλος τη διεγερμένη κατάσταση αυξημένης ενέργειας. Η αναγκαία απορροφώμενη ενέργεια για τη μετάβαση από την χαμηλότερη προς την υψηλότερη ενεργειακή κατάσταση είναι γνωστή ως ενέργεια διέγερσης και είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά των δυο αυτών καταστάσεων.

Η διαφορά ενέργειας δύο καταστάσεων δίνεται από τη σχέση:

$$\Delta E = h\nu_o \quad (1)$$

Επίσης, για έναν πυρήνα στον οποίο επιδρά εξωτερικό μαγνητικό πεδίο ισχύει ότι:

$$\Delta E = \gamma\hbar B_o \quad (2)$$

όπου:  $\hbar = \frac{h}{2\pi}$  (3).

Από τις (1), (2) και (3) καταλήγουμε:

$$\nu_o = \frac{\gamma B_o}{2\pi}$$

όπου  $\nu_o$ : η συχνότητα της μεταπτώτικης κίνησης του πυρήνα, συχνότητα Larmor,  
 $B_o$ : η ισχύς του μαγνητικού πεδίου, και  
 $\gamma$ : ο γυρομαγνητικός λόγος του πυρήνα. [11,41]

Η αποδιέγερση του πυρήνα, δηλαδή η επιστροφή του στη χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, τη θεμελιώδη κατάσταση, χαρακτηρίζεται από δύο χρόνους:

**α)** από το χρόνο επαναφοράς *spin-πλέγματος*,  $T_1$  (spin-lattice relaxation), ο οποίος αποτελεί το μέσο χρόνο που χρειάζεται ένας μεμονωμένος πυρήνας να επιστρέψει στην κατάσταση θερμικής ισορροπίας, μία διεργασία που συνοδεύεται με απώλεια ενέργειας του διεγερμένου πυρηνικού spin προς το περιβάλλον του μοριακού πλέγματος, και

**β)** από το χρόνο επαναφοράς *spin-spin*,  $T_2$  (spin-spin relaxation), ο οποίος αποτελεί το χρόνο που απαιτείται για να σταματήσει η παραγωγή του σήματος, μία διεργασία που συνοδεύεται από απώλεια ενέργειας του διεγερμένου πυρηνικού spin προς τους γειτονικούς πυρήνες. [41]

## VII. 2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΦΑΣΜΑΤΟΣ NMR

Το φάσμα NMR περιλαμβάνει πολλές κορυφές απορρόφησης, οι θέσεις των οποίων απεικονίζουν τις διαφορές στο χημικό περιβάλλον των πρωτονίων και δίνουν λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή δομή των ενώσεων.

Χαρακτηριστικά ενός φάσματος NMR αποτελούν:

- Ο αριθμός των σημάτων,
- Οι θέσεις των σημάτων,
- Η σύζευξη spin-spin και
- Το εμβαδόν των κορυφών.

**Αριθμός σημάτων:** Σε ένα συγκεκριμένο μόριο, τα πρωτόνια με το ίδιο χημικό περιβάλλον απορροφούν στην ίδια ένταση πεδίου και αποτελούν χημικώς ισοδύναμα πρωτόνια, ενώ τα πρωτόνια με διαφορετικό περιβάλλον απορροφούν σε διαφορετικές εντάσεις πεδίου και αποτελούν χημικώς μη ισοδύναμα πρωτόνια. Ο αριθμός των σημάτων δίνει πληροφορίες για τον αριθμό των ισοδύναμων πρωτονίων και τον αριθμό των διαφορετικών ειδών των πρωτονίων που υπάρχουν σε ένα μόριο.

**Θέσεις των σημάτων:** Οι θέσεις των σημάτων δίνουν πληροφορίες για τα είδη των πρωτονίων, καθώς τα διαφορετικά είδη έχουν διαφορετικό ηλεκτρονικό περιβάλλον το οποίο επηρεάζει και καθορίζει τη θέση όπου απορροφά το πρωτόνιο στο φάσμα NMR.

Η κυκλοφορία των ηλεκτρονίων γύρω από γειτονικούς πυρήνες δημιουργεί τοπικά μαγνητικά πεδία, τα επαγόμενα μαγνητικά πεδία, τα οποία αντιτίθενται στο εφαρμοζόμενο πεδίο, με αποτέλεσμα το πεδίο που γίνεται αντιληπτό από το πρωτόνιο να είναι μικρότερο από αυτό που εφαρμόζεται. Η ηλεκτρονική, αυτή, πυκνότητα γύρω από έναν πυρήνα, λέμε ότι τον προστατεύει καθώς η ένταση του πεδίου που αντιλαμβάνεται πραγματικά ο πυρήνας είναι διαφορετική από την ένταση του εφαρμοζόμενου μαγνητικού πεδίου, και συγκεκριμένα μικρότερη κατά την ένταση του τοπικού πεδίου που δημιουργούν τα ηλεκτρόνια των γειτονικών πυρήνων.

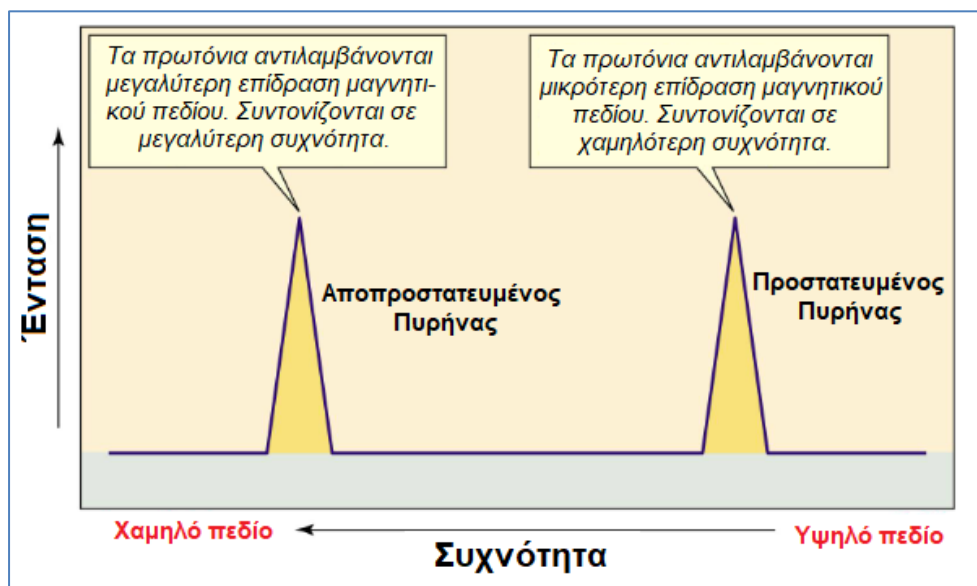
Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι χημικά μη ισοδύναμοι πυρήνες να προστατεύονται σε διαφορετικό ποσοστό από τα γειτονικά ηλεκτρόνια τους και επομένως να συντονίζονται σε διαφορετικές συχνότητες, δίνοντας διαφορετικά σήματα στο φάσμα NMR.

Η θέση συντονισμού ενός πρωτονίου εκφράζεται σε σχέση με μια πρότυπη ένωση (TMS, TSP κ.ά.).

Σύμφωνα με τα παραπάνω, ένα προστατευμένο πρωτόνιο για να αντιληφθεί την ίδια ένταση, μ' ένα γυμνό πρωτόνιο απαιτεί ισχυρότερη ένταση εφαρμοζόμενου πεδίου, ενώ ένα αποπροστατευόμενο πρωτόνιο, δηλαδή ένα πρωτόνιο με μικρή ηλεκτρονική

πυκνότητα γύρω του, απαιτεί χαμηλότερη. Κατά συνέπεια, η προστασία μετατοπίζει την απορρόφηση σε υψηλότερο πεδίο, ενώ η αποπροστασία σε χαμηλότερο. Οι μετατοπίσεις στη θέση της απορρόφησης NMR, που προκαλούνται από προστασία ή αποπροστασία των ηλεκτρονίων, αποκαλούνται χημικές μετατοπίσεις, δ και εκφράζονται σε μέρη ανά εκατομμύριο, ppm.

Σε ένα φάσμα NMR η ισχύς του εφαρμοζόμενου πεδίου αυξάνεται από αριστερά προς τα δεξιά, έτσι, το αριστερό τμήμα του φάσματος είναι η πλευρά χαμηλού πεδίου, όπου εμφανίζονται οι κορυφές των αποπροστατευμένων πυρήνων, ενώ το δεξιό τμήμα αντιπροσωπεύει την πλευρά υψηλού πεδίου, όπου εμφανίζονται οι κορυφές των προστατευμένων πυρήνων.



**Εικόνα 13:** Απλοποιημένο φάσμα  $^1\text{H}$ NMR. Οι προστατευμένοι πυρήνες συντονίζονται σε υψηλό πεδίο και σε χαμηλότερες συχνότητες, ενώ οι αποπροστατευμένοι πυρήνες συντονίζονται σε χαμηλό πεδίο και σε υψηλότερες συχνότητες.

**Spin-spin σύζευξη:** Σε ένα φάσμα  $^1\text{H}$ NMR οι κορυφές συντονισμού εμφανίζονται με τη μορφή πολλαπλών κορυφών (διπλές, τριπλές, τετραπλές κ.λ.π.). Η πολλαπλότητα αυτή των σημάτων συντονισμού καλείται spin-spin σύζευξη (spin-spin coupling) και οφείλεται στην αλληλεπίδραση των spin των γειτονικών πυρήνων, η οποία προκαλεί το διαχωρισμό του σήματος σε δύο ή περισσότερες κορυφές του φάσματος.

Χαρακτηριστικό των πολλαπλών κορυφών αποτελεί το ότι οι επιμέρους κορυφές τους έχουν ίση απόσταση μεταξύ τους κατά μία σταθερά, τη σταθερά συζεύξεως,  $J$ , που είναι ανεξάρτητη από την ένταση του μαγνητικού πεδίου και δίνεται σε Hz.

**Εμβαδόν των κορυφών:** Η περιοχή κάτω από ένα σήμα NMR είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των πρωτονίων που προκαλούν αυτό το σήμα. Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των πρωτονίων που διεγείρονται τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσό της ενέργειας που απορροφάται και η περιοχή κάτω από την κορυφή απορρόφησης. Έτσι, τα εμβαδά

των κορυφών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ποσοτική σύγκριση των κορυφών των διαφόρων πρωτονίων. [11,41]

## **VIII. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ**

---

Μέχρι σήμερα δεν έχει μελετηθεί και συγκριθεί η λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών σε υγιή άτομα, άτομα με προδιαβήτη και σακχαρώδη διαβήτη τύπου II.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη των λιπιδικών προφίλ των HDL σε ασθενείς με προδιαβήτη και ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού και η σύγκριση αυτών με σκοπό τη διερεύνηση πιθανής συσχέτισης των αλλαγών που λαμβάνουν χώρα στο HDL σωματίδιο με την πορεία εξέλιξης του προδιαβήτη σε σακχαρώδη διαβήτη .



## **ΙΧ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

---

### **ΙΧ.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΚΑΙ ΛΗΨΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ**

Ο πληθυσμός της συγκεκριμένης μελέτης αποτελείται από 120 άτομα τα οποία χωρίστηκαν ανάλογα με το γλυκαιμικό τους προφίλ, δημιουργώντας 3 ομάδες των 40 ατόμων: **α)** άτομα με φυσιολογικά επίπεδα γλυκόζης (ομάδα υγιών, ομάδα ελέγχου, με επίπεδα γλυκόζης ορού σε κατάσταση νηστείας < 100 mg/dl ( $90,45 \pm 7,48$ ) και HbA1c < 5,7% ( $4,99 \pm 0,68$ )), **β)** ασθενείς με προδιαβήτη (με επίπεδα γλυκόζης ορού σε κατάσταση νηστείας από 100 μέχρι 125 mg/dl ( $105,58 \pm 7,91$ ) και HbA1c μεταξύ των τιμών 5,7% και 6,4% ( $5,95 \pm 0,35$ )) και **γ)** ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (με επίπεδα γλυκόζης ορού σε κατάσταση νηστείας > 126 mg/dl ( $156,73 \pm 24,40$ ) και HbA1c > 6,5% ( $7,28 \pm 0,69$ )).

Οι ομάδες ασθενών επιλέχθηκαν ώστε να μην παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού για να μην παρεμβαίνουν στην ανάλυση των δεδομένων.

### **ΙΧ.2 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ HDL ΑΠΟ ΤΙΣ non-HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΪΝΕΣ**

Τα δείγματα αίματος συλλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν σε πλαστικά σωληνάρια αιμοληψίας Vacutainer SST II. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία της πήξης, ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η συλλογή του ορού, τα δείγματα παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και μετά φυγοκεντρήθηκαν στις 3000 στροφές για άλλα 15 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση, τα δείγματα ορού που συλλέχθηκαν, μεταφέρθηκαν σε πλαστικά σωληνάκια τύπου Cryovials και καταψύχθηκαν σε θερμοκρασία -80°C.

Για τον προσδιορισμό της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών του ορού, πραγματοποιήθηκε καταβύθιση των non-HDL λιποπρωτεϊνών με μία μέθοδο που στηρίζεται κατά κύριο λόγο στο ότι τα HDL σωματίδια δεν περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β, μια πρωτεΐνη που είναι πλούσια σε θετικά φορτισμένα αμινοξέα αργινίνης και βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες χαμηλότερης πυκνότητας όπως είναι οι VLDL, IDL και LDL. Επομένως, χρησιμοποιώντας πολυανιόντα σε συνδυασμό με δισθενή κατιόντα, σχηματίζονται αδιάλυτα σύμπλοκα με τις τελευταίες, αφήνοντας τις HDL διαλυτές στο υπερκείμενο. Το αντιδραστήριο καταβύθισης που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη αυτή είναι το Dextran Sulfate (20 g/L) – MgCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O (1 M).

Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση των λιποπρωτεϊνών με τα πολυανιόντα παίζουν το pH, η ιοντική ισχύς του διαλύματος και η παρουσία των ιόντων μετάλλων σε αυτό, όσο και η φύση των πολυσακχαριτών και των λιποπρωτεϊνών.

Η ρύθμιση της ιονικής ισχύος του διαλύματος παίζει σημαντικό ρόλο στην επιλεκτική καταβύθιση των λιποπρωτεϊνών. Έχει παρατηρηθεί ότι σε χαμηλές τιμές ιονικής ισχύος

καταβυθίζονται ταυτόχρονα με τα σύμπλοκα των λιποπρωτεϊνών και άλλες πρωτεΐνες του ορού, ενώ σε υψηλές τιμές ιονικής ισχύος επαναδιαλύονται τα αδιάλυτα σύμπλοκα. [42]

Επιπλέον, παρατεταμένη αλληλεπίδραση των πολυανιόντων και των δισθενών κατιόντων με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος που περιέχουν απολιποπρωτεΐνη Β έχει ως αποτέλεσμα την καταβύθιση και των λιποπρωτεϊνών που περιέχουν απόλιποπρωτεΐνη ΑΙ.

### **ΙΧ.3 ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ**

Για την διεξαγωγή της μελέτης αυτής ήταν αναγκαίος ο παρακάτω εργαστηριακός εξοπλισμός:

- Φασματογράφος Bruker Avance DRX 500MHz
- Ζυγός ( Adventurer™, OHAUS)
- Φυγόκεντρος (Hettich, Universal II)
- Σωληνάρια NMR, εσωτερικής διαμέτρου 5mm
- Πλαστικά σωληνάρια Cryovials (CryoTube™Vials, NUNC)

Για να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των HDL και των non-HDL λιποπρωτεϊνών, η διαλυτοποίηση των HDL λιποπρωτεϊνών και, τελικά, η εκχύλιση των λιπιδίων που περιέχονται σε αυτές χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

- Θειική Δεξτράνη (Dextran-Sulfate, Dextralip<sup>®</sup>, MB=50.000 g/mol, 5 gr, Sigma-Aldrich)
- Ένυδρο Χλωριούχο Μαγνήσιο (MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, MB=203.30 g/mol, Merck)
- Χλωριούχο Νάτριο (NaCl, MB=58.44 g/mol, Merck)
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικόξύ (EDTA, C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, MB= 121.14 g/mol, Sigma-Aldrich)
- Μεθανόλη (LAB-SCAN)
- Χλωροφόρμιο (LAB-SCAN)
- Δευτεριωμένη Μεθανόλη (Methanol – d<sub>4</sub>, με βαθμό δευτερίωσης 99,8%, Aldrich)
- Δευτεριωμένο Χλωροφόρμιο (CDCl<sub>3</sub> με βαθμό δευτερίωσης 99,8%, Merck)

### **ΙΧ.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ**

Για την διεξαγωγή του πειράματος ήταν αναγκαία η παρασκευή των παρακάτω διαλυμάτων:

- *Παρασκευή διαλύματος θειικής δεξτράνης με C=20 g/L και pH=7:*

Ζυγίστηκε ποσότητα 1gr θειικής δεξτράνης και διαλύθηκε σε 40ml απιονισμένου ύδατος σε ποτήρι ζέσεως των 100ml. Το pH του διαλύματος που προέκυψε, ρυθμίστηκε σε τιμή 7 με προσθήκη μικρής ποσότητας διαλύματος υδροχλωρικού οξέος (HCl). Το διάλυμα

μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 50ml, προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

➤ *Παρασκευή διαλύματος  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  με  $C=1M$  και  $pH=7$ :*

Ζυγίστηκε ποσότητα 20.3gr $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  και διαλύθηκε σε 80ml απιονισμένου ύδατος σε ποτήρι ζέσεως των 250ml. Το pH του διαλύματος που προέκυψε, ρυθμίστηκε στο 7 με προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του νατρίου (NaOH). Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml, προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

➤ *Παρασκευή διαλύματος θειικής δεξτράνης-χλωριούχου μαγνησίου (Dextran-Sulfate –  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )*

Για την παρασκευή του διαλύματος θειικής δεξτράνης –χλωριούχου μαγνησίου αναμίχθηκαν ίσοι όγκοι από το διάλυμα θειικής δεξτράνης συγκεντρώσεως 20 g/L και χλωριούχου μαγνησίου συγκεντρώσεως 1M.

➤ *Παρασκευή διαλύματος  $NaCl$  με  $C=0,15M$*

Ζυγίστηκε ποσότητα 2.192gr $NaCl$  και μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως των 250ml. Προστέθηκε ποσότητα 100ml απιονισμένου ύδατος μέχρι πλήρους διάλυσης της παραπάνω ποσότητας. Το διάλυμα μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 250ml, προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως και αποθηκεύτηκε στους 4°C.

➤ *Παρασκευή διαλύματος  $NaCl$  (0.15M) – EDTA(1mM)*

Ζυγίστηκαν ποσότητες 0.877gr $NaCl$  και 0.029gr EDTA και αναμίχθηκαν σε ποτήρι ζέσεως των 100ml. Προστέθηκε ποσότητα απιονισμένου ύδατος μέχρι πλήρους διάλυσης των παραπάνω ποσοτήτων των ουσιών. Το διάλυμα που προέκυψε μεταφέρθηκε σε ογκομετρική φιάλη των 100ml και προστέθηκε απιονισμένο ύδωρ μέχρι πληρώσεως.

## IX.5 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### ❖ Διαχωρισμός των HDL και non-HDL λιποπρωτεϊνών

Ο διαχωρισμός των HDL και των non-HDL λιποπρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την πειραματική διαδικασία των Warnicketal [43], τα βήματα της οποίας έχουν ως εξής:

- 1) Πριν την έναρξη του πειράματος το δείγμα ορού και τα διαλύματα παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
- 2) Αρχικά τοποθετείται ποσότητα ορού ίση με 1,5mL σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα.
- 3) Στη συνέχεια παρασκευάζεται η ποσότητα του αντιδραστηρίου καταβύθισης. Λαμβάνοντας υπόψη ότι σε κάθε 1mL δείγματος προστίθεται ποσότητα αντιδραστηρίου καταβύθισης ίση με 100  $\mu L$ , σε 1,5ml δείγματος ορού προστίθενται 150 $\mu L$  από το αντιδραστήριο καταβύθισης.
- 4) Ακολουθεί ήπια ανάδευση για τουλάχιστον 3sec και παραμονή σε ηρεμία για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- 5) Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 2500 στροφές για 10 λεπτά.
- 6) Τέλος, συλλέγεται το διαυγές υπερκείμενο το οποίο περιέχει τις HDL λιποπρωτεΐνες.

Στην περίπτωση που το υπερκείμενο παρουσιάζει θολερότητα, ένδειξη ατελούς καταβύθισης των non-HDL λιποπρωτεϊνών λόγω υψηλής συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων, προστίθεται 1mL από το διάλυμα NaCl (0.15M), επιπλέον 100μL αντιδραστηρίου καταβύθισης και επαναλαμβάνεται η παραπάνω πειραματική διαδικασία (ήπια ανάδευση, ηρεμία για 10 λεπτά και φυγοκέντρηση για άλλα 10 λεπτά στις 2500 στροφές).

#### ❖ Εκχύλιση των λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών

Η εκχύλιση των λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών βασίστηκε σε παραλλαγή της μεθόδου Blight και Dyer, [44] και περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα (όλες οι ποσότητες που αναγράφονται αναλογούν σε 0,25mL διαλύματος HDL λιποπρωτεϊνών. Οι τελικές ποσότητες υπολογίστηκαν αναλογικά με τις ποσότητες που προέκυψαν από την προηγούμενη πειραματική διαδικασία):

- 1) Αρχικά προστίθεται ποσότητα 0,4mL διαλύματος NaCl (0,15M) - EDTA (1mM).
- 2) Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα 1mL μεθανόλης και το διάλυμα αναδεύεται για 10 sec.
- 3) Ακολουθεί προσθήκη ποσότητας 0,5mL χλωροφορμίου και το διάλυμα αναδεύεται για 15 sec.
- 4) Έπειτα προστίθεται ποσότητα 0,5mL χλωροφορμίου και 0,5mL απιονισμένου ύδατος, με ανάδευση για 15 sec μετά από την προσθήκη του χλωροφορμίου και του ύδατος.
- 5) Στη συνέχεια ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 2400 στροφές για 15 λεπτά.
- 6) Μετά τη φυγοκέντρηση, με ιδιαίτερη προσοχή, ώστε να μην απορροφηθεί η πάνω υδατική φάση και τμήμα της ενδιάμεσης πρωτεϊνικής φάσης, μεταφέρεται με μια μικροπιπέταpasteur σε καθαρό γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα η κάτω χλωροφορμική φάση που περιέχει τα λιπίδια.
- 7) Στον αρχικό δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται ποσότητα 0,5mL χλωροφορμίου και επαναλαμβάνονται τα παραπάνω στάδια (ανάδευση για 15 sec και φυγοκέντρηση στις 2400 στροφές για 15 λεπτά) ώστε να συλλεχθούν και τα υπόλοιπα λιπίδια.
- 8) Οι ποσότητες των δυο χλωροφορμικών φάσεων αναμειγνύονται και φυγοκεντρούνται για άλλα 10 λεπτά στις 2400 στροφές.
- 9) Τέλος, απ' το τελικό δείγμα των χλωροφορμικών φάσεων απομακρύνονται τυχών υπολείμματα πρωτεϊνών και ύδατος και πραγματοποιείται εξάτμιση του διαλύτη σε ρεύμα αζώτου.
- 10) Μετά την εξάτμιση, διαβιβάζεται ρεύμα αζώτου στο δείγμα και αποθηκεύεται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη λήψη του φάσματος  $^1\text{H NMR}$ .

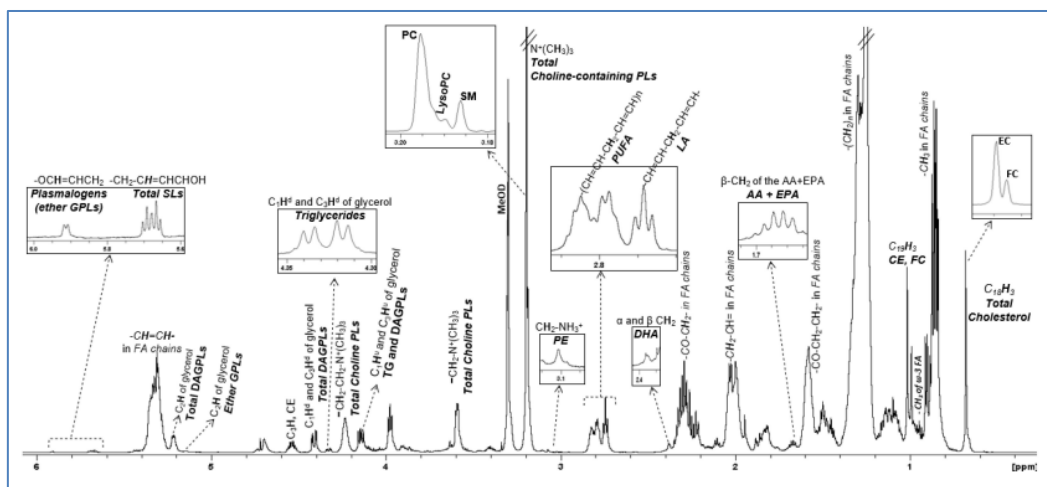
### ❖ Προετοιμασία των δειγμάτων για τη λήψη των φασμάτων $^1\text{H}$ NMR

Για να ληφθεί το φάσμα  $^1\text{H}$  NMR των λιπιδίων πραγματοποιείται η παρακάτω διαδικασία:

- 1) Τα δείγματα, με τα εκχυλίσματα των λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών, παραμένουν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.
- 2) Στη συνέχεια επαναδιαλύονται σε ποσότητα 500μL μίγματος δευτεριωμένων διαλυτών. Το μίγμα των διαλυτών περιλαμβάνει δευτεριωμένη μεθανόλη (Methyl-d<sub>3</sub>alcohol-d, με βαθμό δευτερίωσης 99.8%) και δευτεριωμένο χλωροφόρμιο (Chloroform-d<sub>1</sub>, με βαθμό δευτερίωσης 99.8%) σε αναλογία 2:1 (v/v), αντίστοιχα [45,46]. Η παρασκευή του μίγματος πραγματοποιείται λίγο πριν την έναρξη του πειράματος ώστε να ελαχιστοποιηθεί η εξάτμιση των πτητικών διαλυτών. Επίσης, χρησιμοποιούνται δευτεριωμένοι διαλύτες ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπικάλυψη των σημάτων συντονισμού των πρωτονίων των λιπιδίων με αυτά του διαλύτη,
- 3) Τέλος, τα διαλύματα μεταφέρονται με πιπέτα σε ειδικά γυάλινα σωληνάρια NMR, εσωτερικής διαμέτρου 5mm.

## IX.6 ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣ $^1\text{H}$ NMR ΛΙΠΙΔΙΩΝ HDL ΛΙΠΟΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Σε ένα τυπικό φάσμα  $^1\text{H}$  NMR λιπιδίων των HDL εμφανίζονται σήματα τα οποία αποδίδονται στη χοληστερόλη, στην ελεύθερη και εστεροποιημένη μορφή της, στα τριγλυκερίδια, στα φωσφολιπίδια και στα λιπαρά οξέα (Εικόνα 14).



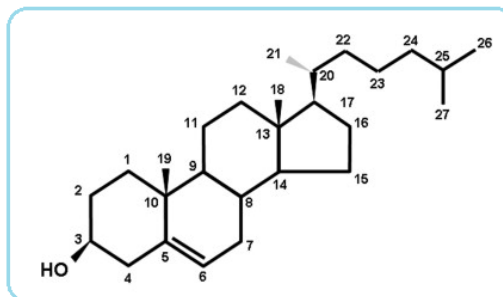
**Εικόνα 14:** Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR (500MHz) από εκχύλισμα λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών. (a) Διάκριση της ελεύθερης από την εστεροποιημένη χοληστερόλη. (b) Διάκριση της φωσφατιδυλοχολίνης από τη σφιγγομυελίνη [47]

Κάθε λιπίδιο στο φάσμα εμφανίζεται με περισσότερα από ένα σήματα καθώς περιέχει στο μόριό του πρωτόνια τα οποία ανήκουν σε χημικώς διαφορετικές ομάδες, με το σήμα του κάθε πρωτονίου, δηλαδή τη χημική μετατόπισή του, να εξαρτάται από το χημικό του περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα ορισμένα σήματα διαφορετικών λιπιδίων να

επικαλύπτονται μεταξύ τους, επειδή τα πρωτόνια τους έχουν παρόμοια χημική φύση, και να δημιουργούν κορυφές οι οποίες είναι δύσκολο να αναλυθούν. Στο φάσμα, όμως, παρουσιάζονται και σήματα με μοναδική χημική μετατόπιση, τα οποία είναι κατάλληλα για ποσοτικοποίηση.

### ❖ Χοληστερόλη

Τα σήματα των πρωτονίων της χοληστερόλης εμφανίζονται στο φάσμα σε μία περιοχή που καλύπτει από τα 0,68 έως τα 5,36 ppm. Τα πιο ευδιάκριτα σήματα είναι των πρωτονίων των ανθράκων 18, 19, 21, 26 και 27 του μορίου της. Επίσης στο φάσμα παρατηρείται μία πολλαπλή στα 3,40 ppm η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια του άνθρακα 3 και μία στα 5,36 ppm η οποία αποδίδεται στα βινυλικά πρωτόνια του άνθρακα 6.



**Εικόνα 15:** Μόριο χοληστερόλης και αρίθμηση των ανθράκων της

Το σήμα του άνθρακα 18 στα 0,68 ppm χωρίζεται περεταίρω σε δύο κορυφές οι οποίες αποδίδονται στην ελεύθερη και στην εστεροποιημένη μορφή της. [47,48]

### ❖ Τριγλυκερίδια

Τα σήματα των πρωτονίων των τριγλυκεριδίων, που αποδίδονται στη γλυκερόλη, εμφανίζονται στο φάσμα σε μία περιοχή που καλύπτει από τα 4,16 έως τα 5,22 ppm.

Το σήμα με τη μεγαλύτερη αναλυτική σημασία είναι αυτό των πρωτονίων των ανθράκων  $C_1H^d$  και  $C_3H^d$  στα 4,32 ppm. [47,48]

### ❖ Φωσφολιπίδια

Τα φωσφολιπίδια είναι εύκολο να διακριθούν σε ένα φάσμα  $^1H$  NMR καθώς εμφανίζουν χαρακτηριστικά σήματα τα οποία αποδίδονται στις ομάδες κεφαλής τους.

Έτσι, τα φωσφολιπίδια τα οποία περιέχουν χολίνη, όπως είναι η φωσφατιδυλοχολίνη η σφιγγομυελίνη και η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, και αποτελούν περίπου το 93% όλων των φωσφολιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών, μπορούν να διακριθούν εύκολα από τρία σήματα: **α)** το πολύ έντονο σήμα στα 3,20 ppm αποδίδεται στα πρωτόνια της ομάδας  $-N^+(CH_3)_3$  της χολίνης, και χωρίζεται περεταίρω σε τρεις κορυφές οι οποίες αποδίδονται στα τρία αυτά φωσφολιπίδια, **β)** το σήμα στα 3,59 ppm το οποίο αποδίδεται στα πρωτόνια  $-CH_2-N^+(CH_3)_3$  και **γ)** το σήμα στα 4,24 ppm το οποίο αποδίδεται στα πρωτόνια  $-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$ .

Η φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη αναγνωρίζεται από τη χαρακτηριστική κορυφή στα 3,10 ppm η οποία αποδίδεται στα μεθυλενικά πρωτόνια της  $-CH_2-CH_2-NH_3^+$  ομάδας.

Η κορυφή στα 5,70 ppm αντιστοιχεί στα πρωτόνια της  $-CH_2-CH=CHCHOH$  και μας δίνει πληροφορίες για τα ολικά σφιγγολιπίδια.

Τέλος, τα αιθερικά γλυκεροφωσfolιπίδια αναγνωρίζονται από την κορυφή στα 5,15 ppm η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια του άνθρακα 2 της γλυκερόλης, με τα πλασμαλογόνα, να αναγνωρίζονται από την κορυφή στα 5,90 ppm η οποία αποδίδεται στα πρωτόνια  $-OCH=CHCH_2$ . [47,48]

#### ❖ **Λιπαρά οξέα**

Όλα τα λιπαρά οξέα δίνουν σήμα στα 0,88 ppm το οποίο αποδίδεται στα μεθυλικά  $\omega-CH_3$  πρωτόνια τους. Για τα  $\omega-3$  λιπαρά οξέα το σήμα αυτό εμφανίζεται στα 0,95 ppm. Χαρακτηριστικά σήματα αποτελούν και οι απορροφήσεις στα 2,30 και 1,59 ppm οι οποίες αποδίδονται στα  $\alpha$  και  $\beta$  μεθυλενικά πρωτόνια, αντίστοιχα, με την πρώτη απορρόφηση να είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς μας δίνει πληροφορίες για τα ολικά λιπαρά οξέα. Τέλος, τα υπόλοιπα μεθυλενικά πρωτόνια της αλυσίδας  $[(-CH_2-)_n]$  δίνουν σήμα στα 1,30 ppm, τα αλλυλικά μεθυλενικά πρωτόνια  $-CH=CH-CH_2-$  δίνουν σήμα στα 2,04 ppm, με το σήμα αυτό να μας δίνει πληροφορίες και για τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα διαλλυλικά  $-CH=CH-CH_2-CH=$  στα 2,80 ppm, με το σήμα αυτό να αντιστοιχεί και στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και τέλος τα ολεφινικά πρωτόνια  $-CH=CH-$  στα 5,36 ppm.

Συγκεκριμένα παραδείγματα πολυακόρεστων λιπαρών οξέων τα οποία χαρακτηρίστηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν στο φάσμα είναι: **α)** τα λιπαρά οξέα τα οποία περιέχουν στο μόριό τους μόνο δύο διπλούς δεσμούς, όπως είναι το λινολεϊκό οξύ (18:2  $\Delta^{9,12}$ ), και αποδίδουν σήμα στα 2,75 ppm λόγω των διαλλυλικών πρωτονίων τους, **β)** το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ (*docosahexaenoic acid*, DHA) το οποίο δίνει σήμα στα 2,38 ppm το οποίο αποδίδεται στα  $\alpha$  και  $\beta$  μεθυλενικά πρωτόνά του και **γ)** τα εικοσαπεντανοϊκό (*eicosapentaenoic acid*, EPA) και αραχιδονικό (*arachidonic acid*, ARA) οξύ, μαζί, τα οποία δίνουν χαρακτηριστικό σήμα στα 1,67 ppm το οποίο αποδίδεται στα  $\beta$  μεθυλενικά πρωτόνά του. [47,48]

**Πίνακας 8:** Χημικές μετατοπίσεις των λιπιδίων των HDL σε ένα φάσμα  $^1\text{H}$  NMR [48]

Λιπίδιο	Απόδοση σήματος	Χημική μετατόπιση (ppm)
<i>Χοληστερόλη</i>	$\text{C}_{18}\text{H}_3$	0,68
	$\text{C}_{26}\text{H}_3, \text{C}_{27}\text{H}_3, \text{C}_{21}\text{H}_3$	0,87
	$\text{C}_{19}\text{H}_3$	1,00
	$\text{C}_3\text{H}$	3,40
	$\text{C}_6\text{H}$	5,36
<i>Τριγλυκερίδια</i>	$\text{C}_1\text{H}^u$ και $\text{C}_3\text{H}^u$ της γλυκερόλης	4,16
	$\text{C}_1\text{H}^d$ και $\text{C}_3\text{H}^d$ της γλυκερόλης	4,32
	$\text{C}_2\text{H}$ της γλυκερόλης	5,22
<i>Φωσφολιπίδια</i>	$\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (PC, SM, και LPC)	3,20
	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (PC, SM, και LPC)	3,59
	$-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (PC, SM, και LPC)	4,24
	$-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ (PE)	3,10
	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CHCHOH}$ (ολικά SLs)	5,70
	$\text{C}_2\text{H}$ γλυκερόλης (Ether GPLs)	5,15
	$-\text{OCH}=\text{CHCH}_2$ (πλασμαλογόνα)	5,90
<i>Λιπαρά οξέα</i>	$\omega-\text{CH}_3$	0,88
	$\omega-\text{CH}_3$ (των $\omega-3$ )	0,95
	$(\text{CH}_2)_n$	1,30
	$-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$	1,59
	$\beta-\text{CH}_2$ των EPA και AA	1,67
	$\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ (UFA)	2,04
	$-\text{CO}-\text{CH}_2$ (ολικά FA)	2,30
	$\alpha$ και $\beta$ $\text{CH}_2$ του DHA	2,38
	$-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{}$ του LA	2,75
	$(\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH})_n, n>1$ (PUFA)	2,80
	$-\text{CH}=\text{CH}$	5,36



## IX.7 ΛΗΨΗ ΚΑΙ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΦΑΣΜΑΤΩΝ

Η λήψη των φασμάτων  $^1\text{H}$  NMR πραγματοποιήθηκε με χρήση του φασματογράφου 500 MHz Avance Bruker DRX, εντάσεως μαγνητικού πεδίου 11,74 Tesla, στο Κέντρο NMR του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για την καταστολή του σήματος του νερού χρησιμοποιήθηκε η 1D παλμική ακολουθία NOESYPRESAT (RD-90°-t1-90°-tm-90°-FID λήψη). Σε κάθε φάσμα έγινε συλλογή 64 σαρώσεων (scans), 64 K δεδομένων (datapoints) με φασματικό εύρος 5000Hz και παλμό 90°. Τα φάσματα που συλλέχθηκαν επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα Bruker topspin.

Για να είναι κατάλληλα τα φάσματα για τον ποσοτικό προσδιορισμό των λιπιδίων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: Αρχικά, πριν από το μετασχηματισμό κατά Fourier, για την αύξηση της ευαισθησίας οι FIDs πολλαπλασιάστηκαν με κατάλληλη εκθετική συνάρτηση που αντιστοιχούσε σε διεύρυνση γραμμών πλάτους 0.3 Hz. Στη συνέχεια έγινε βαθμονόμηση με βάση το σήμα της δευτεριωμένης μεθανόλης στα 3,30ppm και για τη βελτίωση της συμμετρίας των κορυφών πραγματοποιήθηκε διόρθωση της φάσης, μηδενικής και πρώτης τάξης.

Για τον αξιόπιστο ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών των λιπιδίων, έγινε διόρθωση της γραμμής βάσης και στη συνέχεια καταγραφή της χημικής μετατόπισης των κορυφών του φάσματος ως προς τη μεθανόλη (3,30ppm), η οποία και αποτέλεσε την ουσία αναφοράς.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε ολοκλήρωση των περιοχών, για να υπολογιστεί το εμβαδόν μίας απλής ή μιας ομάδας κορυφών, με το εμβαδόν αυτό να είναι ανάλογο του αριθμού των πρωτονίων που περιέχουν. Το ολοκλήρωμα του σήματος συντονισμού των πρωτονίων του άνθρακα 18 της χοληστερόλης ( $\text{C}_{18}\text{H}_3$ ,  $\delta=0,68\text{ppm}$ ) τέθηκε ίσο με την τιμή 1, για να είναι δυνατή η σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ τους.

Τέλος, οι τιμές των ολοκληρωμάτων των σημάτων συντονισμού των υπόλοιπων λιπιδίων υπολογίστηκαν αναλογικά με την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, δεδομένου του αριθμού των πρωτονίων κάθε σήματος, οι τιμές των ολοκληρωμάτων των υπόλοιπων λιπιδίων ανάχθηκαν με βάση την τιμή του ολοκληρώματος της χοληστερόλης.

## Χ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στον Πίνακα 9 παρουσιάζονται τα δημογραφικά χαρακτηριστικά και οι λιπιδαιμικές παράμετροι του ορού (ολική χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, HDL-χοληστερόλη, LDL-χοληστερόλη) και τα επίπεδα της γλυκόζης και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης (HbA1c) των 3 ομάδων μελέτης.

**Πίνακας 9:** Δημογραφικά Χαρακτηριστικά και Εργαστηριακές Παράμετροι των 3 ομάδων του πληθυσμού της μελέτης

	<b>Ομάδα Υγιών</b>	<b>Ασθενείς με Προδιαβήτη</b>	<b>Ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2</b>
Αριθμός	40	40	40
Ηλικία	55,66 ± 9,59	57,05 ± 7,66	57,20 ± 9,75
Φύλο (Α/Γ)	21/19	20/20	22/18
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL)	184,00 ± 26,22	177,53 ± 22,71	183,90 ± 40,40
Τριγλυκερίδια (mg/dL)	99,73 ± 34,44	113,15 ± 43,42	109,43 ± 37,13
HDL Χοληστερόλη (mg/dL)	49,35 ± 10,85	50,85 ± 9,40	46,70 ± 8,46
LDL Χοληστερόλη (mg/dL)	114,71 ± 20,95	104,04 ± 23,64	115,82 ± 35,38
non-HDL Χοληστερόλη (mg/dL)	134,65 ± 24,24	126,68 ± 23,80	137,20 ± 36,52
Γλυκόζη (mg/dL)	90,45 ± 7,48	105,58 ± 7,91*	156,73 ± 24,40*,#
HbA1c (%)	4,99 ± 0,68	5,95 ± 0,35*	7,28 ± 0,69*,#

\* p<0,05 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου

# p<0,05 σε σύγκριση με τους ασθενείς με προδιαβήτη

Οι ομάδες, αυτές, των ασθενών επιλέχθηκαν ώστε να μην παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικές μεταβολές στις λιπιδαιμικές παραμέτρους του ορού, παρά μόνο στα επίπεδα της γλυκόζης και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης, ώστε να μην παρεμβαίνουν στην ανάλυση των δεδομένων.

Η λιπιδική ανάλυση των HDL λιποπρωτεϊνών με φασματοσκοπία NMR πρωτονίου έδωσε πληροφορίες σχετικά με τη λιπιδική τους σύσταση στις 3 ομάδες της μελέτης. Από τα φάσματα NMR που λήφθηκαν, αρχικά, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της ποσότητας των λιπιδίων ανά mol HDL-χοληστερόλης και στη συνέχεια ακολούθησε αναγωγή σε επί της 100 της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών.

Τα συστατικά των λιπιδίων HDL που προσδιορίστηκαν είναι τα λιπίδια του πυρήνα, οι εστέρες της χοληστερόλης, CE, και τα τριγλυκερίδια, TG, καθώς και τα λιπίδια της επιφάνειας, όπως είναι η ελεύθερη χοληστερόλη, FC, τα φωσφολιπίδια, PLs, με προσδιορισμό συγκεκριμένα των γλυκεροφωσφολιπιδίων: φωσφατιδυλοχολίνη, PC, λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, LPC, φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE, και φωσφατιδυλο-ίνοσιτόλη, PI, τα αιθερικά γλυκεροφωσφολιπίδια, όπως τα πλασμαλογόνα, καθώς και τα σφιγγολιπίδια, SLs, όπως η σφιγγομυελίνη, SM, αλλά και άλλα τα οποία αντιστοιχούν κυρίως σε κεραμίδια (Πίνακας 10). Επίσης, προσδιορίστηκε το συνολικό ποσοστό των λιπιδίων τόσο του πυρήνα όσο και της επιφάνειας των HDL λιποπρωτεϊνών. Τέλος, υπολογίστηκαν οι λόγοι της ολικής χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια, της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς την ελεύθερη χοληστερόλη καθώς και της φωσφατιδυλοχολίνης προς τη σφιγγομυελίνη.

**Πίνακας 10:** Λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών (moles/ 100 moles των λιπιδίων).

	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με Προδιαβήτη		Ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2	
			Ποσοστό μεταβολής		Ποσοστό μεταβολής
% Χοληστερόλη	40,22 ± 1,98	41,38 ± 2,49*	▲ 2,88%	41,74 ± 2,42**	▲ 0,87%
Εστεροποιημένη (EC)	32,52 ± 1,57	32,45 ± 1,21	▼ 0,22%	29,41 ± 1,97**,#	▼ 9,37%
Ελεύθερη (FC)	7,70 ± 0,79	8,93 ± 1,75**	▲ 15,97%	12,33 ± 1,93**,#	▲ 38,07%
% Τριγλυκερίδια (TG)	4,27 ± 0,71	5,43 ± 0,85**	▲ 27,17%	5,83 ± 1,37**,#	▲ 7,37%
% Φωσφολιπίδια (PLs)	55,50 ± 2,10	53,20 ± 2,16**	▼ 4,14%	52,43 ± 3,15**	▼ 1,45%
• Γλυκεροφωσφολιπίδια GPLs)	43,67 ± 2,55	41,07 ± 2,38**	▼ 5,95%	40,71 ± 2,93**	▼ 0,88%
Φωσφατιδυλοχολίνη (PC)	32,70 ± 2,27	32,18 ± 2,98	▼ 1,59%	31,03 ± 2,80**,#	▼ 3,57%
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC)	2,69 ± 0,5	4,18 ± 0,64**	▲ 55,39%	4,20 ± 0,91**	▲ 0,48%
Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE)	1,05 ± 0,25	0,70 ± 0,28**	▼ 33,33%	0,73 ± 0,20**	▲ 4,29%
Φωσφατιδυλοίνοσιτόλη (PI)	1,78 ± 0,53	1,11 ± 0,33**	▼ 37,64%	2,34 ± 0,74**,#	▲ 110,81%
Υπόλοιπα Λιπίδια <sup>α</sup>	5,45 ± 1,55	2,90 ± 1,21**	▼ 46,79%	2,41 ± 0,77**	▼ 16,90%
• Αιθερικά Γλυκερολιπίδια (Ether GLs)	5,40 ± 0,88	4,92 ± 0,63*	▼ 8,89%	4,29 ± 0,95**,#	▼ 12,80%
Πλασμαλογόνα	1,60 ± 0,32	1,72 ± 0,59	▲ 7,50%	1,52 ± 0,25 <sup>#</sup>	▼ 11,63%
Υπόλοιπα Αιθερικά Λιπίδια <sup>β</sup>	3,80 ± 0,85	3,20 ± 0,74**	▼ 15,79%	2,77 ± 0,90**,#	▼ 13,44%
• Σφιγγολιπίδια (SLs)	6,43 ± 0,95	7,21 ± 1,02**	▲ 12,13%	7,43 ± 0,93**	▲ 3,05%
Σφιγγομυελίνη (SM)	6,11 ± 0,90	5,51 ± 1,08**	▼ 9,82%	5,48 ± 0,80**	▼ 0,54%
Υπόλοιπα Σφιγγολιπίδια <sup>γ</sup>	0,32 ± 0,11	1,70 ± 0,77**	▲ 413,25%	1,95 ± 0,90**	▲ 14,71
% Λιπίδια του Πυρήνα	36,79 ± 1,77	37,88 ± 0,97*	▲ 2,96%	35,24 ± 2,71**,#	▼ 6,97%
% Λιπίδια της Επιφάνειας	63,21 ± 1,77	62,12 ± 0,97*	▼ 1,72%	64,76 ± 2,71**,#	▲ 4,25%

Ολική Χοληστερόλη/ Φωσφολιπίδια	0,73 ± 0,06	0,78 ± 0,08**	▲ 6,85%	0,80 ± 0,11**	▲ 2,56%
Εστεροποιημένη/Ελεύθερη Χοληστερόλη	4,26 ± 0,42	3,76 ± 0,70**	▼ 11,74%	2,45 ± 0,44**,##	▼ 34,84%
Φωσφατιδυλοχολίνη/ Σφιγγομυελίνη	4,75 ± 0,54	5,37 ± 1,23**	▲ 13,05%	4,60 ± 0,89**,##	▼ 14,34

\* p<0,05 και \*\* p<0,01 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου  
# p<0,05 και ## p<0,01 σε σύγκριση με τους ασθενείς με προδιαβήτη  
α: κυρίως φωσφατιδυλοσερίνη και φωσφατιδυλογλυκερόλη, β: PAF και γ: κυρίως κεραμίδιο

Στον Πίνακα 11 παρουσιάζεται το προφίλ των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών στις 3 ομάδες, όπου προσδιορίστηκε το ποσοστό των κορεσμένων, ακόρεστων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Συγκεκριμένα, από τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προσδιορίστηκε το ποσοστό του λινελαϊκού, του εικοσαπενταενοϊκού και του αραχιδονικού καθώς και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος. Τέλος, υπολογίστηκε το μέσο μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων καθώς και οι λόγοι των κορεσμένων προς τα ακόρεστα λιπαρά οξέα αλλά και των κορεσμένων προς τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

**Πίνακας 11:** Προφίλ Λιπαρών Οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών (moles/ 100 moles των λιπιδίων)

Λιπαρά Οξέα	Ομάδα Ελέγχου	Ασθενείς με Προδιαβήτη		Ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2	
			Ποσοστό μεταβολής		Ποσοστό μεταβολής
% Κορεσμένα	37,07 ± 3,11	41,87 ± 1,81**	▲ 12,95%	47,23 ± 6,78**,##	▲ 12,80%
% Ακόρεστα	62,93 ± 3,11	58,13 ± 1,81**	▼ 7,63%	52,77 ± 6,77**,##	▼ 9,22%
% Μονοακόρεστα	10,67 ± 3,68	6,35 ± 2,45**	▼ 40,49%	5,40 ± 2,30**	▼ 14,96%
% Πολυακόρεστα	52,26 ± 2,78	51,78 ± 3,36	▼ 0,92%	47,37 ± 5,73**,##	▼ 8,52%
➤ Λινελαϊκό Οξύ	19,39 ± 2,24	18,73 ± 1,49	▼ 3,40%	16,65 ± 2,04**,##	▼ 11,11%
➤ Εικοσαπενταενοϊκό και Αραχιδονικό Οξύ	12,26 ± 1,68	10,71 ± 1,63**	▼ 12,64%	10,14 ± 1,75**	▼ 5,32%
➤ Εικοσιδιεξαενοϊκό Οξύ	4,17 ± 0,68	2,47 ± 0,41**	▼ 40,77%	3,29 ± 0,82**,##	▲ 33,20%
Μέσο Μήκος Αλυσίδας Λιπαρών Οξέων	16,90 ± 1,04	14,89 ± 0,66**	▼ 11,89%	15,34 ± 0,90**,#	▲ 3,02%
Κορεσμένα/Ακόρεστα	0,59 ± 0,09	0,72 ± 0,05**	▲ 22,03%	0,93 ± 0,26**,##	▲ 29,17%
Κορεσμένα/Πολυακόρεστα	0,71 ± 0,08	0,81 ± 0,09*	▲ 14,08%	1,03 ± 0,28**,##	▲ 27,16%

\* p<0.05 και \*\* p<0.01 σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου  
# p<0.05 και ## p<0.01 σε σύγκριση με τους ασθενείς με προδιαβήτη

➤ **Ασθενείς με Προδιαβήτη vs Ομάδα Υγιών:**

Από τη σύγκριση της λιπιδικής σύστασης των HDL των ασθενών με προδιαβήτη με την ομάδα ελέγχου παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες διαφορές τόσο στα δομικά συστατικά του πυρήνα και της επιφάνειας των σωματιδίων, όσο και στο προφίλ των λιπαρών οξέων τους.

Στον **Πίνακα 10** παρατηρούμε ότι στο κλάσμα των HDL των ασθενών με προδιαβήτη παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της ολικής χοληστερόλης (41,38 vs 40,22,  $p < 0,05$ ) η οποία οφείλεται κυρίως στην ελεύθερη χοληστερόλη (8,93 vs 7,70,  $p < 0,01$ ) και των τριγλυκεριδίων (5,43 vs 4,27,  $p < 0,01$ ), ενώ για τα ολικά φωσφολιπίδια παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση (53,20 vs 55,50  $p < 0,01$ ) η οποία οφείλεται στη μείωση τόσο των γλυκεροφωσφολιπιδίων (41,07 vs 43,67  $p < 0,01$ ) όσο και των αιθερικών γλυκερολιπιδίων (4,92 vs 5,40  $p < 0,05$ ) ενώ τα σφιγγολιπίδια παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση (7,21 vs 6,43  $p < 0,01$ ).

Όσον αναφορά τα φωσφολιπίδια, και συγκεκριμένα τα γλυκεροφωσφολιπίδια η μείωση που παρουσιάστηκε οφείλεται στη φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (0,70 vs 1,05  $p < 0,01$ ), στη φωσφατιδυλοϊνσοσιτόλη (1,11 vs 1,78  $p < 0,01$ ), και στα υπόλοιπα λιπίδια (2,90 vs 5,45  $p < 0,01$ ), τα οποία αναφέρονται κυρίως στη φωσφατιδυλοσερίνη και στη φωσφατιδυλογλυκερόλη. Επίσης στους ασθενείς με προδιαβήτη η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη αποτέλεσε το μόνο γλυκεροφωσφολιπίδιο το οποίο παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση (4,18 vs 2,69  $p < 0,01$ ) σε σχέση με την ομάδα των υγιών. Η μείωση στα αιθερικά γλυκερολιπίδια που παρουσιάστηκε οφείλεται στα υπόλοιπα αιθερικά λιπίδια (3,20 vs 3,80  $p < 0,01$ ), τα οποία αναφέρονται κυρίως στον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (*Platelet Activating Factor*, PAF), με τα πλασμαλογόνα να παρουσιάζουν μη στατιστικά σημαντική αύξηση (1,72 vs 1,60).

Τέλος, ενώ η σφιγγομυελίνη, το κυριότερο σφιγγολιπίδιο που εμφανίζεται στις HDL, παρουσίασε στατιστικά σημαντική μείωση (5,51 vs 6,11  $p < 0,01$ ), τα σφιγγολιπίδια εμφάνισαν στατιστικά σημαντική αύξηση (7,21 vs 6,43  $p < 0,01$ ), με την αύξηση αυτή να οφείλεται στον εμπλουτισμό των σωματιδίων με υπόλοιπα σφιγγολιπίδια (1,70 vs 0,32  $p < 0,01$ ) όπως είναι τα κεραμίδια.

Το ποσοστό των λιπιδίων του πυρήνα των HDL των ασθενών με προδιαβήτη παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση (37,88 vs 36,79  $p < 0,05$ ), ενώ αντίθετα το ποσοστό των λιπιδίων της επιφάνειας στατιστικά σημαντική μείωση (62,12 vs 63,21  $p < 0,05$ ) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Τέλος, υπολογίστηκε ο λόγος της ολικής χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια, ο οποίος παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος (0,78 vs 0,73  $p < 0,01$ ), όπως και ο λόγος της φωσφατιδυλοχολίνης προς τη σφιγγομυελίνη (5,37 vs 4,75  $p < 0,01$ ). Ο λόγος της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς την ελεύθερη χοληστερόλη (3,76 vs 4,26  $p < 0,01$ ) παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά μικρότερος στους ασθενείς με προδιαβήτη απ' ότι στην ομάδα ελέγχου.

Όσον αναφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων των HDL λιποπρωτεϊνών, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο ομάδες. Όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 11**, οι HDL των προδιαβητικών παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων (41,87 vs 37,07,  $p < 0,01$ ) και στατιστικά σημαντική μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (58,13 vs 62,93,  $p < 0,01$ ) σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Η μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων οφείλεται κυρίως στη μείωση του ποσοστού των μονοακόρεστων (6,35 vs 10,67,  $p < 0,01$ ) καθώς η μείωση του ποσοστού των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (51,78 vs 52,26,  $p > 0,05$ ) ήταν στατιστικά μη σημαντική.

Για τα επιμέρους πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παρουσιάστηκε ότι το σύνολο των εικοσαπενταενοϊκού και αραχιδονικού οξέος καθώς και το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση (10,71 vs 12,26  $p < 0,01$ ) και (2,47 vs 4,17  $p < 0,01$ ), αντίστοιχα, ενώ η μείωση που παρατηρήθηκε για το λινελαϊκό οξύ (18,73 vs 19,39) ήταν στατιστικά μη σημαντική. Επίσης στατιστικά σημαντική μείωση παρουσιάστηκε και στο μέσο μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων (14,89 vs 16,90  $p < 0,01$ ).

Τέλος, υπολογίστηκε ο λόγος των κορεσμένων προς τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ο οποίος παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος (0,72 vs 0,59  $p < 0,01$ ), όπως και ο λόγος των κορεσμένων προς τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (0,81 vs 0,71  $p < 0,05$ ).

#### ➤ **Ασθενείς με Προδιαβήτη vs Ασθενείς με Σακχαρώδη Διαβήτη:**

Όταν έγινε σύγκριση της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών των ασθενών με T2DM και των ασθενών με προδιαβήτη για τα περισσότερα λιπίδια παρατηρήθηκαν μεταβολές οι οποίες ακολουθούν σταδιακά τις μεταβολές που έχουν ήδη εμφανιστεί μεταξύ των προδιαβητικών και της ομάδας ελέγχου.

Συγκεκριμένα στον **Πίνακα 10**, παρατηρούμε ότι στο κλάσμα των HDL των ασθενών με T2DM παρατηρήθηκε, σε σχέση με τους ασθενείς με προδιαβήτη, αύξηση της ολικής χοληστερόλης (41,74 vs 41,38) και των τριγλυκεριδίων (5,83 vs 5,43  $p < 0,05$ ), με την τελευταία να είναι στατιστικά σημαντική, ενώ για τα ολικά φωσφολιπίδια παρατηρήθηκε στατιστικά μη σημαντική μείωση (52,43 vs 53,20) η οποία οφείλεται στη μείωση τόσο των γλυκεροφωσφολιπιδίων (40,71 vs 41,07) όσο και των αιθερικών γλυκερολιπιδίων (4,29 vs 4,92  $p < 0,01$ ), αν και στατιστικά σημαντική ήταν μόνο για τα αιθερικά γλυκερολιπίδια. Όσον αναφορά τα σφιγγολιπίδια, και εδώ, αποτελούν τη μοναδική κατηγορία φωσφολιπιδίων που παρουσίασε αύξηση (7,43 vs 7,21) αν και μη στατιστικά σημαντική.

Συγκεκριμένα για την ολική χοληστερόλη, αν και η αύξησή της ήταν στατιστικά μη σημαντική, η αύξηση της ελεύθερης χοληστερόλης (12,33 vs 8,93  $p < 0,01$ ), καθώς και η μείωση της εστεροποιημένης χοληστερόλης (29,41 vs 32,45,  $p < 0,01$ ) ήταν στατιστικά σημαντικές.

Όσον αναφορά τα φωσφολιπίδια, και συγκεκριμένα τα γλυκεροφωσφολιπίδια η μείωση που παρουσιάστηκε οφείλεται κυρίως στην στατιστικά σημαντική μείωση της φωσφατιδυλοχολίνης (31,03 vs 32,18,  $p < 0,05$ ). Όλα τα υπόλοιπα γλυκεροφωσφολιπίδια,

εκτός από αυτά που αναφέρονται κυρίως στη φωσφατιδυλοσερίνη και στη φωσφατιδυλογλυκερόλη, εμφάνισαν αύξηση, με αυτήν της φωσφατιδυλοϊννοσιτόλης να είναι και η μοναδική στατιστικά σημαντική (2,34 vs 1,11,  $p < 0,01$ ).

Επίσης, η στατιστικά σημαντική μείωση στα αιθερικά γλυκερολιπίδια που παρουσιάστηκε οφείλεται τόσο στα πλασμαλογόνα (1,52 vs 1,72  $p < 0,05$ ) όσο και στα υπόλοιπα αιθερικά λιπίδια (2,77 vs 3,20  $p < 0,05$ ).

Τέλος, η αύξηση που παρουσιάστηκε στα σφιγγολιπίδια οφείλεται στην αύξηση των σωματιδίων σε σφιγγολιπίδια διάφορα της σφιγγομυελίνης (1,95 vs 1,70), με την τελευταία να παρουσιάζει μείωση (5,48 vs 5,51). Οι διαφορές αυτές, όμως, ήταν στατιστικά μη σημαντικές.

Κατά τη σύγκριση των ποσοστών των λιπιδίων τόσο του πυρήνα των HDL όσο και της επιφάνειάς τους, οι HDL των ασθενών με T2DM παρουσίασαν στατιστικά σημαντική μείωση στο ποσοστό των λιπιδίων του πυρήνα τους (35,24 vs 37,88  $p < 0,01$ ), και στατιστικά σημαντική αύξηση στο ποσοστό των λιπιδίων της επιφάνειάς τους (64,76 vs 62,12  $p < 0,01$ ) σε σχέση με τις HDL της ομάδας των προδιαβητικών.

Τέλος, υπολογίστηκαν οι λόγοι της ολικής χοληστερόλης προς τα φωσφολιπίδια, της εστεροποιημένης χοληστερόλης προς την ελεύθερη χοληστερόλη και της φωσφατιδυλοχολίνης προς τη σφιγγομυελίνη. Από αυτούς, στατιστικά σημαντικοί ήταν οι δύο τελευταίοι και συγκεκριμένα εμφανίστηκαν στατιστικά σημαντικά μικρότεροι (2,45 vs 3,76  $p < 0,01$ ) και (4,60 vs 5,37  $p < 0,01$ ), αντίστοιχα.

Όσων αναφορά το προφίλ των λιπαρών οξέων, παρατηρούνται και εδώ σημαντικές μεταβολές ανάμεσα στις δύο ομάδες οι οποίες ακολουθούν σταδιακά τις μεταβολές που έχουν ήδη εμφανιστεί μεταξύ των προδιαβητικών και της ομάδας ελέγχου.

Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 11**, οι HDL των ασθενών με T2DM παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων (47,23 vs 41,87  $p < 0,01$ ) και στατιστικά σημαντική μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων (52,77 vs 58,13  $p < 0,01$ ) σε σχέση με την ομάδα των προδιαβητικών. Η μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων οφείλεται κυρίως στην στατιστικά σημαντική μείωση του ποσοστού των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (47,37 vs 51,78  $p < 0,01$ ) καθώς η μείωση του ποσοστού των μονοακόρεστων (5,40 vs 6,35) ήταν στατιστικά μη σημαντική.

Για συγκεκριμένα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως είναι το λινελαϊκό, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική μείωση (16,65 vs 18,73  $p < 0,01$ ), ενώ για το εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ, παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντική αύξηση (3,29 vs 2,47  $p < 0,01$ ) του ποσοστού του.

Επιπλέον, το μέσο μήκος της αλυσίδας των λιπαρών οξέων στις HDL των ασθενών με T2DM παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο (15,34 vs 14,89  $p < 0,05$ ) σε σχέση με αυτό των HDL των προδιαβητικών.

Τέλος, υπολογίστηκε ο λόγος των κορεσμένων προς τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, ο οποίος παρουσιάστηκε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος (0,93 vs 0,72  $p < 0,01$ ), όπως και ο λόγος των κορεσμένων προς τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (1,03 vs 0,81  $p < 0,01$ ).

Παρατηρούμε ότι οι μεταβολές που εμφανίζονται στο λιπιδικό προφίλ των ασθενών με T2DM και των ασθενών με προδιαβήτη ακολουθούν τις μεταβολές που παρατηρήθηκαν κατά τη σύγκριση της λιπιδικής σύστασης των HDL των ασθενών με προδιαβήτη με της ομάδας των υγιών, δείχνοντας μας ότι οι μεταβολές που παρατηρούνται στο προφίλ των λιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών ακολουθούν την πορεία της νόσου.



## **XI. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

---

Η λειτουργικότητα των HDL λιποπρωτεϊνών εξαρτάται και από τη λιπιδική τους σύσταση, καθώς μελέτες [15,17-21] έχουν δείξει πως οι HDL με διαταραχές στο λιπιδικό προφίλ παρουσιάζουν μειωμένη δραστική και λειτουργική ικανότητα. Έχει αποδειχτεί, δηλαδή, πως τα HDL σωματίδια μπορεί να είναι δυσλειτουργικά, ανεξάρτητα από την περιεκτικότητά τους σε χοληστερόλη.

Στην κάθε μέρα κλινική πράξη η εκτίμηση της αθηροπροστατευτικότητας των HDL σωματιδίων πραγματοποιείται με τον προσδιορισμό των επιπέδων της περιεκτικότητας του σωματιδίου σε χοληστερόλη (HDL-χοληστερόλη). Μελέτες όμως των τελευταίων χρόνων [49-51] έχουν δείξει πως τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης δεν είναι αξιόπιστος δείκτης, καθώς δεν αντιπροσωπεύουν τη λειτουργικότητα του σωματιδίου.

Αυτός είναι και ο λόγος που τα τελευταία χρόνια υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον στην ερευνητική κοινότητα για την αναζήτηση νέων βιοδεικτών που θα αντικατοπτρίζουν καλύτερα τη λειτουργικότητα του HDL σωματιδίου, καθώς είναι πλέον αποδεκτό ότι η σύσταση των HDL, δηλαδή η ποιότητα των σωματιδίων, είναι σημαντικότερη από την ποσότητά τους.

Όπως είδαμε και παραπάνω, οι περισσότερες μελέτες των τελευταίων χρόνων έχουν επικεντρωθεί στο προσδιορισμό της περιεκτικότητας των HDL σε χοληστερόλη [27-31], με τον αριθμό των μελετών όπου εξετάστηκε εκτενέστερα η σύσταση των HDL στους ασθενείς με διαβήτη να είναι μικρός [32-34] και να μειώνεται ακόμα περισσότερο όσον αναφορά μελέτες που εμπεριείχαν στοιχεία και για προδιαβητικούς ασθενείς [35]. Επίσης, το μεγαλύτερο μέρος των μελετών αυτών αφορούσε τα υποκλάσματα των HDL [28,29,31,32,35]

Η παρατήρηση, αυτή, αποτέλεσε και το λόγο διεξαγωγής της συγκεκριμένης μελέτης με σκοπό να αναλυθεί η λιπιδική σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών και στις δύο ομάδες ασθενών και να βρεθεί εάν οι διαφορές που παρουσιάζονται στο λιπιδικό προφίλ των HDL στους ασθενείς με προδιαβήτη, εμφανίζονται στους ασθενείς με T2DM, και αν ναι, σε τι βαθμό συγκριτικά τόσο με την κατάσταση πριν την εξέλιξη του προδιαβήτη, όσο και με εγκατεστημένο σακχαρώδη διαβήτη.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης έδειξαν ότι το λιπιδικό προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών παρουσιάζει σημαντικές αλλαγές πριν την ανάπτυξη του Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, δηλαδή από το στάδιο του Προδιαβήτη. Επίσης, βρέθηκε πως οι αλλαγές, αυτές, ακολουθούν μία σταδιακή τάση από την ομάδα υγιών προς τους προδιαβητικούς, και από τους προδιαβητικούς προς τους ασθενείς με T2DM.

Μελέτες έχουν δείξει πως τα επίπεδα της HDL-C εμφανίζονται μειωμένα στους ασθενείς με T2DM σε σχέση με ασθενείς που παρουσιάζουν φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη. [30,52] Τα αποτελέσματα της μελέτης μας επεκτείνουν αυτή τη διατύπωση δείχνοντας ότι η περιεκτικότητα των HDL σε ολική χοληστερόλη αυξάνεται με την

επιδείνωση του γλυκαιμικού ελέγχου καθώς η ελεύθερη χοληστερόλη, FC, αυξάνεται στην επιφάνειά τους, ενώ στον πυρήνα τους οι εστέρες της χοληστερόλης, EC, μειώνονται.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και από τους Wang et al. [35] οι οποίοι επικεντρώθηκαν στην ανάλυση της λιπιδικής σύστασης των πολύ μεγάλων, μεγάλων, μεσαίων και μικρών HDL λιποπρωτεϊνών σε υγιείς ασθενείς, σε προδιαβητικούς ασθενείς με διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, IFG, ή με μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IGT, ή και με τα δύο ( IGT και IFG ασθενείς) καθώς και σε νέους διαβητικούς ασθενείς. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πως ενώ η HDL-χοληστερόλη μειώνεται, η ολική χοληστερόλη, TC, στα σωματίδια αυτά αυξάνεται, κυρίως λόγω της ελεύθερης χοληστερόλης, FC, όσο επιδεινώνεται ο γλυκαιμικός έλεγχος, με τις αλλαγές να είναι πιο έντονες στα πιο μικρά σωματίδια HDL. Συγκεκριμένα, οι συγκεντρώσεις των μεγάλων HDL σωματιδίων μειώνονται και αυξάνονται τα μικρά HDL σωματίδια τα οποία είναι εμπλουτισμένα με τριγλυκερίδια. Παρόμοια ευρήματα έχουν βρεθεί και σε άλλες μελέτες στις οποίες αναφέρεται πως οι ασθενείς με διαβήτη τύπου II [28,29] και με προδιαβήτη [31] παρουσιάζουν κυρίως μικρά, πυκνά και πλούσια σε πρωτεΐνες HDL σωματίδια (HDL<sub>3</sub>), με τις συγκεντρώσεις των μεγάλων και πιο πλούσιων σε λιπίδια HDL σωματιδίων (HDL<sub>2</sub>) να είναι μειωμένες. Οι Stahlman et al [34] και οι Gowri et al [32] έχουν δείξει, όπως και εμείς, πως η περιεκτικότητα σε εστεροποιημένη χοληστερόλη στον πυρήνα των HDL των διαβητικών ασθενών παρουσιάζεται μειωμένη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και, σε αντίθεση με τα δικά μας αποτελέσματα, την ίδια μείωση παρουσιάζει και η ελεύθερη χοληστερόλη (τα αποτελέσματά μας έδειξαν πως η ελεύθερη χοληστερόλη αυξήθηκε κατά την επιδείνωση του γλυκαιμικού ελέγχου).

Στην παρούσα μελέτη, η περιεκτικότητα του πυρήνα σε τριγλυκερίδια, TG, αυξάνεται στους προδιαβητικούς σε σχέση με την ομάδα υγιών και η αύξηση αυτή φαίνεται πως ακολουθεί την πορεία εξέλιξης της νόσου δηλαδή παρουσιάζεται σταδιακός εμπλουτισμός του σωματιδίου με τριγλυκερίδια από την προδιαβητική στην διαβητική κατάσταση. Τα αυξημένα επίπεδα των TG προκαλούν την αύξηση της δράση της CETP [28], δηλαδή την αυξημένη μεταφορά των TG από τις VLDL στις HDL [27] και την αυξημένη μεταφορά των CE προς την αντίθετη κατεύθυνση.[53]

Οι παραπάνω διαταραχές στην σύσταση των λιπιδίων του πυρήνα επηρεάζουν τη λειτουργικότητα των HDL σωματιδίων. Συγκεκριμένα, έχει δειχθεί πως η αύξηση των TG στον πυρήνα των HDL καθιστά τα σωματίδια αυτά ικανά να προσλαμβάνουν μεγαλύτερες ποσότητες FC χωρίς να είναι, όμως, ικανά να την μετατρέψουν στους αντίστοιχους εστέρες της, καθώς δεν αποτελούν ευνοϊκά υποστρώματα για τη LCAT. [40] Αυτό έχει και ως αποτέλεσμα, πολλές φορές, λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης της χοληστερόλης οι HDL αντί να δρουν ως δέκτες της από διάφορους κυτταρικούς τύπους, να δρουν ως δότες της. [21,54]

Επίσης, η αύξηση των TG καθιστά τις HDL ευαίσθητες στην οξειδωση [32], ενώ η μειωμένη ποσότητα των εστέρων έχει ως αποτέλεσμα τα σωματίδια αυτά να παρουσιάζουν αστάθεια και να απομακρύνονται από την κυκλοφορία του αίματος πολύ

πιο γρήγορα απ' ό τι τα φυσιολογικά σωματίδια [55]. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι η σταθερότητα της α-έλικας της apoA-I ενισχύεται από την αύξηση της περιεκτικότητας του πυρήνα σε CE και μειώνεται από τα TG. Συνεπώς, οι παραπάνω μεταβολές στη λιπιδική σύσταση του πυρήνα έχουν ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση της apoA-I από την HDL, διαδικασία που ενισχύει επιπλέον την αστάθεια του σωματιδίου. [56]

Τέλος, οι αλλοιώσεις αυτές στη σύσταση των HDL έχει βρεθεί πως επηρεάζουν και το μεταβολισμό τους, μεταβάλλοντας την αλληλεπίδρασή τους με διάφορες πρωτεΐνες. Προηγουμένως αναφέρθηκε ο τρόπος που επηρεάζει η αλλαγή της σύστασης τη δράση των CETP και LCAT. Εκτός από τα ένζυμα αυτά, έχει βρεθεί πως οι τροποποιημένες HDL αποτελούν ασθενείς δότες εστέρων στο ήπαρ μέσω της δράσης της SR-BI, με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται σωστά ο καταβολισμός της χοληστερόλης που έχει συλλεχθεί από τα περιφερικά κύτταρα. [21]

Όσων αναφορά τα φωσφολιπίδια των HDL από τη μελέτη μας φάνηκε πως οι προδιαβητικοί ασθενείς παρουσιάζουν μία μείωση στην περιεκτικότητα των φωσφολιπιδίων των HDL λιποπρωτεϊνών τους η οποία γίνεται πιο έντονη στους ασθενείς με T2DM. Η μείωση που παρουσιάζεται, οφείλεται κυρίως στα γλυκεροφωσφολιπίδια και στα αιθερικά γλυκερολιπίδια, καθώς τα σφιγγολιπίδια παρουσιάζουν αύξηση.

Πιο συγκεκριμένα μείωση παρουσιάζουν κυρίως η φωσφατιδυλοχολίνη, τα αιθερικά λιπίδια τα οποία δεν αναφέρονται στα πλασμαλόγονα και η σφιγγομυελίνη. Η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, LPC, και τα κεραμίδια, αποτελούν τα μοναδικά φωσφο-λιπίδια τα οποία παρουσιάζουν αύξηση κατά την επιδείνωση του γλυκαιμικού ελέγχου.

Τα ευρήματα αυτά είναι σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες των Wang et al. [35] καθώς και των Gowri et al [32]. Οι πρώτοι έδειξαν πως η περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια, στα διάφορα υποκλάσματα των HDL, μειώνεται από την ομάδα ελέγχου προς τους προδιαβητικούς, με τη μείωση αυτή να αυξάνεται καθώς προχωράμε προς την κατάσταση του T2DM. Τα αποτελέσματα των Gowri et al. [32] δεν περιείχαν δεδομένα για προδιαβητικούς ασθενείς, με τη μείωση των φωσφολιπιδίων να αφορά τις HDL των διαβητικών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Μία μελέτη με πιο εκτενή δεδομένα για τη λιπιδιακή σύσταση των HDL ήταν αυτή των Ståhlman et al [34] χωρίς όμως να εμπεριέχονται, δεδομένα για προδιαβητικούς ασθενείς, παρά μόνο για υγιείς και διαβητικούς. Έτσι, η μελέτη αυτή έδειξε πως οι ασθενείς με T2DM εμφανίζουν HDL πιο φτωχές σε PC, σε SM, καθώς και σε κεραμίδια, σε σχέση με τους υγιείς, με τη LPC να είναι το μόνο γλυκεροφωσφολιπίδιο το οποίο παρουσιάζει αύξηση. [34] Τα αποτελέσματα είναι σύμφωνα με τα δικά μας, με τη μόνη διαφορά να εμφανίζεται στη ποσότητα των κεραμιδίων, καθώς εμείς βρήκαμε πως η περιεκτικότητά τους στις HDL των ασθενών με διαβήτη είναι μεγαλύτερη απ' ό τι στις HDL των υγιών.

Από πολλές μελέτες είναι γνωστό ότι οι αλλοιώσεις στη σύσταση των φωσφολιπιδίων των HDL προκαλούν σημαντικές αλλαγές τόσο στη δομή και στη σταθερότητα των σωματιδίων όσο και στη λειτουργία τους, επηρεάζοντας κυρίως τη διαδικασία της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, καθώς η μείωση των φωσφολιπιδίων

επηρεάζει την αλληλεπίδρασή τους με διάφορες πρωτεΐνες όπως είναι η CETP, η LCAT και η SR-BI. [15,57]

Συγκεκριμένα έχει βρεθεί πως η μείωση των PL έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της δράσης της CETP και την απομάκρυνση της apoA-I από τα σωματίδια, καθιστώντας τα ασταθή και ευάλωτα στην απομάκρυνσή τους από την κυκλοφορία του αίματος. [17] Επίσης, είναι γνωστό πως η δράση της LCAT εξαρτάται άμεσα από τη σύσταση των φωσφολιπιδίων των HDL, καθώς ο λόγος της PC/SM είναι ευθέως ανάλογος με τη δράση της [20]. Επιπλέον, η μείωση της περιεκτικότητας των φωσφολιπιδίων προκαλεί μείωση στην εκροή της FC από τις HDL προς τα ηπατοκύτταρα μέσω της δράσης της SR-BI, κατάσταση η οποία επιδεινώνει, και αυτή με τη σειρά της, το τελικό στάδιο της αντίστροφης μεταφοράς της χοληστερόλης, δηλαδή τον καταβολισμό της στο ήπαρ. [18,19]

Η PC έχει βρεθεί ότι αποτελεί το μοναδικό φωσφολιπίδιο το οποίο απαιτείται για τον αρχικό σχηματισμό των λιποπρωτεϊνών και την απελευθέρωσή τους στην κυκλοφορία, μία κατάσταση που δείχνει τη σημασία της για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα των HDL λιποπρωτεϊνών. [58] Επίσης, η PC έχει την ικανότητα να αναστέλλει την έκφραση φλεγμονωδών μορίων στο ενδοθήλιο, με αποτέλεσμα η μείωσή της στο μόριο των HDL να επηρεάζει την ικανότητα των HDL λιποπρωτεϊνών να ασκούν τις αντιφλεγμονώδεις και αντιαθηρογόνες ιδιότητες τους. [59]

Τέλος, η SM έχει δειχθεί πως επηρεάζει τη δομή και την σταθερότητα των HDL λιποπρωτεϊνών καθώς η μείωσή της προκαλεί ελαττώματα στο πακετάρισμα των φωσφολιπιδίων στην επιφάνεια των HDL λιποπρωτεϊνών. [60] Εκτός από τις δομικές αλλαγές που προκαλεί η μείωση αυτή επηρεάζει και διάφορες ιδιότητες των HDL, όπως είναι οι αντιφλεγμονώδεις. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί πως η SM αποδίδει στα HDL σωματίδια την ικανότητα αναστολής της απελευθέρωσης του TNF- $\alpha$ . Γι' αυτό και η μείωση της συγκέντρωσής της έχει ως αποτέλεσμα την μείωση των αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων της. [19,57]

Με σύνοψη των παραπάνω, φάνηκε πως με την επιδείνωση του γλυκαιμικού ελέγχου το περιεχόμενο του πυρήνα σταδιακά εμπλουτίζεται με τριγλυκερίδια και μειώνεται με εστέρες της χοληστερόλης, ενώ στην επιφάνεια μειώνεται η περιεκτικότητα σε φωσφολιπίδια και αυξάνεται η ελεύθερη χοληστερόλη. Το ποσοστό όμως των λιπιδίων του πυρήνα και των λιπιδίων της επιφάνειας δεν παρουσιάζουν την ίδια σταδιακή μεταβολή καθώς μέσα από τα αποτελέσματά μας φάνηκε πως οι HDL των προδιαβητικών παρουσιάζουν πιο έντονες αλλοιώσεις συγκριτικά και με τις δύο ομάδες, των controls και των ασθενών με T2DM, καθώς το ποσοστό των λιπιδίων στον πυρήνα των HDL τους παρουσιάζει αύξηση σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες και το ποσοστό των λιπιδίων της επιφάνειας τους μείωση.

Έως τώρα δεν έχει δημοσιευτεί μελέτη στην οποία να μελετάται η λιπιδιακή σύσταση των HDL λιποπρωτεϊνών σε ασθενείς με προδιαβήτη και να γίνεται σύγκριση με την αντίστοιχη των ασθενών με προχωρημένο σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Η μελέτη των

Stahlman et al., που περιέχει πληροφορίες για ασθενείς με T2DM σε σύγκριση με υγιείς, έδειξε πως οι διαβητικοί ασθενείς παρουσιάζουν μειωμένη περιεκτικότητα σε λιπίδια της επιφάνειας των HDL και αυξημένα λιπίδια του πυρήνα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. [34]

Όσον αναφορά τα λιπαρά οξέα, στη μελέτη μας φάνηκε ότι το ποσοστό των κορεσμένων λιπαρών οξέων αυξάνεται διαδοχικά από την ομάδα των υγιών προς τους προδιαβητικούς με την αύξηση αυτή να γίνεται ακόμα πιο έντονη μεταξύ των προδιαβητικών και των ασθενών με T2DM, ενώ τα ακόρεστα λιπαρά οξέα μειώνονται βαθμιαία από τους υγιείς, στους προδιαβητικούς και στη συνέχεια στους διαβητικούς.

Όσον αναφορά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, η ίδια αύξηση έχει δείχθει και σε παλαιότερη μελέτη κατά τη σύγκριση ασθενών με T2DM και controls. [34] Επίσης, στη μελέτη των Morgantini et al. αναφέρεται μία αύξηση των οξειδωμένων λιπιδικών προϊόντων στους διαβητικούς ασθενείς σε σχέση με τους controls, με τα μικρότερα HDL σωματίδια να είναι πιο πλούσια σε οξειδωμένα λιπαρά οξέα από ότι τα μεγαλύτερα. [33]

Οι μεταβολές αυτές στα λιπαρά οξέα έχει δείχθει ότι επηρεάζουν τις αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες των HDL λιποπρωτεϊνών, καθώς τα αυξημένα επίπεδα των κορεσμένων λιπαρών οξέων έχει βρεθεί ότι επάγουν τις προφλεγμονώδεις διεργασίες, αυξάνουν τη βλάβη του ενδοθηλίου και επηρεάζουν αρνητικά την ικανότητα επιδιόρθωσης του, ενώ η μείωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων επιδεινώνουν τη λειτουργία των λιποπρωτεϊνών [61,62]. Επιπλέον, οι μεταβολές στα λιπαρά οξέα επηρεάζουν και την αλληλεπίδραση των HDL με τη LCAT, καθώς η μείωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων καθιστά τις λιποπρωτεΐνες αυτές μη ευνοϊκά υποστρώματα για το συγκεκριμένο ένζυμο, με αποτέλεσμα αν και παρουσιάζουν καλύτερη εκροή χοληστερόλης προς τα ηπατοκύτταρα, η μετατροπή της FC προς τους αντίστοιχους εστέρες της να πραγματοποιείται με μειωμένο ρυθμό. [19]

## ***XII. ΠΕΡΙΛΗΨΗ – “Διερεύνηση της λιπιδικής σύστασης των HDL λιποπρωτεϊνών του αίματος σε προδιαβητικούς και διαβητικούς ασθενείς, Καρακίτσου Κυριακή”***

---

Ο προδιαβήτης είναι μία παθολογική κατάσταση κατά την οποία οι ασθενείς παρουσιάζουν επίπεδα γλυκόζης στο αίμα μεγαλύτερα από τα φυσιολογικά (σε κατάσταση νηστείας > 100 mg/dL) αλλά μικρότερα από εκείνα που παρουσιάζουν οι ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (πάλι σε κατάσταση νηστείας ≤ 125 mg/dL).

Ο προδιαβήτης είναι μία σύνθετη πολυπαραγοντική μεταβολική διαταραχή με πολλές σοβαρές επιπλοκές, με τους ασθενείς που πάσχουν από προδιαβήτη να εμφανίζουν διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, IFG, με αυξημένη παραγωγή γλυκόζης, ή μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, IGT, όπου η κύρια διαταραχή εμφανίζεται στη μειωμένη διάθεση της γλυκόζης κυρίως στους σκελετικούς μυς. Οι δύο αυτές διαφορετικές παθολογικές καταστάσεις, αποτελούν τον προδιαβήτη, και η κύρια διαφορά τους εμφανίζεται στο σημείο αντίστασης στην ινσουλίνη, καθώς στους ασθενείς με IFG, το όργανο το οποίο παρουσιάζει αντίσταση είναι το ήπαρ, ενώ στους ασθενείς με IGT οι σκελετικοί μυς είναι αυτοί που δεν λαμβάνουν το σήμα της ινσουλίνης ώστε να προσλάβουν τη γλυκόζη και να μειώσουν τα επίπεδά της στην κυκλοφορία του αίματος.

Εκτός από την κύρια αυτή διαφορά, χαρακτηριστικό του προδιαβήτη αποτελεί η δυσλειτουργία των β-παγκρεατικών κυττάρων, με αποτέλεσμα να παράγουν αυξημένη ποσότητα ινσουλίνης χωρίς όμως να είναι ικανά να μειώσουν τα επίπεδα της γλυκόζης, κατάσταση που τελικά οδηγεί στην εξάντληση των κυττάρων αυτών.

Εάν η κατάσταση του προδιαβήτη δεν αντιστραφεί, οι ασθενείς με προδιαβήτη παρουσιάζουν μεγάλη πιθανότητα να αναπτύξουν σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2 είναι μία χρόνια ασθένεια που παρουσιάζει πολλές σοβαρές επιπλοκές, με τις καρδιαγγειακές παθήσεις να αποτελούν τη σοβαρότερη και επικινδυνότερη επιπλοκή.

Η κατάσταση που επικρατεί στον οργανισμό ενός διαβητικού ασθενή ουσιαστικά είναι μία επιδεινωμένη εικόνα ενός προδιαβητικού ασθενή, καθώς τα παγκρεατικά κύτταρα, λόγω της συνεχόμενης παραγωγής ινσουλίνης, έχουν φτάσει σε σημείο να είναι δυσλειτουργικά και να είναι ανίκανα να αντισταθμίσουν το αποτέλεσμα της μειωμένης ευαισθησίας των ιστών σε αυτήν. Σε αυτό το σημείο, οι σκελετικοί μυς έχουν φτάσει να παρουσιάζουν το 85-95% της αντίστασης στην ινσουλίνη.

Οι HDL είναι λιποπρωτεΐνες οι οποίες στην ώριμη μορφή τους εμφανίζονται ως σφαιρικά σωματίδια αποτελούμενα από έναν υδροφοβικό πυρήνα, ο οποίος περιέχει τριγλυκερίδια, σε ποσοστό 5-10% (των ολικών λιπιδίων του σωματιδίου) και εστέρες της χοληστερόλης σε ποσοστό 30-40%, και από μία εξωτερική λιπιδική μονοστιβάδα η οποία περιέχει φωσφολιπίδια, σε ποσοστό 40-60%, με κύριο εκπρόσωπό τους, τη φωσφατιδυλοχολίνη (33-45%), ελεύθερη χοληστερόλη σε ποσοστό 3-12%, (μέρος της

οποίας διεισδύει στον πυρήνα) και απολιποπρωτεΐνες, κυρίως της απολιποπρωτεΐνη apo-AI.

Οι HDL είναι σωματίδια τα οποία παρουσιάζουν πλήθος ιδιοτήτων, παράδειγμα των οποίων αποτελούν οι αθηροπροστατευτικές, αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτικές, αντιθρομβωτικές και αντιδιαβητικές.

Με τη βοήθεια των Lipidomics, μίας τεχνικής που έχει ως στόχο την καταγραφή και ανάλυση του συνολικού προφίλ των λιπιδίων, τις τελευταίες δεκαετίες έχει γίνει πρόοδος σχετικά με την ποιοτική ανάλυση των HDL σωματιδίων καθώς έχει γίνει φανερό πως η ποιότητα των σωματιδίων αυτών είναι καλύτερος δείκτης λειτουργικότητας τους απ' ότι η ποσότητα των σωματιδίων σε χοληστερόλη ή η ποσότητά τους, γενικά, στην κυκλοφορία του αίματος..

Στη συγκεκριμένη διπλωματική εργασία, με τη χρήση της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού, NMR, ως τεχνική ανάλυσης, μελετήθηκε το λιπιδικό προφίλ των HDL σωματιδίων τριών ομάδων ασθενών, των ασθενών με φυσιολογική ανοχή στη γλυκόζη, των ασθενών με προδιαβήτη και των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου II, με στόχο τη σύγκριση των προφίλ τους ώστε να εξεταστεί τόσο η πορεία της γλυκαιμικής διαταραχής και το αντίκτυπο που έχει στο σωματίδιο των HDL λιποπρωτεϊνών, όσο και κατά πόσο η έκταση των αλλοιώσεων της λιπιδικής σύστασης των HDL αντανακλά στο βαθμό της δυσλειτουργικότητάς τους.

Συγκεκριμένα, για τη μελέτη αυτή επιλέχθηκαν 120 άτομα και χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες των 40 ατόμων όπου: **α)** ασθενείς με γλυκόζη νηστείας  $90,45 \pm 7,48$  mg/dL και γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη, HbA1c,  $4,99 \pm 0,68$  % αποτέλεσαν τον υγιή πληθυσμό, ομάδα ελέγχου, **β)** ασθενείς με γλυκόζη νηστείας  $105,58 \pm 7,91$  mg/dL και HbA1c  $5,95 \pm 0,35$  % τον προδιαβητικό πληθυσμό και **γ)** τέλος ασθενείς με γλυκόζη νηστείας  $156,73 \pm 24,40$  mg/dL και HbA1c  $7,28 \pm 0,69$  % τον πληθυσμό με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Κατά το πειραματικό μέρος της διπλωματικής, τα HDL σωματίδια απομονώθηκαν με καταβύθιση των non-HDL και τα λιπίδιά τους εκχυλίστηκαν με μίγμα χλωροφορμίου/μεθανόλης. Το τελικό δείγμα που προέκυψε επαναδιαλύθηκε σε μίγμα δευτεριωμένων διαλυτών και πραγματοποιήθηκε λήψη φάσματος NMR.

Από τη μελέτη και την ανάλυση των φασμάτων που λήφθηκαν παρατηρήθηκε σταδιακή μεταβολή της λιπιδικής σύστασης όσο επιδεινώνεται ο γλυκαιμικός έλεγχος. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε μία γενική αύξηση της ολικής χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων του πυρήνα, ενώ τα φωσφολιπίδια της εξωτερικής λιπιδικής μονοστιβάδας παρουσίασαν σημαντική μείωση.

Αναλυτικότερα, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των εστέρων της χοληστερόλης του πυρήνα στα HDL σωματίδια των προδιαβητικών σε σχέση με αυτών των ασθενών με T2DM, ενώ η αύξηση της ελεύθερης χοληστερόλης στην επιφάνεια των σωματιδίων ήταν σημαντική μεταξύ και των τριών ομάδων, καθώς οι προδιαβητικοί ασθενείς παρουσίασαν HDL πλουσιότερες σε ελεύθερη χοληστερόλη σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, αλλά φτωχότερες σε σχέση με την ομάδα του T2DM.

Όσον αναφορά τα φωσφολιπίδια, τόσο τα γλυκεροφωσφολιπίδια όσο και τα αιθερικά γλυκερολιπίδια παρουσίασαν μείωση μεταξύ των τριών ομάδων ενώ τα σφιγγολιπίδια ήταν τα μόνα φωσφολιπίδια που παρουσίασαν αύξηση.

Συγκεκριμένα για τα γλυκεροφωσφολιπίδια, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης και των υπόλοιπων λιπιδίων (που αναλογούν στην φωσφατιδυλοσερίνη και στη φωσφατιδυλογλυκερόλη) στις HDL των προδιαβητικών σε σχέση με τις HDL της ομάδας ελέγχου. Το μόνο γλυκεροφωσφολιπίδιο που παρουσίασε αύξηση ήταν η λυσοφωσφατιδυλοχολίνη με την αύξηση αυτή να είναι σημαντική για τους προδιαβητικούς σε σχέση, πάλι, με την ομάδα ελέγχου.

Για τα αιθερικά γλυκερολιπίδια παρουσιάστηκε μείωση στα πλασμαλογόνα των HDL των προδιαβητικών σε σχέση με τις HDL των ασθενών με T2DM, ενώ όσον αναφορά τα υπόλοιπα αιθερικά λιπιδίων (PAF) η μείωση ήταν σημαντική μεταξύ και των τριών ομάδων.

Τέλος, η αύξηση που παρατηρήθηκε για τα σφιγγολιπίδια στις HDL των προδιαβητικών σε σχέση με τις HDL της ομάδας ελέγχου, οφείλεται, κυρίως, στα αυξημένα επίπεδα των υπόλοιπων σφιγγολιπιδίων καθώς η σφιγγομυελίνη, το κύριο σφιγγολιπίδιο στις HDL, παρουσίασε μείωση μεταξύ των ομάδων αυτών.

Εκτός από το είδος των λιπιδίων, στη μελέτη αυτή, αναλύθηκε και η περιεκτικότητα των λιπαρών οξέων στα λιπίδια αυτά, η οποία έδειξε αύξηση των κορεσμένων λιπαρών οξέων και μείωση των ακόρεστων, τόσο στα μονοακόρεστα όσο και στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Για τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αναλύθηκαν περαιτέρω το λινελαϊκό οξύ το οποίο παρουσίασε σημαντική μείωση στις HDL των προδιαβητικών σε σχέση με τις HDL των ασθενών με T2DM, του αραχιδονικού και του εικοσαπεντανοϊκού οξέος, με την μείωση να είναι σημαντική στις HDL των προδιαβητικών σε σχέση με τις HDL της ομάδας ελέγχου και του εικοσιδιεξαενοϊκού οξέος το οποίο παρουσίασε μείωση στις HDL των προδιαβητικών τόσο σε σχέση με την ομάδα ελέγχου όσο και με τους ασθενείς με T2DM.

Παρόμοιες μεταβολές έχουν παρατηρηθεί και σε παλαιότερες μελέτες, οι οποίες όμως επικεντρώθηκαν στη σύγκριση των HDL λιποπρωτεϊνών υγιών ασθενών σε σχέση με τις HDL ασθενών με T2DM. Επίσης, τα αποτελέσματα των περισσότερων μελετών αφορούσαν το ποσοστό μεταβολής της χοληστερόλης στα HDL σωματίδια, καθώς και το ποσοστό των τριγλυκεριδίων και φωσφολιπιδίων γενικά, χωρίς να γίνεται μία εκτενέστερη μελέτη σχετικά με το συνολικό λιπιδικό προφίλ των HDL.

Έτσι, η συγκεκριμένη μελέτη συμβάλει στο να γίνει γνωστό το λιπιδικό προφίλ των HDL λιποπρωτεϊνών και στην ενδιάμεση κατάσταση, δηλαδή στην κατάσταση του προδιαβήτη, δείχνοντάς μας πως η εικόνα που εμφανίζουν οι ασθενείς με προδιαβήτη παρουσιάζει σημαντικές μεταβολές σε σχέση με τους υγιείς ασθενείς, ενώ σε σχέση με τους ασθενείς με T2DM οι αντίστοιχες μεταβολές δεν είναι όλες στατιστικά σημαντικές. Τα παραπάνω αποτελέσματα τονίζουν την ήδη γνωστή επικινδυνότητα του προδιαβήτη ως



ασθένεια καθώς και την ανάγκη για καλύτερη παρακολούθηση και έλεγχο της κατάστασης αυτής.

Η ύπαρξη επιπλέον μελετών με ίδιο περιεχόμενο αλλά με μεγαλύτερο πληθυσμό θα μπορούσε να συμβάλει στην επικύρωση των αποτελεσμάτων αυτών ώστε μελλοντικά να λαμβάνεται υπόψιν η λιπιδική σύσταση των HDL τόσο ως διαγνωστικό μέσο του προδιαβήτη όσο και ως μέσω ένδειξης της μεταβολικής διαταραχής σε έναν ασθενή.

### ***XIII. SUMMARY – “Lipid’s composition investigation of blood’s HDL lipoproteins in prediabetic and diabetic patients, Karakitsou Kiriaki”***

---

Prediabetes is a pathological condition in which patients have blood glucose levels higher than normal (fasting blood glucose level > 100 mg/dL) but lower than patients with Type 2 Diabetes Mellitus, T2DM (again, fasting blood glucose level ≤ 125 mg/dL).

Prediabetes is a complex multifactorial metabolic disorder with many serious complications. Patients who suffer from prediabetes show impaired fasting glucose, IFG, with increased glucose production, or impaired glucose tolerance, IGT. Individuals with IGT develop decreased glucose disposal mainly in skeletal muscles. These two different pathological conditions refer as prediabetes, with their main difference to be the tissue which shows the main insulin resistance. Insulin resistance in the liver appears mostly in patients with IFG, while in patients with IGT the skeletal muscles are the tissue which is not able to receive insulin’s signal in order to take up glucose and reduce its levels in the bloodstream.

In addition to this main difference, a characteristic of prediabetes is the dysfunction of beta-pancreatic cells, resulting in an increased amount of insulin which is not able to reduce glucose levels, a condition that ultimately leads to the depletion of these cells.

Unless the condition of prediabetes is not reversed, patients with prediabetes are more likely to develop type 2 diabetes mellitus.

Type 2 diabetes mellitus is a chronic disease that shows many serious complications, with cardiovascular diseases being the most serious and dangerous complication.

The condition of a diabetic patient is essentially a deteriorating image of a prediabetic patient, as the pancreatic cells, due to their continuous insulin production, have reached the point of being dysfunctional and unable to compensate the reduced tissue sensitivity to insulin. At this point skeletal muscles appears 85-95% of the insulin resistance.

HDLs are lipoproteins which in their mature form appear as spherical particles consisting of a hydrophobic core, which contains triglycerides, 5-10% (of total lipids of the particle) and cholesterol esters at 30-40%, and from a lipid monolayer as the surface of the particle, containing phospholipids, 40-60%, with their main representative, phosphatidylcholine (33-45%), free cholesterol at 3-12%, (part of the cholesterol molecule penetrates the core) and apolipoproteins, mainly the apo-AI apolipoprotein.

HDL are particles with shown a number of properties, such as atheroprotective, anti-inflammatory, antioxidant, antithrombotic and antidiabetic.

Lipidomics is a methodology that aims at the analysis of the overall lipid profile of a biological matrix. In the last decade progress has been made on the qualitative analysis of HDL particles, as it has become apparent that the quality of these particles is a better indicator of their functionality than the amount of cholesterol in the particle, or their quantity, in general, in the bloodstream.

In this in particular thesis, we used proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, NMR, as analytical technique to study the HDL particles' lipid profile of three groups of patients: patients with normal glucose tolerance, patients with prediabetes and patients with type II diabetes mellitus, aiming to compare their profiles and examine both the course of glycaemic disorder and its impact on the HDL lipoprotein particle composition.

In particular for this study 120 subjects were selected and divided into three groups of 40 subjects each, where: **a)** patients with fasting glucose levels  $90,45 \pm 7,48$  mg/dL and glycated hemoglobin, HbA1c,  $4,99 \pm 0,68$  % formed the healthy population, control group, **b)** patients with fasting glucose levels  $105,58 \pm 7,91$  mg/dL and HbA1c  $5,95 \pm 0,35$ % formed the prediabetic population and **c)** patients with fasting glucose levels  $156,73 \pm 24,40$  mg/dL and HbA1c  $7,28 \pm 0,69$  % formed the population with type 2 diabetes mellitus.

During the experimental part of the research, the HDL lipoproteins were isolated from non-HDL lipoproteins with precipitation and their lipids were extracted using a chloroform-methanol mixture. The final sample was re-dissolved in a solution of deuterated solvents and a NMR spectrum was taken.

The study and analysis of the received spectrums showed a gradual change in lipid composition as glycemic control worsened. Specifically, we showed a general elevation in total cholesterol and in the triglycerides of the core, while the phospholipids of the surface showed a significant decrease.

In more detail, there was a significant decrease in core's cholesterol in HDL particles of prediabetic individuals compared to those with T2DM, while the increase in free cholesterol on the particle's surface was significant among all three groups, as prediabetic individuals showed richer HDL in free cholesterol than in the control group, but poorer than the T2DM group.

Regarding phospholipids, both glycerophospholipids and etheric glycerolipids decreased between the three groups, while sphingolipids were the only phospholipids that showed increase.

In particular for glycerophospholipids, was observed a significant reduction in phosphatidylethanolamine and remaining lipids (corresponding to phosphatidylserine and phosphatidylglycerol) in prediabetic's HDL compared to the HDL of the control group. The only glycerophospholipid that increased was lysophosphatidylcholine, with this elevation being significant for prediabetic compared, again, to the control group.

For etheric glycerolipids there was a decrease in HDL's plasmalogens of prediabetic individuals compared to HDL of patients with T2DM, while in terms of the remaining etheric lipids (PAF) the reduction was significant between all three groups.

Lastly, the increase that observed in sphingolipids of prediabetic's HDL compared to HDL of control group was mainly due to the increased levels of the remaining sphingolipids, as sphingomyelin, the main sphingolipid in HDL, was decreased between these groups.

In addition to the lipid type, in this study also analyzed the content of fatty acids in these lipids, which showed an increase in saturated fatty acids and a decrease in unsaturated, both monounsaturated and polyunsaturated fatty acids.

For polyunsaturated fatty acids, we further analyzed acids such as linoleic, which showed a significant reduction in HDL from prediabetics compared to HDL from patients with T2DM, arachidonic and eicosapentaenoic acid, with the reduction being significant in prediabetic's HDL compared to the HDL of control group and docosahexaenoic acid which showed a decrease in HDL of prediabetic compared to both control group and the group of patients with T2DM.

Similar alterations have been observed in previous studies, however, the results of most studies focused on comparing HDL lipoproteins of healthy patients with HDL from patients with T2DM. Also, in most of the studies analyzed the rate of cholesterol in the HDL particles, as well as the percentage of triglycerides and phospholipids in the particle, without considered the overall lipid profile of HDL.

Thus, this study contributes to the knowledge of the lipid profile of HDL lipoproteins not only for the T2DM patients, but also for the patients in an intermediate condition, i.e., the state of prediabetes, showing us that the prediabetic' HDL show significant alterations compared to healthy patients, whereas the corresponding alterations compared to patients with T2DM are not all statistically significant. The above results highlight the already known risk of prediabetes as a disease and the need for better monitoring and control of this condition.

The existence of additional studies with the same content but with larger population could help validate these results, so that in future the lipid composition of HDL will take into consideration both as a diagnostic tool of prediabetes and as an indication of metabolic disorder in a patient.

## XIV. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

<b>GLUT</b>	<i>Glucose Transporter</i>	<b>HL</b>	<i>Hepatic Lipase</i>
<b>ADA</b>	<i>American Diabetes Association</i>	<b>PLA<sub>2</sub></b>	<i>Phospholipase A<sub>2</sub></i>
<b>IDF</b>	<i>International Diabetes Federation</i>	<b>ABCA1</b>	<i>ATP Binding Cassette transporter A1</i>
<b>IGT</b>	<i>Impaired Glucose Tolerance</i>	<b>SR-BI</b>	<i>Scavenger-Receptor Class B, type 1</i>
<b>IFG</b>	<i>Impaired Fasting Glucose</i>	<b>rHDL</b>	<i>Reconstituted High Density Lipoprotein</i>
<b>OGTT</b>	<i>Oral Glucose Tolerance Test</i>	<b>C</b>	<i>Cholesterol</i>
<b>NGT</b>	<i>Normal Glucose Tolerance</i>	<b>CE</b>	<i>Cholesterol Esters</i>
<b>CDC</b>	<i>Centers for Disease Control</i>	<b>TG</b>	<i>Triglycerides</i>
<b>T2DM</b>	<i>Type 2 Diabetes Mellitus</i>	<b>PLs</b>	<i>Phospholipids</i>
<b>FA</b>	<i>Fatty Acids</i>	<b>PC</b>	<i>Phosphatidylcholine</i>
<b>GL</b>	<i>Glycerolipids</i>	<b>LPC</b>	<i>Lysophosphatidylcholine</i>
<b>GP</b>	<i>Glycerophospholipids</i>	<b>PE</b>	<i>Phosphatidylethanolamine</i>
<b>SP</b>	<i>Sphingolipids</i>	<b>PI</b>	<i>Phosphatidylinositol</i>
<b>ST</b>	<i>Sterollipids</i>	<b>SM</b>	<i>Sphingomyelin</i>
<b>PR</b>	<i>Prenollipids</i>	<b>PAF</b>	<i>Platelet-Activating Factor</i>
<b>SL</b>	<i>Sacharolipids</i>	<b>NFκB</b>	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
<b>PK</b>	<i>Polyketides</i>	<b>ΕΔ</b>	<i>Ενδοπλασματικό δίκτυο</i>
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>	<b>TLC</b>	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
<b>IDL</b>	<i>Intermediate Density Lipoproteins</i>	<b>HPLC</b>	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoproteins</i>	<b>GC</b>	<i>GasChromatography</i>
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoproteins</i>	<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>
<b>LCAT</b>	<i>Lecithin-Cholesterol Acyltransferase</i>	<b>NMR</b>	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>CETP</b>	<i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i>	<b>DHA</b>	<i>Docosahexaenoic Acid</i>
<b>ARA</b>	<i>Arachidonic Acid</i>	<b>EPA</b>	<i>Eicosapentaenoic acid</i>
<b>PLTP</b>	<i>Phospholipid Transfer Protein</i>		

## XV. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

---

1. Lehninger, Βασικές Αρχές Βιοχημείας, Β΄ Ελληνική Έκδοση, Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Glucose>
3. Ralph A. DeFronzo. Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus.
4. Wilson ML. Prediabetes: Beyond the Borderline. Nurs Clin North Am. 2017 Dec;52(4):665-677. [PubMed: 29080583]
5. Tabák AG, Herder C, Rathmann W, Brunner EJ, Kivimäki M. Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. Lancet. 2012 Jun 16;379(9833):2279-90. [PubMed: 22683128]
6. Edwards CM, Cusi K. Prediabetes: A Worldwide Epidemic. Endocrinol Metab Clin North Am. 2016 Dec;45(4):751-764. [PubMed: 27823603]
7. International Diabetes Federation: <https://www.diabetesatlas.org/en/resources/>
8. Liatis S, Dafoulas GE, Kani C, Politi A, Litsa P, Sfrikakis PP, Makrilakis K. The prevalence and treatment patterns of diabetes in the Greek population based on real-world data from the nation-wide prescription database. Diabetes Res Clin Pract. 2016 Aug;118:162-7. [PubMed: 27372056]
9. Tabak AG, Jokela M, Akbaraly TN, et al. Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. Lancet 2009;373:2215–21.
10. Sud M, Fahy E, Cotter D, Brown A, Dennis EA, Glass CK, Merrill AH Jr, Murphy RC, Raetz CR, Russell DW, Subramaniam S. LMSD: LIPID MAPS structure database. Nucleic Acids Res. 2007 Jan;35(Database issue):D527-32. [PubMed: 17098933]
11. Vollhardt Schore, Οργανική Χημεία – Δομή και Λειτουργικότητα. 6΄ Έκδοση, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε.
12. William Marshall, Κλινική Βιοχημεία, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας
13. Rye KA, Clay MA, Barter PJ. Remodelling of high density lipoproteins by plasma factors. Atherosclerosis. 1999 Aug;145(2):227-38. [PubMed: 10488948]
14. Marsche G, Saemann MD, Heinemann A, Holzer M. Inflammation alters HDL composition and function: implications for HDL-raising therapies. Pharmacol Ther. 2013 Mar;137(3):341-51. [PubMed: 23246719]
15. Anatol Kontush, Marie Lhomme, M. John Chapman. Unraveling the complexities of the HDL lipidome. J Lipid Res. 2013 Nov; 54(11): 2950–2963.[PubMed: 23543772]
16. von Eckardstein A, Kardassis D. High Density Lipoproteins From Biological Understanding to Clinical Exploitation.

17. Rye KA, Duong MN. Influence of phospholipid depletion on the size, structure, and remodeling of reconstituted high density lipoproteins. *J Lipid Res.* 2000 Oct;41(10):1640-50. [PubMed: 11013306]
18. Yancey PG, de la Llera-Moya M, Swarnakar S, Monzo P, Klein SM, Connelly MA, Johnson WJ, Williams DL, Rothblat GH. High density lipoprotein phospholipid composition is a major determinant of the bi-directional flux and net movement of cellular free cholesterol mediated by scavenger receptor BI. *J Biol Chem.* 2000 Nov 24;275(47):36596-604. [PubMed: 10964930]
19. Schwendeman A, Sviridov DO, Yuan W, Guo Y, Morin EE, Yuan Y, Stonik J, Freeman L, Ossoli A, Thacker S, Killion S, Pryor M, Chen YE, Turner S, Remaley AT. The effect of phospholipid composition of reconstituted HDL on its cholesterol efflux and anti-inflammatory properties. *J Lipid Res.* 2015 Sep;56(9):1727-37. [PubMed: 26117661]
20. Bolin DJ, Jonas A. Sphingomyelin inhibits the lecithin-cholesterol acyltransferase reaction with reconstituted high density lipoproteins by decreasing enzyme binding. *J Biol Chem.* 1996 Aug 9;271(32):19152-8. [PubMed: 8702592]
21. Skeggs JW, Morton RE. LDL and HDL enriched in triglyceride promote abnormal cholesterol transport. *J Lipid Res.* 2002 Aug;43(8):1264-74. [PubMed: 12177170]
22. Drew BG, Rye KA, Duffy SJ, Barter P, Kingwell BA. The emerging role of HDL in glucose metabolism. *Nat Rev Endocrinol.* 2012 Jan 24;8(4):237-45. [PubMed: 22271188]
23. Wong NKP, Nicholls SJ, Tan JTM, Bursill CA. The role of high-density lipoproteins in diabetes and its vascular complications. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 5;19(6). [PubMed: 29874886]
24. Amal Zerrad-Saadi, Patrice Therond, Sandrine Chantepie, Martine Couturier, Kerry-Anne Rye, M John Chapman, Anatol Kontush. HDL3-mediated inactivation of LDL-associated phospholipid hydroperoxides is determined by the redox status of apolipoprotein A-I and HDL particle surface lipid rigidity: relevance to inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Dec;29(12):2169-75. [PubMed: 19762782]
25. P W Baker , K A Rye, J R Gamble, M A Vadas, P J Barter. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res.* 2000 Aug;41(8):1261-7. [PubMed: 10946014]
26. Arnold von Eckardstein, Christian Widmann. High-density lipoprotein, beta cells, and diabetes. *Cardiovascular Research* (2014) 103, 384–394.
27. Silva VM, Vinagre CG, Dallan LA, Chacra AP, Maranhão RC. Plasma lipids, lipoprotein metabolism and HDL lipid transfers are equally altered in metabolic syndrome and in type 2 diabetes. *Lipids.* 2014 Jul;49(7):677-84. [PubMed: 24719245]

28. Griffiths K, Pazderska A, Ahmed M, McGowan A, Maxwell AP, McEneny J, Gibney J, McKay GJ. Type 2 Diabetes in Young Females Results in Increased Serum Amyloid A and Changes to Features of High Density Lipoproteins in Both HDL2 and HDL3. *J Diabetes Res*. 2017;2017:1314864. [PubMed: 28596970]
29. Garvey WT, Kwon S, Zheng D, Shaughnessy S, Wallace P, Hutto A, Pugh K, Jenkins AJ, Klein RL, Liao Y. Effects of insulin resistance and type 2 diabetes on lipoprotein subclass particle size and concentration determined by nuclear magnetic resonance. *Diabetes*. 2003 Feb;52(2):453-62. [PubMed: 12540621]
30. Drexel H, Aczel S, Marte T, Benzer W, Langer P, Moll W, Saely CH. Is atherosclerosis in diabetes and impaired fasting glucose driven by elevated LDL cholesterol or by decreased HDL cholesterol? *Diabetes Care*. 2005 Jan;28(1):101-7. [PubMed: 15616241]
31. Lorenzo C, Hartnett S, Hanley AJ, Rewers MJ, Wagenknecht LE, Karter AJ, Haffner SM. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance have distinct lipoprotein and apolipoprotein changes: the insulin resistance atherosclerosis study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013 Apr;98(4):1622-30. [PubMed: 23450048]
32. Gowri MS1, Van der Westhuyzen DR, Bridges SR, Anderson JW. Decreased protection by HDL from poorly controlled type 2 diabetic subjects against LDL oxidation may be due to the abnormal composition of HDL. *ArteriosclerThrombVasc Biol*. 1999 Sep;19(9):2226-33. [PubMed: 10479666]
33. Morgantini C, Meriwether D, Baldi S, Venturi E, Pinnola S, Wagner AC, Fogelman AM, Ferrannini E, Natali A, Reddy ST. HDL lipid composition is profoundly altered in patients with type 2 diabetes and atherosclerotic vascular disease. *NutrMetab Cardiovasc Dis*. 2014 Jun;24(6):594-9. [PubMed: 24594086]
34. Ståhlman M, Fagerberg B, Adiels M, Ekroos K, Chapman JM, Kontush A, Borén J. Dyslipidemia, but not hyperglycemia and insulin resistance, is associated with marked alterations in the HDL lipidome in type 2 diabetic subjects in the DIWA cohort: impact on small HDL particles. *BiochimBiophys Acta*. 2013 Nov;1831(11):1609-17. [PubMed: 23896361]
35. Wang J, Stančáková A, Soininen P, Kangas AJ, Paananen J, Kuusisto J, Ala-Korpela M, Laakso M. Lipoprotein subclass profiles in individuals with varying degrees of glucose tolerance: a population-based study of 9399 Finnish men. *J Intern Med*. 2012 Dec;272(6):562-72. [PubMed: 22650159]
36. <http://alttox.org/mapp/emerging-technologies/omics-bioinformatics-computational-biology/>
37. Han X., Gross R.W. Global analyses of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples by ESI mass spectrometry: a bridge to lipidomics. *J Lipid Res*. 2003 Jun;44(6):1071-9. [PubMed: 12671038]
38. Spener F, Lagarde M, Gélouën A, Record M. Editorial: What is lipidomics?



39. Zhao YY, Cheng XL, Lin RC. Lipidomics applications for discovering biomarkers of diseases in clinical chemistry. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2014;313:1-26. [PubMed: 25376488]
40. Yang K, Han X. Lipidomics: Techniques, Applications, and Outcomes Related to Biomedical Sciences. *Trends Biochem Sci.* 2016 Nov;41(11):954-969. [PubMed: 27663237]
41. John C. Edwards. Principles of NMR.
42. Burstein M, Samaille J. Selective precipitation beta blood lipoproteins by heparin and synthetic heparinoids in the presence of calcium chloride. *J Physiol (Paris).* 1957; 49:83-6. [PubMed: 13449746]
43. Warnick GR, Benderson J, Albers JJ. Dextran sulfate-Mg<sup>2+</sup> precipitation procedure for quantitation of high-density-lipoprotein cholesterol. *Clin Chem.* 1982; 28:1379-88. [PubMed: 7074948]
44. Blight EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959; 37:911-7. [PubMed: 13671378]
45. Adosraku RK, Choi GT, Constantinou-Kokotos V, Anderson MM, Gibbons WA. NMR lipid profiles of cells, tissues, and body fluids: proton NMR analysis of human erythrocyte lipids. *J Lipid Res.* 1994; 35:1925-31. [PubMed: 7868971]
46. Noula C, Bonzom P, Brown A, Gibbons WA, Martin J, Nicolaou A. <sup>1</sup>H-NMR lipid profiles of human blood platelets; links with coronary artery disease. *BiochimBiophys Acta.* 2000; 1487:15-23. [PubMed: 11004608]
47. CE. Kostara, A. Papathanasiou, MT. Cung, MS. Elisaf, J. Goudevenos, ET. Bairaktari. Evaluation of Established Coronary Heart Disease on the Basis of HDL and Non-HDL NMR Lipid Profiling. *Journal of Proteome Research* 2010, 9, 897–911 897.
48. CE. Kostara, E. Ferrannini, ET. Bairaktari, A. Papathanasiou, MS. Elisaf, V. Tsimihodimos. Early Signs of Atherogenic Features in the HDL Lipidomes of Normolipidemic Patients Newly Diagnosed with Type 2 Diabetes. *Int J Mol Sci* 2020; 21(22):8835 [PubMed: 33266469]
49. S Yamashita , T Maruyama, K Hirano, N Sakai, N Nakajima, Y Matsuzawa. Molecular mechanisms, lipoprotein abnormalities and atherogenicity of hyperalphalipoproteinemia. *Atherosclerosis* . 2000 Oct;152(2):271-85. [PubMed: 10998455]
50. Ansell BJ, Navab M, Hama S, et al. Inflammatory/antiinflammatory properties of high-density lipoprotein distinguish patients from control subjects better than high-density lipoprotein cholesterol levels and are favorably affected by simvastatin treatment. *Circulation* 2003; 108:2751–2756. [PubMed: 14638544]
51. Ansell BJ, Fonarow GC, Fogelman AM. The paradox of dysfunctional high-density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol* . 2007 Aug;18(4):427-34. [PubMed: 17620860]
52. Abbasi A, Corpeleijn E, Gansevoort RT, Gans RO, Hillege HL, Stolk RP, Navis G, Bakker SJ, Dullaart RP. Role of HDL cholesterol and estimates of HDL particle composition in future

development of type 2 diabetes in the general population: the PREVEND study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Aug;98(8):E1352-9.[PubMed: 23690306]

53. Sprandel MC, Hueb WA, Segre A, Ramires JA, Kalil-Filho R, Maranhão RC. Alterations in lipid transfers to HDL associated with the presence of coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol.* 2015 Aug 14;14:107.[PubMed: 26268997]
54. van der Steeg WA, Holme I, Boekholdt SM, Larsen ML, Lindahl C, Stroes ES, Tikkanen MJ, Wareham NJ, Faergeman O, Olsson AG, Pedersen TR, Khaw KT, Kastelein JJ. High-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein particle size, and apolipoprotein A-I: significance for cardiovascular risk: the IDEAL and EPIC-Norfolk studies. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Feb 12;51(6):634-42.[PubMed: 18261682]
55. Lamarche B, Rashid S, Lewis GF. HDL metabolism in hypertriglyceridemic states: an overview. *Clin Chim Acta.* 1999 Aug;286(1-2):145-61.[PubMed: 10511289]
56. Lamarche B, Uffelman KD, Carpentier A, Cohn JS, Steiner G, Barrett PH, Lewis GF. Triglyceride enrichment of HDL enhances in vivo metabolic clearance of HDL apo A-I in healthy men. *J Clin Invest.* 1999 Apr;103(8):1191-9.[PubMed: 10207171]
57. Yetukuri L, Söderlund S, Koivuniemi A, Seppänen-Laakso T, Niemelä PS, Hyvönen M, Taskinen MR, Vattulainen I, Jauhiainen M, Oresic M. Composition and lipid spatial distribution of HDL particles in subjects with low and high HDL-cholesterol. *J Lipid Res.* 2010 Aug;51(8):2341-51.[PubMed: 20431113]
58. Cole LK, Vance JE, Vance DE. Phosphatidylcholine biosynthesis and lipoprotein metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2012 May;1821(5):754-61. [PubMed: 21979151]
59. Baker PW, Rye KA, Gamble JR, Vadas MA, Barter PJ. Phospholipid composition of reconstituted high density lipoproteins influences their ability to inhibit endothelial cell adhesion molecule expression. *J Lipid Res.* 2000 Aug;41(8):1261-7. [PubMed: 10946014]
60. Rye KA, Hime NJ, Barter PJ. The influence of sphingomyelin on the structure and function of reconstituted high density lipoproteins. *J Biol Chem.* 1996 Feb 23;271(8):4243-50.[PubMed: 8626769]
61. Nicholls SJ, Lundman P, Harmer JA, Cutri B, Griffiths KA, Rye KA, Barter PJ, Celermajer DS. Consumption of saturated fat impairs the anti-inflammatory properties of high-density lipoproteins and endothelial function. *J Am Coll Cardiol.* 2006 Aug 15;48(4):715-20.[PubMed: 16904539]
62. Kostara CE, Tsimihodimos V, Elisaf MS, Bairaktari ET. NMR-Based Lipid Profiling of High Density Lipoprotein Particles in Healthy Subjects with Low, Normal, and Elevated HDL-Cholesterol. *J Proteome Res.* 2017 Apr 7;16(4):1605-1616. [PubMed: 28287268]