



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Η χρόνια επίδραση του υπεριώδους φωτός στο διαβητικό δέρμα:

Προστασία με φαινολικά αντιοξειδωτικά

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Γεωργακοπούλου Ι. Παναγιώτα

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών: «Βιομηχανική Φαρμακευτική»

ΑΘΗΝΑ 2011

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Η χρόνια επίδραση του υπεριώδους φωτός στο διαβητικό δέρμα:

Προστασία με φαινολικά αντιοξειδωτικά

Γεωργακοπούλου Ι. Παναγιώτα

Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης έγινε με απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, κατά την οποία εγκρίθηκε το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής και η τριμελής Εξεταστική Επιτροπή.

Εξεταστική Επιτροπή:

Ράλλης Μιχαήλ, Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, (επιβλέπων)
ΕΚΠΑ

Δάλλας Παρασκευάς, Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, (μέλος)
ΕΚΠΑ

Δελικωνσταντίνος Γεώργιος, Επίκουρος καθηγητής, Τμήμα Ιατρικής, (μέλος)
ΕΚΠΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το διαβητικό δέρμα χαρακτηρίζεται από σημαντική ξηροδερμία ακολουθούμενη από πιθανή πρόωρη γήρανση. Η κατεξοχήν βλάβη η οποία προκαλείται από υπερβολική δόση υπεριώδους φωτός είναι η φωτογήρανση η οποία μπορεί να αποτελέσει πρόδρομη κατάσταση για την εμφάνιση δερματικού καρκίνου. Ενώ τόσο ο διαβήτης όσο και η επίδραση του υπεριώδους φωτός στο φυσιολογικό δέρμα έχουν αρκετά μελετηθεί εν τούτοις η σχέση του διαβητικού δέρματος με την υπεριώδη ακτινοβολία είναι ουσιαστικά ανεξερεύνητη.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η σχέση διαβητικού δέρματος, υπεριώδους ακτινοβολίας και ικανότητας προστασίας από φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες.

Σε άτριχους μύες αρσενικούς και θηλυκούς, μετά από εφάπαξ δόση στρεπτοζοτοκίνης, προκλήθηκε πειραματικά διαβήτης τύπου I και το δέρμα ακτινοβολήθηκε με υπεριώδες φως A και B (λάμπα Ξένον), είτε με εφάπαξ, είτε με μέση χρόνια (5 ημέρες) είτε με σχετικά μακρά χρόνια (14 ημέρες) δόση. Πριν, κατά τη διάρκεια και μετά την ακτινοβολήση, εφαρμόστηκαν τοπικά υδαταλκοολικά εκχυλίσματα φλοιού *Pinus halepensis* (15%), φύλλων και βλαστών *Rubus longanobaccus* (5%) και γύρης (25%), πλούσια σε φαινολικά αντιοξειδωτικά.

Αξιολογήθηκε η κατάσταση του δέρματος σε διαφορετικές χρονικές περιόδους κλινικά, με μέτρηση της άδηλης απώλειας νερού, της ελαστικότητας και της ερυθρότητας. Παράλληλα εκτιμήθηκαν η κινητικότητα, το βάρος και τα επίπεδα γλυκόζης του αίματος των μυών.

Τα επίπεδα γλυκόζης μετά την τοπική εφαρμογή και την ακτινοβολήση μειώνονται σημαντικά, σε ορισμένες περιπτώσεις σε ποσοστά μεγαλύτερα του 50%. Το βάρος των ζώων παρουσίασε μικρές διακυμάνσεις και παρατηρήθηκε βελτίωση της ελαστικότητας του δέρματός τους. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση της άδηλης απώλειας νερού όσο αυξάνεται ο χρόνος ακτινοβολήσης των μυών, ακριβώς το αντίθετο από αυτό που θα αναμενόταν καθώς και οι δύο παράμετροι που εξετάζονται (διαβήτης, υπεριώδης ακτινοβολία) με την πάροδο του χρόνου επιτείνουν την άδηλη απώλεια νερού. Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν και κατά την εκτίμηση της ερυθρότητας. Επιπλέον η κλινική εικόνα έδειξε σημαντική προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία στην περιοχή εφαρμογής όλων των αντιοξειδωτικών.

Συμπερασματικά, ενώ το υπεριώδες φως δρα συνεργικά με τον διαβήτη επιδεινώνοντας την κατάσταση του δέρματος, τα ανωτέρω εκχυλίσματα πλούσια σε φαινολικά αντιοξειδωτικά προλαμβάνουν τις οξειδωτικές βλάβες του δέρματος.

ABSTRACT

The chronic effects of UV light in diabetic skin:

Protection by antioxidant phenols

Diabetic skin is characterized by significant dry followed by possible premature aging. The ideal damage which advance consists of an overdose of ultraviolet light is the UV radiation which can be a precursor condition for the appearance of skin cancer. While both diabetes and the effect of ultraviolet light in normal skin have been studied sufficiently, however, the relationship between diabetic skin and UV radiation is virtually unexplored.

This study investigates the relationship between diabetic skin, ultraviolet radiation and protection capacity of natural antioxidants.

In smooth mice (male and female), after a single streptozotokin dose, it was caused experimental diabetes type I and their skin irradiated with ultraviolet light A and B (xenon lamp). Measurements were evaluated after a lump sum dose of UV , a 5-day and a 14-day dose. Before, during and after irradiation, several extracts such as: bark extract of *Pinus halepensis* (15%), leaves and shoots of *Rubus longanobaccus* (5%) and pollen (25%), rich in phenolic antioxidants, were implemented on mice skin.

The condition of the skin was evaluated clinically at several different periods of time by measuring the water loss, the elasticity and the redness. Alongside, mobility, weight and blood glucose levels of mice were assessed.

Glucose levels, after topical application and irradiation, significantly reduced, in some cases at rates greater than 50%. The weight of the animals showed little fluctuation and it was observed improvement in the elasticity of their skin. It was showed, also, significant reduction of water loss when increasing irradiation time in mice, just the opposite of what it would be expected, as both parameters examined (diabetes, ultraviolet radiation) exacerbate the latent water loss over time. Similar results were obtained in the assessment of redness. Moreover, the clinical facts showed significant protection from ultraviolet radiation in the implementation area of all antioxidants.

In conclusion, while the UV light acts synergistically with diabetes worsening the condition of the skin, these extracts rich in phenolic antioxidants prevent oxidative skin damage.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στον τομέα Φαρμακευτικής Τεχνολογίας του τμήματος Φαρμακευτικής, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών “Βιομηχανική Φαρμακευτική” κατά το ακαδημαϊκό έτος 2010-2011, υπό την επίβλεψη του Επικουρου Καθηγητή κ. Ράλλη Μιχαήλ.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον Επικουρο Καθηγητή κ. Ράλλη Μιχαήλ για την ανάθεση της παρούσας μελέτης, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ’ όλη τη διάρκεια του πειράματος και για την υπομονετική καθοδήγηση του σε όλη την πορεία εκτέλεσης και συγγραφής της παρούσας εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής μου επιτροπής, κ. Δάλλα Παρασκευά, Επικουρο καθηγητή (Τμήμα Φαρμακευτικής, ΕΚΠΑ) και τον κ. Δελικωνσταντίνο Γεώργιο, Επικουρο καθηγητή (Τμήμα Ιατρικής, ΕΚΠΑ) για τον χρόνο που αφιέρωσαν και την υπομονή τους να διαβάσουν την παρούσα εργασία.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες, θα ήθελα να εκφράσω στην υποψήφια Διδάκτορα Δανιά Φωτεινή για τη συνεργασία, την υπομονή, την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις παρατηρήσεις της.

Επίσης, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου, όλα τα μέλη του εργαστηρίου για τη βοήθειά τους, τις ωραίες συνθήκες εργασίας και το φιλικό περιβάλλον που δημιούργησαν.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω πάνω απ’ όλα στην οικογένεια και τους φίλους μου, για την ηθική συμπαράσταση, την ανεκτικότητα και την κατανόησή που έδειξαν όλο αυτό το χρονικό διάστημα.

Γεωργακοπούλου Παναγιώτα

Αθήνα 2011

Περιεχόμενα

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
A.1 ΔΕΡΜΑ.....	17
A.1.1 Μορφολογία δέρματος.....	17
A.1.1.1 Επιδερμίδα	17
A.1.1.2 Χόριο ή κυρίως δέρμα.....	20
A.1.1.3 Υπόδερμα	20
A.1.1.4 Εξαρτήματα δέρματος	21
A.1.2 Ο ρόλος του δέρματος	22
A.1.2.1 Φραγμός.....	22
A.1.2.2 Χημική άμυνα- ανοσολογική απάντηση	22
A.1.2.3 Θερμορύθμιση	24
A.1.2.4 Αντίληψη αισθητικότητας.....	24
A.1.2.5 Άλλες λειτουργίες του δέρματος	24
A.2 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (UV)	25
A.2.1 Γενικά	25
A.2.2 Θετικές επιδράσεις υπεριώδους ακτινοβολίας.....	27
A.2.2.1 Παραγωγή βιταμίνης D	27
A.2.2.2 Επιδιόρθωση DNA- Μεταγραφή της p53 πρωτεΐνης.....	27
A.2.2.3 Ιατρικές εφαρμογές της Υπεριώδους Ακτινοβολίας.....	29
A.2.3 Επιβλαβείς επιδράσεις υπεριώδους ακτινοβολίας	29
A.2.3.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών	29
A.2.3.2 Οι βλάβες στο DNA	29
A.2.3.3 Φωτογήρανση- Διάσπαση κολλαγόνου.....	30
A.2.3.4 Προ-κακοήθεις & Κακοήθεις Βλάβες.....	32
A.2.3.5 Φλεγμονώδη φαινόμενα και μελάγχρωση από την υπεριώδη ακτινοβολία.....	32
A.2.3.6 Αγγειακές διαταραχές.....	33
A.2.3.7 Επίδραση στο Ανοσοποιητικό Σύστημα.....	33
A.2.3.8 Αλλεργικές Αντιδράσεις και Αντιδράσεις φωτοευαισθησίας.....	34
A.2.3.9 Επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στα μάτια	34
A.2.3.10 Καταστροφή βιταμίνης A	35
A.2.3.11 Επιδείνωση Νοσημάτων	35
A.3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	37
A.3.1 Γενικά	37

A.3.2 Ρόλος της ινσουλίνης στο κύτταρο	37
A.3.3 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη	40
A.3.4 Συμπτώματα Σακχαρώδους Διαβήτη.....	41
A.3.5 Επιδημιολογικά Στοιχεία.....	41
A.3.6 Νοσηρότητα και θνησιμότητα	43
A.3.7 Επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη	43
A.3.7.1 Μικροαγγειοπάθεια.....	44
A.3.7.2 Μακροαγγειοπάθεια	45
A.3.7.3 Διαβητική Νευροπάθεια	45
A.3.7.4 Άλλες επιπλοκές.....	46
A.3.7.5 Επιπλοκές του δέρματος.....	47
A.3.7.6 Δερματικές επιπλοκές που εμφανίζονται κυρίως ή μόνο σε άτομα με διαβήτη.....	48
A.3.7.7 Δερματικές επιπλοκές που ο καθένας μπορεί να εμφανίσει κατά τη διάρκεια της ζωής του , ωστόσο η συχνότητα και η ευκολία εμφάνισής τους στους διαβητικούς είναι μεγαλύτερη	50
A.3.8 Μηχανισμοί επιπλοκών Σακχαρώδους Διαβήτη	50
A.3.8.1 Μεταβολική εκτροπή της γλυκόζης και άλλων σακχάρων μέσω της οδού των πολυολών	51
A.3.8.2 Αυξημένη παραγωγή προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (AGEs)	51
A.3.8.3 Ενεργοποίηση ορισμένων ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C	53
A.3.8.4 Υπερδραστηριότητα της οδού της εξοξαμίνης	53
A.3.8.5 Οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων	54
A.3.9 Υπεργλυκαιμική μνήμη	55
A.4 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ- ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	57
A.4.1 Γενικά	57
A.4.1.1 Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών	57
A.4.1.2 Είδη ελευθέρων ριζών	58
A.4.1.3 Μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών	59
A.4.1.4 Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών	59
A.4.2 Οξειδωτικό στρες	61
A.4.2.1 Παράγοντες που συντελούν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες	62
A.4.2.2 Ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες	63
A.4.2.3 Θετικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες.....	64
A.4.3 Αντιοξειδωτικά	65
A.4.3.1 Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών.....	66

A.4.3.2 Αντιοξειδωτικά φυτικής προελεύσεως.....	68
A.4.3.3 Πολυφαινολικές ενώσεις	68
A.4.3.4 Αντιοξειδωτικά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία	74
B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	83
B.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ.....	83
B.2 ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ	83
B.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ Ι	83
B.3.1 Προετοιμασία ένεσης στρεπτοζοτοκίνης:.....	83
B.3.2 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος	84
B.3.3 Μετρήσεις επιπέδων γλυκόζης στο αίμα	84
B.4 ΚΥΡΙΩΣ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ:.....	86
B.4.1 Κωδικοποίηση- ονομασία μυών	86
B.4.2 Σκεύσματα προς επάλειψη.....	87
B.4.3 Επάλειψη δέρματος μυών	88
B.4.4 Ακτινοβολία του δέρματος με UV ακτινοβολία.....	90
B.5 ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΧΩΡΑ:	90
B.5.1 Μετρήσεις Άδηλης Απώλειας Νερού.....	90
B.5.2 Μετρήσεις ερυθρότητας.....	91
B.5.3 Εκτίμηση κλινικής εικόνας	91
B.5.4 Μελέτη ελαστικότητας δέρματος	92
B.5.5 Μελέτη χρόνου αντίδρασης μυών.....	93
B.5.6 Βάρος μυών.....	94
B.6 ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	95
B.7 ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ	96
B.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΟ ΔΕΡΜΑ	97
B.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ	98
B.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	99
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Γ.1 Αποτελέσματα μετρήσεων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.....	103
Γ.2 Αποτελέσματα μετρήσεων άδηλης απώλειας νερού.....	105
Γ.3 Αποτελέσματα μετρήσεων ερυθρότητας.....	109
Γ.4 Αποτελέσματα μετρήσεων ελαστικότητας (χρόνος επαναφοράς του δέρματος).....	113
Γ.5 Αποτελέσματα μετρήσεων χρόνου αντίδρασης.....	115
Γ.6 Αποτελέσματα μετρήσεων του βάρους των μυών	117
Γ.7 Αποτελέσματα μετρήσεων οξειδωτικού στρες στο δέρμα	119

Γ.8 Αποτελέσματα μετρήσεων οξειδωτικού στρες στο αίμα	123
Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	127
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	139
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	143

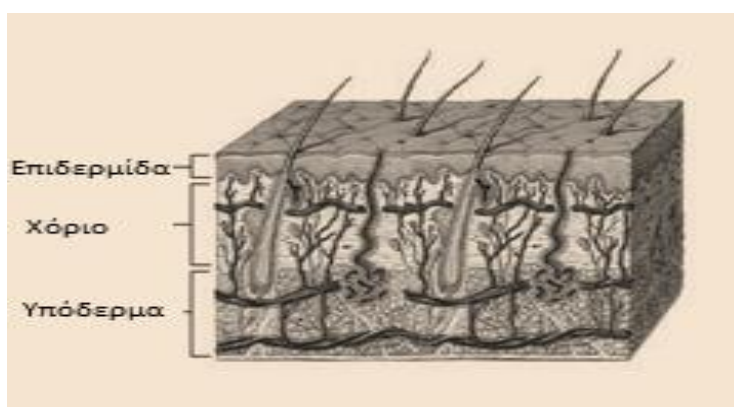
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A.1 ΔΕΡΜΑ

Το ανθρώπινο δέρμα θεωρείται το μεγαλύτερο όργανο του σώματος αποτελώντας περίπου το 16% του σωματικού βάρους ¹ και καλύπτοντας επιφάνεια περίπου 1,8 m² ². Διαθέτει πολλές λειτουργίες, σημαντικότερη εκ των οποίων είναι ο ρόλος του ως φραγμός για την προστασία του οργανισμού από φυσικούς, βιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες, συμβάλλοντας έτσι στη διατήρηση της ομοιοστασίας του ³.

A.1.1 Μορφολογία δέρματος



Εικ. 1 Οι τρεις ανατομικές περιοχές του δέρματος.

Το δέρμα αποτελείται ανατομικά από την επιδερμίδα, το ιδίως δέρμα ή χόριο και το υπόδερμα [Εικ. 1].

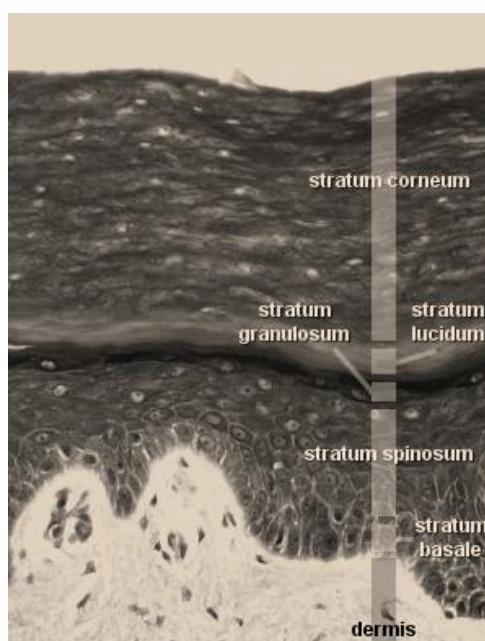
A.1.1.1 Επιδερμίδα

Είναι η εξωτερική επιφανειακή επιθηλιακή στιβάδα του δέρματος και αποτελείται από ένα στρωματοποιημένο κερατινοποιημένο πλακώδες επιθήλιο με πάχος που κυμαίνεται από περίπου 0,1 χιλιοστά μέχρι 0,8-1,4 χιλιοστά (στις παλάμες και τα πέλματα αντίστοιχα)². Η επιδερμίδα στερείται των αιμοφόρων αγγείων, τρέφεται μέσω διάχυσης^{1,2} και αποτελείται από 4-5 στιβάδες κυττάρων ⁴. Ο κύριος πληθυσμός των κυττάρων της είναι τα κερατινοκύτταρα (παράγουν κερατίνη) και αποτελείται

από πέντε επιμέρους στιβάδες που αντιπροσωπεύουν τα στάδια ωρίμανσης της κερατίνης στα κύτταρα αυτά^{1,2}.

Η επιδερμίδα απαρτίζεται από πέντε στιβάδες στην εσωτερική της δομή [Εικ.2]:

1. **Βασική στιβάδα (Stratum basale ή stratum germinativum):** η στιβάδα όπου αρχίζει η ανανέωση του δέρματος. Η Βασική στιβάδα έρχεται σε άμεση επαφή με τη βασική μεμβράνη (που συνδέει το χόριο με την επιδερμίδα) και αποτελείται κυρίως από επιμήκη κυλινδρικά βασικά κύτταρα, που είναι τα μητρικά ή πρόδρομα κύτταρα των κερατινοκυττάρων. Σε αυτή τη στιβάδα, επίσης, εντοπίζονται τα μελανοκύτταρα που αποτελούν το 5-10% του πληθυσμού των βασικών κυττάρων. Τα κύτταρα αυτά συνθέτουν τη μελανίνη και συμβάλλουν στη μεταφορά της στα γειτονικά κερατινοκύτταρα μέσω δενδριτικών αποφυάδων². Τέλος στη Βασική στιβάδα εντοπίζονται και τα κύτταρα Μέρκελ που λειτουργούν ως αισθητήριοι υποδοχείς της αφής^{1,2}.

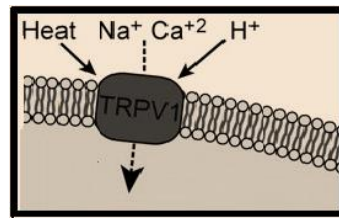


Εικ.2 Οι πέντε επιμέρους στιβάδες της επιδερμίδας

Ο ρόλος των κερατινοκυττάρων⁵:

Τα κερατινοκύτταρα της επιδερμίδας είναι επιθηλιακά κύτταρα του δέρματος των θηλαστικών. Στη Βασική στιβάδα της επιδερμίδας, τα κύτταρα αυτά πολλαπλασιάζονται έντονα και χάρη στην αέναη λειτουργία της κερατινοποίησης, καθώς ωριμάζουν ανερχόμενα προς τα έξω (μετανάστευση), μεταβάλλουν το σχήμα τους σε κυβοειδές και τέλος αποπλατύνονται, χάνοντας εν τω μεταξύ τους μεσοκυττάριους δεσμούς (διαφοροποίηση)⁴. Στο ανώτατο στρώμα της

επιδερμίδας, τα κερατινοκύτταρα υφίστανται απόπτωση, σχηματίζοντας ένα λεπτό, αδιάβροχο στο νερό στρώμα που ονομάζεται κεράτινη στιβάδα (εξωτερικό στρώμα, βλέπε σελ. 20). Μέχρι πρόσφατα, θεωρείτο ότι ο κύριος ρόλος των επιδερμικών κερατινοκυττάρων ήταν να συντελέσουν στην δημιουργία και



Εικ.3 Ο υποδοχέας TRPV1 στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα ενεργοποιείται από τη θερμότητα και το χαμηλό pH.

διατήρηση της λειτουργίας του αδιαπέραστου στο νερό φραγμού. Ωστόσο, η λειτουργική ύπαρξη των TRPV1 (υποδοχείς βανιλλοειδών τύπου 1 που υπάρχουν στους αλγούποδοχείς -υποδοχείς πόνου- στο δέρμα), η οποία διαπιστώθηκε στα επιδερμικά κερατινοκύτταρα και ενεργοποιείται από τη θερμότητα και το χαμηλό pH, προσέθεσε νέα δεδομένα στο ρόλο των κερατινοκυττάρων [Εικ.3]. Έχει διαπιστωθεί ότι πολλά κανάλια TRP εκφράζονται σε επιδερμικά κερατινοκύτταρα και παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση, τον πολλαπλασιασμό και την ομοιοστάση του φραγμού. Επιπλέον, επειδή τα TRP κανάλια που εκφράζονται σε κερατινοκύτταρα έχουν τη δυνατότητα να ανιχνεύουν διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τη θερμοκρασία, τη μηχανική καταπόνηση, την οσμωτική πίεση και τα χημικά ερεθίσματα, τα επιδερμικά κερατινοκύτταρα μπορεί να αποτελούν βασικό μέρος του αισθητήριου συστήματος της επιδερμίδας.

2. **Ακανθώδης στιβάδα (Stratum spinosum):** Αποτελείται από 5-7 στρώσεις εμπύρηνων πολυγωνικών κυττάρων που συνδέονται μεταξύ τους με δεσμοσώματα. Σε αυτή εντοπίζονται και τα κύτταρα του Langerhans που διεγείρουν το ανοσοποιητικό ^{1,2,6}.
3. **Κοκκιώδης στιβάδα (Stratum granulosum):** Αποτελείται από 2-3 στρώσεις εμπύρηνων ατρακτοειδών κυττάρων, τα οποία εμπεριέχουν βασεόφιλα κοκκία κερατοϋαλίνης που με τη σειρά τους περιέχουν λιπίδια, τα οποία μαζί με τις δεσμοσωμικές συνδέσεις, συμβάλλουν στο σχηματισμό αδιάβροχου φράγματος που προλαμβάνει την απώλεια υγρών από το σώμα ^{1,2}. Επίσης και στην κοκκιώδη στιβάδα παράγεται η κερατίνη ⁶.
4. **Διαυγής στιβάδα (Stratum lucidum):** Στιβάδα πλούσια σε κερατίνη που εντοπίζεται συνήθως στις παλάμες των χεριών και τα πέλματα των ποδιών ⁶.

5. Κεράτινη στιβάδα (Stratum corneum): Η εξωτερική στιβάδα που αποτελείται από νεκρά κύτταρα (πλακώδη κύτταρα) που αποπίπτουν και αντικαθίστανται από κύτταρα προερχόμενα από τις κάτω στιβάδες ^{2,6}.

A.1.1.2 Χόριο ή κυρίως δέρμα

Υποβαστάζει την υπερκείμενη επιδερμίδα και λειτουργεί υποστηρικτικά για τα νεύρα, τα λεμφαγγεία, τους θύλακες των τριχών, τους ιδρωτοποιούς και τους σμηγματογόνους αδένες και τα αιμοφόρα αγγεία για τον εφοδιασμό της επιδερμίδας με θρεπτικά συστατικά ^{1,2,4}. Το χόριο περιέχει ως επί το πλείστον ινοβλάστες οι οποίοι είναι υπεύθυνοι για την έκκριση κολλαγόνου, ελαστίνης και θεμέλιας ουσίας που προσφέρουν υποστήριξη και ελαστικότητα στο δέρμα ^{1,2}. Επίσης παρόντα είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος που εμπλέκονται στην άμυνα έναντι ξένων εισβολέων που διέρχονται από την επιδερμίδα ^{1,2}.

Το χόριο υποδιαιρείται σε δύο στρώματα ^{1,2} [Εικ.4]:

- Το θηλώδες στρώμα: αποτελείται από χαλαρό συνδετικό ιστό και ίνες κολλαγόνου τύπου II και περιλαμβάνει αισθητικές νευρικές απολήξεις και δομές που ονομάζονται σωμάτια Meissner.
- Το δικτυωτό στρώμα: βρίσκεται κάτω από το θηλώδες και αποτελείται από ακανόνιστο πυκνό συνδετικό ιστό και ίνες κολλαγόνου τύπου I.



Εικ.4 Τα δύο επιμέρους στρώματα του χορίου.

A.1.1.3 Υπόδερμα ^{1,2,4,6}

Εντοπίζεται κάτω από το χόριο και είναι πλούσιο σε λιπώδη ιστό (εκτός από το όσχεο και τα βλέφαρα) που προστατεύει από τα μηχανικά χτυπήματα και τις ακραίες θερμοκρασίες. Η παρουσία του υποδόριου λίπους έχει και τοξικολογική σημασία,

επειδή στο λίπος αυτό αποθηκεύονται λιπόφιλες ουσίες που έχουν προσληφθεί διαδερμικά ή συστηματικά. Επίσης, συνδέει το δέρμα με τους υποκείμενους ιστούς. Τέλος, από το υπόδερμα διέρχονται τα αγγεία και νεύρα του δέρματος και σε μερικές θέσεις του, ακόμη και στο βάθος, μπορεί να παρατηρηθούν τμήματα των εξαρτημάτων του δέρματος.

A.1.1.4 Εξαρτήματα δέρματος^{1,2,6,7} [Εικ. 5]

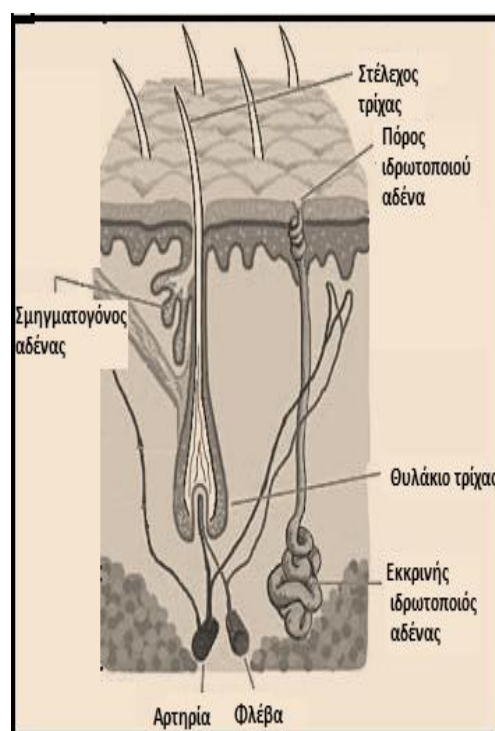
Τρίχες: Είναι λεπτές κερατινοποιημένες κυτταρικές δομές που σχηματίζονται από μια εγκόλπωση της επιδερμίδας, το θυλάκιο τρίχας, που εντοπίζεται στο χόριο.

Ιδρωτοποιοί αδένες: Εντοπίζονται δύο τύποι ιδρωτοποιών αδένων στο δέρμα.

- **Εκκρινείς αδένες:** Βρίσκονται σε όλο το σώμα εκτός από τα χείλη και γύρω από τα εξωτερικά γεννητικά όργανα. Εκκρίνουν ιδρώτα μέσω των πόρων στην επιφάνεια του δέρματος όταν το σώμα υπερθερμανθεί, ή επηρεάζονται από τη θερμότητα λόγω στρες. Συμβάλλουν στη θερμορύθμιση του σώματος καθώς η εξάτμιση του ιδρώτα προκαλεί ψύξη του δέρματος.
- **Αποκρινείς αδένες:** Εκκρίνουν ιδρώτα κυρίως σε θύλακες των τριχών παρά στην επιφάνεια του δέρματος και εντοπίζονται στις μασχάλες και στην ηβική περιοχή.

Σμηγματογόνοι αδένες: Συνήθως βρίσκονται μαζί με τους θύλακες των τριχών και ως εκ τούτου, υπάρχουν στο μεγαλύτερο τμήμα του σώματος. Αυτοί

οι αδένες εκκρίνουν μια λιπαρή ουσία, το σμήγμα, που λιπαίνει, μαλακώνει και προστατεύει το δέρμα από εξωτερικούς παράγοντες.



Εικ.5 Εξαρτήματα του δέρματος

Νυχιά: Ημιδιαφανείς πλάκες που αποτελούνται από σκληρή κερατίνη, η οποία προστατεύει την άκρη της τελευταίας φάλαγγας των δακτύλων των χεριών και των ποδιών.

A.1.2 Ο ρόλος του δέρματος ^{6,4}

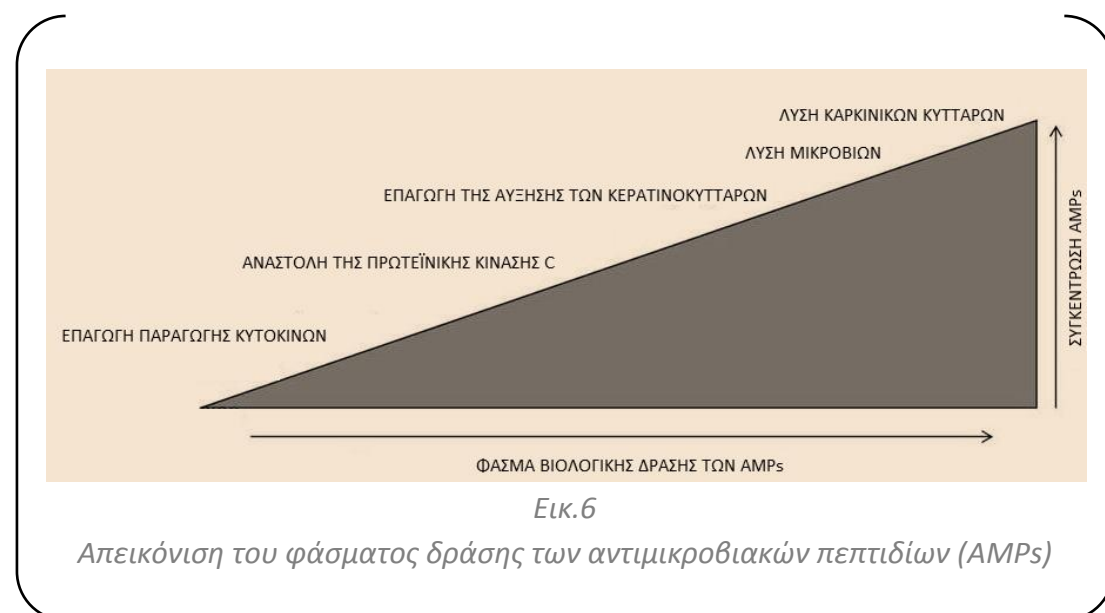
A.1.2.1 Φραγμός

Το δέρμα παρεμβάλλεται ενεργά μεταξύ του οργανισμού και του περιβάλλοντος αποτελώντας την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε βλαβερές ξένες ουσίες. Η ακεραιότητα του φραγμού του δέρματος είναι απολύτως απαραίτητη για να εξυπηρετεί σωστά το σκοπό του ως ασπίδα από το περιβάλλον. Τα κερατινοκύτταρα είναι στην πρώτη γραμμή αυτής της υπεράσπισης, επειδή αποτελούν την πλειοψηφία των επιδερμικών κυττάρων και βρίσκονται σε συνεχή επαφή με τον έξω κόσμο. Επίσης είναι υπεύθυνα, όπως προαναφέρθηκε, για τη σύσταση της κεράτινης στιβάδας, το τελικό διαφοροποιημένο εξωτερικό στρώμα της επιδερμίδας που αποτελείται από άκαμπτα, και απύρηντα κερατινοκύτταρα με υδρόφοβες, πλούσιες σε λιπίδια διπλοστιβάδες που εμποδίζουν την απώλεια νερού και συντελούν στην προστασία από τους παθογόνους οργανισμούς ⁸. Επιπλέον η συνεχής απολέπιση του δέρματος καθιστά δύσκολη τη δημιουργία μόνιμης κατοικίας για τους παθογόνους μικροοργανισμούς. Συνεπώς, ένας άθικτος φραγμός του δέρματος δεν διαπερνάται από βακτήρια ή ιούς, ελέγχει την απώλεια πολύτιμων υγρών από το σώμα, παρεμποδίζει τη διείσδυση της ακτινοβολίας και προστατεύει τα εσωτερικά όργανα από μηχανικά χτυπήματα. Αυτός ο προστατευτικός φραγμός είναι πολύ ήπιος έναντι των όξινων ουσιών, ενώ είναι πολύ ευάλωτος σε οργανικές και ανόργανες αλκαλικές ουσίες, οι οποίες αποδιοργανώνουν τις πρωτεΐνες της κερατίνης και αλλοιώνουν τη συνοχή μεταξύ των κερατινοκυττάρων και την ικανότητα συγκράτησης του νερού.

A.1.2.2 Χημική άμυνα- ανοσολογική απάντηση

Ως το μεγαλύτερο όργανο του σώματος και η πρώτη γραμμή άμυνας κατά του περιβάλλοντος, το δέρμα παίζει ζωτικό ρόλο στην ανοσιακή άμυνα του ξενιστή. Εκτός από τη λειτουργία του ως ένα φυσικό εμπόδιο, το δέρμα περιέχει ένα ενεργό ανοσοποιητικό δίκτυο επιτήρησης και διαθέτει πολύ εξειδικευμένες απαντήσεις για την παρεμπόδιση της εισόδου των μικροβίων ⁹. Η επιφάνεια του δέρματος αποτελεί ένα όξινο περιβάλλον (pH~5,5) μη κατοικήσιμο σε πολλούς μικροοργανισμούς.

Επιπλέον, έχει προταθεί ότι η φυσιολογική μικροχλωρίδα που αποικεί στο ανθρώπινο δέρμα μπορεί να συμβάλει στην άμυνα: οι μη παθογόνοι συμβιωτικοί μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για τα θρεπτικά συστατικά και τις θέσεις εγκατάστασης τους παθογόνους οργανισμούς, εκκρίνοντας αντιμικροβιακά μόρια που σκοτώνουν ή αναστέλλουν την ανάπτυξη των παθογόνων μικροβίων^{10,11}, ή/και μεταβάλλοντας τη φλεγμονώδη αντίδραση^{12,13}. Επιπρόσθετα, το δέρμα αντιμετωπίζει τους παθογόνους παράγοντες χρησιμοποιώντας χημικές άμυνες, όπως οι ιδρωτοποιοί αδένες που παράγουν ένα επίπεδο pH που καθιστά το δέρμα ακατοίκητο για πολλά μικρόβια. Το σάλιο, τα δάκρυα και οι βλεννώδεις εκκρίσεις επίσης απομακρύνουν πολλά ανεπιθύμητα μικρόβια. Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει γίνει ολοένα και πιο εμφανές ότι τα κερατινοκύτταρα και άλλα κύτταρα του δέρματος παράγουν μια σειρά αντιμικροβιακών μορίων σημαντικών για τη διατήρηση της ομοιόστασης¹⁴. Μελέτες των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) σε πολλά συστήματα οργάνων έχουν δείξει ότι συμμετέχουν σε ένα ευρύ φάσμα δραστηριοτήτων, συμπεριλαμβανομένων της άμεσης θανάτωσης μικροβίων, της χημειοταξίας, της τροποποίησης των φλεγμονωδών αντιδράσεων, της αγγειογένεσης, και της επούλωσης



τραυμάτων¹⁵ [Εικ.6]. Οι “Cathelicidins” και οι “Defensins” είναι δύο τάξεις των AMPs που έχουν μελετηθεί επαρκώς στο δέρμα. Σύμφωνα με τους Ahrens et al. η ανταπόκριση των β-defensins στις οξείες και χρόνιες προκλήσεις για το φράγμα διαπερατότητας του δέρματος, καταδεικνύει την στενή σχέση του αντιμικροβιακού φραγμού και του φραγμού διαπερατότητας του δέρματος¹⁶. Πιο αναλυτικά, τα πολλαπλά στοιχεία του φυσικού φραγμού διαπερατότητας και η αντιμικροβιακή ασπίδα άμυνας συνδυάζονται για να αντισταθεί το δέρμα στην μικροβιακή εισβολή,

απουσία φλεγμονής. Μετά από τραυματισμό, ένα ελάττωμα στη λειτουργία του φραγμού πυροδοτεί μία αντίδραση που περιλαμβάνει την επαγωγή της παραγωγής των αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs). Υπό κανονικές συνθήκες, η διαδικασία επιδιόρθωσης- αποκατάστασης, σε περιβάλλον αυξημένης αντιμικροβιακής έκφρασης σε συνδυασμό με ατελή φραγμό, υποβοηθά την αντίσταση στη μικροβιακή εισβολή. Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία επιδιόρθωσης, ο φυσικοί και μικροβιακοί φραγμοί ανακτούν την κατάσταση της ομοιόστασης.

A.1.2.3 Θερμορύθμιση

Ρυθμίζει τη θερμοκρασία του σώματος μέσω των εξαρτημάτων του (βλέπε A.1.1.4 Εκκρινείς ιδρωτοποιούς αδένες).

A.1.2.4 Αντίληψη αισθητικότητας

Το δέρμα μορφοποιεί τα εισερχόμενα ερεθίσματα μέσω των υποδοχέων των νεύρων που επιτρέπουν στον οργανισμό την αίσθηση της ζέστης, του κρύου, την πίεση, τον πόνο και την αφή.

A.1.2.5 Άλλες λειτουργίες του δέρματος

- Κυτταρική αντικατάσταση
- Κάθαρση δέρματος
- Αγγειακή αντίδραση
- Παραγωγή βιταμίνης D

A.2 ΥΠΕΡΙΩΔΗΣ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ (UV)

A.2.1 Γενικά ³

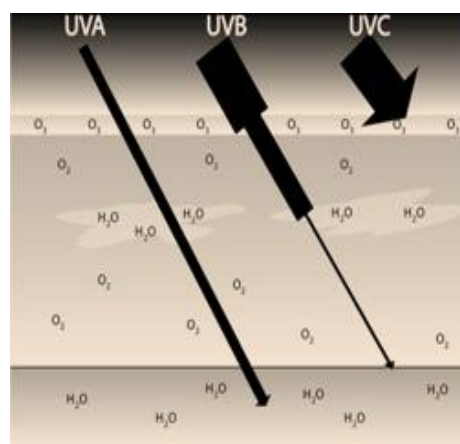
Η ηλιακή υπεριώδης ακτινοβολία (UV) είναι μια από τις σημαντικότερες περιβαλλοντικές προσβολές για το δέρμα και προκαλεί πολυεπίπεδα κυτταρικά και μοριακά γεγονότα που οδηγούν μέχρι και στον καρκίνο του δέρματος. Τις τελευταίες δεκαετίες οι αλλαγές στον τρόπο ζωής έχουν οδηγήσει σε σημαντική αύξηση του ποσού της ακτινοβολίας UV που λαμβάνουν οι άνθρωποι, γεγονός που καταδεικνύει την επείγουσα ανάγκη ανάπτυξης στρατηγικών για τη μείωση των αρνητικών βιολογικών επιδράσεων της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα. Ως εκ τούτου, μια ευρεία ποικιλία φυσικών παραγόντων έχει μελετηθεί για την συμβολή τους στη φωτοπροστασία του δέρματος.

Τύποι ακτινοβολίας UV ⁵⁰⁻⁵⁴

Η υπεριώδης ακτινοβολία διακρίνεται σε 3 κατηγορίες, ανάλογα με το μήκος κύματός της:

UVC, 200 - 290 nm

Η UVC είναι πολύ επικίνδυνη, μεταλλαξιογόνος και καρκινογόνος για το δέρμα ¹⁷(προκαλεί άμεσα βλάβες στο DNA) αν και κατά κανόνα δεν φτάνει στην επιφάνεια της γης καθώς απορροφάται σε μεγάλο βαθμό από το ατμοσφαιρικό στρώμα του όζοντος [Εικ. 7]. Η UVC ακτινοβολία εφόσον έρθει σε επαφή με το δέρμα, δύναται να το διαπεράσει σε βάθος περίπου 60-80 μικρόμετρα, και να προκαλέσει βλάβες στα μόρια του DNA [Εικ.8]¹⁸.

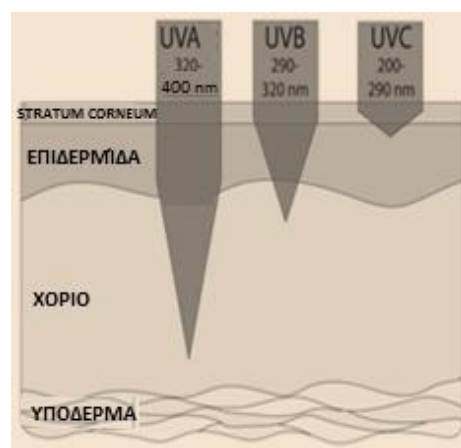


Εικ.7 Ποσοστό απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας από το στρώμα του όζοντος.

UVB, 290 - 320 nm

Ακτινοβολία UVB αποτελεί περίπου το 5% της συνολικής ηλιακής ακτινοβολίας UV και είναι η κυρίως υπεύθυνη για μια ποικιλία ασθενειών του δέρματος ¹⁸: είναι το

πρωταρχικό αίτιο πρόκλησης εγκαυμάτων από τον ήλιο αλλά και διάφορων μορφών καρκίνου (προκαλεί άμεσα βλάβες στο DNA)¹⁹. Μπορεί να διαπεράσει το δέρμα σε βάθος περίπου 160 έως 180 μικρόμετρα, να διασχίσει όλο το στρώμα της επιδερμίδας και να διεισδύσει στο χόριο του ανθρώπινου δέρματος [Εικ.8]¹⁸. Η ακτινοβολία UVB μπορεί να προκαλέσει τόσο άμεσες όσο και έμμεσες αρνητικές επιπτώσεις, όπως επαγωγή του οξειδωτικού στρες, βλάβη στο DNA, πρόωρη γήρανση



Εικ.8 Διαπερατότητα του δέρματος στη υπεριώδη ακτινοβολία

του δέρματος²⁰⁻²², και πολλαπλές επιπτώσεις στο ανοσοποιητικό σύστημα²³⁻²⁵, που σε συνδυασμό παίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόκληση νεοπλασμάτων²⁶⁻²⁸. Στην επιφάνεια της γης φτάνει σε μικρότερα ποσά σε σύγκριση με τη UVA, λόγω της απορρόφησης μεγάλου μέρους της από τη στιβάδα του όζοντος, που όμως είναι αρκετά για την πρόκληση βλάβης [Εικ.7].

UVA, 320 - 400 nm

Αποτελεί το μεγαλύτερο φάσμα της ηλιακής ακτινοβολίας UV (90-95%) και θεωρείται ως η «ακτίνα γήρανσης»¹⁸. Παλαιότερα εθεωρείτο ότι δεν είχε ιδιαίτερη επίδραση στο δέρμα, αλλά σήμερα είναι γνωστό ότι η εκτεταμένη έκθεση σε UVA μπορεί να οδηγήσει σε καλοήθεις σχηματισμούς όγκων καθώς και κακοήθεις μορφές καρκίνου, μέσω έμμεσης βλάβης στο DNA (σχηματίζονται ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδροξυλίου και άλλες πολύ δραστικές ενδιάμεσες χημικές ουσίες που προκαλούν βλάβη στο DNA) και γενικά έχει αποδειχθεί ότι συνεισφέρει τα μέγιστα στις δερματικές βλάβες²⁹⁻³³. Διεισδύει βαθύτερα στην επιδερμίδα και στο χόριο του δέρματος (μπορεί να διαπεράσει το δέρμα σε βάθος περίπου 1000 μικρομέτρων [Εικ.8]), όπου διαδικασίες φωτογήρανσης λαμβάνουν χώρα, αλλά δεν προκαλεί εγκαύματα¹⁸. Επίσης, επιδρά στον υποδόριο ιστό και μπορεί να αλλάξει τη δομή του κολλαγόνου και των ινών ελαστίνης του δέρματος, επιταχύνοντας έτσι την γήρανσή του¹⁹.

Συμπερασματικά, όσο μικρότερο το μήκος κύματος, τόσο μεγαλύτεροι οι κίνδυνοι από την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ¹⁹. Ωστόσο, στις 13 Απριλίου 2011, η Διεθνής Υπηρεσία Έρευνας για τον Καρκίνο του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας κατέταξε όλες τις κατηγορίες και τα μήκη κύματος της υπεριώδους ακτινοβολίας στην ΟΜΑΔΑ 1 ΚΑΡΚΙΝΟΓΟΝΩΝ. Πρόκειται για το υψηλότερο επίπεδο κατάταξης των καρκινογόνων παραγόντων και δηλώνει ότι «υπάρχουν αρκετά στοιχεία που αποδεικνύουν ότι και οι 3 κατηγορίες UV ακτινοβολίας μπορούν να προκαλέσουν καρκίνο στον άνθρωπο» ³⁴.

A.2.2 Θετικές επιδράσεις υπεριώδους ακτινοβολίας

A.2.2.1 Παραγωγή βιταμίνης D

Η έκθεση σε ακτινοβολία UVB προκαλεί την παραγωγή της προ-βιταμίνης D ³⁵, από την 7-δεϋδροχοληστερόλη- πρόδρομη ένωση της βιταμίνης D (λιποδιαλυτή βιταμίνη)- στο δέρμα σε ποσοστό έως και 1.000 IUs ανά λεπτό ^{36,37}. Η βιταμίνη D έχει κανονιστικό ρόλο ³⁷:

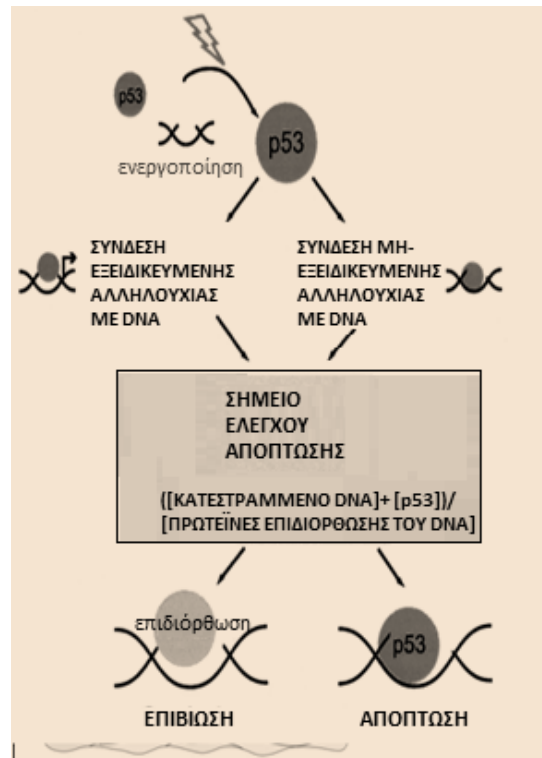
- στο μεταβολισμό του ασβεστίου (ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική λειτουργία του νευρικού συστήματος, την ανάπτυξη των οστών και τη διατήρηση της οστικής πυκνότητας)
- στην έκκριση ινσουλίνης και μείωση της πιθανότητας εμφάνισης σακχαρώδους διαβήτη τύπου I ^{36,38-41}
- στο ανοσοποιητικό μέσω της παραγωγής αντιμικροβιακών πεπτιδίων - ιδιαίτερα των cathelicidin ⁴²
- στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων
- στο αίμα, στην αναπνευστική οδό, στο δέρμα και δυνητικά στην υγεία του εντέρου ⁴²

Ένας αριθμός αυτοάνοσων νόσων, όπως η σκλήρυνση κατά πλάκας, ο διαβήτης τύπου I, ο συστηματικός ερυθματώδης λύκος και η ρευματοειδής αρθρίτιδα, σχετίζονται με ανεπάρκεια βιταμίνης D ⁴².

A.2.2.2 Επιδιόρθωση DNA- Μεταγραφή της p53 πρωτεΐνης

Τα κύτταρα του δέρματος έχουν μηχανισμούς για την πρόληψη περαιτέρω βλάβης που μπορεί να οδηγήσει σε καρκινογένεση και χρόνια φλεγμονώδη φαινόμενα, αν και η ικανότητα του ανθρώπινου σώματος να προστατεύει και να αποκαθιστά τις βλάβες

που προκαλούνται από την υπερϊώδη ακτινοβολία, μειώνεται κατά τη διάρκεια της ζωής του ¹⁹. Ένας από αυτούς τους μηχανισμούς είναι η παύση του κυτταρικού κύκλου ακολουθούμενη από επιδιόρθωση του DNA. Ένας εξίσου σημαντικός μηχανισμός είναι ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος και η απόπτωση (διαδικασία, κατά την οποία, κύτταρα που έχουν υποστεί σοβαρή βλάβη, «αυτοκτονούν», έτσι ώστε να μην γίνουν καρκινικά) ⁴³. Η πρωτεΐνη p53 έχει πρωτεύοντα ρόλο και στους δύο αυτούς μηχανισμούς [Εικ.9]. Μετά από βλάβη του DNA από οξεία UV ακτινοβολία, η μεταγραφή της p53 αυξάνεται, η ίδια ενεργοποιείται ⁴⁴ και η άθροιση αυτή της ενεργοποιημένης p53 πρωτεΐνης επάγει μια βίαιη παύση του κυτταρικού κύκλου στην G1 φάση, που επιτρέπει την επιδιόρθωση του DNA πριν αυτό αρχίσει τη διαδικασία της αντιγραφής στην S φάση ⁴⁵. Αν η βλάβη του DNA που προκλήθηκε από την UV ακτινοβολία είναι ιδιαίτερα σοβαρή και δεν μπορεί να επιδιορθωθεί, ενεργοποιούνται οι αποπτωτικοί μηχανισμοί για να καταστρέψουν τα προσβληθέντα κύτταρα με την p53 να έχει σημαίνοντα ρόλο και σε αυτούς ⁴⁶. Δυστυχώς, συνέχιση της έκθεσης στη UV προκαλεί καταστολή της p53, με αποτέλεσμα την πρόκληση καρκινογένεσης και χρόνιων φλεγμονωδών φαινομένων, που οδηγούν σε χαρακτηριστικούς δερματικούς φαινοτύπους ⁴⁷.



Εικ.9 Η πρωτεΐνη p53 μεσολαβεί για την επίτευξη ενός σημείου ελέγχου της απόπτωσης ως απάντηση στην βλάβη του DNA. Η ίδια ενεργοποιείται από επιζήμια ερεθίσματα στο DNA μέσω πολλαπλών μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Ένα σημείο ελέγχου απόπτωσης καθορίζεται από τα κατώτατα όρια των πρωτεϊνών p53 και του κατεστραμμένου DNA (SDS-DNA) σε σχέση με ένα σταθερό επίπεδο πανταχού πρωτεϊνών επιδιόρθωσης του DNA

A.2.2.3 Ιατρικές εφαρμογές της Υπεριώδους Ακτινοβολίας

Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει εφαρμογή στη θεραπεία δερματικών παθήσεων όπως η ψωρίαση και η λεύκη^{48,49}.

A.2.3 Επιβλαβείς επιδράσεις υπεριώδους ακτινοβολίας

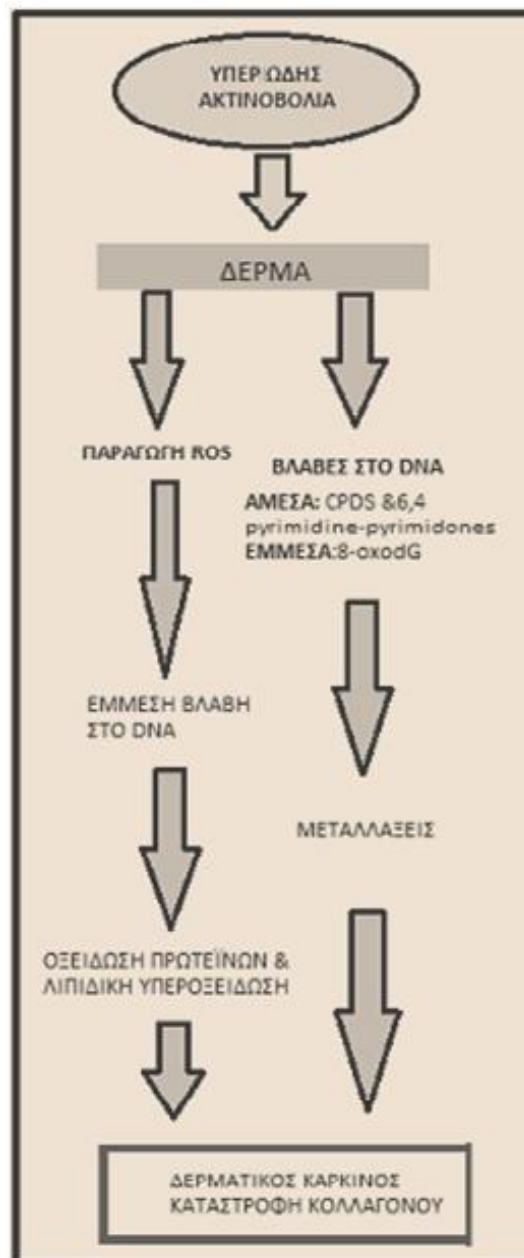
A.2.3.1 Παραγωγή ελευθέρων ριζών

34,50-54

Η UV ακτινοβολία είναι ένα από τα κυριότερα αίτια παραγωγής ελεύθερων ριζών (βλέπε σελ. 57). Οι ελεύθερες ρίζες είναι ασταθή μόρια οξυγόνου που έχουν ένα μονήρες ηλεκτρόνιο. Επειδή τα ηλεκτρόνια ανευρίσκονται ανά ζεύγη, το κάθε μόριο αναζητά άλλα μόρια για να συμπληρώσει το ζεύγος ηλεκτρονίων του. Αυτή ακριβώς η διαδικασία όμως προκαλεί βλάβες στην κυτταρική λειτουργία (ενεργοποίηση μεταλλοπρωτεϊνών ⇒ διάσπαση κολλαγόνου) και αλλαγές στο γενετικό υλικό (DNA και RNA) των κυττάρων [Εικ.10].

A.2.3.2 Οι βλάβες στο DNA [Εικ.10]

Η UVB ακτινοβολία απορροφάται άμεσα από τις βάσεις του κυτταρικού DNA οδηγώντας στο σχηματισμό DNA αλλοιώσεων και κυρίως διμερών κυκλοβουτανίου- πυριμιδίνης (CPDS) και 6,4 διμερών πυριμιδίνης-



Εικ.10 Προκαλούμενες άμεσες και έμμεσες βλάβες στο DNA από την έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία.

πυριμιδόνης (6,4 pyrimidine-pyrimidones)^{55,56} προκαλώντας άμεσα βλάβες στο DNA (εγκαύματα και μερικές μορφές καρκίνου του δέρματος). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι η UVB προκαλεί οξείδωση των υπολειμμάτων της γουανίνης με αποτέλεσμα το σχηματισμό της 8-οξυ-7,8-διυδρο-2 '-δεοξυγουανοσίνης (8-oxodG) μια διαδικασία που μεσολαβείται από δραστικές μορφές οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) και έχει προταθεί ως κλειδί βιοδείκτης της οξειδωτικής βλάβης του DNA⁵⁷.

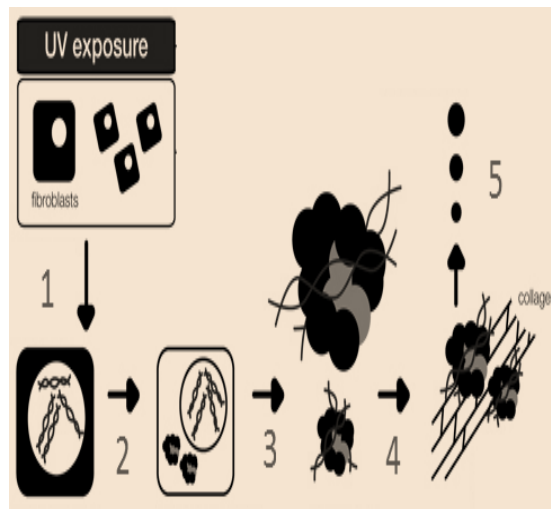
Η UVA και σε μικρότερο βαθμό η UVB έχει την ικανότητα, όπως προαναφέρθηκε, να προκαλέσει βλάβες στο DNA έμμεσα μέσω της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS)⁵⁸. Μάλιστα, η πιο θανατηφόρα μορφή δερματικού καρκίνου (κακόηθες μελάνωμα) προκαλείται κυρίως από την έμμεση βλάβη στο DNA. Οι ROS περιλαμβάνουν ανιόντα υπεροξειδίου, υπεροξειδία και ελεύθερες ρίζες οξυγόνου⁵⁹ και καταστρέφουν το κυτταρικό DNA, τα λιπίδια και τις πρωτείνες^{59,60}. Επιπρόσθετα, οι ROS συνεισφέρουν άμεσα στην αποδόμηση των ιστών και παρεμβαίνουν στα σηματοδοτικά κανάλια που εμπλέκονται στην έκφραση των υπεύθυνων γονιδίων για το μεταβολισμό του κολλαγόνου⁶¹.

Η UV ακτινοβολία με μήκος κύματος από 245 μέχρι 290 nm (UVC) απορροφάται σε μέγιστο βαθμό από το DNA⁶² και είναι σε θέση να επάγει μεταλλαξιογόνα φωτοπροϊόντα ή βλάβες στο DNA, κυρίως ανάμεσα σε γειτονικές πυριμιδίνες, με τη μορφή των διμερών⁶³. Αν αυτές δεν επιδιορθωθούν, οι UV-επαγόμενες DNA βλάβες μπορούν να οδηγήσουν σε μεταλλάξεις στην αλληλουχία του DNA. Αυτές οι DNA μεταλλάξεις φαίνεται να είναι άμεσα σχετιζόμενες με τις ειδικές κλινικές βλάβες της φωτογήρανσης, όπως η παθολογική ρυτίδωση, η ολική εκφύλιση της ελαστίνης και η καταστροφή του κολλαγόνου⁶⁴⁻⁶⁶.

A.2.3.3 Φωτογήρανση- Διάσπαση κολλαγόνου

Η παρατεταμένη (χρόνια) έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία δύναται, όπως προαναφέρθηκε, να προκαλέσει χρόνιες επιπτώσεις στην υγεία του δέρματος όπως πρόωγη γήρανση (φωτογήρανση) και καρκίνο^{19,34}. Ενδοκυτταρικό και εξωκυττάριο οξειδωτικό στρες οφειλόμενο σε αντιδραστικά είδη οξυγόνου (ROS) ενισχύουν τη γήρανση του δέρματος, η οποία χαρακτηρίζεται από ρυτίδες και άτυπη μελάγχρωση⁶⁷. Επειδή η UV ενισχύει την παραγωγή ROS στα κύτταρα, η γήρανση του δέρματος συνήθως εξετάζεται σε σχέση με έκθεση στο UV⁶⁷. Στο χόριο, η UV ακτινοβολία προκαλεί διάσπαση των κολλαγόνων ινών σε ρυθμούς μεγαλύτερους από αυτούς της

χρονολογικής γήρανσης, προς συσσώρευση ελαττωματικής ελαστίνης^{34,50-54}. Η συσσώρευση της ελαττωματικής ελαστίνης πυροδοτεί την παραγωγή μεταλλοπρωτεϊνών σε μεγάλες ποσότητες. Υπό φυσιολογικές συνθήκες, τα ένζυμα δρουν επιδιορθωτικά ανασυνθέτοντας κολλαγόνο. Ωστόσο, αυτή η διαδικασία δεν είναι πάντα 100% επιτυχής και μερικές μεταλλοπρωτεϊνάσες στην πραγματικότητα διασπούν κολλαγόνο [Εικ.11], παράγοντας αποσυντεθειμένες κολλαγόνες ίνες, τις «ηλιακές ουλές», γεγονός που εξηγεί την μειωμένη παραγωγή κολλαγόνου στο φωτογηρασμένο δέρμα⁶⁸. Όταν το δέρμα επαναλαμβάνει αυτή την ατελή διαδικασία ξανά και ξανά, σχηματίζονται οι ρυτίδες^{34,50-54}. Άλλα κλινικά συμπτώματα του φωτογηρασμένου δέρματος που αναφέρονται, είναι η ξηρότητα, η ανώμαλη μελάγχρωση, η έμμονη υπερμελάγχρωση, οι ηλιακές εφηλίδες, η ελάστωση, οι ηλιακοί φαγέσωρες και οι τηλαγγειεκτασίες.



Εικ.11

1. Οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (MMPs) ενεργοποιούνται στον πυρήνα των ινοβλαστών (χόριο) από την υπεριώδη ακτινοβολία ή από εκκινητές φλεγμονώδους αντίδρασης.
2, 3. MMPs όπως η κολλαγενάση, συνθέτονται μέσα στους ινοβλάστες.
4. MMPs (κολλαγενάση), αποδομούν το κολλαγόνο και αναστέλλουν- εμποδίζουν τον σχηματισμό νέου.
5. Το κολλαγόνο υποβαθμίζεται μέσα σε πηκτώδη πεπτίδια που με τη σειρά τους είναι υποβαθμισμένα από άλλα MMPs. Παράλληλα παρατηρείται διασταυρούμενη σύνδεση του κολλαγόνου προκαλώντας ρυτίδωση και δυσκαμψία στο δέρμα.

Πρόσφατη έρευνα δείχνει μια συνεργική οξειδωτική βλάβη όταν το δέρμα εκτίθεται σε UVA σε συνδυασμό με περιβαλλοντικούς αστικούς ρύπους (συμπεριλαμβανομένου του καπνού του τσιγάρου). Μάλιστα, το γεγονός ότι η φωτογήρανση προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από οξειδωτική βλάβη, επιβεβαιώνεται

επίσης από την απόδειξη ότι η θεραπεία με τοπικά αντιοξειδωτικά μπορεί να προλάβει ακόμη και να αναστρέψει εν μέρει την φωτογήρανση που οφείλεται στην ακτινοβολία UV ⁶⁹.

A.2.3.4 Προ-κακοήθειες & Κακοήθειες Βλάβες ^{34,50-54}

Η χρόνια έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να ευθύνεται για την πρόκληση των παρακάτω βλαβών:

Προκακοήθειες:

- Ακτινικές Υπερκερατώσεις
- Δερματικό Κέρας
- Δυσπλαστικοί Σπίλοι
- Κακοήθης Φακή
- Συγγενείς Μελαγχρωματικοί Σπίλοι

Κακοήθειες (Καρκίνοι Δέρματος)

- Βασικοκυτταρικό Καρκίνωμα (BCC)
- Ακανθοκυτταρικό Καρκίνωμα (SCC)
- Μελάνωμα

A.2.3.5 Φλεγμονώδη φαινόμενα και μελάγχρωση από την υπεριώδη ακτινοβολία

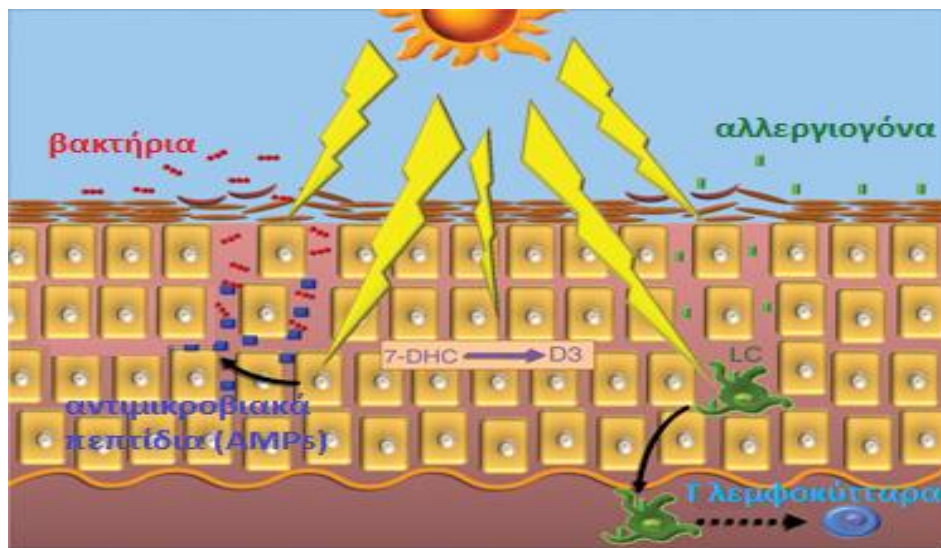
Οι κύριες οξείες κλινικές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας στο φυσιολογικό ανθρώπινο δέρμα είναι η φλεγμονή (κόκκινο δέρμα, ερύθημα) και η μελάγχρωση (αυξημένη μελανινογένεση). Οι ιστολογικές αλλαγές που ακολουθούν την έκθεση σε UV περιλαμβάνουν την πάχυνση της κερατίνης στιβάδας, της επιδερμίδας και του χορίου, καθώς και ενδοκυττάριο και περιαγγειακό οίδημα στο χόριο και περιαγγειακή διήθηση. Το ηλιακό ερύθημα (έγκαυμα) ποικίλλει από ένα ήπιο κοκκίνισμα έως την εμφάνιση φυσαλίδων. Η βαρύτητά του εξαρτάται από την ένταση και τον χρόνο έκθεσης στον ήλιο καθώς και από τον φωτότυπο του δέρματος ^{34,50-54}. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι οι αρνητικές συνέπειες των εγκαυμάτων είναι αθροιστικές ¹⁹.

A.2.3.6 Αγγειακές διαταραχές

Η UV ακτινοβολία έχει αποδειχθεί ότι δημιουργεί ένα ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για παθολογική αγγειογένεση⁷⁰⁻⁷²

A.2.3.7 Επίδραση στο Ανοσοποιητικό Σύστημα³⁶

Η UV ακτινοβολία ενέχεται επίσης και στην τοπική και συστηματική ανοσοκαταστολή^{19,73} καθώς είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη λειτουργική κατάσταση του ανοσοποιητικού συστήματος του δέρματος. Σε ευαίσθητα άτομα, η υπεριώδης ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει ανάφλεξη των παθογόνων φλεγμονωδών μονοπατιών που οδηγούν σε αλλεργία ή αυτοανοσία. Σε άλλες περιπτώσεις, αυτή η ίδια ακτινοβολία UV μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φωτοθεραπεία για την καταστολή των παθογόνων δερματικών ανοσολογικών αποκρίσεων. Αυτές οι πολύ διαφορετικές ιδιότητες είναι άμεσο αποτέλεσμα της ικανότητάς του υπεριώδους φωτός να ιονίζει μόρια στο δέρμα και έτσι να τα αλλάζει χημικά. Επιπλέον, αν και ο οργανισμός διαθέτει ένα αμυντικό σύστημα που επιτίθεται στα πολλαπλασιαζόμενα καρκινικά κύτταρα, στο οποίο περιλαμβάνονται τα T-λεμφοκύτταρα (είδος Λευκών αιμοσφαιρίων του αίματος), αλλά και εξειδικευμένα κύτταρα του χορίου που καλούνται κύτταρα Langerhans, όταν η υπεριώδης ακτινοβολία επιδράσει στο δέρμα, απελευθερώνονται ειδικές χημικές ουσίες που καταστέλλουν τα κύτταρα αυτά με αποτέλεσμα να υπόκεινται σε πολλές λειτουργικές και μορφολογικές αλλοιώσεις, συνεπάγοντας την λειτουργική τους ανεπάρκεια⁷⁴. Επίσης, αν και αυτό το μονοπάτι της απόπτωσης, μπορεί να προλαμβάνει τον καρκίνο του δέρματος, έχει τη δυνατότητα να επιφέρει επιδείνωση των αυτοδραστικών ανοσολογικών αποκρίσεων εκθέτοντας τα πυρηνικά αντιγόνα του κυττάρου. Χημικές αντιδράσεις UV-προκαλούμενες μπορούν να ενεργοποιήσουν το ανοσοποιητικό σύστημα με μια ποικιλία άλλων μηχανισμών [Εικ.12]. Σε απάντηση στην υπεριώδη ακτινοβολία, τα κερατινοκύτταρα εκκρίνουν κυτοκίνες και χημειοκίνες, που ενεργοποιούν και προσλαμβάνουν λευκοκύτταρα στο δέρμα. Σε μερικά άτομα οι UV-προκαλούμενες χημικές αντιδράσεις μπορούν να συνθέσουν νέα αντιγόνα με αποτέλεσμα την πρόκληση φωτοαλλεργίας. Εναλλακτικά, φωτοευαίσθητα μόρια μπορούν να βλάψουν τα κύτταρα προκαλώντας φωτοτοξικές αντιδράσεις που ομοιάζουν στο ηλιακό έγκαυμα.



Εικ. 12

Η UV ακτινοβολία διαρηγνύει την κεράτινη στιβάδα επιτρέποντας την είσοδο βακτηρίων και αλλεργιογόνων και διεγείρει την απελευθέρωση αντιμικροβιακών πεπτιδίων (AMPs) από τα κερατινοκύτταρα, τα οποία επιτίθενται και εμποδίζουν την είσοδο των βακτηρίων. Επίσης η UV ακτινοβολία επηρεάζει τη ικανότητα των κυττάρων Langerhans να εκθέτουν στην επιφάνειά τους αντιγόνα (συμπεριλαμβανομένου και των αλλεργιογόνων) γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή των T-λεμφοκυττάρων. Τέλος η μετατροπή της πρόδρομης ένωσης 7-δεϋδροχοληστερόλη σε βιταμίνη D3, φαίνεται να εμπλεκεται στις παραπάνω διαδικασίες.

A.2.3.8 Αλλεργικές Αντιδράσεις και Αντιδράσεις φωτοευαισθησίας

Ορισμένα άτομα παρουσιάζουν αντιδράσεις φωτοευαισθησίας στην έκθεση σε ακτινοβολία UV λόγω γενετικών-μεταβολικών ιδιοτεροτήτων ή χρήση φαρμάκων (ορισμένα φάρμακα, όπως τα αντισυλληπτικά, αντιυπερτασικά, αντιφλεγμονώδη, αντικαταθλιπτικά κ.ά. δύνανται να προκαλέσουν φωτοαλλεργικό εξάνθημα), καλλυντικών, αρωμάτων, τοπικών σκευασμάτων και αντηλιακών^{19,34,50-54}.

A.2.3.9 Επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στα μάτια

Στους ανθρώπους, η παρατεταμένη έκθεση στην ηλιακή υπεριώδη ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει οξείες και χρόνιες επιπτώσεις στην υγεία των ματιών

(φωτοκερατίτιδα, καταράκτης, πτερύγιο, κερατοπάθεια) ^{19,34}. Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι το δέρμα έχει την ικανότητα να αφομοιώνει την υπεριώδη ακτινοβολία παράγοντας μελανίνη (μαύρισμα), η οποία προστατεύει από την έκθεση στην UV ακτινοβολία ενώ, το ανθρώπινο μάτι δεν διαθέτει παρόμοια ικανότητα ¹⁹.

A.2.3.10 Καταστροφή βιταμίνης A

Οι δύο ακτινοβολίες UVA και UVB επιδρούν καταστροφικά της βιταμίνης A στο δέρμα, επίδραση που μπορεί να προκαλέσει περαιτέρω βλάβη ⁷⁵.

A.2.3.11 Επιδείνωση Νοσημάτων ^{34,50-54}

Η υπεριώδης ακτινοβολία έχει αρνητική επίδραση στην εξέλιξη ορισμένων νοσημάτων, όπως:

- Ροδόχρους Νόσος,
- Απλούς Έρπης,
- Ανεμοβλογιά,
- Ψωρίαση (10%),
- Ερυθηματώδης Λύκος,
- Πορφυρίες

A.3 ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

A.3.1 Γενικά

Ο σακχαρώδης διαβήτης (ΣΔ) αποτελεί χρόνια και γενικευμένη μεταβολική διαταραχή, οφειλόμενη σε σχετική ή απόλυτη έλλειψη της ινσουλίνης, πολυπεπτιδικής ορμόνης, η οποία παράγεται από τα β-κύτταρα της ενδοκρινούς μοίρας του παγκρέατος, τα νησίδια του Langerhans⁷⁶. Βασικός ρόλος της ινσουλίνης στο ανθρώπινο σώμα, είναι ο έλεγχος της ομοιόστασης των ενεργειακών πρώτων υλών του οργανισμού, μέσω της τροποποίησης του μεταβολισμού τους στο ήπαρ, στους μύες και στο λιπώδη ιστό^{35,77}. Αναλυτικότερα, η ινσουλίνη προωθεί την πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα και την αποθήκευσή της, από τους μύς και το ήπαρ, ως γλυκογόνο, ελαττώνοντας έτσι τη γλυκόζη του αίματος, περιορίζει τη γλυκοζουρία και προάγει την χρήση κετονών, λιπών, αμινοξέων και γλυκόζης⁷⁶. Σε σχετική ή απόλυτη έλλειψη ινσουλίνης διαταράσσονται οι παραπάνω διεργασίες με συνέπεια την διαταραχή του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπών και των λευκωμάτων, η οποία συνεπάγεται την αύξηση της τιμής του σακχάρου στο αίμα (υπεργλυκαιμία) γεγονός που χαρακτηρίζει το σακχαρώδη διαβήτη⁷⁶.

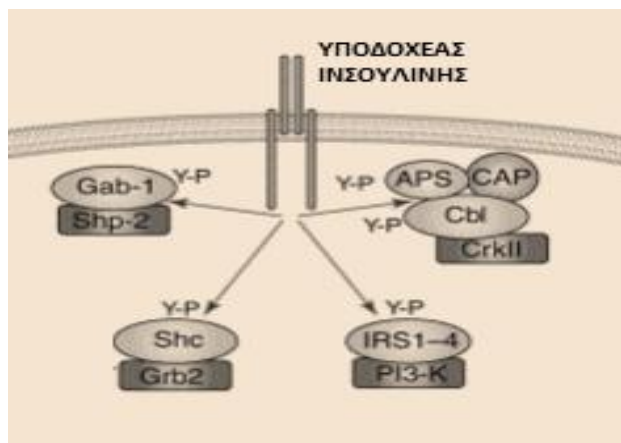
A.3.2 Ρόλος της ινσουλίνης στο κύτταρο

Σε κυτταρικό επίπεδο, η δράση της ινσουλίνης χαρακτηρίζεται από διάφορα αποτελέσματα, όπως επαγωγή μεταφοράς κυστιδίων, ενεργοποίηση πρωτεϊνικών κινασών και φωσφατασών, ενεργοποίηση ή καταστολή μεταγραφής και επαγωγή κυτταρικής αύξησης και διαφοροποίησης. Αυτή η πολυπλοκότητα υποδηλώνει ότι η δράση της ινσουλίνης περιλαμβάνει πολλά μεταβολικά μονοπάτια που η λειτουργία τους εξαρτάται λίγο ή πολύ από την ενεργοποίηση υποδοχέων κινασών τυροσίνης.

- **Πορεία της σηματοδότησης**

Η σηματοδότηση ξεκινά με την πρόσδεση της ινσουλίνης στην εξωκυτταρική, πλούσια σε κατάλοιπα κυστεΐνης, περιοχή του υποδοχέα της ινσουλίνης. Ο υποδοχέας της ινσουλίνης έχει ενσωματωμένη στο ενδοκυτταρικό του τμήμα μια κινάση τυροσίνης. Η ινσουλίνη προκαλεί την αυτοφωσφορυλίωση του υποδοχέα, ο οποίος με τη σειρά του καταλύει τη φωσφορυλίωση διάφορων ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών

υποστρωμάτων (IRS, APS, c-Cbl , Gab-1, Shc) ²¹⁵⁻²¹⁹[Εικ. 13]. Σε κάθε ένα από αυτά τα υποστρώματα συνδέεται ένα σύνολο σηματοδοτικών πρωτεϊνών που περιέχουν την αλληλουχία SH2, η οποία αναγνωρίζει περιοχές που περιβάλλουν τα φωσφορυλιωμένα κατάλοιπα τυροσίνης.

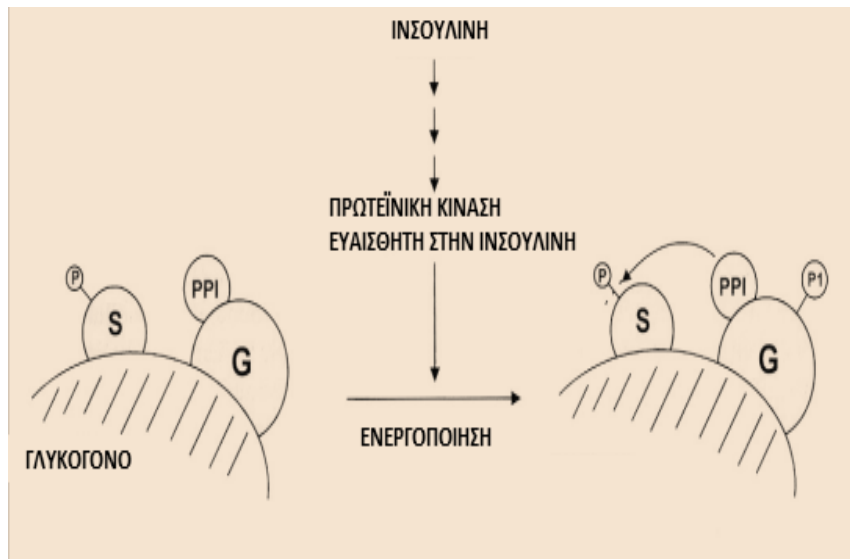


Εικ.13 Σηματοδοτικά μονοπάτια και πρωτεϊνικά υποστρώματα του υποδοχέα της ινσουλίνης (IRS1-4, APS, Shc, Gab-1)

Οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί στο μονοπάτι της πρωτεΐνης IRS, το οποίο, αν και δεν ενεργοποιείται μόνο από την ινσουλίνη, μόνο η ινσουλίνη μπορεί να προκαλέσει μέσω αυτού τη μετακίνηση κυστιδίων υπεύθυνων για τη μεταφορά γλυκόζης.

- **Ο ρόλος της ινσουλίνης στο μεταβολισμό του γλυκογόνου**

Η ινσουλίνη διεγείρει τη σύνθεση του γλυκογόνου (αποταμιευτική ουσία που αποτελείται από μόρια γλυκόζης που σχηματίζουν διακλαδισμένες αλυσίδες) και αναστέλλει τη διάσπασή του προκαλώντας αποφωσφορυλίωση και ενεργοποίηση της συνθάσης του γλυκογόνου και αποφωσφορυλίωση και αναστολή της φωσφορυλάσης του γλυκογόνου. Και τα δυο ένζυμα (υπόστρωμα S στην εικόνα) αποφωσφορυλιώνονται από την πρωτεϊνική φωσφατάση PPIG. Η ινσουλίνη ενεργοποιεί την πρωτεϊνική φωσφατάση PPIG προκαλώντας φωσφορυλίωση της G υπομονάδας στην P1 περιοχή, μέσω μιας πρωτεϊνικής κινάσης (πρωτεϊνική κινάση ευαίσθητη στην ινσουλίνη) που διεγείρεται από την ινσουλίνη ²¹⁸⁻²²²(Εικ. 14).



Εικ.14 Ενεργοποίηση της πρωτεϊνικής φωσφατάσης I που είναι συνδεδεμένη στο γλυκογόνο από την ινσουλίνη

- **Τερματισμός της δράσης της ινσουλίνης**²¹⁸

Ο τερματισμός της δράσης της ινσουλίνης λαμβάνει χώρα με διάφορους μηχανισμούς όπως η αποφωσφορυλίωση του υποδοχέα και των υποστρωμάτων από πρωτεϊνικές φωσφατάσες τυροσίνης, με κυριότερη την κυτταροπλασματική PTP1B καθώς και η φωσφορυλίωση του υποδοχέα από κινάσες σερίνης/θρεονίνης με κυριότερη την GSK3. Πέρα από τους μηχανισμούς τερματισμού δράσης της ινσουλίνης που έχουν να κάνουν με τον υποδοχέα, υπάρχουν και άλλοι που σχετίζονται με την PIP3 (3,4,5 τριφωσφορική φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη), οι οποίοι είτε μειώνουν τη συγκέντρωσή της εμποδίζοντας την ενεργοποίηση του μεταφορέα Glut4 είτε την αποφωσφορυλιώνουν μπλοκάροντας την δράση της ινσουλίνης.

A.3.3 Τύποι σακχαρώδους διαβήτη

Ο Σακχαρώδης Διαβήτης διακρίνεται σε τρεις κύριες κατηγορίες:

1. Ινσουλινοεξαρτώμενος ή διαβήτης τύπου I ή νεανικός διαβήτης

Χαρακτηρίζεται από καταστροφή των β-κυττάρων του παγκρέατος, τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της ινσουλίνης, με αποτέλεσμα να υπάρχει ολική έλλειψη ή ελάχιστη έκκριση ινσουλίνης^{76,78}. Επομένως, ο ασθενής με σακχαρώδη διαβήτη τύπου I είναι απόλυτα εξαρτημένος από τη εξωγενή χορήγηση ινσουλίνης προκειμένου τα επίπεδα σακχάρου στο αίμα του να διατηρηθούν σε φυσιολογικά επίπεδα^{76,78}. Η ονομασία "ινσουλινοεξαρτώμενος" χαρακτηρίζει τη διαταραχή και τη μορφή θεραπείας που απαιτείται ενώ ο χαρακτηρισμός του ως Νεανικός διαβήτης, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε άτομα νεώτερης ηλικίας, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε μεγαλύτερης ηλικίας άτομα⁷⁸. Ποσοστό της τάξης του 5-10% των συνολικών περιπτώσεων ΣΔ, ανήκει στη συγκεκριμένη κατηγορία⁷⁹.

2. Μη ινσουλινοεξαρτώμενος ή διαβήτης τύπου II ή διαβήτης ενηλίκων

Χαρακτηρίζεται από μειωμένη έκκριση ινσουλίνης στο πάγκρεας με αποτέλεσμα την αύξηση της τιμής του σακχάρου στο αίμα⁷⁶. Ο χαρακτηρισμός του ως διαβήτης των ενηλίκων, οφείλεται στο γεγονός ότι κατά κανόνα εμφανίζεται σε άτομα ηλικίας άνω των 40 χρονών και συνηθέστερα σε ηλικία άνω των 55 ετών⁷⁸, χωρίς βέβαια να αποκλείεται και η εμφάνιση αυτής της μορφής σε νεαρότερης ηλικίας άτομα. Σε πολλές περιπτώσεις αυτός ο τύπος ΣΔ περνάει απαρατήρητος για μεγάλα χρονικά διαστήματα πριν τη διάγνωσή του⁷⁹ και αποτελεί τον συνηθέστερο των τριών (περίπου το 80% του συνόλου των διαβητικών)⁷⁶.

3. Σακχαρώδης Διαβήτης Κύησης

Χαρακτηρίζεται από κατάσταση δυσανοχής στη γλυκόζη, η οποία εμφανίζεται στις εγκυμονούσες είτε στην αρχή, είτε κατά τη διάρκεια της κύησης⁷⁹. Ο τύπος αυτός μοιάζει με το διαβήτη τύπου II ως προς την ελαττωμένη έκκριση

ινσουλίνης και την ελαττωμένη ευαισθησία των κυττάρων στην ινσουλίνη ⁷⁶. Σήμερα είναι γνωστό ότι ο διαβήτης κύησης εμφανίζεται στο 3-5% των κύσεων και συσχετίζεται με την παχυσαρκία ⁷⁶ αλλά και οι γυναίκες με οικογενειακό ιστορικό ΣΔ, είναι επιρρεπείς στην εμφάνιση ΣΔ κύησης ⁷⁹. Ο διαβήτης κύησης είναι αναστρέψιμη νόσος, η οποία υποχωρεί μετά τον τοκετό, συνδέεται όμως με περιγεννητικές επιπλοκές και προβλήματα στην υγεία της μητέρας και του νεογνού ⁷⁶. Επίσης γυναίκες στις οποίες παρουσιάστηκε ΣΔ κύησης, έχουν 35-60% πιθανότητα να αναπτύξουν ΣΔ τύπου II τα επόμενα 10-20 χρόνια ⁷⁹.

4. Άλλοι ειδικοί τύποι Σακχαρώδους Διαβήτη

Οφείλονται σε διαφορετικές αιτίες όπως: γενετικές διαταραχές στη λειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος και των υποδοχέων της ινσουλίνης, σε ασθένειες της εξωκρινούς μοίρας του παγκρέατος, σε ενδοκρινικά νοσήματα, σε λοιμώξεις, σε δράση διαφόρων χημικών και φαρμακευτικών παραγόντων ⁷⁹.

A.3.4 Συμπτώματα Σακχαρώδους Διαβήτη ⁷⁹

Συνήθη συμπτώματα που αναφέρονται στο Διαβήτη τύπου I: συχνουρία, ασυνήθιστη δίψα, ακραία πείνα, ασυνήθιστη απώλεια βάρους, υπερκόπωση και ευερεθιστότητα.

Συνήθη συμπτώματα που αναφέρονται στο Διαβήτη τύπου II: οποιοδήποτε από τα συμπτώματα του τύπου I, θολή όραση, πληγές / μώλωπες που αργούν να επουλωθούν, μυρμήγκιασμα / μούδιασμα στα άκρα, επαναλαμβανόμενες λοιμώξεις δέρματος, ούλων, ή ουροδόχου κύστης.

A.3.5 Επιδημιολογικά Στοιχεία

Εκτιμάται ότι το 2001, 150 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως έπασχαν από διαβήτη ⁸⁰ ενώ σύμφωνα με την Παγκόσμια Ομοσπονδία Διαβήτη (IDF) , μέχρι το 2025, 333 εκατομμύρια άτομα ή το 6,3% του παγκόσμιου πληθυσμού θα έχουν εκδηλώσει ΣΔ ⁸¹. Στη χώρα μας, το 6% του γενικού πληθυσμού πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη ⁷⁶. Η νόσος έχει υψηλότερο επιπολασμό (συχνότητα εμφάνισης) στο δυτικό κόσμο

(ιδιαίτερα ο διαβήτης τύπου ΙΙ) και αυτό αποτελεί μια σαφή ένδειξη για τη συσχέτιση της νόσου με το σύγχρονο τρόπο ζωής, τις διατροφικές μας συνήθειες και την έλλειψη σωματικής άσκησης ⁷⁶.

Παρακάτω [πίνακας 1] παραθέτονται τα στατιστικά αποτελέσματα πρόσφατης επίσημης μελέτης στις Ηνωμένες Πολιτείες [Data from the 2011 National Diabetes Fact Sheet (released Jan. 26, 2011)] ⁷⁹:

Συνολικό ποσοστό πληθυσμού που πάσχει από διαβήτη στις ΗΠΑ	8,3%
Ποσοστό εξ' αυτών που πάσχουν από διαβήτη αλλά δεν έχει διαγνωστεί ακόμα	27,1%
Συνολικό ποσοστό πληθυσμού που βρίσκεται σε κατάσταση prediabetes (στάδιο πριν την εκδήλωση ΣΔ)	25,4%
Αριθμός νέων περιπτώσεων που διαγνώστηκαν το 2010 σε άτομα > 20 ετών	1.9 εκατομμύρια
Ποσοστό πληθυσμού < 20 ετών, που πάσχει από ΣΔ	0,26% (περίπου 1 σε κάθε 400 παιδιά και έφηβοι έχουν διαβήτη τύπου 1)
Ποσοστό πληθυσμού ηλικίας > 20 ετών που πάσχει από ΣΔ	11,3%
Ποσοστό πληθυσμού ηλικίας > 65 ετών που πάσχει από ΣΔ	26,9%
Άνδρες πάσχοντες από ΣΔ στις ΗΠΑ	11,8% συνόλου ανδρών ηλικίας > 20 ετών

Γυναίκες πάσχουσες από ΣΔ στις ΗΠΑ	10,8% συνόλου γυναικών ηλικίας >20 ετών
Διαβήτης κύησης στις ΗΠΑ	• Τα ποσοστά των καταγγελλθέντων περιστατικών διαβήτη κύησης: από 2% έως 10% των κυήσεων. • Αμέσως μετά από την εγκυμοσύνη, το 5% έως 10% των γυναικών με διαβήτη κύησης βρίσκονται να έχουν διαβήτη, τύπου συνήθως 2.
Πίνακας 1	

A.3.6 Νοσηρότητα και θνησιμότητα ⁷⁹

- Το 2007, ο διαβήτης καταγράφεται ως η υποκείμενη αιτία θανάτου σε 71.382 πιστοποιητικά θανάτου στις ΗΠΑ, η οποία εισήχθη και ως ένας παράγοντας που συνέβαλλε σε επιπλέον 160.022 πιστοποιητικά θανάτου. Αυτό σημαίνει ότι ο διαβήτης συνέβαλλε συνολικά σε 231.404 θανάτους.
1. Ο διαβήτης ήταν η έβδομη κύρια αιτία θανάτου των ΗΠΑ το 2007.
- Ο Σακχαρώδης διαβήτης τύπου II αποτελεί μια από τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως καθώς συνδέεται με αυξημένο κίνδυνο για καρδιαγγειακά επεισόδια ⁷⁶. Άλλες σοβαρές επιπλοκές αποτελούν η Χρόνια Νεφρική Ανεπάρκεια, η τύφλωση και οι ακρωτηριασμοί ⁷⁶.
 - Συνολικά, ο κίνδυνος θανάτου μεταξύ των ατόμων με διαβήτη είναι περίπου διπλάσιος από αυτόν των ατόμων της ίδιας ηλικίας, αλλά χωρίς διαβήτη.

A.3.7 Επιπλοκές Σακχαρώδους Διαβήτη

Πρωτογενής αιτιολογικός παράγοντας για την εμφάνιση των περισσότερων επιπλοκών του Σ.Δ. είναι η επιμένουσα και παρατεταμένη υπεργλυκαιμία. Ως κύριες επιπλοκές του ΣΔ αναφέρονται οι: μικροαγγειοπάθεια, μακροαγγειοπάθεια,

νευροπάθεια, αυξημένη επιρρέπεια στις λοιμώξεις και μειωμένη ικανότητα επούλωσης ιστών^{82,83}.

A.3.7.1 Μικροαγγειοπάθεια:

Καλείται η προσβολή των τριχοειδών και προτριχοειδών αγγείων, με χαρακτηριστική πάχυνση της βασικής τους μεμβράνης που οδηγεί σε διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, νεφροπάθεια και σε χρόνια διαβητικά έλκη του άκρου ποδός^{82,83}. Η διαβητική νεφροπάθεια χαρακτηρίζεται από υπέρταση και διαφόρου βαθμού νεφρική ανεπάρκεια^{82,83}. Παρακάτω παρατίθενται επιδημιολογικά στοιχεία που επιβεβαιώνουν την σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μελετώμενων επιπλοκών:

Τύφλωση και προβλήματα στα μάτια⁷⁹

- Ο διαβήτης καταγράφεται ως η κύρια αιτία των νέων περιπτώσεων τύφλωσης που παρουσιάζονται σε ενήλικες ηλικίας 20-74 ετών.
- Για την περίοδο 2005-2008, το 28,5% των διαβητικών ηλικίας 40 ετών και άνω στις ΗΠΑ, είχαν διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια, και από αυτούς, το 4,4% είχαν προχωρημένη διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια που μπορεί να οδηγούσε σε σοβαρή απώλεια της όρασης.

Νεφρική νόσος⁷⁹

- Ο διαβήτης είναι η κύρια αιτία νεφρικής ανεπάρκειας, αντιπροσωπεύοντας το 44% όλων των νέων κρουσμάτων της νεφρικής ανεπάρκειας το 2008 στις ΗΠΑ.
- Τον ίδιο χρόνο στις ΗΠΑ, 48.374 άτομα με διαβήτη ξεκίνησαν θεραπεία για νεφρική νόσο τελικού σταδίου και 202.290 άτομα με νεφρική νόσο τελικού σταδίου, λόγω του διαβήτη, ζούσαν σε χρόνια αιμοκάθαρση ή μεταμόσχευση νεφρού.

Υπέρταση⁷⁹

Το 2005-2008, το 67% των ενηλίκων ηλικίας 20 ετών και άνω με διαβήτη, είχαν αρτηριακή πίεση μεγαλύτερη ή ίση με 140 / 90 χιλιοστά της στήλης υδραργύρου (mmHg) ή χρησιμοποιούσαν συνταγογραφούμενα φάρμακα για την υπέρταση.

Ακρωτηριασμοί⁷⁹

Πάνω από το 60% των μη τραυματικών ακρωτηριασμών κάτω άκρων συμβαίνουν σε άτομα με διαβήτη.

A.3.7.2 Μακροαγγειοπάθεια

Προσβολή των αγγείων μεγάλου και μεσαίου μεγέθους (αθηρωματοσκλήρωση κυρίως των αγγείων της καρδιάς και των άκρων), εκφράζεται με πρόωμη εμφάνιση αρτηριοσκλήρυνσης και οδηγεί σε στεφανιαία νόσο, έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικά επεισόδια, θρομβωτικά ή εμβολικά, τα οποία αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου των ασθενών με ΣΔ^{82,83}. Παρακάτω παρατίθενται επιδημιολογικά στοιχεία που επιβεβαιώνουν την σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μελετώμενων επιπλοκών:

Καρδιακές παθήσεις και εγκεφαλικά επεισόδια⁷⁹

- Το 2004, καρδιακή νόσος σημειώθηκε σε 68% και το εγκεφαλικό επεισόδιο στο 16% των διαβητικών ηλικίας 65 ετών και άνω.
- Οι ενήλικες που πάσχουν από διαβήτη έχουν ποσοστά θανάτου από καρδιακή νόσο ή κινδύνου για εγκεφαλικό επεισόδιο περίπου 2 έως 4 φορές υψηλότερα από τους ενήλικες χωρίς διαβήτη.

A.3.7.3 Διαβητική Νευροπάθεια

Καταστροφή των νεύρων, τόσο του περιφερικού όσο και του αυτόνομου νευρικού συστήματος, λόγω του αυξημένου επιπέδου της γλυκόζης και χαρακτηρίζεται από διαφόρου βαθμού παραισθησίες, καυσαλγίες κτλ.^{82,83}. Κάθε ασθενής μπορεί να πάσχει από περισσότερους του ενός τύπους διαβητικής νευροπάθειας (αισθητική ή κινητική) που όμως όλοι στο σύνολό τους συνήθως εξελίσσονται σταδιακά και προσβάλλουν μικρές και μεγάλες νευρικές ίνες⁸⁴. Κατά τη περιγραφή των συμπτωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθούν τόσο θετικοί όσο και αρνητικοί χαρακτηρισμοί όπως, αίσθημα καύσου ή κρύου, μούδιασμα, μυρμηκίαση, μαχαιριές, αίσθημα σύνθλιψης ή μέγγενη, παραισθησία, αλλοδυνία, απώλεια της ικανότητας αντίληψης του πόνου και άλλες αισθήσεις που μπορεί να επηρεάσουν τη διάθεση του ασθενούς, τη σκέψη και τη συγκέντρωση του. Τα συμπτώματα αυτά ακολουθούν καθορισμένη κατανομή ξεκινώντας από τα κάτω άκρα και τα δάκτυλα των ποδιών

και συνεχίζοντας προς τα πάνω ^{84,85}. Παρακάτω παρατίθενται επιδημιολογικά στοιχεία που επιβεβαιώνουν την σοβαρότητα και τη συχνότητα εμφάνισης των μελετώμενων επιπλοκών:

Νόσος του νευρικού συστήματος (Νευροπάθεια)

- Περίπου το 60% έως 70% των ατόμων με διαβήτη παρουσιάζουν σε ήπια έως σοβαρή μορφή βλάβες στο νευρικό σύστημα. Τα συμπτώματα αυτών των βλαβών περιλαμβάνουν τη διαταραχή της αίσθησης ή πόνο στα άκρα, επιβράδυνση της πέψης της τροφής στο στομάχι (γαστροπάρεση), σύνδρομο καρπιαίου σωλήνα, στυτική δυσλειτουργία ή άλλα προβλήματα νεύρων.
- Η διαβητική νευροπάθεια είναι μια σημαντική αιτία που οδηγεί στον ακρωτηριασμό των κάτω άκρων.

A.3.7.4 Άλλες επιπλοκές ⁷⁹:

Η **περιοδοντική νόσος** είναι πιο συχνή οδοντιατρική ασθένεια σε άτομα με διαβήτη. Πολλοί ερευνητές θέτουν την περιοδοντική νόσο ως την έκτη επιπλοκή του ΣΔ ^{86,87}. Στους νεαρούς ενήλικες, τα άτομα με διαβήτη έχουν περίπου διπλάσιο κίνδυνο εμφάνισης περιοδοντικής νόσου από εκείνους που δεν πάσχουν από διαβήτη.

Οι επιπλοκές της κύησης: Ανεπαρκής έλεγχος του διαβήτη πριν από τη σύλληψη και κατά τη διάρκεια του πρώτου τριμήνου της κύησης μεταξύ των γυναικών με διαβήτη τύπου Ι μπορεί να προκαλέσει σημαντικές γενετικές ανωμαλίες στο 5% έως 10% των κυήσεων και αυτόματες αποβολές σε 15% έως 20% των κυήσεων. Από την άλλη πλευρά, για μια γυναίκα με προϋπάρχων διαβήτη, η βελτιστοποίηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα πριν και κατά την πρώιμη περίοδο της εγκυμοσύνης μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο γενετικών ανωμαλιών στα βρέφη τους. Ανεπαρκής έλεγχος του διαβήτη κατά τη διάρκεια του δεύτερου και τρίτου τριμήνου της κύησης μπορεί να οδηγήσει σε υπερβολικά μεγάλα έμβρυα, θέτοντας σε κίνδυνο τόσο τη μητέρα όσο και το βρέφος.

Μη ελεγχόμενος διαβήτης συχνά οδηγεί σε βιοχημικές ανισορροπίες που μπορούν να προκαλέσουν οξέα απειλητικά για τη ζωή συμβάντα, όπως η διαβητική **κετοξέωση** και το **υπερωσμωτικό κώμα**.

Τα άτομα με διαβήτη είναι **πιο επιρρεπή σε πολλές άλλες ασθένειες**. Μόλις αποκτήσουν αυτές τις ασθένειες, συχνά έχουν χειρότερη πρόγνωση. Για παράδειγμα, είναι πιο πιθανό να πεθάνουν από πνευμονία ή γρίπη σε σύγκριση με εκείνους που δεν πάσχουν από διαβήτη.

Τα άτομα με διαβήτη έχουν διπλάσιες πιθανότητες να εκδηλώσουν **κατάθλιψη**, η οποία μπορεί να περιπλέξει τη διαχείριση του διαβήτη, σε σύγκριση με άτομα χωρίς διαβήτη. Επιπλέον, η κατάθλιψη σχετίζεται με αυξημένο κατά 60% κίνδυνο ανάπτυξης διαβήτη τύπου II.

A.3.7.5 Επιπλοκές του δέρματος^{79,88}:

Ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί πολλές παθοφυσιολογικές αλλαγές στο δέρμα. Πληθώρα πειραμάτων έχουν γίνει σε άτριχους μύες, με χορήγηση στρεπτοζοτοκίνης (streptozotocin) ή αλλοξάνης (alloxan) για την πρόκληση διαβήτη τύπου I, προκειμένου να εξεταστούν οι ιδιότητες της κερατίνης στιβάδας της επιδερμίδας. Πειράματα έδειξαν ότι η περιεκτικότητα της κερατίνης στιβάδας σε νερό μειώνεται σημαντικά στους διαβητικούς μύες, ενώ η άδηλη απώλεια νερού παραμένει αμετάβλητη. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε αμινοξέα της επιδερμίδας είναι είτε φυσιολογική, είτε αυξημένη στην κερατίνη στιβάδα μυών που είχαν εκδηλώσει διαβήτη ύστερα από έγχυση στρεπτοζοτοκίνης. Αντίθετα, η περιεκτικότητα της κερατίνης στιβάδας τους σε τριγλυκερίδια είναι σημαντικά χαμηλότερη στους διαβητικούς μύες, παρόλο που τα επίπεδα των κεραμιδίων, της χοληστερόλης και των λιπαρών οξέων της είναι υψηλότερα από τα επίπεδα ελέγχου των φυσιολογικών μυών. Παρατηρήθηκε επίσης μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων της βασικής στιβάδας, μείωση του επιδερμικού DNA, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αξιοσημείωτες αλλαγές στις επιδερμικές πρωτεΐνες-δείκτες διαφοροποίησης⁸⁸.

Ανάλογα ευρήματα με αυτά που αναφέρθηκαν παραπάνω για τους διαβητικούς μύες (μειωμένη περιεκτικότητα σε νερό της κερατίνης στιβάδας, διαταραχή του κύκλου εργασιών της επιδερμίδας, αύξηση στα επίπεδα των κερατινοκυττάρων και μειωμένη περιεκτικότητα τριγλυκεριδίων) έχουν βρεθεί και στο γηρασμένο ανθρώπινο δέρμα⁸⁸.

Υπολογίζεται, ότι το 33% των ατόμων με διαβήτη θα έχουν μια διαταραχή του δέρματος που θα προκαλείται ή θα επηρεάζεται από το διαβήτη κάποια στιγμή στη

ζωή τους. Επίσης κάποιες δερματικές παθήσεις είναι μερικές φορές το πρώτο σημάδι που υποδηλώνει ότι ένα άτομο πάσχει από διαβήτη. Οι δερματικές επιπλοκές που θα αναλυθούν παρακάτω διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

Α.3.7.6 Δερματικές επιπλοκές που εμφανίζονται κυρίως ή μόνο σε άτομα με διαβήτη

Διαβητική Δερματοπάθεια:

Ο διαβήτης δύναται να προκαλέσει αλλαγές στα μικρά αιμοφόρα αγγεία που μπορεί να δημιουργήσουν προβλήματα στο δέρμα και να οδηγήσουν σε κατάσταση καλούμενη διαβητική δερματοπάθεια. Εκδηλώνεται με την εμφάνιση οβάλ λεπιδωδών πλακών ανοιχτού καφέ χρώματος στα πόδια, που συχνά μπορεί να διαγνωστούν λάθος ως σημεία ηλικίας [Εικ. 15].



*Εικ.15
Διαβητική δερματοπάθεια*

Διαβητική Λιποειδική Νεκροβίωση: Μια σπάνια πάθηση που μπορεί επίσης να προκληθεί από αλλαγές στα αιμοφόρα αγγεία. Εκδηλώνεται με κηλίδες παρόμοιες αυτών που οφείλονται τη διαβητική δερματοπάθεια, αλλά είναι λιγότερες αριθμητικά, μεγαλύτερες, βαθύτερες και υπάρχει πιθανότητα να εξελιχθούν σε «ανοιχτές» πληγές.

Αθηροσκλήρωση: Αποτελεί πάχυνση των αρτηριών άρα και στένωση αυτών, που δύναται να επηρεάσει την κατάσταση του δέρματος στα πόδια. Το δέρμα γίνεται άτριχο, λεπτό, δροσερό, και λαμπερό, τα δάχτυλα των ποδιών δίνουν την αίσθηση ότι κρυώνουν και παρατηρείται πύκνωση και αποχρωματισμός των νυχιών. Επιπλέον, η άσκηση προκαλεί πόνο στους μύες επειδή δεν οξυγονώνονται αρκετά και η επούλωση τραυματισμών και η καταπολέμηση δερματικών λοιμώξεων κυρίως στα άκρα καθυστερεί λόγω της μειωμένης ροής του αίματος (υπεύθυνο για τη μεταφορά των λευκών αιμοσφαιρίων). Εκτιμάται ότι οι διαβητικοί έχουν την τάση να εμφανίσουν αθηροσκλήρωση σε νεαρότερη ηλικία.

Εξανθηματικά Ξανθώματα: Εκδηλώνονται με την εμφάνιση κίτρινων βλατίδων με κόκκινο περίγραμμα που προκαλούν κνησμό. Η διαταραχή αυτή εμφανίζεται συνήθως σε νέους άνδρες με διαβήτη τύπου Ι που έχουν υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και λιπιδίων στο αίμα. Εξαφανίζονται όταν ο διαβήτης τεθεί υπό έλεγχο.

Ψηφιακή σκλήρωση: Εκδηλώνεται με πάχυνση του δέρματος του πίσω μέρους των παλαμών και κηρώδης απόχρωση αυτού, πάχυνση του δέρματος του μετώπου και των δακτύλων των ποδιών και δυσκαμψία των αρθρώσεων των δακτύλων. Αυτή η επιπλοκή παρατηρείται στο 1/3 περίπου των ατόμων που πάσχουν από διαβήτη τύπου Ι. Η μόνη θεραπεία είναι ο έλεγχος των επιπέδων σακχάρου στο αίμα.

Διάσπαρτο Δακτυλιοειδές κοκκίωμα:

Εκδηλώνεται με την εμφάνιση εξανθημάτων σχήματος δαχτυλιδιού ή τόξου και χρώματος κόκκινου, κόκκινου-καφέ ή στο χρώμα του δέρματος, που παρατηρούνται πιο συχνά σε μέρη του σώματος μακριά από τον κορμό (για παράδειγμα, τα δάχτυλα ή τα αυτιά) [Εικ.16].



Εικ.16 Διάσπαρτο δακτυλιοειδές κοκκίωμα

Μελανίζουσα ακάνθωση:

Εκδηλώνεται με την εμφάνιση μαυρισμένων ή καφέ περιοχών στο λαιμό, στις μασχάλες και στη βουβωνική χώρα και πιο σπάνια στα χέρια, τους αγκώνες και τα γόνατα [Εικ.17]. Προσβάλλει συνήθως άτομα υπέρβαρα και η καλύτερη θεραπεία τους είναι η μείωση του βάρους τους.



Εικ.17 Μελανίζουσα ακάνθωση

Διαβητική Σκληροδερμία: Σπάνια δερματική επιπλοκή που επηρεάζει άτομα με διαβήτη τύπου 2 και εκδηλώνεται με πάχυνση του δέρματος στο πίσω μέρος του αυχένα και στην άνω πλάτη. Για την θεραπεία της συστήνεται ο έλεγχος των επιπέδων σακχάρου στο αίμα.

Διαβητικές Φλύκταινες: Σπάνια δερματική επιπλοκή που εμφανίζεται συνήθως σε όσους πάσχουν από διαβητική νευροπάθεια και εκδηλώνεται στα δάκτυλα και σε άλλα μέρη των άκρων. Παρατηρείται αυτοϊαση σε περίπου τρεις εβδομάδες.

Αλλεργικές αντιδράσεις: που οφείλονται στην φαρμακευτική αγωγή (υπογλυκαιμικά δισκία, ενέσεις ινσουλίνης)

A.3.7.7 Δερματικές επιπλοκές που ο καθένας μπορεί να εμφανίσει κατά τη διάρκεια της ζωής του , ωστόσο η συχνότητα και η ευκολία εμφάνισής τους στους διαβητικούς είναι μεγαλύτερη

Βακτηριακές λοιμώξεις (συνήθης υπεύθυνος ο Staphylococcus Aureus)

- Λοιμώξεις των αδένων των βλεφαρίδων
- Θυλακίτιδα (λοιμώξεις των θυλάκων των τριχών)
- Δοθιήνες (εν τω βάθει λοιμώξεις του δέρματος και των ιστών κάτω)
- Μολύνσεις γύρω από τα νύχια

Μυκητιασικές Λοιμώξεις (συνήθης ένοχος ο Candida albicans)

Αυτές οι λοιμώξεις συμβαίνουν συχνά σε πτυχές του δέρματος όπου υπάρχει ζεστό περιβάλλον και υγρασία, όπως: οι περιοχές κάτω από το στήθος, γύρω από τα νύχια, ανάμεσα στα δάκτυλα , οι γωνίες του στόματος, κάτω από την ακροποσθία (περιτομή σε άνδρες), οι μασχάλες και η βουβωνική χώρα.

Λεύκη: Δερματική πάθηση που συνδέεται συχνότερα με το διαβήτη τύπου Ι. Εκδηλώνεται με αποχρωματισμό σημείων του δέρματος (κυρίως στο στήθος, την κοιλιά αλλά και στο πρόσωπο) που οφείλεται στην καταστροφή των ειδικών κυττάρων που παράγουν τη χρωστική του δέρματος.

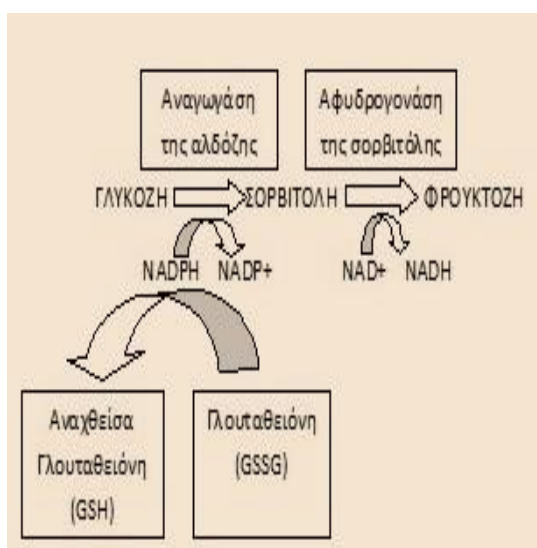
Κνησμός: Πρόκληση εντοπισμένου κνησμού που μπορεί να οφείλεται σε μυκητίαση, ξηροδερμία ή κακή κυκλοφορία του αίματος.

A.3.8 Μηχανισμοί επιπλοκών Σακχαρώδους Διαβήτη ⁸⁹

Οι μηχανισμοί που πυροδοτούνται από την υπεργλυκαιμία και προκαλούν τελικά ιστική βλάβη παραμένουν στην ουσία υποθετικοί . Οι κυριότεροι από αυτούς είναι:

A.3.8.1 Μεταβολική εκτροπή της γλυκόζης και άλλων σακχάρων μέσω της οδού των πολυολών

Το ρυθμιστικό ένζυμο της οδού των πολυολών είναι η αναγωγή της αλδόζης. Στην οδό αυτή χρησιμοποιείται ως συνένζυμο το NADPH (αναχθέν φωσφορικό νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο) και ως υπόστρωμα η γλυκόζη που μετατρέπεται σε σορβιτόλη, η οποία με τη σειρά της οξειδώνεται σε φρουκτόζη [Εικ.18]. Φυσιολογικά, η οδός των πολυολών είναι ανενεργή, καθώς η χημική συγγένεια της αναγωγής της αλδόζης για την γλυκόζη είναι μικρή (υψηλή K_m). Όταν λόγω της υπεργλυκαιμίας, αυξηθεί η συγκέντρωση της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα, αυξάνει ο μεταβολισμός μέσω της οδού των πολυολών. Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι το NADPH είναι απαραίτητο για την αναγέννηση της αναχθείσας γλουταθειόνης, που είναι σημαντικός αδρανοποιητής



Εικ.18 Μηχανισμός μετατροπής της γλυκόζης σε σορβιτόλη και στη συνέχεια σε φρουκτόζη

των ελεύθερων ριζών οξυγόνου και η έλλειψή της προκαλεί οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων. Τέλος, η υπεργλυκαιμία αδρανοποιεί την αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης, που αποτελεί τη σημαντικότερη πηγή του NADPH, μειώνοντας περαιτέρω τις συγκεντρώσεις του NADPH σε ορισμένα αγγειακά και νευρικά κύτταρα.

A.3.8.2 Αυξημένη παραγωγή προϊόντων προχωρημένης γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycosylation End-products, AGEs)

Οι μη ενζυμικές αντιδράσεις της γλυκόζης με πρωτεΐνες, αυτομάτως σχηματίζουν προϊόντα με υψηλό δείκτη αντιδραστικότητας, τα οποία αντιπροσωπεύουν ένα μείγμα ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων, που αποκαλούνται Προχωρημένα Τελικά Προϊόντα Γλυκοζυλίωσης (Advanced Glycosylation End Products: AGEs). Οι γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες του πλάσματος συνδέονται με AGE-υποδοχείς που

βρίσκονται στην επιφάνεια ορισμένων κυττάρων. Ένας ειδικός τύπος υποδοχέα, ο RAGE, του οποίου η δομή μοιάζει με εκείνη των ανοσοσφαιρινών, όταν συνδεθεί με AGEs προκαλεί την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ενεργοποιεί το μεταγραφικό παράγοντα NFκB (nuclear factor kappa-B), που με τη σειρά του προκαλεί την παθολογική έκφραση πολλών γονιδίων⁹⁰. Τα AGEs βρίσκονται σε αυξημένο ποσοστό σε εξωκυττάρια δομές των αγγείων του αμφιβληστροειδούς⁹¹ και του σπειράματος⁹² διαβητικών ατόμων. Ωστόσο, σήμερα κυριαρχεί η άποψη ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης μέσα στα κύτταρα ευθύνεται για την παραγωγή των AGEs τόσο ενδοκυτταρίως όσο και έξω από τα κύτταρα⁹³.

Χημικές ιδιότητες των AGEs

- Σχηματίζονται σε πρωτεΐνες, λιπίδια πυρηνικά οξέα
- Ο σχηματισμός τους είναι μη αναστρέψιμος και προκαλεί υψηλή αντίσταση στην πρωτεολυτική πέψη
- Είναι μεγάλης αντιδραστικότητας και προκαλούν:
 - Διασυνδέσεις μεταξύ των πολυπεπτιδίων της ίδιας πρωτεΐνης π.χ. του κολλαγόνου^{94,95}
 - Παγιδεύουν τις μη γλυκοζυλιωμένες πρωτεΐνες, π.χ. Ig, LDL
- Ο σχηματισμός τους σε λιπίδια προάγει την οξείδωσή τους
- Αδρανοποιούν χημικώς το μονοξείδιο του νιτρικού οξέος (EDRF)

Δέρμα και AGEs⁹⁶

Το Δέρμα επηρεάζεται από τη διαδικασία της γήρανσης όπου παρατηρούνται, όπως προαναφέρθηκε, πολλές τροποποιήσεις: με τον καιρό το δέρμα γίνεται πιο ξηρό, πιο λεπτό, εμφανίζονται κηλίδες, μειώνεται η ελαστικότητά του και αυξάνει η ακαμψία του, σε συνδυασμό με την εμφάνιση ρυτίδων. Αυτές οι παρατηρήσεις προκύπτουν από την συνέργεια της εγγενούς χρονολογικής γήρανσης (εξατομικευμένη, γενετική) και της εξωγενούς γήρανσης (οφείλεται σε εξωτερικούς παράγοντες όπως η UV, η ρύπανση και ο τρόπος ζωής). Μία από τις αιτίες της γήρανσης είναι και η εμφάνιση των τελικών προϊόντων AGEs, κατά τη διάρκεια της ζωής. Η αντίδραση

γλυκοζυλίωσης προκύπτει από μια μη-ενζυματική αντίδραση μεταξύ ενός σακχάρου και μιας ελεύθερης αμινικής ομάδας από Lys, Arg αμινοξέα σε πρωτεΐνες. Τα AGEs προκαλούν βιολογικές αλλαγές κάτι που συνεπάγεται την ενεργοποίηση των μορίων σύνθεσης (εξωκυττάριου χώρου, κυτταροκίνες) και την ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών. Το UV επιδρά στα AGEs (όπως pentosidine) παράγει δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) στον εξωκυττάριο χώρο που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε πρόσθετες αρνητικές επιπτώσεις. Μόρια που περιγράφονται στη βιβλιογραφία ως αναστολείς σε αυτή τη μη αναστρέψιμη αντίδραση είναι οι αμινογουανιδίνες. Για να κατανοήσουμε τις συνέπειες της γλυκοζυλίωσης στο δέρμα, ένα σύστημα από ανακατασκευασμένο δέρμα αναπτύχθηκε με κολλαγόνο τροποποιημένο από τη γλυκοζυλίωση για τη δερματική σύσταση. Σε αυτό το σύστημα παρατηρήσαμε ότι χόριο και επιδερμίδα είναι τροποποιημένα χάρη στη γλυκοζυλίωση (σύνθεση μακρομορίων, κυτταροκίνες, μεταλλοπρωτεΐνες) και είναι δυνατό να δοκιμαστούν αναστολείς αυτής της αντίδρασης. Εν κατακλείδι, στο δέρμα, η γλυκοζυλίωση εμπλέκεται σε μια πολύ σύνθετη διαδικασία της γήρανσης και ταυτόχρονα επηρεάζει, άμεσα και έμμεσα, ορισμένα κύτταρα, τη σύνθεση και την οργάνωση του matrix.

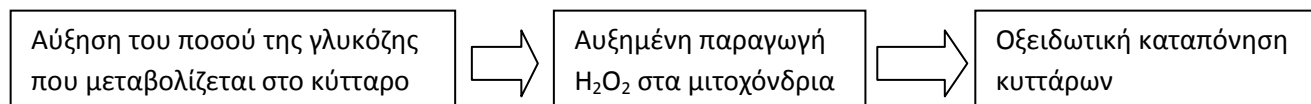
A.3.8.3 Ενεργοποίηση ορισμένων ισομορφών της πρωτεϊνικής κινάσης C

Η πρωτεϊνική κινάση C αποτελεί μια ομάδα ενζύμων που παρεμβαίνουν στη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από το ATP σε ειδική θέση σε μια πρωτεΐνη-στόχο, δηλαδή δρουν φωσφορυλιώνοντας το υπόστρωμά της. Η υπερβολική και συνεχής ενεργοποίηση της PKC είναι ένας από τους μηχανισμούς με τους οποίους η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες στους ιστούς.

A.3.8.4 Υπερδραστηριότητα της οδού της εξοζαμίνης

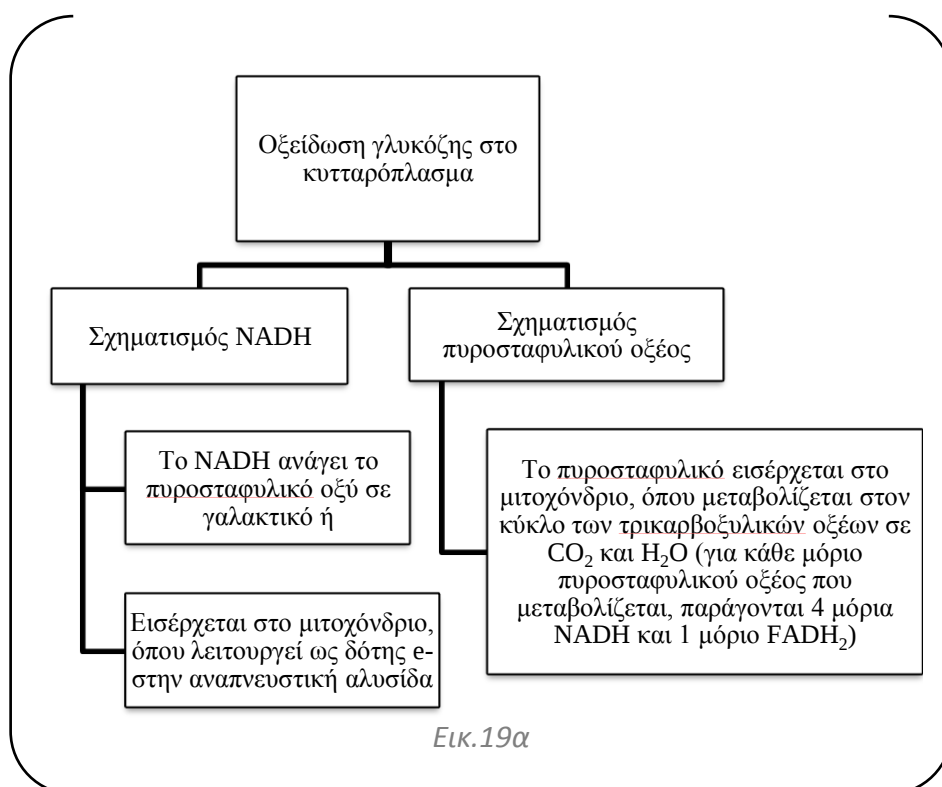
Μία ακόμη υπόθεση υποστηρίζει ότι η υπεργλυκαιμία προκαλεί βλάβες στους ιστούς μέσω εκτροπής του μεταβολισμού της γλυκόζης δια της οδού της εξοζαμίνης⁹⁷⁻⁹⁹.

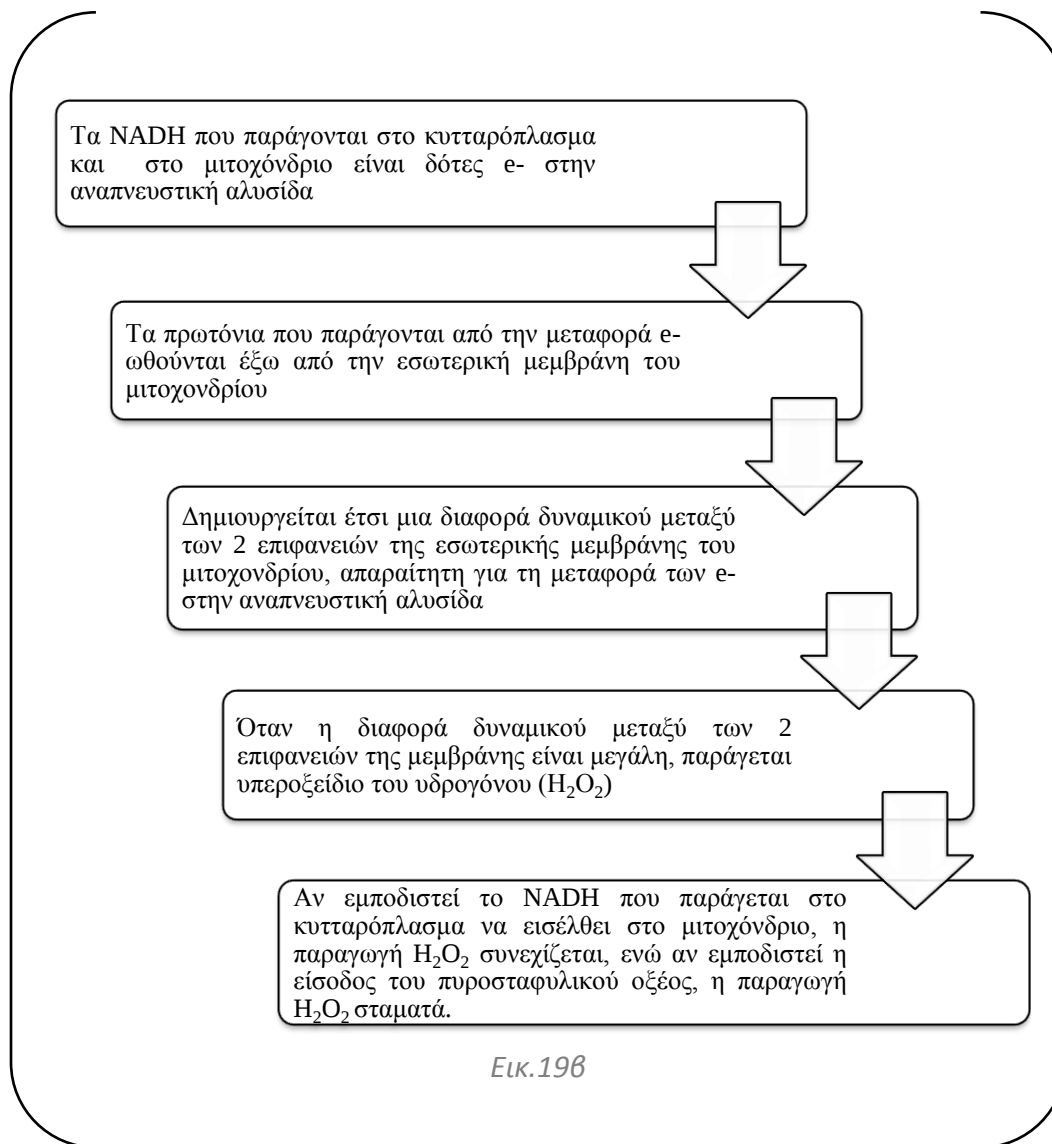
Οι 4 πρώτοι μηχανισμοί πιθανότατα έχουν ως κοινή υποκείμενη αιτία την οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων (Υπόθεση Brownlee ¹⁰⁰) που αναλύεται στο παρακάτω σχήμα ¹⁰¹:



A.3.8.5 Οξειδωτική καταπόνηση των κυττάρων ⁸⁹

Ο μηχανισμός παραγωγής H_2O_2 στα μιτοχόνδρια περιγράφεται παρακάτω [Εικ.19α, Εικ.19β]:





A.3.9 Υπεργλυκαιμική μνήμη (Υπόθεση Brownlee)

Ένα ποσοστό των ασθενών με διαβήτη εξακολουθεί να εμφανίζει επιπλοκές παρά την αποκατάσταση της ευγλυκαιμίας (υπεργλυκαιμική μνήμη). Ο BROWNLEE αποδίδει την υπεργλυκαιμική μνήμη σε μεταλλάξεις του μιτοχονδριακού DNA¹⁰². Το DNA του μιτοχονδρίου δεν διαθέτει επιδιορθωτικούς μηχανισμούς, ιντρόνια ή ιστόνες, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις σε αυτό να είναι 20 φορές συχνότερες σε σχέση με το πυρηνικό DNA. Αυτές προκαλούν δυσλειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας και συνεχή υπερπαραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου παρά την αποκατάσταση της ευγλυκαιμίας.

Όσον αφορά στη χρήση αντιοξειδωτικών παραγόντων στην πρόληψη των επιπλοκών του διαβήτη, η υπόθεση της υπεργλυκαιμικής μνήμης ίσως εξηγεί γιατί μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενα φάρμακα, όπως η βιταμίνη Ε, δεν είχαν τα αναμενόμενα αποτελέσματα ¹⁰³. Οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες εξουδετερώνουν τα ήδη σχηματισμένα τοξικά παράγωγα του οξυγόνου, αλλά δεν σταματούν την παραγωγή υπεροξειδίου στα μιτοχόνδρια. Σήμερα δοκιμάζονται μόρια με μικρό M.B., που μιμούνται τη δραστηριότητα των ενζύμων δισμουτάση/καταλάση του υπεροξειδίου

104-106

A.4 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ- ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ

A.4.1 Γενικά

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα άτομο ή μόριο που είναι ικανό να υφίσταται ως ανεξάρτητη οντότητα για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια σε μοριακό ή ατομικό τροχιακό ¹⁰⁷⁻¹⁰⁹. Οι ελεύθερες ρίζες χαρακτηρίζονται από αστάθεια εξαιτίας του ασύζευκτου ηλεκτρονίου και για αυτό προσπαθούν να αποκαταστήσουν τον αριθμό των ηλεκτρονίων στην εξωτερική στοιβάδα. Με αυτό τον τρόπο, τα ασύζευκτα ηλεκτρόνια προσδίδουν στις ελεύθερες ρίζες μεγάλου βαθμού δραστικότητα, η οποία όμως ταυτόχρονα εξαρτάται από την φύση των ριζών και από τα μόρια που συναντούν ¹⁰⁸⁻¹¹⁰. Ορισμένες ρίζες είναι ιδιαίτερα δραστικές (OH·, LO·) και έχουν την ικανότητα να προκαλούν καταστροφές σε σημαντικά μόρια του οργανισμού όπως πρωτεΐνες, λίπη και DNA. Ωστόσο, υπάρχουν και ρίζες λιγότερο ενεργές, και άρα σταθερότερες, όπως η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO·), της βιταμίνης E (τοκοφερόλη), και της βιταμίνης C (δεϋδροασκορβικό οξύ) ¹¹¹.

A.4.1.1 Αντιδράσεις ελευθέρων ριζών

Οι αντιδράσεις των ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν την ανταλλαγή μεμονωμένων ηλεκτρονίων. Η ανταλλαγή αυτή προέρχεται είτε μέσω των αντιδράσεων οξειδοαναγωγής είτε από ομολυτική διάσπαση ενός δεσμού, όπου τα ηλεκτρόνια που αποτελούν τον αρχικό δεσμό μοιράζονται από ένα σε κάθε μόριο. Αποτέλεσμα αυτών των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται, είναι η δημιουργία ολοένα νέων ριζών και κατ' αυτό τον τρόπο προκαλούνται συνεχόμενες αλυσιδωτές αντιδράσεις μέσα στον ανθρώπινο οργανισμό αναγεννώντας συνεχώς νέα άτομα ή ενώσεις με ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Οι αντιδράσεις λαμβάνουν τέλος όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα, τα οποία δεν μπορούν πλέον να παράγουν νέες ελεύθερες ρίζες ¹¹²⁻¹¹⁴.

Σχηματικά η διαδικασία παραγωγής ελευθέρων ριζών παρουσιάζεται παρακάτω ¹⁰⁹:

Εναρξη: R· (ελεύθερη ρίζα)

Διάδοση: R· + O₂ → ROO· (ρίζα υπεροξειδίου)

Τερματισμός: R· + R· → R-R

ROO· + R· → ROOR

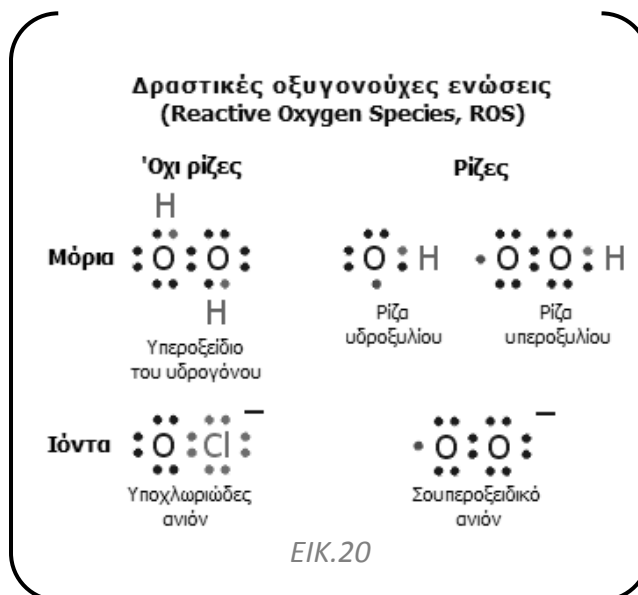
ROO· + ROO· → ROOR + O₂ (αδρανή προϊόντα)

A.4.1.2 Είδη ελευθέρων ριζών

Δραστικές μορφές οξυγόνου

Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS, Reactive Oxygen Species), ονομάζονται τα δραστικά μόρια που προκύπτουν από το μοριακό οξυγόνο ή τα μόρια και οι ενώσεις που μπορούν να μετατρέπονται εύκολα σε δραστικές μορφές και να συμμετέχουν σε τοξικές αντιδράσεις ¹¹⁵ [Εικ.20].

Είναι απαραίτητες για την κυτταρική σηματοδότηση και για την βακτηριακή άμυνα. Το υπεροξείδιο (O_2), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) και οι υδροξυλικές ρίζες είναι μερικές από τις τυπικές ενεργές μορφές οξυγόνου. Μερικές από αυτές έχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια και είναι ελεύθερες ρίζες, ενώ άλλες



όχι. Το H_2O_2 , το οποίο δεν είναι από μόνο του μια ελεύθερη ρίζα, αφού δε διαθέτει ασύζευκτα ηλεκτρόνια, θεωρείται μια δραστική μορφή οξυγόνου εξαιτίας της ικανότητάς του να παράγει υψηλά δραστικές μορφές υδροξυλίου μέσω αλληλεπιδράσεων με δραστικά μεταβατικά μέταλλα ^{116,117}. Η ρίζα υδροξυλίου αποτελεί την πιο δραστική μορφή οξυγόνου καθώς παραμένει ελεύθερη για μικροκλάσματα του δευτερολέπτου πριν συνδυαστεί με άλλα μόρια. Η πιο χαρακτηριστική αλυσιδωτή αντίδραση όπου συμμετέχει είναι η λιπιδική υπεροξειδωση. Αυτή λαμβάνει χώρα στις μεμβράνες όπου η ρίζα υδροξυλίου αφαιρεί υδρογόνα από τους άνθρακες των πλευρικών αλυσίδων των λιπαρών οξέων των μεμβρανών με ακόλουθες αλυσιδωτές αντιδράσεις ¹¹⁸⁻¹²⁰. Η πιο κοινή ρίζα στα βιολογικά συστήματα που αφορά την ρύθμιση λειτουργιών είναι το ανιόν υπεροπεροξειδίου ¹¹⁸⁻¹²⁰.

Δραστικές μορφές αζώτου ^{111,115, 118-120}

Δραστικές μορφές αζώτου (RNS, Reactive Nitrogen Species) ονομάζονται οι ελεύθερες ρίζες που περιέχουν άζωτο. Προέρχονται από το NO ύστερα από αντίδραση του με το O_2^- . Η πιο δραστική ρίζα αζώτου είναι η υπεροξυνιτρώδης ρίζα

ONOO⁻. Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου συμμετέχει στον έλεγχο αρκετών βασικών λειτουργιών η οποία παράγεται μέσα από την δράση της συνθετάσης του μονοξειδίου του αζώτου (NOS) στην L-αργινίνη.

A.4.1.3 Μηχανισμοί παραγωγής ελευθέρων ριζών

Οι εσωτερικοί μηχανισμοί παραγωγής ROS περιλαμβάνουν τα μιτοχόνδρια, τα υπεροξειδωμάτα, τα φαγοκύτταρα, την οξειδάση της ξανθίνης, το μονοπάτι του αραχιδονικού οξέος, διάφορα μέταλλα, την φλεγμονή, την ισχαιμία και την επαναιμάτωση¹¹⁹⁻¹²² και γενικά αντιδράσεις οξειδοαναγωγής που καταλύονται είτε από μεταλλικά ιόντα, είτε από ένζυμα.

Τα εξωτερικά ερεθίσματα που είναι ικανά να συντελέσουν στην παραγωγή ROS είναι ο καπνός του τσιγάρου, η UV ακτινοβολία, τα ναρκωτικά, η αιθανόλη (αλκοόλ), η αιθαλομίχλη, το όζον, διάφορα φάρμακα, οι βιομηχανικοί διαλύτες και άλλοι χημικοί παράγοντες¹¹⁹⁻¹²².

A.4.1.4 Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών

Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν σημαντικό ρόλο στην λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού, ταυτόχρονα όμως, μπορούν να ασκήσουν τοξική επίδραση σε αυτόν. Οι ζώντες οργανισμοί έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για την χρησιμοποίηση των ελευθέρων ριζών προς όφελος τους όταν αυτές βρίσκονται σε χαμηλή συγκέντρωση. Οι πιο σημαντικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν τις ρίζες ή τα παράγωγά τους είναι^{123,124}.

- Η ρύθμιση του καρδιακού τόνου (NO[•])
- Η ευαισθησία στη μερική πίεση του οξυγόνου και στην ρύθμιση των λειτουργιών που ελέγχονται από την συγκέντρωση του οξυγόνου (O₂[•] και παράγωγα)
- Η εξάρτηση της μεταγωγής σήματος από ποικιλία μεμβρανικών υποδοχέων, συμπεριλαμβανομένου του αντιγονικού υποδοχέα των λεμφοκυττάρων (O₂[•] και παράγωγα). Οι ελεύθερες ρίζες παίζουν ζωτικό ρόλο στη διάδοση των σημάτων (απαραίτητη για την επικοινωνία των κυττάρων).

- Οι αποκρίσεις οξειδωτικού στρες που εξασφαλίζουν την διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης ($O_2^{\cdot -}$ και παράγωγα).
- Η σύνθεση απαραίτητων συστατικών για τον οργανισμό
- Η φαγοκυττάρωση (σημαντική διεργασία του ανοσοποιητικού συστήματος)

Ωστόσο οι ελεύθερες ρίζες εμπλέκονται και στην παθογένεια πολλών ασθενειών όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση αλλά και στη γήρανση ¹¹¹ καθώς μπορούν να αντιδράσουν με τα μακρομόρια του οργανισμού, δηλαδή με τα λιπίδια (προκαλώντας υπεροξείδωση), τις πρωτεΐνες (προκαλώντας μετουσίωση), τους υδατάνθρακες (αποπολυμερισμός πολυσακχαριτών) και τα νουκλεϊνικά οξέα (οδηγώντας σε μεταλλάξεις) ¹²². Μέσω της **λιπιδικής υπεροξειδωσης** τροποποιούνται οι χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες (LDL) με αποτέλεσμα τη δημιουργία αρτηριοσκληρώσεως. Επίσης, με την **οξειδωση** προκαλείται καταστροφή των απολιποπρωτεϊνών B με αποτέλεσμα την σοβαρή τροποποίηση της LDL γεγονός που ενισχύει την ανάπτυξη αθηροσκλήρωσης. Τέλος οι ελεύθερες ρίζες επηρεάζουν την ομοιόσταση του ασβεστίου. Οι ΑΤΡάσες ασβεστίου περιέχουν θειοαλκοολικές ομάδες οι οποίες μπορούν να απενεργοποιηθούν από τις ROS. Η καταστροφή αυτή μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της παράγωγής ενέργειας για να αντισταθμιστεί η μείωση της ικανότητας των κυττάρων να διατηρήσουν ηλεκτροχημικό πρανάς των K, Na και Ca ¹²².

Ο ρόλος των ελευθέρων ριζών και των οξυγονούχων δραστικών ενώσεων (ROS) στην ενδοκυτταρική μεταγωγή σημάτων και ενδεχομένως στη γήρανση των κυττάρων²²³⁻²³⁰

Το H_2O_2 αποτελεί παραπροϊόν της αερόβιας ζωής των έμβιων όντων, μέρος της αλυσίδας των αντιδράσεων του οξυγόνου σε αναγωγικο-οξειδωτικές φυσιολογικές λειτουργίες (ενζυμικές και μη). Σχετικά πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι το H_2O_2 είναι απαραίτητο στην κυτταρική λειτουργία. Ως ουδέτερο μικρό μόριο διαχέεται εύκολα μέσω των κυτταρικών μεμβρανών, αλλά επίσης παράγεται και απομακρύνεται εύκολα με μια σειρά φυσιολογικών διεργασιών. Η ιδιότητα αυτές καθιστούν το H_2O_2 ιδανικό για τη ρύθμιση της μεταγωγής (signal transduction) βιολογικών σημάτων μέσω αλυσίδας αντιδράσεων φωσφορυλίωσης/αποφωσφορυλίωσης, που καταλύονται από πρωτεϊνικές κινάσες και φωσφατάσες.

Μια ενδιαφέρουσα πλευρά της φυσιολογικής δράσης του H_2O_2 που προσπαθούν να κατανοήσουν οι επιστήμονες, είναι οι μηχανισμοί ενεργοποίησης των πρωτεϊνών που συμμετέχουν στη μεταβίβαση ή μεταγωγή ενδοκυτταρικών σημάτων. Οι βιολογικές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις όπου μετέχει το H_2O_2 περιλαμβάνουν κυρίως την οξείδωση της ομάδας -SH της κυστεΐνης των πρωτεϊνών. Η οξείδωση αυτή απενεργοποιεί τις **φωσφατάσες**. Οι πρωτεϊνικές φωσφατάσες και κινάσες της τυροσίνης είναι ένζυμα απαραίτητα για τη φωσφορυλίωση της τυροσίνης των πρωτεϊνών. Η οξειδωτική απενεργοποίηση των φωσφατασών και η αυξημένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών τυροσίνης έχει αποδειχθεί ότι εξαρτάται από την παραγωγή H_2O_2 στα κυτταρικά διαμερίσματα με τη βοήθεια αυξητικών παραγόντων. Στις λειτουργίες αυτές το H_2O_2 δρα ως **μεταγωγέας** (transducer) σημάτων.

Τεκμηριώθηκε, ακόμη, ότι το H_2O_2 συμμετέχει ενεργά στην **οξειδοαναγωγική μεταβίβαση σημάτων** (cellular redox signaling) στα κύτταρα, που αποτελεί σημαντικό φυσιολογικό μηχανισμό, αλλά και προαγωγό προβλημάτων, όπως είναι η αγγειογένεση, το οξειδωτικό στρες, η κυτταρική γήρανση και διάφορες κακοήθειες νεοπλασίες.

A.4.2 Οξειδωτικό στρες

Μια ανισορροπία μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών υπέρ των οξειδωτικών, που δυνητικά οδηγεί σε βλάβη (οξειδωτική βλάβη), αποκαλείται «οξειδωτικό στρες»¹²⁵⁻¹²⁷. Ως οξειδωτική βλάβη ορίζεται η ζημία που προκαλείται από βιομοριακή επίθεση των ελευθέρων ριζών κατά των συστατικών των ζωντανών οργανισμών¹²⁸. Αυξημένα επίπεδα οξειδωτικής βλάβης μπορεί να προκληθούν όχι μόνο από το οξειδωτικό στρες, αλλά και από την αποτυχία επιδιόρθωσης ή αντικατάστασης των συστημάτων, π.χ. η άνοδος της στάθμης των «βιολογικών δεικτών» της οξειδωτικής βλάβης δεν χρειάζεται να συνεπάγεται πάντα ένα υψηλότερο επίπεδο του οξειδωτικού στρες^{113,128}. Η πιθανή μη επιλεκτική φύση της οξειδωτικής βλάβης είναι ένα χαρακτηριστικό που συνάδει με την θεωρία της γήρανσης που βασίζεται στις ελεύθερες ρίζες¹¹³: ακόμα και ο γενετικά ομοιόμορφος *Caenorhabditis elegans* διατηρούμενος υπό παρόμοιες συνθήκες εργαστηρίου έδειξε μια εντυπωσιακή τυχαιότητα στη γήρανση και τον θάνατο¹²⁹, και οι γενετικοί χειρισμοί που

ενισχύουν/ συμβάλλουν στη μακροζωία φαίνεται να ενεργούν, εν μέρει, αυξάνοντας τα επίπεδα αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού ¹³⁰.

Από μια μηχανιστική άποψη, το οξειδωτικό στρες θα μπορούσε να οριστεί και ως μία διαταραχή της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου ¹³¹. Υιοθέτηση ενός τέτοιου ορισμού θα μπορούσε να ανακατευθύνει την έρευνα για τον εντοπισμό βασικών διαταραχών της οξειδοαναγωγικής σηματοδότησης και ελέγχου και να οδηγήσει σε νέες θεραπείες για ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες ¹³¹.

Α.4.2.1 Παράγοντες που συντελούν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες ¹³²

ΕΝΔΟΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	ΕΞΩΓΕΝΕΙΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ
• Φυσική δραστηριότητα- καθιστικός τρόπος ζωής • Φυσιολογικό στρες της καθημερινότητας • Φλεγμονή (παροδική μόλυνση- χρόνια ασθένεια) • Καρκίνος • Ισχαιμία / Επαναιμάτωση • Κυτταρικός θάνατος	1. <u>Κατανάλωση τροφής</u> * Διατροφή πλούσια σε λίπος ή πρωτεΐνη * Χαμηλή κατανάλωση αντιοξειδωτικών * Κατανάλωση αλκοόλ/ Καφέ 2. <u>Αερομεταφερόμενοι ρύποι</u> * Καπνός τσιγάρου * Μόλυνση του αέρα (SO₂, NO₂, O₃) * Μεταβατικά μέταλλα, αμίαντος 3. <u>Φαρμακευτική αγωγή</u> * Αντικαρκινικά φάρμακα 4. <u>Ακτινοβολία</u> * Ιονίζουσα ακτινοβολία * Υπεριώδης ακτινοβολία * Μικροκύματα
<i>Πίνακας 2</i>	

Το οξειδωτικό στρες μπορεί να οφείλεται στην αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών, στην αδυναμία του αντιοξειδωτικού συστήματος να απομακρύνει τις ελεύθερες ρίζες (λόγω μειωμένης πρόσληψης ή παραγωγής αντιοξειδωτικών), ή σε συνδυασμό των παραπάνω. Ποικίλοι παράγοντες όπως ο τρόπος ζωής, η διατροφή, το περιβάλλον και η κληρονομικότητα μπορούν να προκαλέσουν διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των προοξειδωτικών μηχανισμών και των αντιοξειδωτικών μηχανισμών εις βάρος των δεύτερων. Πιο αναλυτικά, οι παράγοντες που επάγουν την εμφάνιση του οξειδωτικού στρες μπορούν να διαχωριστούν σε ενδογενείς και εξωγενείς [πίνακας 2].

A.4.2.2 Ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες εμπλέκεται στην παθογένεια πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, του καρκίνου, της καρδιαγγειακής νόσου, των νευρολογικών διαταραχών, του σακχαρώδους διαβήτη, της ισχαιμίας, ασθενειών του αναπνευστικού συστήματος καθώς και στην γήρανση^{123,133-137}. Αυτές οι ασθένειες μπορούν να διαιρεθούν σε δύο κατηγορίες¹²³:

Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει ασθένειες όπως ο καρκίνος και ο σακχαρώδης διαβήτης που χαρακτηρίζονται από αυξημένη συγκέντρωση προ-οξειδωτικών τα οποία μεταβάλλουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των θειοαλκοολικών ή δισουλφιδικών ομάδων αλλοιώνοντας την ανεκτικότητα στην γλυκόζη. Αποκαλείται και **μιτοχονδριακό οξειδωτικό στρες**.

Η δεύτερη ομάδα χαρακτηρίζεται από **φλεγμονώδες οξειδωτικό στρες** και ενισχύει την δραστηριότητα είτε της NAD(P)H οξειδάσης είτε της οξειδάσης της ξανθίνης.

Πιο αναλυτικά:

- Καρκίνος: Έχει αποδειχθεί πως στα καρκινικά κύτταρα υπάρχει μεγαλύτερη ανισορροπία μεταξύ των οξειδοαναγωγικών μηχανισμών σε σύγκριση με τα φυσιολογικά κύτταρα, το οποίο επιβεβαιώνει την συσχέτιση με το οξειδωτικό στρες. Η μόνιμη αλλοίωση του γενετικού υλικού ως αποτέλεσμα της οξειδωτικής καταστροφής αποτελεί το πρώτο βήμα για την καρκινογένεση και την γήρανση.

- **Σακχαρώδης Διαβήτης:** Η μειωμένη αφομοίωση της γλυκόζης στον μυϊκό και των λιπώδη ιστό οδηγεί σε χρόνια εξωκυττάρια υπεργλυκαιμία η οποία έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του ιστού και παθοφυσιολογικές επιπλοκές που περιλαμβάνουν καρδιοπάθειες, αθηροσκλήρωση, εμφάνιση καταρράκτη, περιφερική νευρική βλάβη. Το αυξημένο οξειδωτικό στρες έχει προταθεί να αποτελεί έναν από τους κυριότερους παράγοντες για την εμφάνιση υπεργλυκαιμίας. Μάλιστα, το γεγονός ότι ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλείται σε μεγάλο βαθμό από οξειδωτική βλάβη, ίσως επιβεβαιώνεται και από την απόδειξη ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών μπορεί να έχει παρόμοια αποτελέσματα με αυτήν της χορήγησης ινσουλίνης¹³⁸.
- **Ισχαιμία:** Παρότι κατά την ισχαιμία η πίεση του οξυγόνου είναι χαμηλή, παρατηρείται μια ήπιας μορφής παραγωγή ROS πιθανόν από τα μιτοχόνδρια.
- **Ρευματοειδής αρθρίτιδα:** Η παθογένεση της ασθένειας συνδέεται κυρίως με τον σχηματισμό των ελευθέρων ριζών στο σημείο της φλεγμονής.
- **Νευρολογικές διαταραχές:** Ο εγκέφαλος είναι ιδιαίτερα ευάλωτος στην οξείδωση εξαιτίας την χρησιμοποίησης μεγάλων ποσών οξυγόνου, την μεγάλη περιεκτικότητα σε PUFA και την παρουσία οξειδοαναγωγικών μετάλλων όπως ο σίδηρος και ο χαλκός. Οι δύο κυριότερες ασθένειες που έχουν μελετηθεί είναι το Alzheimer και η νόσος του Parkinson.
- **Καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD):** Το οξειδωτικό στρες στα καρδιακά και αγγειακά μυοκύτταρα έχει συνδεθεί με τον τραυματισμό του καρδιαγγειακού ιστού. Οι κυριότερες πηγές οξειδωτικού στρες στο σύστημα αυτό είναι: τα ενζυμα της οξειδοαναγωγής της ξανθίνης, η NAD(P)H οξειδάση, η συνθετάση του οξειδίου του αζώτου και η αιμογλουβίνη. Οι δύο τελευταίες πηγές οδηγούν στην παραγωγή RNS.

A.4.2.3 Θετικές επιδράσεις του οξειδωτικού στρες

Η παραγωγή ελευθέρων ριζών σε σημεία φλεγμονής μπορεί όχι μόνο να καταστρέψει εισερχόμενους παθογόνους οργανισμούς, αλλά επίσης να βοηθήσει στη διαμόρφωση μιας έντονης φλεγμονώδους αντίδρασης σε ορισμένες περιπτώσεις¹³⁹.

A.4.3 Αντιοξειδωτικά

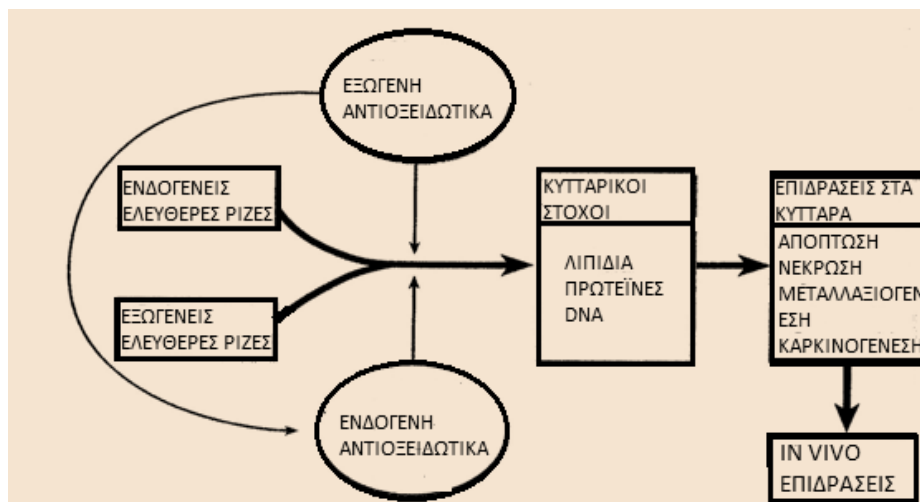
Είναι γεγονός ότι το οξυγόνο είναι δηλητηριώδες, και οι αερόβιοι οργανισμοί επιβιώνουν επειδή διαθέτουν αντιοξειδωτικές άμυνες ¹¹³. Ως αντιοξειδωτικό ορίζεται κάθε οξειδοαναγωγικά ενεργό σώμα, που καθυστερεί, αποτρέπει ή και εμποδίζει την οξειδωτική βλάβη σε ένα μόριο-στόχο δρώντας μη ενζυματικά με ένα αντιδραστικό οξειδωτικό ¹¹³ ή καλύτερα, κάθε ουσία η οποία όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις, σε σχέση με αυτές των υπό οξείδωση υποστρωμάτων, καθυστερεί ή παρεμποδίζει σημαντικά την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων ¹⁴⁰⁻¹⁴². Ως **αντιοξειδωτικό ένζυμο** ορίζεται μια πρωτεΐνη, η οποία μπορεί να περιορίζει το οξειδωτικό στρες καταλύοντας μια οξειδοαναγωγική αντίδραση με ένα αντιδραστικό οξειδωτικό ⁶⁹. Επομένως τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι είτε ενδογενή (να παράγονται μέσα στον οργανισμό) –ενζυμικά ή μη ενζυμικά-, είτε εξωγενή ¹⁴³ [πίνακας 3].

ΜΗ ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ENZYMΙΚΑ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ	ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΜΕΤΑΛΛΑ ΚΑΙ ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ ^{120,155}
• Βιταμίνη E ^{118,122,144} • Β- καροτένιο ^{144,145} • Βιταμίνη C (Ασκορβικό οξύ) ^{138,144,145} • Λυκοπένιο ¹⁴⁴ • Ουβικινόλη, Ουβικινόνη ^{107,146} • Ουρικό οξύ ^{107,147,148} • Λιποϊκό οξύ • μεταλλοδεσμευτικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανόμενης της αλβουμίνης, της σιδηροδεσμευτικής πρωτεΐνης (τρανσφερίνη, σερουροπλασμίνη, λακτοφερίνη) και της αιμοσφαιρίνης ^{144,149-153} • Ορμόνες με αντιοξειδωτική δράση όπως μελατονίνη και DHEA (διυδροεπιανδροστερόνη) • Φλαβονοειδή ¹⁵⁴ • Γλουταθειόνη (GSH) ¹⁴⁸	• Υπεροξειδική δισμουτάση ^{148,155} • NADPH • F-Καταλάση ¹⁴⁸ • Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GSH-Px) ¹⁴⁸	• Ψευδάργυρος • Μαγνήσιο • Μαγγάνιο • Χαλκός • Σελήνιο ¹⁵⁶
Πίνακας 3 Ταξινόμηση αντιοξειδωτικών		

A.4.3.1 Τρόπος δράσης των αντιοξειδωτικών

Η προστασία του κυττάρου απέναντι στις δραστικές οξειδωτικές ενώσεις του αερόβιου μεταβολισμού οργανώνεται σε τρία επίπεδα: Πρόληψη, Αλληλεπίδραση και Επιδιόρθωση ¹⁵⁷. Η κύρια λειτουργία των αντιοξειδωτικών είναι να δρουν σαν συντονισμένο και ισορροπημένο σύστημα για την προστασία των ιστών και των υγρών του σώματος από τις βλάβες που μπορεί να προκαλέσουν οι ROS/RNS/RCS

είτε αυτές έχουν παραχθεί φυσιολογικά είτε σαν απάντηση σε λοίμωξη, σε φλεγμονή ή ασθένεια ¹²⁰ [Εικ. 21].



Εικ.21 Τα ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά συντονίζονται για την προστασία του οργανισμού από βλάβες οφειλόμενες σε ελεύθερες ρίζες.

Πιο αναλυτικά τα αντιοξειδωτικά μπορούν ¹⁵⁷:

Να δράσουν προληπτικά:

- Εμποδίζοντας τον σχηματισμό των δραστικών ριζών και περιορίζοντας τη μετατροπή τους ¹⁴⁴
- Αποτρέποντας την έναρξη των αλυσιδωτών αντιδράσεων μέσω δέσμευσης των μεταλλικών ιόντων, συγκεκριμένα του σιδήρου και του χαλκού, σε μόρια όπως η φερριτίνη, η τρανσφερρίνη, η σερουλοπλασμίνη και η μεταλλοθειόνη. Με αυτό τον τρόπο ελέγχεται κυρίως η λιπιδική υπεροξείδωση και ο κατακερματισμός του DNA.

Να αλληλεπιδράσουν με οξειδωτικές ουσίες:

- Απενεργοποιώντας τις δραστικές μορφές ριζών ¹⁴⁴ μετά από την δημιουργία σταθερών προϊόντων

- Μεταφέροντας τις ρίζες σε σημεία όπου η δραστηριότητά τους δεν θα είναι τόσο επιβλαβής (π.χ. μεταφορά τους από υδροφοβες περιοχές σε υδατικές)

Να δράσουν επιδιορθωτικά:

- Διορθώνοντας την καταστροφή που έγινε στο υπόστρωμα ¹⁴⁴
- Εξαφανίζοντας μόρια τα οποία έχουν καταστραφεί ολοσχερώς και αντικαθιστώντας τα με καινούρια ¹⁴⁴

A.4.3.2 Αντιοξειδωτικά φυτικής προελεύσεως

Τα χημικά συστατικά των φυτικών κυττάρων τα οποία εκδηλώνουν βιολογικές δράσεις σε ανθρώπινα και ζωικά κύτταρα, ανάλογα με την σχετική τους συγκέντρωση στα φυτά και την πρωταρχική λειτουργία τους, κατανέμονται σε δύο κύριες ομάδες: στους **πρωτογενείς μεταβολίτες**, η συσσώρευση των οποίων καλύπτει θρεπτικές και δομικές ανάγκες και στους **δευτερογενείς μεταβολίτες** που δρουν ως ορμόνες, φαρμακευτικές ουσίες και τοξίνες ¹⁵⁸. Οι πρωτογενείς μεταβολίτες απαντώνται κυρίως ως συστατικά μακρομορίων, όπως η κελλουλόζη ή η αμυλόζη, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων και περιέχουν κυρίως άνθρακα, άζωτο και φώσφορο, στοιχεία τα οποία μετασχηματίζονται μέσα στο φυτικό κύτταρο μέσω τριών κύριων καταβολικών οδών: την γλυκόλυση, την οδό των φωσφορικών πεντοζών και των κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων. Όσον αφορά τους δευτερογενείς μεταβολίτες, πρόκειται για ενώσεις που ανήκουν σε εξαιρετικά διαφοροποιημένες χημικές ομάδες, όπως οργανικά οξέα, αρωματικές ενώσεις, τερπένια, στεροειδή, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, κ.α. Η δράση τους στα φυτά συνήθως σχετίζεται με την ρύθμιση του μεταβολισμού και/ή της αύξησης, την απόδοση του αρώματος και του χρωματισμού των τμημάτων του φυτού και την προστασία έναντι παθογόνων οργανισμών. Αν και ο δευτερογενής μεταβολισμός γενικά αποτελεί το 10% του συνολικού μεταβολισμού στα φυτά, εντούτοις τα προϊόντα του αποτελούν τα κύρια συστατικά με φαρμακολογική δράση ¹⁵⁹.

A.4.3.3 Πολυφαινολικές ενώσεις

Ουσίες που απαντούν στην φύση και οι οποίες έχουν ένα τουλάχιστον κοινό αρωματικό δακτύλιο, που φέρει ένα ή περισσότερα φαινολικά υδροξύλια συνδεδεμένα με τους δακτυλίους. Πολλοί ερευνητές έδειξαν ότι οι πολυφαινόλες

είναι αντιοξειδωτικά με οξειδοαναγωγικές ιδιότητες που τους επιτρέπουν να δρουν ως αναγωγικά μέσα, δότες υδρογόνου και αναστολείς ενεργών μορφών οξυγόνου ¹⁶⁰. Η αντιοξειδωτική ικανότητα των φαινολικών ενώσεων είναι η πρώτη που μελετήθηκε ¹⁶¹. Τα φαινολικά αντιοξειδωτικά είναι σημαντικοί εκκαθαριστές πολλών οξειδωτικών μορίων όπως του ατομικού οξυγόνου και πολλών ελευθέρων ριζών, τα οποία εμπλέκονται στην καταστροφή του DNA. Συγκεκριμένα, ανενεργοποιούν τις ελεύθερες ρίζες αντιδρώντας με αυτές και σχηματίζουν ενώσεις που δεν έχουν την τάση να δίνουν νέες ελεύθερες ρίζες. Επιπλέον, *in vitro* έρευνες έχουν δείξει ότι φαινολικές ενώσεις όπως οι κατεχίνες που περιέχονται στο τσάι, συμβάλλουν στην αύξηση της δράσης αρκετών οξειδωτικών ενζύμων, όπως της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, της καταλάσης και της αναγωγάσης της κινόνης ¹⁶². Τέλος πολλές φαινολικές ενώσεις εμφανίζουν επίσης σημαντική αντιφλεγμονώδη δράση αναστέλοντας το ένζυμο της κυκλοοξυγενάσης (COX-2) και της συνθετάσης του νιτρικού οξέος.

Η αντιοξειδωτική δράση των φαινολικών συστατικών, όπως προαναφέρθηκε, έγκειται στη δέσμευση των διαφόρων ελευθέρων ριζών αζώτου ή οξυγόνου, όπως υπεροξειδικές, υδροξυλικές κτλ. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα α) την προστασία των μεμβρανικών λιπιδίων των ενδοθηλιακών κυττάρων από την υπεροξειδωση, β) την διασφάλιση διαφόρων ενδοθηλιακών παραγόντων, όπως η προστακυκλίνη, από πιθανή καταστροφή, γ) την αποτροπή οξείδωσης της LDL, δ) τη διέγερση των ενδογενών αντιοξειδωτικών ενζύμων κατά του οξειδωτικού stress ε) την αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης και της NADPH οξειδάσης, ενζύμων που κινητοποιούν την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ROS και στ) την προστασία από την οξείδωση ενός σημαντικού παράγοντα παραγωγής NO, του συμπαράγοντα της τραυδροβιοπρωτεΐνης, με συνέπεια την αποτροπή ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας ^{163,164}.

Οι πολυφαινολικές ενώσεις είναι ευρέως διαδεδομένες στα φυτικά προϊόντα και διακρίνονται σε δεκατέσσερις μεγάλες κατηγορίες: απλές φαινόλες, βενζοκινόνες, φαινολικά οξέα, ακετοφαινόλες, φαινυλοξικά οξέα, φαινυλοπροπανοειδή, (υδροξυ)κιναμμωμικά οξέα, κουμαρίνες, χρωμόνες, ναφθοκινόνες, ξανθόνες, στυλβένια, ανθρακινόνες, φλαβονοειδή και λιγνάνες ¹⁶⁵. Τα φαινολικά οξέα και τα φλαβονοειδή, βασικές κατηγορίες φαινολικών ενώσεων, **είναι δευτερογενείς**

μεταβολίτες που παράγονται από τη φαινυλαλανίνη, μέσω της βιοσυνθετικής οδού του σικιμικού οξέος, από το γενικό βιοσυνθετικό μονοπάτι του φαινυλοπροπανίου και το ειδικό μονοπάτι σύνθεσης των φλαβονοειδών¹⁶⁶. Σημαντικές πηγές των πολυφαινολών είναι τα κρεμμύδια (φλαβονόλες), το κακάο, οι σπόροι σταφυλιών (προανθοκυανιδίνες), το τσάι, τα μήλα, και το κόκκινο κρασί (φλαβονόλες και κατεχίνες), τα εσπεριδοειδή (φλαβανόνες), τα μούρα και τα κεράσια (ανθοκυανίνες), η σόγια (ισοφλαβόνες)¹⁶⁷.

A.4.3.3.1. Αντιηλιακή δράση πολυφαινολών¹⁸

Οι περισσότερες από τις πολυφαινόλες είναι φυσικές χρωστικές ουσίες, συνήθως κίτρινες, κόκκινες ή μοβ, και μπορεί να απορροφούν την υπεριώδη ακτινοβολία. Επομένως, όταν εφαρμόζονται τοπικά, μπορούν να αποτρέψουν τη διείσδυση της ακτινοβολίας στο δέρμα. Οι πολυφαινόλες μπορούν να απορροφήσουν ακτινοβολία που περιλαμβάνει όλο το φάσμα των μηκών κύματος της UVB και μέρος των φασμάτων UVC και UVA. Έτσι οι πολυφαινόλες μπορούν να λειτουργήσουν ως αντιηλιακό. Αυτή η ικανότητα των φυσικών πολυφαινολών να ενεργούν ως αντιηλιακά μπορεί να μειώσει τη φλεγμονή, το οξειδωτικό στρες και βλαβερές συνέπειες στο DNA από την επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας στο δέρμα.

A.4.3.3.2. Αντιφλεγμονώδης δράση πολυφαινολών

Η έκφραση της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2) και η επακόλουθη αύξηση της παραγωγής των μεταβολιτών της προσταγλανδίνης (PG) στο δέρμα, αποτελούν χαρακτηριστικές αντιδράσεις των κερατινοκυττάρων σε οξεία ή χρόνια έκθεση σε ακτινοβολία UVB. Η COX-2 είναι ένα ένζυμο υπεύθυνο για την παραγωγή PG μεταβολιτών από το αραχιδονικό οξύ¹⁶⁸, και η έκφρασή της συνδέεται με την παθοφυσιολογία της φλεγμονής¹⁶⁹. Μια σειρά μελετών έχουν δείξει υπερέκφραση της COX-2 σε χρόνια έκθεση του δέρματος σε UVB-ακτινοβολία^{170,171}. Η τοπική εφαρμογή πολυφαινολών πριν από την έκθεση στην UVB ακτινοβολία μειώνει την υπερπλαστική απόκριση που προκαλείται από την ακτινοβολία UV, την δραστηριότητα της μυελοϋπεροξειδάσης και τον αριθμό των διεισδόμενων φλεγμονωδών λευκοκυττάρων στο δέρμα¹⁷²⁻¹⁷⁹. Επίσης η τοπική εφαρμογή τους έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της προκαλούμενης από την UVB παραγωγής των προσταγλανδινών μεταβολιτών, συμπεριλαμβανομένων των PGE2, PGF2α και PGD2, οι οποίες διαδραματίζουν έναν κρίσιμο ρόλο σε φλεγμονώδεις παθήσεις και

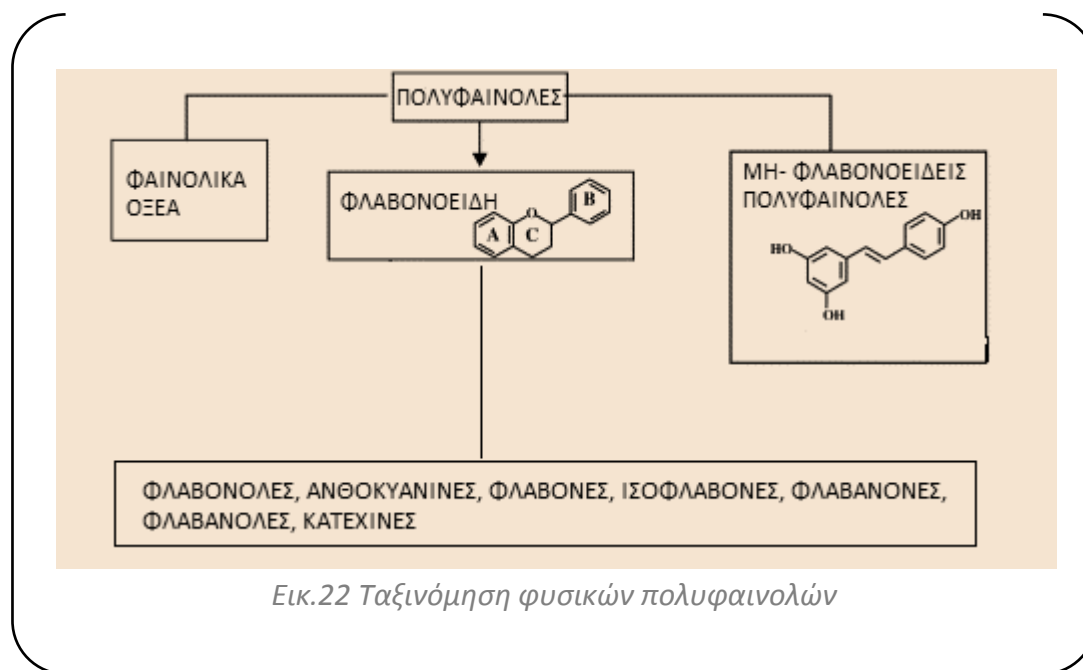
στην πολλαπλασιαζόμενες ασθένειες του δέρματος ¹⁷⁶. Αν και η έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία είναι γνωστό ότι αυξάνει τα επίπεδα των προφλεγμονωδών κυτταροκινών, πειράματα δείχνουν την ανασταλτική δράση των πολυφαινολών στις UVB- προκαλούμενες φλεγμονώδεις αντιδράσεις.

A.4.3.3.3. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών

Τοπική θεραπεία μυός αλλά και ανθρώπινου δέρματος με πολυφαινόλες πριν από την έκθεση στην UV ακτινοβολία φαίνεται να μειώνει σημαντικά την UVB- προκαλούμενη παραγωγή μονοξειδίου του αζώτου και υπεροξειδίου του υδρογόνου ^{176,177,180}. Είναι αποδεδειγμένο ότι τα διεισδούμενα λευκοκύτταρα είναι η κύρια πηγή του μονοξειδίου του αζώτου και του υδρογόνου του υπεροξειδίου, τα οποία δημιουργούν την κατάσταση του οξειδωτικού στρες. Οι πολυφαινόλες φαίνεται ότι έχουν τη δυνατότητα να μπλοκάρουν τη UVB-προκαλούμενη διήθηση λευκοκυττάρων στους μύες, καθώς και στο ανθρώπινο δέρμα ^{174,176,177,181}. Έτσι, η εφαρμογή τους μπορεί να αποδειχθεί ευεργετική στην άμβλυνση των επιβλαβών επιπτώσεων που προκαλούνται από την ακτινοβολία UVB χάρη στην ικανότητά του να μειώσει την παραγωγή των δραστικών μορφών οξυγόνου. Η θεραπεία με πολυφαινόλες επίσης έχει αποδειχθεί ότι οδηγεί σε μείωση του παραγόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου και μονοξειδίου του αζώτου, τόσο στην επιδερμίδα όσο και στο χόριο των UVB- ακτινοβοληθέντων σημεία του δέρματος ¹⁷⁷. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επίσης παρατηρηθεί σε ανθρώπινο δέρμα όταν πολυφαινόλες εφαρμόζονται τοπικά πριν από την έκθεση σε ακτινοβολία UVB (4x ελάχιστη δόση ερυθρήματος) ¹⁸¹. Αυτή η θεραπεία επιπλέον αναστέλλει την UV- προκαλούμενη επιδερμική υπεροξείδωση των λιπιδίων και προστατεύει τα αντιοξειδωτικά ένζυμα οργανισμού στις περιοχές του δέρματος που είναι εκτεθειμένες στην UVB ¹⁸¹. Διαπίστωσαν, ακόμη, ότι η θεραπεία με πολυφαινόλες των ανθρώπινων ινοβλαστών σε καλλιέργεια μπλοκάρει την υπεριώδη ακτινοβολία που προκαλεί αύξηση στην έκκριση κολλαγόνου και των επιπέδων της mRNA κολλαγενάσης ¹⁸².

Αξίζει επίσης να αναφερθούμε σε έναν άλλο ευρέως αποδεκτό δείκτη της οξειδωτικής βλάβης των πρωτεϊνών κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες: η παρουσία ομάδων καρβονυλίου σε πρωτεΐνες. Οξείδωση ορισμένων αμινοξέων, όπως η λυσίνη, η αργινίνη και η προλίνη, οδηγεί στο σχηματισμό παραγώγων καρβονυλίου που επηρεάζουν τη φύση και τη λειτουργία των πρωτεϊνών ¹⁸³. Πολλαπλή έκθεση του δέρματος στην υπεριώδη ακτινοβολία οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των

πρωτεϊνικών καρβονύλων σε σύγκριση με το μη-εκτεθειμένο δέρμα σε UV. Σε ξεχωριστά πειράματα, έχει αποδειχθεί ότι η τοπική θεραπεία με πολυφαινόλες αναστέλλει σημαντικά την οξειδωση των πρωτεϊνών στο δέρμα των μυών ύστερα από έκθεση σε οξεία ή χρόνια UV ακτινοβολία ^{184,185}. Η αναστολή της οξειδωσης των πρωτεϊνών που οφείλεται στη UVB, από πολυφαινόλες θα μπορούσε να οδηγήσει σε μείωση της φωτογήρανσης του δέρματος και, πιο συγκεκριμένα, μπορεί να εμποδίσει την πρόωρη γήρανση του δέρματος. Το UVB- προκαλούμενο οξειδωτικό στρες μεσολαβεί στην ενεργοποίηση των μιτογόνων πρωτεϊνικών κινασών (MAPK) και των NF-κB (nuclear factor-kappaB) μονοπατιών. Διαπιστώθηκε ότι η θεραπεία με πολυφαινόλες ανέστειλε την UVB- προκαλούμενη φωσφορυλίωση της εξωκυττάριας σήματο- ρυθμιζόμενης κινάσης 1/2 (ERK1/2), της c-Jun-N-τελικής-κινάσης και των p38 πρωτεϊνών της οικογένειας MAPK, η οποία φαινόταν να μεσολαβείται από την επανενεργοποίηση των MAPK φωσφατάσεων ¹⁸⁴. Έχει, ακόμη, αποδειχθεί ότι οι πολυφαινόλες μπορούν να εμποδίσουν την UVB -προκαλούμενη ενεργοποίηση του NF-κB μέσω της αναστολής της υποβάθμισης της IκBa και της ενεργοποίησης της κινάσης IκBa. Χρησιμοποιώντας ένα πανομοιότυπο μοντέλο μυός, έχει επίσης αποδειχθεί ότι η διαιτητική χορήγηση πολυφαινολών οδήγησε σε αναστολή της έκφρασης του PCNA, cyclin D1, επαγωγίσιμης συνθετάσης του νιτρικού οξειδίου (iNOS) και COX-2 στο δέρμα, οι οποίες είναι NF-κB στοχευμένες πρωτεΐνες. Παρόμοιες μελέτες διεξήχθησαν *in vitro* χρησιμοποιώντας φυσιολογικά ανθρώπινα επιδερμικά κερατινοκύτταρα με και χωρίς θεραπεία με πολυφαινόλες και την ακτινοβολία UVB. Τα αποτελέσματα ήταν όμοια με εκείνα που λαμβάνονται στο μοντέλο μυός, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα αποτελέσματα της φωτοπροστασίας των πολυφαινολών που προέκυψαν από το ζωικό μοντέλο μπορούν να προβληθούν και για το ανθρώπινο σύστημα ¹⁸⁶. Μελέτες, επίσης, έχουν διεξαχθεί για τον προσδιορισμό της επίδρασης των ολιγομερών προανθοκυανιδίων σε UV- προκαλούμενη μελανογένεση σε ανθρώπινα μελανοκύτταρα *in vitro* και τα αποτελέσματα δείχνουν την πιθανή φωτοπροστατευτική τους δράση στα ανθρώπινα μελανοκύτταρα συμπεριλαμβανομένης της απομάκρυνσης των ενδοκυττάρων αντιδραστικών ειδών οξυγόνου και της προσαρμογής των σημείων ελέγχου του κυτταρικού κύκλου ¹⁸⁷.



Τα **Φλαβονοειδή**, κύρια ομάδα των πολυφαινολών, έχουν ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες και είναι ικανά να αντιδρούν με μεγάλο αριθμό δραστικών μορφών οξυγόνου, αζώτου και χλωρίου. Ακόμα, είναι ικανά να περιορίζουν την προ-οξειδωτική δραστηριότητα των μεταλλικών ιόντων. Τέλος αναστέλλουν την ικανότητα της μυελοϋπεροξειδάσης να οξειδώνει την LDL, με αποτέλεσμα να διαδραματίζουν έναν πιθανό αντί-αθηροσκληρωτικό ρόλο ¹⁵⁴.

Ανθοκυανιδίνες: η μεγαλύτερη ομάδα υδατοδιαλυτών χρωστικών (κόκκινες) του φυτικού βασιλείου και ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών. Διαθέτουν μια ευρεία ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονται αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή και αντικαρκινική ^{188,189}. Επιπλέον, ασκούν ποικίλα αποτελέσματα στα αιμοφόρα αγγεία, τα αιμοπετάλια και στις **λιποπρωτεΐνες**, που είναι ικανές να περιορίσουν τον κίνδυνο των νόσων των στεφανιαίων αγγείων της καρδιάς. Επίσης σειρά επιδημιολογικών μελετών αναδुकνύει το ρόλο των πολυφαινολών του κρασιού (ρεσβερατρόλη, ανθοκυανιδίνες κτλ) στην αποτροπή τροποποίησης της LDL ¹⁹⁰.

Προανθοκυανιδίνες: ομάδα φλαβονοειδών συμπλεγμάτων που δρουν ως αντιοξειδωτικά στον ανθρώπινο οργανισμό. Εμποδίζουν τα σωματικά ένζυμα που διασπούν το κολλαγόνο καθώς βοηθούν στην επιδιόρθωση και σωστή αναδόμηση του κολλαγόνου αναστρέφοντας με αυτό τον τρόπο την ζημιά που προκαλείται με την

πάροδο των χρόνων από τραυματισμούς και επίθεση ελεύθερων ριζών. Οι προανθοκυανιδίνες βοηθούν να διατηρήσει το δέρμα την ελαστικότητα και την ομαλότητά του. Επίσης, δρουν προστατευτικά (αντιοξειδωτική δράση) έναντι των περιβαλλοντολογικών τοξινών, όπως η ακτινοβολία, τα εντομοκτόνα, η μόλυνση, τα βαρέα μέταλλα κτλ. που ευθύνονται για την παραγωγή ελεύθερων ριζών.

Α.4.3.4 Αντιοξειδωτικά που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία

Pinus halepensis:

Στην παρούσα εργασία εφαρμόστηκε τοπικά υδαταλκοολικό εκχύλισμα φλοιού του πεύκου *Pinus halepensis* που εντοπίζεται στην κεντρική και νότια Ευρώπη (Γερμανία, Ισπανία, Ελλάδα) και κυρίως στα παράλια της Μεσογείου αλλά και στη Βόρεια Αφρική και χαρακτηρίζεται για τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες¹⁹¹⁻¹⁹⁴. Ο φλοιός του πεύκου είναι μια σημαντική πηγή πολυφαινόλων και αποτελείται κυρίως από προανθοκυανιδίνες¹⁹⁵.



Εικ.23 *Pinus Halepensis*

Tayberry:

Επίσης εφαρμόστηκε τοπικά και υδαταλκοολικό εκχύλισμα tayberry που προέρχεται από το φυτό *Rubus longanobaccus*, διασταύρωση δύο ειδών βατόμουρου, του raspberry και του blackberry που έχουν μελετηθεί για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες που οφείλονται στο πλούσιο περιεχόμενό τους σε φλαβονοειδή, και ιδίως

ανθοκυανίνες και ανθοκυανιδίνες^{189,196}. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε ανθοκυανιδίνες, κυανιδινικά παράγωγα, ασκορβικό οξύ και φαινόλες^{196,197}.



Εικ. 24 *Rubus longanobaccus*

Γύρη:

Τέλος εφαρμόστηκε τοπικά υδαταλκοολικό εκχύλισμα γύρης προελεύσεως Χαλκιδικής, καθώς έχει μελετηθεί για τις θεραπευτικές της ιδιότητες, όπως: αντιβακτηριδιακή¹⁹⁸⁻²⁰⁰, αντιμυκητιασική¹⁹⁸ και αντιοξειδωτική²⁰⁰. Έχει υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες και κυρίως φλαβονοειδή²⁰⁰⁻²⁰³, φαινολικά οξέα²⁰² καθώς και β-καροτένιο²⁰⁰.



Εικ. 25 Γύρη

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Το διαβητικό δέρμα χαρακτηρίζεται από σημαντική ξηροδερμία ακολουθούμενη από πιθανή πρόωρη γήρανση. Η κατεξοχήν βλάβη η οποία προκαλείται από υπερβολική δόση υπεριώδους φωτός είναι η φωτογήρανση η οποία μπορεί να αποτελέσει πρόδρομη κατάσταση για την εμφάνιση δερματικού καρκίνου. Ενώ τόσο ο διαβήτης όσο και η επίδραση του υπεριώδους φωτός στο φυσιολογικό δέρμα έχουν αρκετά μελετηθεί εν τούτοις η σχέση του διαβητικού δέρματος με την υπεριώδη ακτινοβολία είναι ουσιαστικά ανεξερεύνητη.

Στην παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η σχέση διαβητικού δέρματος, υπεριώδους ακτινοβολίας και ικανότητας προστασίας από φυσικές αντιοξειδωτικές ουσίες.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

B.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΖΩΑ

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν άτριχοι αρσενικοί και θηλυκοί μύες τύπου SKH-1. Οι μύες παρέμεναν σε ειδικά κλουβιά σε χώρο ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία 24°C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 12 ώρες φως/ 12 ώρες σκοτάδι) και η πρόσβασή τους σε τροφή και νερό, ήταν ελεύθερη όλο το 24ωρο.

B.2 ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ

Πριν την έναρξη του πειράματος, πραγματοποιήθηκε η διαδικασία του εγκλιματισμού. Κατά τη διαδικασία αυτή, 60 μύες ηλικίας δύο μηνών και αρχικού σωματικού βάρους 25-30g, χωρίστηκαν σε έξι (6) κλουβιά και μεταφέρθηκαν στο χώρο πειραματισμού (Εργαστήριο Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Φαρμακευτική Σχολή Αθηνών) όπου παρέμειναν για μία εβδομάδα υπό τις ελεγχόμενες συνθήκες του πειράματος (θερμοκρασία 24°C, υγρασία 40% και φωτοπερίοδος 12 ώρες φως/ 12 ώρες σκοτάδι)²⁰⁴. Μετά από αυτό το διάστημα οι μύες χωρίστηκαν με τυχαίο τρόπο σε τρεις ομάδες (κάθε ομάδα απαρτιζόταν από 10 αρσενικούς και 10 θηλυκούς μύες).

B.3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΔΙΑΒΗΤΗ ΤΥΠΟΥ Ι

Στο πρώτο στάδιο του πειράματος πραγματοποιήθηκε, σε όλους τους μύες, πειραματική πρόκληση Διαβήτη τύπου Ι με εφάπαξ ενδοπεριτοναϊκή ένεση στρεπτοζοτοκίνης (STZ) 170 mg/kg βάρους μυός²⁰⁵⁻²⁰⁷. Πριν την έγχυση STZ είχε αφαιρεθεί η τροφή από τα πειραματόζωα για 12 ώρες^{204,208,209}. Το γεγονός ότι η στρεπτοζοτοκίνη είναι δυνατόν να προκαλέσει θανατηφόρο υπογλυκαιμία ως αποτέλεσμα της μαζικής έκκρισης ινσουλίνης από το πάγκρεας^{204,208-210}, εξηγεί το ποσοστό θνησιμότητας 0,08% που παρατηρήθηκε στους μύες ύστερα από την ένεση STZ.

B.3.1 Προετοιμασία ένεσης στρεπτοζοτοκίνης:

Χημικές ουσίες: Όλες οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικής καθαρότητας και αγοράστηκαν από εμπορικές πηγές.

- Στρεπτοζοτοκίνη (Sigma)
- NaOH

Όργανα:

- Vortex
- Ηλεκτρονικό πεχάμετρο
- Αναλυτικός ζυγός

Αναλώσιμα:

- Σύριγγες του 1ml

Διαδικασία:

Ετοιμάστηκε φρέσκο διάλυμα STZ (100 mg / ml) σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού (0,1 M, pH 3,5-4.5) και χρησιμοποιήθηκε μέσα σε 1 ώρα.

B.3.2 Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος (buffer)

- Ζυγίστηκαν 22 mg κιτρικού οξέος, διαλύθηκαν σε 1 ml φυσιολογικού ορού και αναδεύτηκαν χρησιμοποιώντας Vortex μέχρι πλήρους διαλύσεώς τους. Ακολούθησε μέτρηση του PH του διαλύματος (θεμιτό PH: 3,5-4,5) με χρήση ηλεκτρονικού πεχαμέτρου και εξουδετέρωση με NaOH.
- Στη συνέχεια ζυγίστηκαν 100 mg στρεπτοζοτοκίνης και διαλύθηκαν σε 1 ml ρυθμιστικού διαλύματος (γιατί η διαλυτότητα της στρεπτοζοτοκίνης είναι 100mg/ml buffer).
- Τέλος ζυγίστηκε ο εκάστοτε μυς και υπολογίστηκε αναλογικά πόσα ml ρυθμιστικού διαλύματος με στρεπτοζοτοκίνη έπρεπε να του εγχύσουμε ώστε η ενδοπεριτοναϊκή ένεση στρεπτοζοτοκίνης να αντιστοιχεί σε 170mg/kg βάρους μύος.

B.3.3 Μετρήσεις επιπέδων γλυκόζης στο αίμα

Σε δεύτερο στάδιο του πειράματος και μετά την πάροδο 5 ημερών από την ένεση στρεπτοζοτοκίνης (και αφού είχαν παρουσιαστεί δείγματα πολουρίας και πολυδιψίας στους μύες) πραγματοποιήθηκε μέτρηση επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των νηστικών μυών (3 h χωρίς τροφή) σύμφωνα με το ακόλουθο πρωτόκολλο:

Όργανα:

- Χειρουργικό ψαλιδάκι
- Μετρητής γλυκόζης (ABBOTT Precision Xtra Plus)

Αναλώσιμα:

- Ταινίες γλυκόζης (ABBOTT Precision Xtra Plus)

Διαδικασία βαθμονόμησης του μετρητή:

Κάθε φορά που ανοιγόταν ένα νέο κουτί ταινιών γλυκόζης, γινόταν εισαγωγή της ταινίας προκαθορισμένης βαθμονόμησης στην υποδοχή του μετρητή μέχρι να εμφανιστεί στην οθόνη του ο αριθμός της παρτίδας (LOT) και να ταυτοποιηθεί συγκρινόμενος με αυτόν που αναγραφόταν πάνω στην ταινία βαθμονόμησης.

Διαδικασία μέτρησης γλυκόζης:

Κάθε φορά, πριν την έναρξη της διαδικασίας ανοιγόταν μια καινούρια ταινία μέτρησης γλυκόζης και εισαγόταν στην υποδοχή του μετρητή το άκρο της με τις τρεις μαύρες γραμμές. Στη συνέχεια αποσπóταν με προσοχή απειροελάχιστο κομμάτι από την ουρά του μυός -με τη χρήση χειρουργικού ψαλιδιού, ώστε να σχηματιστεί και να αντληθεί μικρή σταγόνα αίματος η οποία αμέσως εφαρμοζόταν στην άκρη της ταινίας (λευκή περιοχή). Η μέτρηση ξεκινούσε αυτόματα όταν η ποσότητα αίματος ήταν επαρκής, εκπέμποντας χαρακτηριστικό ηχητικό σήμα, και ολοκληρωνόταν σε χρόνο 3 sec με το αποτέλεσμα της μέτρησης να εμφανίζεται αυτόματα στη οθόνη του μετρητή συνοδευόμενο από ώρα και ημερομηνία.

Από τις πρώτες μετρήσεις που λήφθηκαν (Όλες >150 mg/dl) διαπιστώθηκε ότι τα υψηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των μυών που παρατηρήθηκαν, έδειχναν την εμφάνιση Διαβήτη τύπου Ι. Επομένως μπορούσε να ακολουθήσει η κυρίως φάση του πειράματος. Σημειώνεται ότι κατά την κυρίως φάση του πειράματος ακολούθησαν άλλες δύο μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης για κάθε ομάδα: την 7^η και την 14^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης.

B.4 ΚΥΡΙΩΣ ΦΑΣΗ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ:

B.4.1 Κωδικοποίηση- ονομασία μυών

Πριν την αρχική επάλειψη δόθηκε κωδική ονομασία- αρίθμηση στους μύες και στα κλουβιά τους για να γίνει εφικτός ο διαχωρισμός τους [πίνακας 4]:

Κωδικός κλουβιού	Περιγραφή
Θ-1	Θηλυκοί μύες ομάδας 1
Θ-2	Θηλυκοί μύες ομάδας 2
Θ-3	Θηλυκοί μύες ομάδας 3
A-1	Αρσενικοί μύες ομάδας 1
A-2	Αρσενικοί μύες ομάδας 2
A-3	Αρσενικοί μύες ομάδας 3
Πίνακας 4	

Κάθε κλουβί είχε από 8- 10 μύες (5 θάνατοι από ΣΤΖ), επομένως ακολουθήθηκε στο κάθε κλουβί κωδική ονομασία-αρίθμηση μέχρι το 10 σημαδεύοντας τα αυτιά των μυών σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα [πίνακας 5]:

Κωδικός Αριθμός μυός	Περιγραφή- Αναγνώριση
1	Κανένα κόψιμο στα αυτιά
2	1 κόψιμο στο δεξί αυτί
3	1 κόψιμο στο αριστερό αυτί
4	1 κοψιμο σε κάθε αυτί
5	2 κοψίματα στο δεξί αυτί
6	2 κοψίματα στο αριστερό αυτί
7	2 κοψίματα σε κάθε αυτί
8	2 κοψίματα στο δεξί και 1 στο αριστερό αυτί
9	2 κοψίματα στο αριστερό και 1 στο δεξί αυτί
10	3 κοψίματα στο δεξί αυτί
Πίνακας 5	

Άρα, για παράδειγμα, η ονομασία του αρσενικού μυός στο κλουβί Α-3, με 1 κόψιμο στο κάθε αυτί θα είναι: Α-3/4. Αντιστοίχως ονομάζονται και οι υπόλοιποι μύες.

B.4.2 Σκευάσματα προς επάλειψη

Παρασκευάστηκαν υδατοαλκοολικά διαλύματα αντιοξειδωτικών για επαλείψεις:

- ***Pinus halepensis*** (συλλέχθηκε στη περιοχή της Καισαριανής- Αθήνα, Δεκέμβριος 2010): Ομογενοποιήθηκαν 15g φλοιού *Pinus halepensis* σε γουδί (για 10 min) και εμβαπτίστηκαν σε 100ml υδαταλκοολικού διαλύματος (98 H₂O:2 ethanol) για την παρασκευή υδαταλκοολικού διαλύματος 15%. Ακολούθησε ανάδευση για 12 h και διατήρηση του διαλύματος εκτός ψυγείου για 72 ώρες.
- ***Tayberry*** (συλλέχθηκε στην περιοχή της Κορινθίας): Ομογενοποιήθηκαν 5g αποξηραμένων φύλλων και φλοιών Tayberry σε γουδί (για 10 min) και εμβαπτίστηκαν σε 100ml υδαταλκοολικού διαλύματος (98 H₂O:2 ethanol) για την παρασκευή υδαταλκοολικού διαλύματος 5%. Ακολούθησε ανάδευση για 12h και διατήρηση του διαλύματος εκτός ψυγείου για 72 ώρες.
- ***Γύρη*** (συλλέχθηκε στην περιοχή της Χαλκιδικής-Άγιο Όρος 2010) : Ομογενοποιήθηκαν 25g κόκκων γύρης σε γουδί (μέχρι πλήρους κονιοποίησης τους) και εμβαπτίστηκαν τους σε 100ml υδατοαλκοολικού διαλύματος (98 H₂O:2 ethanol) για την παρασκευή υδατοαλκοολικού διαλύματος 25% ²⁰⁰. Ακολούθησε ανάδευση για 12h και διατήρηση του διαλύματος εκτός ψυγείου για 72 ώρες.

Μετά την λήξη των 72 ωρών ακολούθησε διήθηση των τριών εκχυλισμάτων, προσθήκη CMC σε ποσοστό 4% για παρασκευή γελών προς επάλειψη των μυών, ανάδευση για 12 h και διατήρηση των γελών στους -20°C.

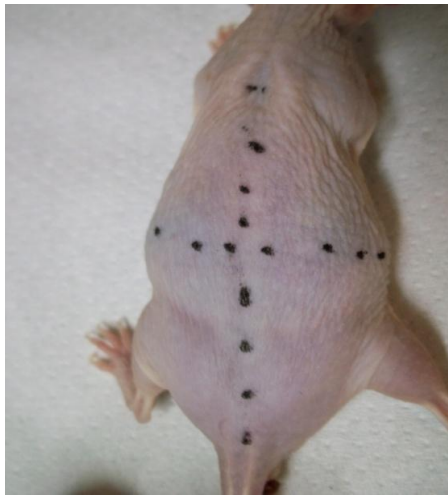
- ***Μάρτυρας***: Παρασκευάστηκε με προσθήκη 4% CMC σε H₂O, ανάδευση για 12 h και διατήρηση της γέλης στους -20°C.

B.4.3 Επάλειψη δέρματος μυών

Αρχικά έγινε νοητός διαχωρισμός του δέρματος της ράχης κάθε μυός σε 4 συμμετρικά τμήματα ώστε να γίνει επάλειψη και των 4 σκευασμάτων σε όλους τους μύες προς εξάλειψη ενδοατομικών διαφορών.

Οι θέσεις επάλειψης για το κάθε σκεύασμα εναλλάσσονταν με τη φορά του ρολογιού για κάθε μυ σύμφωνα με την κωδική ονομασία- αρίθμηση που του είχε δοθεί [Εικ.25, πίνακας 6].

Μάρτυρας (M)	Pinus Halepensis (P)
Γύρη (Γ)	Tayberry (T)



Εικ.25 Νοητός διαχωρισμός του δέρματος της ράχης κάθε μυός για την εφαρμογή 4 διαφορετικών σκευασμάτων

Κωδικός Αριθμός μύος	Περιοχή δέρματος της ράχης	
	Πάνω Αριστερά	Πάνω Δεξιά
	Κάτω Αριστερά	Κάτω Δεξιά
1	M	P
	Γ	T
2	Γ	M
	T	P
3	T	Γ
	P	M
4	P	T
	M	Γ
5	M	P
	Γ	T
6	Γ	M
	T	P
7	T	Γ
	P	M
8	P	T
	M	Γ
9	M	P
	Γ	T
10	Γ	M
	T	P
Πίνακας 6		

Τρεις μέρες πριν την έναρξη της ακτινοβολήσης (προληπτικά), κατά τη διάρκεια αυτής και δεκατέσσερις μέρες μετά το τέλος της ακτινοβολήσης πραγματοποιήθηκε, σε όλες τις ομάδες, καθημερινή επάλειψη των τριών αντιοξειδωτικών σκευασμάτων και ενός σκευάσματος μάρτυρα στην ακτινοβοληθείσα περιοχή. Άρα, έγινε επάλειψη 4 γελών στην ράχη κάθε μύος (καθημερινώς) με προσοχή να μην διαταραχθούν οι μύες, να μην εφαρμοστεί δείγμα στους οφθαλμούς τους και μέχρι πλήρους απορρόφησης τους (οπτικά να μην υπάρχουν απομεινάρια γέλης) για να περιοριστεί

όσο το δυνατόν η πιθανότητα κατάποσής αυτών από τους μύες, καθώς σκοπός της έρευνας ήταν η τοπική δράση των αντιοξειδωτικών και όχι η συστηματική.

Μετά το πέρας 72 ωρών και αφού είχαν ήδη γίνει 3 επαλείψεις σε όλους τους μύες, ακολούθησε η ακτινοβολήση UV.

B.4.4 Ακτινοβολήση του δέρματος με UV ακτινοβολία

Όργανα: Λάμπα Ξένου 1000W (Oriol)- πηγή UV ακτινοβολίας και ισχύ UVA:8,5Mw/CM² και UVB:8mW/cm²

Διαδικασία: Οι μύες ακτινοβολήθηκαν στη ράχη τους προσέχοντας να μην εκτεθούν τα άκρα και το κεφάλι τους στην UV ακτινοβολία:

Στην **πρώτη ομάδα** έγινε εφάπαξ ακτινοβολήση UV δόσης 3 MED (Ελάχιστη Ερυθηματώδης Δόση) για 15 sec.

Στη **δεύτερη ομάδα** έγινε για 5 μέρες ακτινοβολήση UV δόσης 1 MED για 5 sec/ ημέρα.

Ενώ στην **τρίτη ομάδα** έγινε για 15 μέρες ακτινοβολήση UV δόσης 1 MED για 5 sec/ ημέρα.

B.5 ΑΛΛΕΣ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΠΟΥ ΕΛΑΒΑΝ ΧΩΡΑ:

B.5.1 Μετρήσεις Άδηλης Απώλειας Νερού

Όργανα: Tewameter TM 210

Διαδικασία: Το όργανο αφηνόταν να ρυθμιστεί για λίγα λεπτά πριν την έναρξη της μέτρησης. Στη συνέχεια αφού εξασφαλιζόταν ότι οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας ήταν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων, εφαρμοζόταν ο καθετήρας του οργάνου διαδοχικά, σε 4 ανατομικές περιοχές (στη ράχη) του ακτινοβολημένου δέρματος κάθε μυός, με συνεχή πίεση για 1 min ώστε να ληφθεί το αποτέλεσμα της μέτρησης.

ΧΡΟΝΟΣ: Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα την 4^η, την 7^η και την 14^η ημέρα μετά την τελευταία ακτινοβολήση κάθε ομάδας.

B.5.2 Μετρήσεις ερυθρότητας

Όργανα: Mexameter MX 18

Διαδικασία: Αφού εξασφαλιζόταν ότι οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας ήταν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια των μετρήσεων, εφαρμοζόταν ο καθετήρας του οργάνου με συνεχή πίεση για 1 min διαδοχικά, σε 4 ανατομικές περιοχές (στη ράχη) του ακτινοβολημένου δέρματος κάθε μυός, αλλά αυτή τη φορά λαμβάνονταν 3 μετρήσεις για κάθε ανατομική ζώνη.

ΧΡΟΝΟΣ: Οι μετρήσεις έλαβαν χώρα την 4^η, την 7^η και την 14^η ημέρα μετά την τελευταία ακτινοβολήση κάθε ομάδας.

B.5.3 Εκτίμηση κλινικής εικόνας

Όργανα:

- Ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Kodak AF 3x Optical Aspheric Leans, 12 MegaPixels
- Χρονόμετρο
- Ζυγός

Μακροφωτογραφία: Φωτογραφίες μικρής μεγέθυνσης ελήφθησαν από την έναρξη των επαλείψεων μέχρι τη λήξη του πειράματος με τη θανάτωσή των μυών, κάτω από καθορισμένες και επαναλήψιμες συνθήκες για να καταγραφούν αλλαγές της επιφάνειας του δέρματος. Η συχνότητα λήψης φωτογραφιών κυμαινόταν στις 2-3 μέρες, ωστόσο συμπεριλαμβάνονται απαραίτητως φωτογραφίες σε κρίσιμες για το πείραμα μέρες:

- Την ημέρα έναρξης των επαλείψεων
- Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων (πριν την 1^η ακτινοβολήση)
- Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων (μετά την τελευταία ακτινοβολήση)
- Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
- Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
- Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης

Παράλληλα λάμβανε χώρα και καταγραφή των παρατηρήσεων που γίνονταν δια γυμνού οφθαλμού και αφορούσαν την ερυθρότητα και την ξηροδερμία των μυών,

όταν μάλιστα δεν ήταν δυνατόν αυτές να απεικονιστούν πλήρως στη μακροφωτογραφία.

Οι παρατηρήσεις καταγράφονταν τις παρακάτω κρίσιμες μέρες για το πείραμα:

- Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 2^η ομάδα)
- Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων (μετά την τελευταία ακτινοβολήση)
- Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
- Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
- Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης

B.5.4 Μελέτη ελαστικότητας δέρματος

Λαμβάνοντας υπόψη και τη θεωρία της οριζόντιας/πλάγιας διάχυσης των ουσιών στο δέρμα σχεδιάστηκε μια κλίμακα βαθμονόμησης της συνολικής ελαστικότητας του ακτινοβολημένου δέρματος κάθε μυός (η μειωμένη ελαστικότητα και ο σχηματισμός ρυτίδων φέρονται ως κύρια συμπτώματα της φωτογήρανσης)^{34,50-54,68}. Η κλίμακα αυτή βασίστηκε σε μετρήσεις του χρόνου επαναφοράς του δέρματος στην αρχική του κατάσταση μετά από πλήρη διάτασή του.

Ο κάθε μύς βαθμονομείτο σύμφωνα με μια εμπειρική συγκεντρωτική κλίμακα που προέκυψε σε σύγκριση με φυσιολογικούς μύες ίδιας ηλικίας και εκτός πειραματισμού [πίνακας 7].

ΒΑΘΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ
0	<2sec Ύστερα από μέτρηση του χρόνου επαναφοράς του δέρματος φυσιολογικών μυών της ίδιας ηλικίας, χωρίς διαβήτη και χωρίς να βρίσκονται υπό πειραματισμό (χωρίς καταπόνηση), υπολογίστηκε ότι σε <από 2 sec το δέρμα είχε επανέλθει.
1	2-3 sec
2	4-5 sec
3	6-7 sec
4	>7 sec
Πίνακας 7	

Οι μετρήσεις του χρόνου επαναφοράς του δέρματος πραγματοποιήθηκαν:

- Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων
- Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 2^η ομάδα)
- Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων (μετά την τελευταία ακτινοβολήση)
- Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
- Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
- Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης

B.5.5 Μελέτη χρόνου αντίδρασης μυών

Σχεδιάστηκε εμπειρική κλίμακα βαθμονόμησης των μυών σύμφωνα με τον χρόνο που χρειάζονταν για να αρχίσουν να κινούνται, μετά από άσκηση πίεσης [πίνακας 8]. Γινόταν μέτρηση του χρόνου από την άσκηση πίεσης μέχρι την έναρξη μετακίνησης του μυός (χρόνος αντίδρασης).

ΒΑΘΜΟΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ
0	<1sec Υστερα από μέτρηση του χρόνου αντίδρασης φυσιολογικών μυών της ίδιας ηλικίας, χωρίς διαβήτη και χωρίς να βρίσκονται υπό πειραματισμό (χωρίς καταπόνηση), υπολογίστηκε ότι σε <από 1 sec αυτοί είχαν κινηθεί/ αντιδράσει.
1	1-2 sec
2	2-3 sec
3	3-4 sec
4	Δεν μετακινήθηκαν/ δεν αντέδρασαν
Πίνακας 8	

Οι μετρήσεις του χρόνου αντίδρασης των μυών πραγματοποιήθηκαν:

- Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων
- Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 2^η ομάδα)
- Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων (μετά την τελευταία ακτινοβολήση)

- Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσεως
- Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσεως
- Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσεως

Σκοπός της παραπάνω μελέτης ήταν η παρατήρηση πιθανής αξιοσημείωτης αύξησης ή μείωσης του χρόνου αντίδρασης των μυών κατά τη διάρκεια του πειράματος. Η παρατήρηση αυτή θα συσχετιζόταν με τον εντοπισμό βλαβών του νευρικού συστήματος που εκδηλώνονται με τη διαταραχή αίσθησης και φέρονται ως συμπτώματα μίας εκ των κυριότερων επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη, της Διαβητικής Νευροπάθειας⁸²⁻⁸⁵.

B.5.6 Βάρος μυών

Το βάρος των μυών μετρήθηκε, με τη χρήση ζυγού, σε διάφορα στάδια του πειράματος από την έναρξη των επαλείψεων μέχρι τη λήξη του πειράματος με τη θανάτωσή τους. Οι μετρήσεις που λήφθηκαν συνεκτιμήθηκαν με τις αντίστοιχες του χρόνου αντιδραστικότητας (βλέπε παράγραφο B.5.5), καθώς η Διαβητική Νευροπάθεια σχετίζεται με την απώλεια βάρους²¹¹. Σημειώνεται, ότι σε πειράματα που έχουν διεξαχθεί, οι διαβητικοί μύες (ύστερα από πειραματική πρόκληση διαβήτη με STZ) παρουσιάζουν σταδιακά σημαντική και διάχυτη υπεραλγησία, αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο πλάσμα και μείωση του σωματικού βάρους σε σχέση με τους μύες ελέγχου (χωρίς διαβήτη)²¹¹. Επίσης έχει παρατηρηθεί πρόληψη της μείωσης του σωματικού βάρους διαβητικών μυών που τους είχαν χορηγηθεί αντιοξειδωτικά²¹¹. Οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν:

- Την ημέρα έναρξης των επαλείψεων
- Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων
- Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 2^η ομάδα)
- Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων (μόνο για την 3^η ομάδα)
- Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων (μετά την τελευταία ακτινοβολήση)
- Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσεως
- Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσεως
- Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσεως

B.6 ΧΡΟΝΟΔΙΑΓΡΑΜΜΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Συνολική διάρκεια των πειραμάτων (μέχρι τη θανάτωση των μυών)

Ομάδα 1^η :

- 1 εβδομάδα εγκλιματισμού
- 5 ημέρες μέχρι την διαπίστωση εμφάνισης Διαβήτη τύπου 1
- 3 ημέρες προληπτικής επάλειψης αντιοξειδωτικών σκευασμάτων
- 1 ημέρα ακτινοβολήση UV
- 14 ημέρες παρακολούθησης, επαλείψεων και μετρήσεων
- Θανάτωση των μυών τη 15^η ημέρα μετά την ακτινοβολήση UV

Συνολική διάρκεια πειραματισμού των μυών της 1^{ης} ομάδας (9 Αρσενικά+ 10 θηλυκά)= 30 ημέρες

Ομάδα 2^η:

- 1 εβδομάδα εγκλιματισμού
- 5 ημέρες μέχρι την διαπίστωση εμφάνισης Διαβήτη τύπου 1
- 3 ημέρες προληπτικής επάλειψης αντιοξειδωτικών σκευασμάτων
- 5 ημέρες ακτινοβολήση UV
- 14 ημέρες παρακολούθησης, επαλείψεων και μετρήσεων
- Θανάτωση των μυών τη 15^η ημέρα μετά την τελευταία ακτινοβολήση UV

Συνολική διάρκεια πειραματισμού των μυών της 2^{ης} ομάδας (9 Αρσενικά+ 10 θηλυκά)= 34 ημέρες

Ομάδα 3^η:

- 1 εβδομάδα εγκλιματισμού
- 5 ημέρες μέχρι την διαπίστωση εμφάνισης Διαβήτη τύπου 1
- 3 ημέρες προληπτικής επάλειψης αντιοξειδωτικών σκευασμάτων
- 15 ημέρες ακτινοβολήση UV
- 14 ημέρες παρακολούθησης, επαλείψεων και μετρήσεων
- Θανάτωση των μυών τη 15^η ημέρα μετά την τελευταία ακτινοβολήση UV

Συνολική διάρκεια πειραματισμού των μυών της 3^{ης} ομάδας (9 Αρσενικά+ 8 θηλυκά)= 44 ημέρες

B.7 ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΟΥ ΔΕΡΜΑΤΟΣ

Όργανα:

- Χειρουργικό ψαλιδάκι
- Ηπαρινισμένο γυάλινο χωνί
- Φυγόκεντρος (Sigma 202 MK)
- Αυτόματη μικροπιπέτα (Costar)

Αναλώσιμα:

- «καθαρά» erpendorf
- Ηπαρινισμένα erpendorf

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για κάθε μυ ήταν η ακόλουθη:

Κρίθηκε αναγκαία η αποχή των μυών από κάθε στρεσογόνο ή πιθανώς τοξικό παράγοντα (διαδικασία λήψης φωτογραφιών, ζυγίσεις κτλ.) για ένα 24ωρο. Ακολούθως κάθε μυς θανατώθηκε με καρατόμηση και το αίμα συλλέχθηκε σε ηπαρινισμένο erpendorf ταχύτατα για να αποφευχθεί η αιμόλυση του. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το δέρμα με τη χρήση λαβίδας και ψαλιδιού και ακολούθησε φυγοκέντρηση του αίματος για τον διαχωρισμό και τη συλλογή του πλάσματος. Τέλος το αίμα και τα δέρματα αποθηκεύτηκαν στους -80 C.

Πρωτόκολλο φυγοκέντρησης αίματος:

Αρχικά εφαρμόστηκε στην φυγόκεντρο η κατάλληλη κεφαλή με υποδοχές (12 σε αριθμό) για erpendorf και τοποθετήθηκαν σε αυτές τα erpendorf με το αίμα που είχε συλλεχθεί, με προσοχή ώστε τα απέναντι να είναι ισοβαρή. Οι στροφές ρυθμίστηκαν στις 9000 περίπου, η θερμοκρασία στους 23 C και η ώρα στα 3 min. Όταν ολοκληρώθηκε η φυγοκέντρηση, τα erpendorf αποσπάστηκαν με προσοχή για να μην αναταραχθεί το περιεχόμενό τους και τα τοποθετήθηκαν σε ειδική βάση. Στη συνέχεια, αφαιρέθηκε το υπερκείμενο πλάσμα με αυτόματη πιπέτα και μεταφέρθηκε σε νέα erpendorf που αποθηκεύτηκαν στους -80 °C.

B.8 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΗΜΕΝΟ ΔΕΡΜΑ

Όργανα:

- Ζυγός (College B154, Mettler-Toledo, Switzerland)
- Χειρουργικό ψαλιδάκι
- Υάλινος υποδοχέας ομογενοποίησης
- Αυτοσχέδιος ηλεκτρικός ομογενοποιητής
- Φυγόκεντρος (Sigma 202 MK)
- Αυτόματες μικροπιπέτες (Costar)
- Vortex (MSI Minishaker IKA)
- Fluostar BMG (Γερμανία)

Αναλώσιμα:

- Ακτινοβολημένα δέρματα μυών
- «Καθαρά» eppendorf
- Καλάθι με πάγο
- Πλακίδιο 96 πηγαδιών (96 wells, Costar)

Χημικές ουσίες:

Φιαλίδιο που περιέχει 50 μg CM-H₂DCFDA (μη φθορίζον χλωρομεθυλοπαράγωγο της φλουροσκεΐνης) (Molecular Probes)

Πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

1. Ομογενοποίηση δέρματος:

Για κάθε ακτινοβολημένο δέρμα μύος ζυγίστηκε τμήμα δέρματος βάρους 120- 130 mg. Στη συνέχεια, αυτό τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια με ψαλιδάκι, τα οποία προστέθηκαν στον υποδοχέα της ομογενοποίησης μαζί με 1ml φυσιολογικού ορού. Ακολούθησε ομογενοποίηση στον αυτοσχέδιο ομογενοποιητή για 3 min, ενώ παράλληλα έγιναν και 3 chilling βυθίζοντας τον υποδοχέα της ομογενοποίησης στο καλάθι με τον πάγο. Το διάλυμα της ομογενοποίησης συλλέχθηκε σε «καθαρό» eppendorf, φροντίζοντας να μην περιέχει τυχόν υπολείμματα δέρματος και αποθηκεύτηκε στους -80°C.

2. Φυγοκέντρωση των διαλυμάτων ομογενοποίησης δέρματος:

Όλα τα διαλύματα ομογενοποίησης δέρματος φυγοκεντρήθηκαν στις 9000 στροφές, στους 25°C, για 3min. Πριν ξεκινήσει η φυγοκέντρωση, τα διαλύματα ήταν σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C).

3. Μέτρηση οξειδωτικού στρες στο δέρμα

Αρχικά, παρασκευάστηκε διάλυμα φλουροσκεΐνης 2μM (σε 50μg φλουροσκεΐνης σε σκόνη προστίθενται 150μl αιθανόλης, κλείνεται γρήγορα το καπάκι του φιαλιδίου και αυτό αναδεύεται σε Vortex στις 1800 στροφές για 10 sec). Στη συνέχεια, σε κάθε πηγάδι του πλακιδίου προστέθηκαν με μικροπιπέτα 100 μl δείγματος και 100μl φυσιολογικού ορού ενώ στο αρχικό και στο τελικό πηγάδι προστέθηκαν μόνο 200μl φυσιολογικού ορού (2B)- από τα 96 συνολικά πηγάδια, τα 94 είχαν δείγμα και τα 2 είχαν μόνο φυσιολογικό ορό. Επιπλέον, προστέθηκαν 3 μl διαλύματος φλουροσκεΐνης με μικροπιπέτα σε όλα τα πηγάδια και ακολούθησε ανάδευση του πλακιδίου (σκεπασμένου ελαφρά με αλουμινόχαρτο) στο Vortex στις 300 στροφές για 20 min. Ύστερα από αναμονή 30 λεπτών, το πλακίδιο (χωρίς το καπάκι) τοποθετήθηκε στο Fluostar BMG (φίλτρο διέγερσης 485 nm, φίλτρο εκπομπής: 520nm, Gain: 20, θερμοκρασία: 37°C, orbital shaking, flashes: 200- συνολικά μαζί με την ανάδευση που θα κάνει αρχικά το μηχάνημα, η μέτρηση διαρκεί 8 min[520 sec]). Μόλις ολοκληρώθηκε η μέτρηση, προέκυψε αρχείο excel με τις επιμέρους μετρήσεις για το κάθε πηγάδι.

B.9 ΜΕΤΡΗΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΠΛΑΣΜΑ

Όργανα:

- Αυτόματες μικροπιπέτες (Costar)
- Vortex (MSI Minishaker IKA)
- Fluostar BMG (Γερμανία)

Αναλώσιμα:

- Eppendorf με πλάσμα
- «Καθαρά» eppendorf
- Πλακίδιο 96 πηγαδιών (96 wells, Costar)

Χημικές ουσίες:

Φιαλίδιο που περιέχει 50 μg CM-H2DCFDA (μη φθορίζον χλωρομέθυλοπαράγωγο της φλουροσκεΐνης) (Molecular Probes)

Πραγματοποιήθηκε η ακόλουθη διαδικασία:

Παρασκευάστηκε διάλυμα φλουροσκεΐνης 2 μM (σε 50 μg φλουροσκεΐνης σε σκόνη προστίθενται 150 μl αιθανόλης, κλείνεται γρήγορα το καπάκι του φιαλιδίου και αυτό αναδεύεται σε Vortex στις 1800 στροφές για 10 sec). Στη συνέχεια, μεταφέρθηκαν με αυτόματη μικροπιπέτα 20 μl από το κάθε erpendorf με το πλάσμα σε νέο «καθαρό» erpendorf και προστέθηκαν 980 μl φυσιολογικού ορού. Ακολούθησε ανάδευση των νέων erpendorf στο Vortex στις 1800 στροφές για 10 sec. Σε επόμενο στάδιο, μεταφέρθηκαν με μικροπιπέτα 200 μl κάθε δείγματος σε κάθε πηγάδι του πλακιδίου εκτός από το αρχικό και το τελικό πηγάδι όπου προστέθηκαν μόνο 200 μl φυσιολογικού ορού. Επιπλέον, προστέθηκαν 3 μl διαλύματος φλουροσκεΐνης με μικροπιπέτα σε όλα τα πηγάδια και ακολούθησε ανάδευση του πλακιδίου (σκεπασμένου ελαφρά με αλουμινόχαρτο) στο Vortex στις 300 στροφές για 20 min. Ύστερα από αναμονή 30 λεπτών, το πλακίδιο (χωρίς το καπάκι) τοποθετήθηκε στο Fluostar BMG (φίλτρο διέγερσης 485 nm, φίλτρο εκπομπής: 520nm, Gain: 20, θερμοκρασία: 37°C, orbital shaking, flashes: 200- συνολικά μαζί με την ανάδευση που θα κάνει αρχικά το μηχάνημα, η μέτρηση διαρκεί 8 min[520 sec]). Μόλις ολοκληρώθηκε η μέτρηση, προέκυψε αρχείο excel με τις επιμέρους μετρήσεις για το κάθε πηγάδι.

B.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

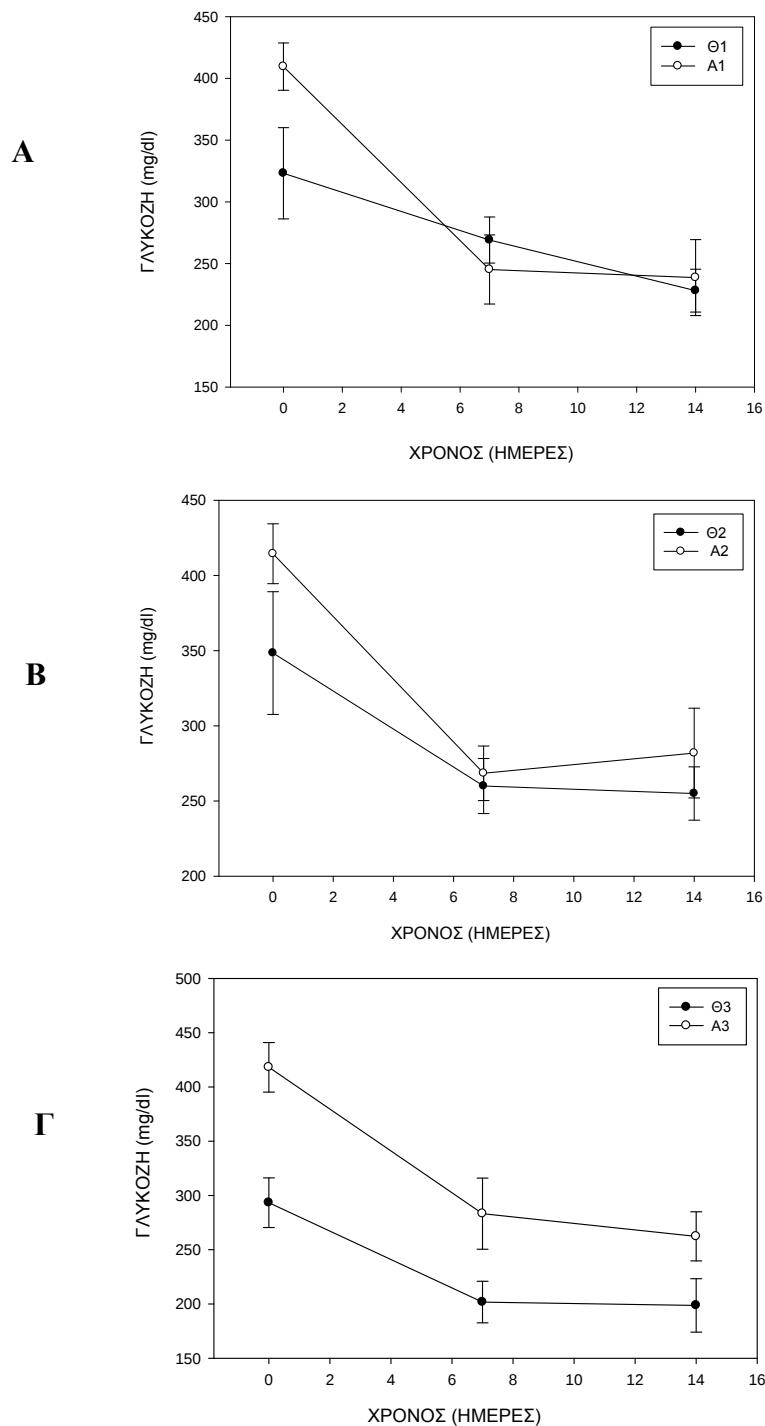
Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με τη στατιστική μέθοδο ANOVA (Analysis of variance). Η μεταβλητή παράμετρος ήταν μία κάθε φορά και επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος ONE WAY ANOVA. Η μέθοδος αυτή είναι μια παραμετρική μέθοδος και για να εφαρμοστεί απαιτείται ο προς ανάλυση πληθυσμός να είναι κανονικός με ίση παραλλακτικότητα. Στις περιπτώσεις που δεν ίσχυε η προϋπόθεση αυτή χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά η μέθοδος ANOVA ON RANKS, που είναι η ανάλογη μέθοδος της ONE WAY ANOVA όταν ο πληθυσμός δεν είναι

κανονικός. Η στατιστική επεξεργασία έγινε με τη χρήση του προγράμματος SigmaStat 3.5 και τα διαγράμματα με το πρόγραμμα SigmaPlot 10.0.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Γ.1 Αποτελέσματα μετρήσεων επιπέδων γλυκόζης στο αίμα



Γράφημα 1 (Α,Β,Γ)

Διαγραμματική απεικόνιση της εξέλιξης των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, Α1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, Α2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, Α3: αρσενικοί μύες ομάδας 3).

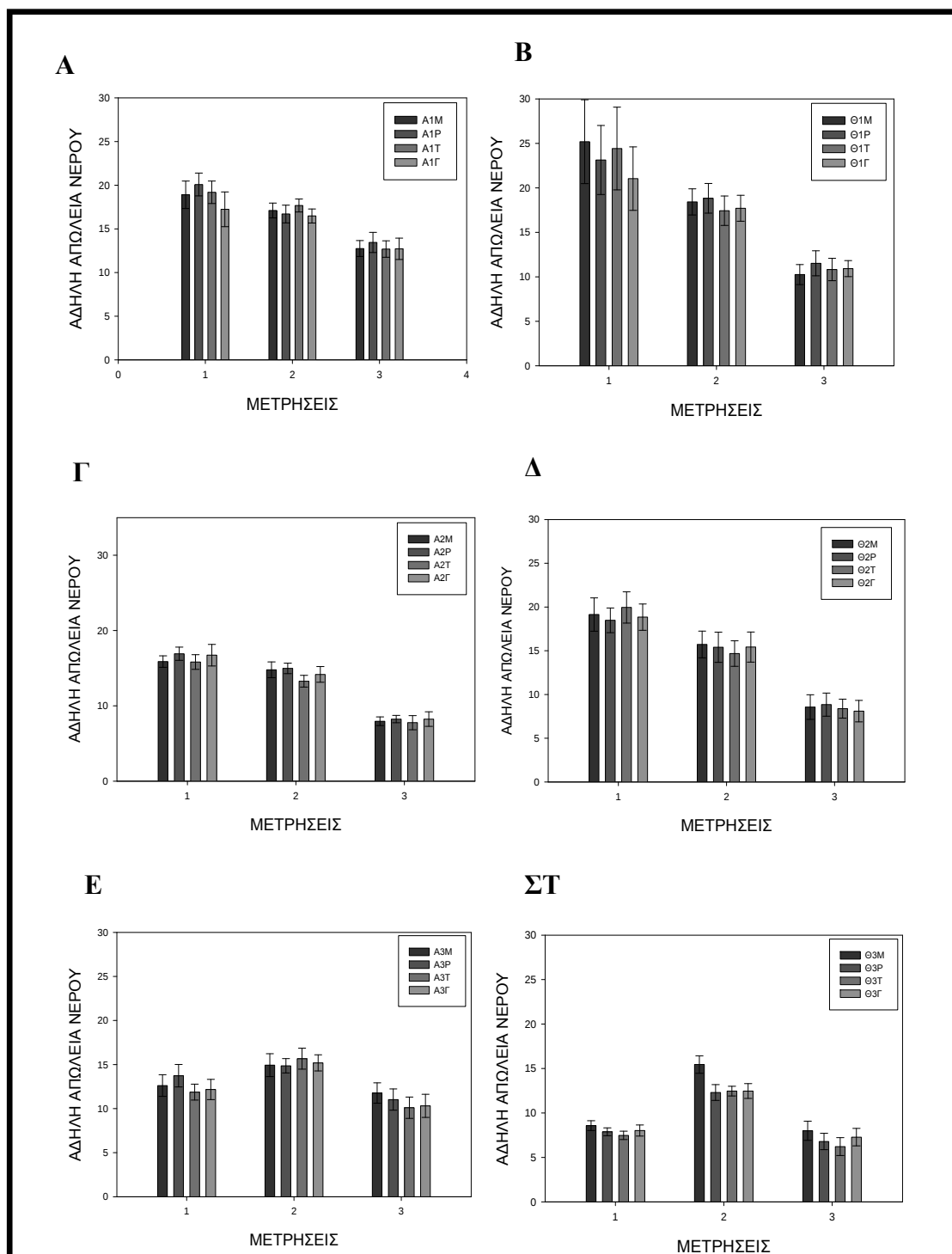
Ελήφθησαν συνολικά 3 μετρήσεις των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1η	Πριν την έναρξη των επαλείψεων
2η	Την 7 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
3η	Την 14 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
Πίνακας 9	

Πιο αναλυτικά, η 1^η μέτρηση αναφέρεται στα αρχικά επίπεδα γλυκόζης που σημειώθηκαν στους μύες μετά την ένεση ΣΤΖ. Η 2^η μέτρηση έγινε 7 ημέρες μετά το πέρας της ακτινοβολήσης όπου βιβλιογραφικά καταγράφεται ότι εκδηλώνεται η δερματική φλεγμονή. Ενώ η 3^η μέτρηση λήφθηκε 14 ημέρες μετά το πέρας της ακτινοβολήσης, όπου θεωρείται ότι η όποια φλεγμονή είχε προκληθεί, έχει πλέον ιαθεί. Σκοπός των μετρήσεων αυτών ήταν η τυπική παρακολούθηση των μυών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων και όχι η πιθανότητα επίδρασης των τοπικά χορηγούμενων αντιοξειδωτικών σκευασμάτων και του UV στα επίπεδα γλυκόζης του αίματος, γεγονός που εξηγεί τον περιορισμένο αριθμό μετρήσεων και την απουσία μαρτύρων με διαβήτη προς σύγκριση στην παρούσα έρευνα.

Όπως φαίνεται στα προηγούμενα διαγράμματα (Γράφημα 1), παρατηρήθηκε **στατιστικώς σημαντική πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όλων των μυών** κατά την 2^η μέτρηση, συγκρινόμενη με την 1^η μέτρηση που έλαβε χώρα πριν την έναρξη των επαλείψεων του δέρματος των μυών. Η αξιοσημείωτη πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών, παρατηρήθηκε και στα δύο φύλα, ανεξαρτήτως της δόσης και του χρονικού διαστήματος ακτινοβολήσής τους, δείγμα πιθανής υπογλυκαιμικής δράσης των τοπικώς χορηγούμενων αντιοξειδωτικών σκευασμάτων (κάποιου εξ αυτών ή συνδυασμού τους) όταν παρατηρείται λύση του φραγμού του δέρματος ύστερα από ακτινοβολήση με UV. Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε να αποτελέσει θέμα επόμενης, εκτενέστερης και πιο εξειδικευμένης μελέτης για την επιβεβαίωση, τεκμηρίωση αλλά και εξήγηση των αποτελεσμάτων.

Γ.2 Αποτελέσματα μετρήσεων άδηλης απώλειας νερού



Γράφημα 2 (Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ)

Απεικόνιση των μετρήσεων της Άδηλης Απώλειας Νερού που ελήφθησαν από το δέρμα των μυών (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, Α1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, Α2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, Α3: αρσενικοί μύες ομάδας 3), όπου εφαρμόζονταν τοπικά σκευάσματα πλούσια σε αντιοξειδωτικά (Μ: μάρτυρας, Ρ: *Pinus halepensis*, Τ: Tayberry, Γ: γύρη).

Ελήφθησαν συνολικά 3 μετρήσεις για την μελέτη της Άδηλης Απώλειας Νερού στο δέρμα των μυών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1η	Την 4 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
2η	Την 7 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
3η	Την 14 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
Πίνακας 10	

Κάθε μέτρηση απαρτίζεται από επιμέρους μετρήσεις που ελήφθησαν από τα 4 διαφορετικά σημεία εφαρμογής σκευασμάτων στο δέρμα κάθε μυός.

Αν και δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην άδηλη απώλεια νερού ανάμεσα στην ανατομική περιοχή του δέρματος που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας και στις υπόλοιπες 3 περιοχές που εφαρμόστηκαν τα αντιοξειδωτικά σκευάσματα (γεγονός που εξηγείται από τη θεωρία οριζόντιας/πλάγιας διάχυσης των ουσιών), άξιες αναφοράς ήταν οι παρατηρήσεις που σημειώθηκαν κατά την εξέλιξη του πειράματος. Συγκρίνοντας την 1^η μέτρηση των τριών ομάδων, παρατηρείται σημαντική μείωση της άδηλης απώλειας νερού όσο αυξάνεται ο χρόνος ακτινοβολήσης των μυών με την 3^η ομάδα να δίνει τη χαμηλότερη άδηλη απώλεια νερού, ακριβώς το αντίθετο από αυτό που θα αναμενόταν καθώς και οι δύο παράμετροι που εξετάζονται (διαβήτης, υπερϊώδης ακτινοβολία) με την πάροδο του χρόνου επιτείνουν την άδηλη απώλεια νερού. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με το γεγονός ότι αυξανόταν παράλληλα και ο χρόνος εφαρμογής των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων. Επιπλέον, στην 1^η μέτρηση που διεξάχθηκε παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές που ελήφθησαν, μεταξύ των δύο φύλων και των τριών ομάδων. Στις δύο πρώτες ομάδες μυών, παρατηρείται στατιστικώς σημαντικά αυξημένη άδηλη απώλεια νερού στο δέρμα των θηλυκών σε σύγκριση με τα αρσενικά των αντίστοιχων ομάδων. Ενώ στην 3^η ομάδα παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο. Φαίνεται ότι κατά την εφάπαξ και μέση χρόνια δόση ακτινοβολίας UV, τα θηλυκά παρουσιάζουν πιο αυξημένη άδηλη απώλεια νερού, ενώ κατά τη μακρά χρόνια δόση UV τα θηλυκά παρουσιάζουν μειωμένη άδηλη απώλεια νερού σε σύγκριση με τα αρσενικά, ίσως αναπτύσσοντας κάποιο μηχανισμό προστασίας. Ακόμη παρατηρήθηκε, όπως αναμενόταν, στις ομάδες 1 και 2

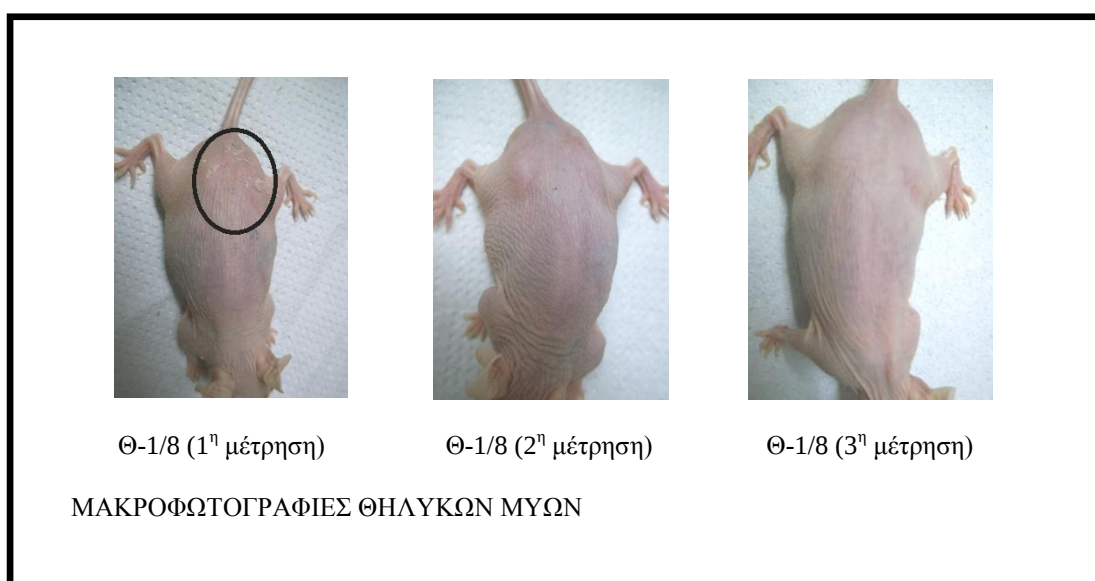
(και στα δύο φύλα) στατιστικώς σημαντική πτώση της άδηλης απώλειας νερού όσο απομακρυνόμασταν από το πέρας των ακτινοβολήσεων, ενώ στην 3^η ομάδα των μυών τα αποτελέσματα έδειξαν ότι την 7^η ημέρα μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων, συνεχίζει να αυξάνει στατιστικώς σημαντικά η άδηλη απώλεια νερού στο δέρμα.

Τέλος αξίζει επίσης να παραθέσουμε ένα συγκριτικό πίνακα (πίνακας 11) των κλινικών παρατηρήσεων που αφορούσαν την εμφάνιση ξηροδερμίας:

Ομάδα- Φύλο	Ποσοστό μυών που δεν εκδήλωσαν καθόλου ξηροδερμία
A-1	11%
A-2	33%
A-3	78%
Θ-1	10%
Θ-2	10%
Θ-3	25%
Πίνακας 11	

Όπως φαίνεται στον παραπάνω πίνακα οι αρσενικοί διαβητικοί μύες είχαν μικρότερο ποσοστό εκδήλωσης ξηροδερμίας σε σύγκριση με τους θηλυκούς, ενώ η ομάδα 3 συγκρινόμενη με τις άλλες δύο είχε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά μυών που δεν εμφάνισαν καθόλου ξηροδερμία.

Ενδεικτικά παραθέτονται φωτογραφίες θηλυκών και αρσενικών μυών στις 3 μετρήσεις:



Στις παραπάνω φωτογραφίες παρατηρούμε την εμφανή εκδήλωση ξηροδερμίας (1^η μέτρηση) στην περιοχή που εφαρμοζόταν ο μάρτυρας και την σταδιακή βελτίωση της κλινικής εικόνας του μυός στις μετρήσεις που ακολούθησαν. Επιπρόσθετα, αν και στις μετρήσεις δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στην άδηλη απώλεια νερού ανάμεσα στην ανατομική περιοχή του δέρματος που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας και στις υπόλοιπες 3 περιοχές που εφαρμόστηκαν τα αντιοξειδωτικά σκευάσματα, στις φωτογραφίες φαίνεται να υπάρχει σχετική διαφορά.

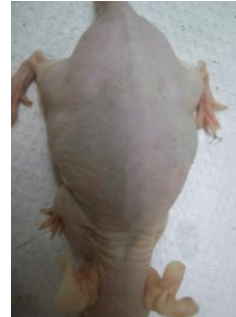
Στις φωτογραφίες που ακολουθούν και είναι ενδεικτικές της ομάδας A-3, δεν παρατηρείται ξηροδερμία και γενικά κάποια διαφορά μεταξύ των τριών μετρήσεων.



A-3/6 (1^η μέτρηση)



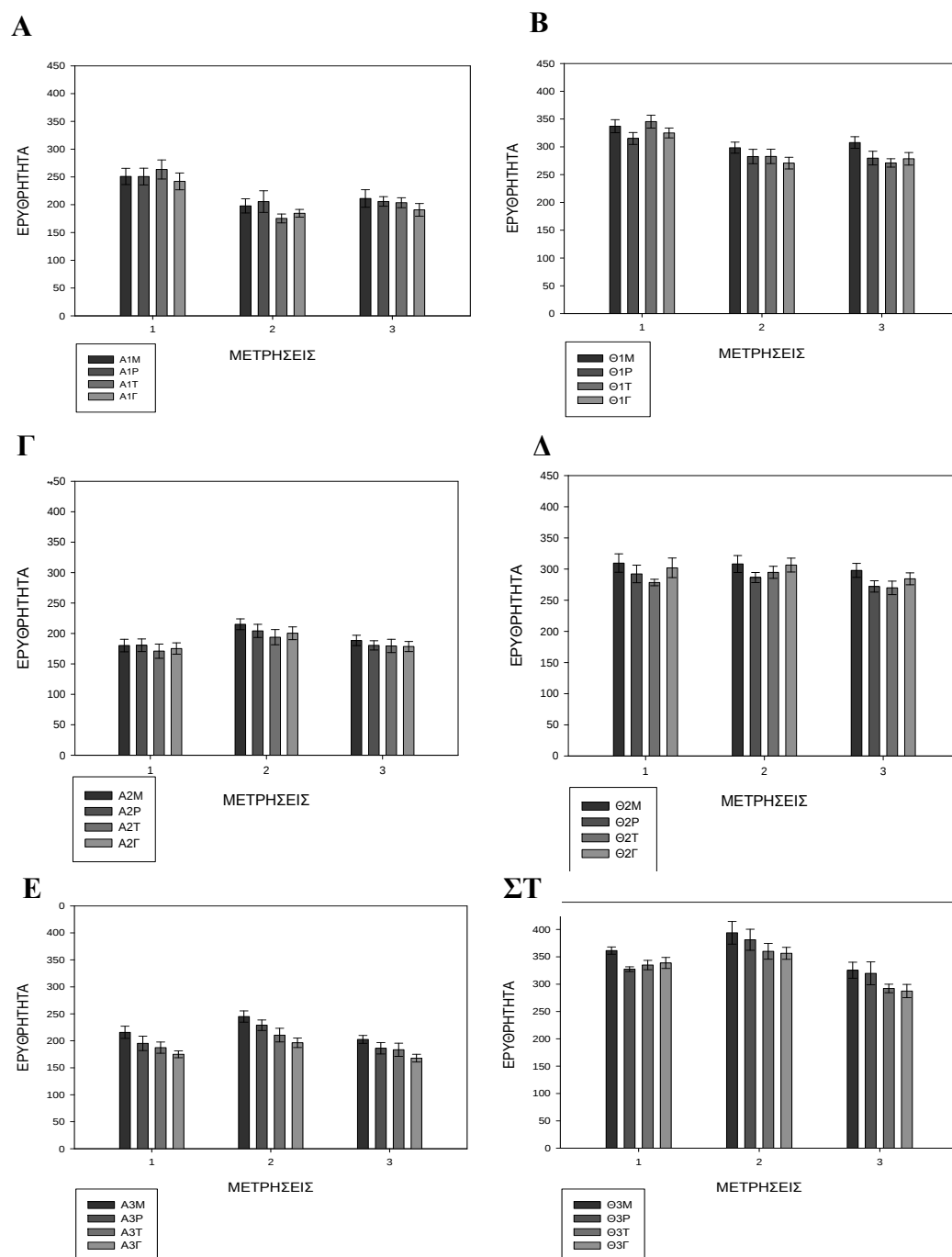
A-3/6 (2^η μέτρηση)



A-3/6 (3^η μέτρηση)

ΜΑΚΡΟΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΡΣΕΝΙΚΩΝ ΜΥΩΝ

Γ.3 Αποτελέσματα μετρήσεων ερυθρότητας



Γράφημα 3 (Α, Β, Γ, Δ, Ε, ΣΤ)

Απεικόνιση των μετρήσεων της ερυθρότητας που ελήφθησαν από το δέρμα των μυών (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, Α1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, Α2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, Α3: αρσενικοί μύες ομάδας 3) όπου εφαρμόζονταν τοπικά σκευάσματα (Μ: μάρτυρας, Ρ: *Pinus Halepensis*, Τ: Tayberry, Γ: γύρη).

Ελήφθησαν συνολικά 3 μετρήσεις για την μελέτη της ερυθρότητας του δέρματος των μυών κατά τη διάρκεια των πειραμάτων:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1η	Την 4 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
2η	Την 7 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
3η	Την 14 ^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
Πίνακας 12	

Κάθε μέτρηση απαρτίζεται από επιμέρους μετρήσεις που ελήφθησαν από τα 4 διαφορετικά σημεία εφαρμογής σκευασμάτων στο δέρμα κάθε μυός.

Αν και δεν παρατηρήθηκε στις μετρήσεις στατιστικώς σημαντική διαφορά στην ερυθρότητα ανάμεσα στην ανατομική περιοχή του δέρματος που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας και στις υπόλοιπες 3 περιοχές που εφαρμόστηκαν τα αντιοξειδωτικά σκευάσματα (γεγονός που εξηγείται από τη θεωρία της μερικής οριζόντιας διάχυσης των ουσιών), αξίζει να παρατηρήσουμε τη στατιστικώς σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων της ερυθρότητας μεταξύ των δύο φύλων.

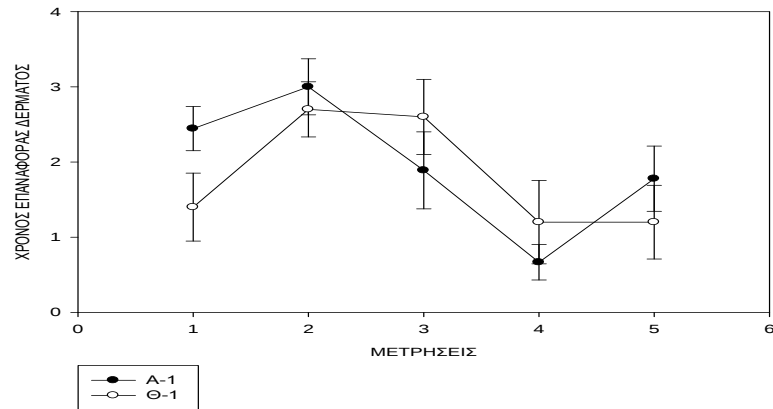
Συμπληρωματικά, παραθέτουμε ένα συγκριτικό πίνακα των κλινικών παρατηρήσεων που αφορούσαν την εμφάνιση ερυθρότητας και εγκαυμάτων:

Ομάδες- Φύλα	Ποσοστό μυών που δεν εμφάνισαν καθόλου ερυθρότητα	Ποσοστό μυών που δεν εκδήλωσαν καθόλου ερύθημα (έγκαυμα) που εξελίχτηκε σε ανοιχτή πληγή
A-1	56%	100%
A-2	56%	100%
A-3	78%	100%
Θ-1	10%	100%
Θ-2	0%	100%
Θ-3	38%	100%
Πίνακας 13		

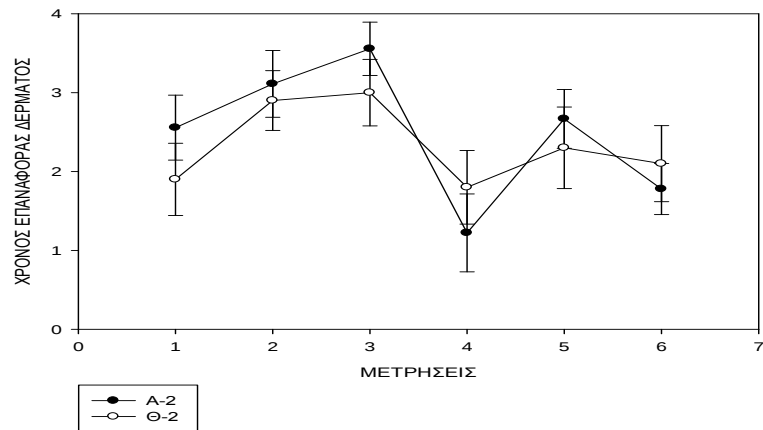
Παρατηρείται και πάλι στην 3^η ομάδα μεγαλύτερο ποσοστό μυών να μην εκδηλώνει καθόλου ερυθρότητα και όλες οι ομάδες αρσενικών να εκδηλώνουν σε μικρότερο ποσοστό ερυθρότητα σε σύγκριση με τα θηλυκά.

Γ.4 Αποτελέσματα μετρήσεων ελαστικότητας (χρόνος επαναφοράς του δέρματος)

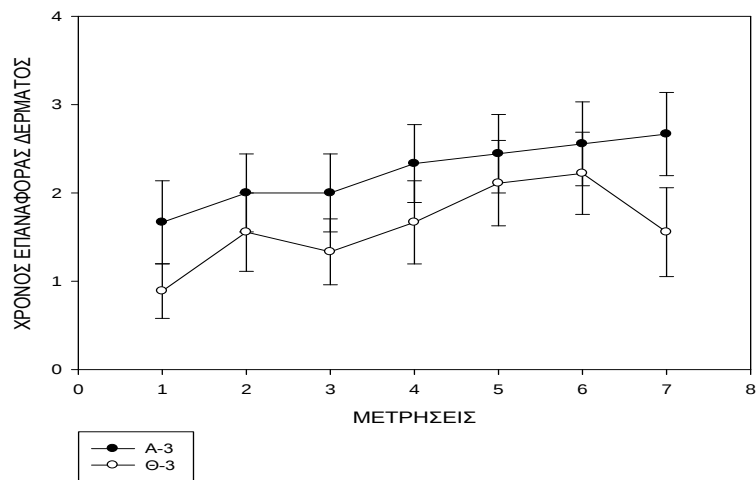
A



B



Γ



Γράφημα 4 (A, B, Γ)

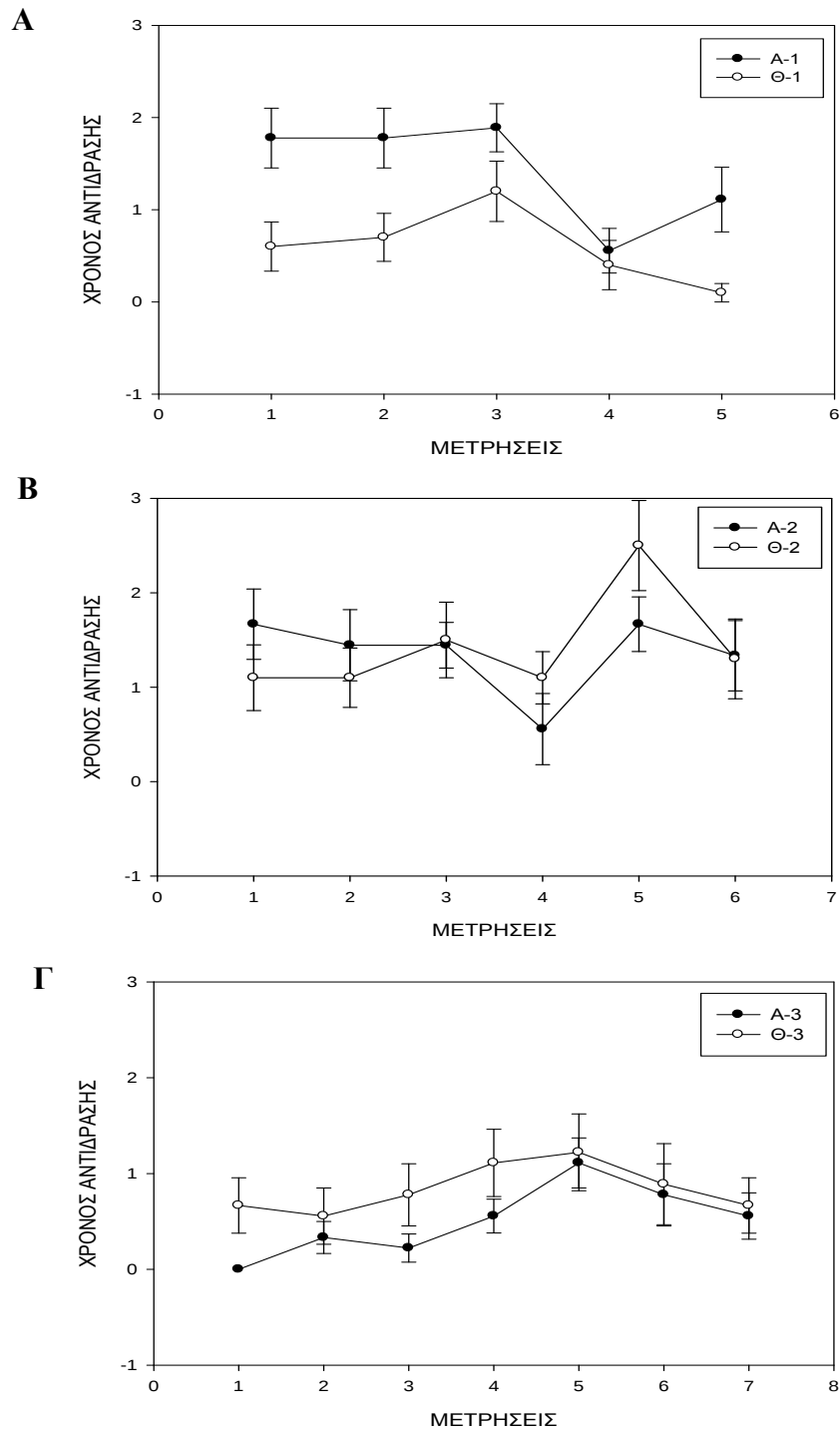
Απεικόνιση των μετρήσεων του χρόνου επαναφοράς του δέρματος των μυών (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, Α1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, Α2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, Α3: αρσενικοί μύες ομάδας 3).

Οι μετρήσεις του χρόνου επαναφοράς του δέρματος πραγματοποιήθηκαν:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1 ^η	Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων (όλες οι ομάδες)
2 ^η	- Ομάδα 1^η: Την ημέρα ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων - Ομάδα 3^η: Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων
3 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων - Ομάδα 3^η: Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων
4 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων
5 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
6 ^η	- Ομάδα 2^η: Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
7 ^η	Ομάδα 3^η: Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
Πίνακας 14	

Στην 3^η ομάδα των μυών παρατηρήθηκε, όπως αναμέναμε σταδιακή αύξηση του χρόνου επαναφοράς του δέρματος (μείωση της ελαστικότητας) καθώς η μειωμένη ελαστικότητα και ο σχηματισμός ρυτίδων φέρονται ως συμπτώματα της φωτογήρανσης αλλά και του διαβήτη^{34,50-54,68,88}. Ωστόσο στις ομάδες 1 και 2 παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου επαναφοράς του ακτινοβολημένου δέρματος κατά την 4^η μέτρηση.

Γ.5 Αποτελέσματα μετρήσεων χρόνου αντίδρασης



Γράφημα 4 (Α, Β, Γ)

Απεικόνιση των μετρήσεων του χρόνου αντίδρασης των μυών (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, Α1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, Α2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, Α3: αρσενικοί μύες ομάδας 3).

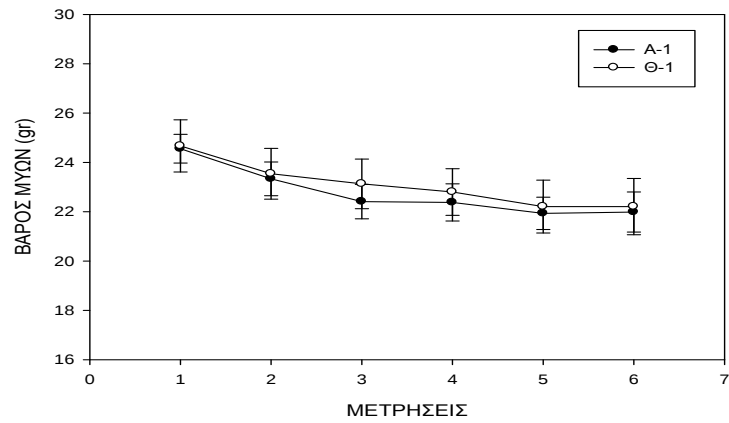
Οι μετρήσεις του χρόνου αντίδρασης των μυών πραγματοποιήθηκαν:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1 ^η	Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων (όλες οι ομάδες)
2 ^η	- Ομάδα 1^η: Την ημέρα ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων - Ομάδα 3^η: Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων
3 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων - Ομάδα 3^η: Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων
4 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων
5 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την 4^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
6 ^η	- Ομάδα 2^η: Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την 7^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
7 ^η	Ομάδα 3^η: Την 14^η ημέρα μετά το τέλος της ακτινοβολήσης
Πίνακας 15	

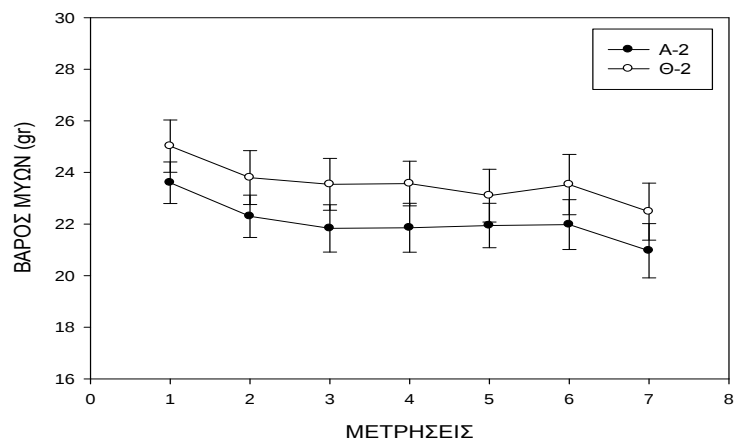
Φυσιολογικά θα αναμέναμε σταδιακή αύξηση του χρόνου αντίδρασης των μυών, καθώς ο σακχαρώδης διαβήτης συσχετίζεται με τον εντοπισμό βλαβών του νευρικού συστήματος που εκδηλώνονται με τη διαταραχή αίσθησης και φέρονται ως συμπτώματα μίας εκ των κυριότερων επιπλοκών του, της Διαβητικής Νευροπάθειας⁸²⁻⁸⁵. Ωστόσο στις ομάδες 1 και 2 παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης κατά την 4^η μέτρηση (7^η και 4^η ημέρα αντίστοιχα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης), ενώ στην 3^η ομάδα παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του χρόνου αντίδρασης στην 6^η και στην 7^η μέτρηση.

Γ.6 Αποτελέσματα μετρήσεων του βάρους των μυών

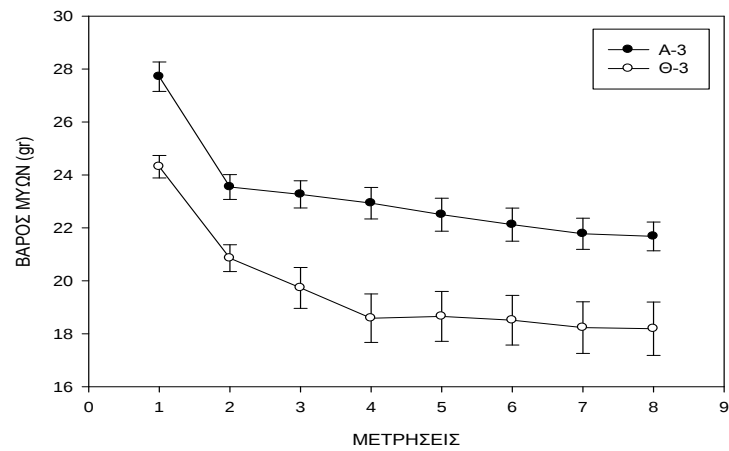
A



B



Γ



Γράφημα 5 (A, B, Γ)

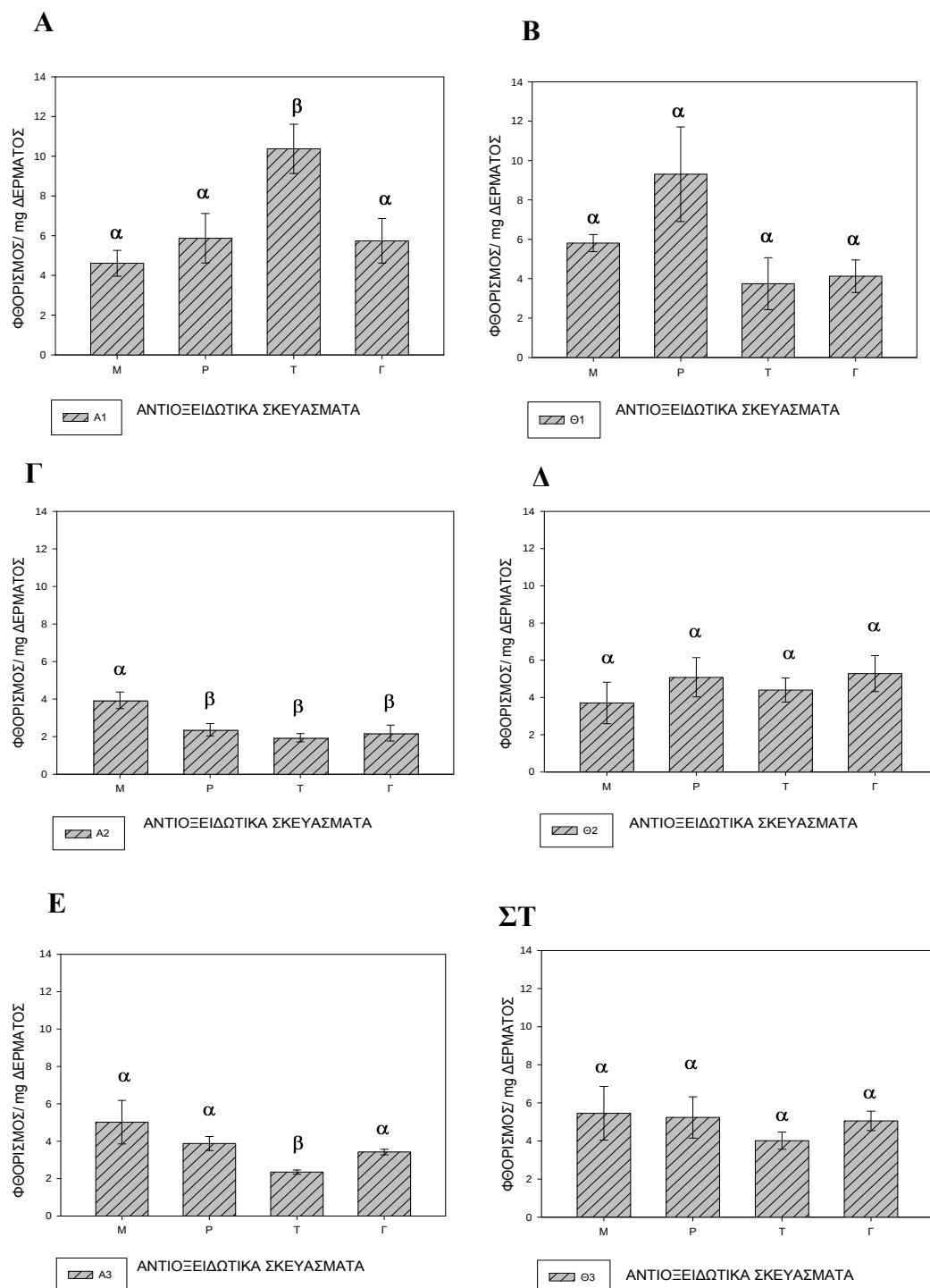
Απεικόνιση των μετρήσεων του σωματικού βάρους των μυών (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, A1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, A2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, A3: αρσενικοί μύες ομάδας 3).

Οι ζυγίσσεις των μυών πραγματοποιήθηκαν:

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ	ΧΡΟΝΟΣ ΛΗΨΗΣ ΤΗΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ
1 ^η	Την ημέρα έναρξης των επαλείψεων
2 ^η	Την ημέρα έναρξης των ακτινοβολήσεων (πριν την 1^η ακτινοβολήση)
3 ^η	- Ομάδα 1^η: Την ημέρα ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 3^η ημέρα των ακτινοβολήσεων - Ομάδα 3^η: Την 4^η ημέρα των ακτινοβολήσεων
4 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 4^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων - Ομάδα 3^η: Την 7^η ημέρα των ακτινοβολήσεων
5 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 7^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 4^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την ημέρα λήξης των ακτινοβολήσεων
6 ^η	- Ομάδα 1^η: Την 14^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης - Ομάδα 2^η: Την 7^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την 4^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
7 ^η	- Ομάδα 2^η: Την 14^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης - Ομάδα 3^η: Την 7^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
8 ^η	Ομάδα 3^η: Την 14^η ημέρα μετά το πέρας της ακτινοβολήσης
Πίνακας 16	

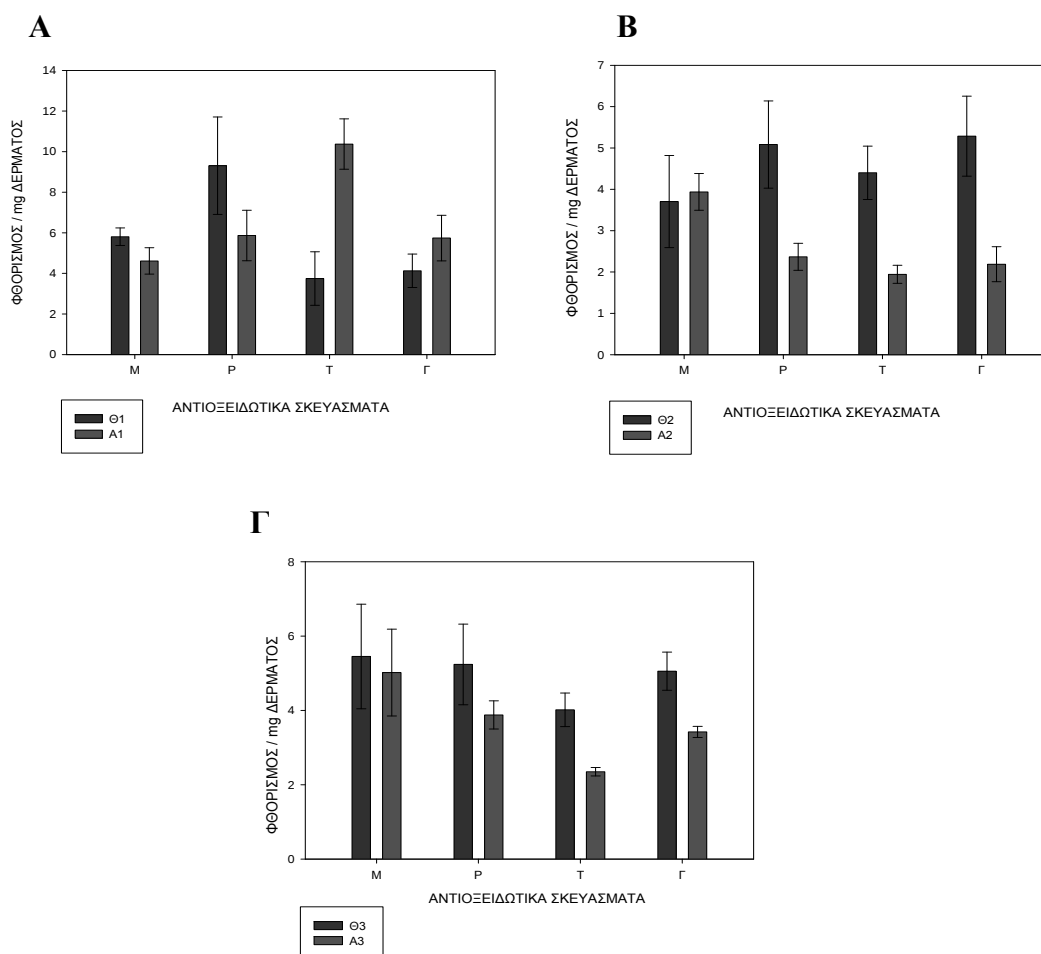
Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του σωματικού βάρους των μυών κατά την εξέλιξη του πειράματος, αν και αξίζει να σημειωθεί η απότομη μείωση που παρατηρήθηκε στην 2^η μέτρηση (και στις 3 ομάδες), πριν την έναρξη των επαλείψεων καθώς και στην 7^η μέτρηση της 2^{ης} ομάδας (και στα 2 φύλα), την 14^η ημέρα μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να δείξουν την πιθανή αντιοξειδωτική δράση των σκευασμάτων στο δέρμα όταν υπάρχει ρήξη του δερματικού φραγμού ύστερα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία.

Γ.7 Αποτελέσματα μετρήσεων οξειδωτικού στρες στο δέρμα



Γράφημα 6 (A, B, Γ, Δ, Ε, ΣΤ)

Απεικόνιση των μετρήσεων του οξειδωτικού στρες στο δέρμα των μυών (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, A1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, A2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, A3: αρσενικοί μύες ομάδας 3).



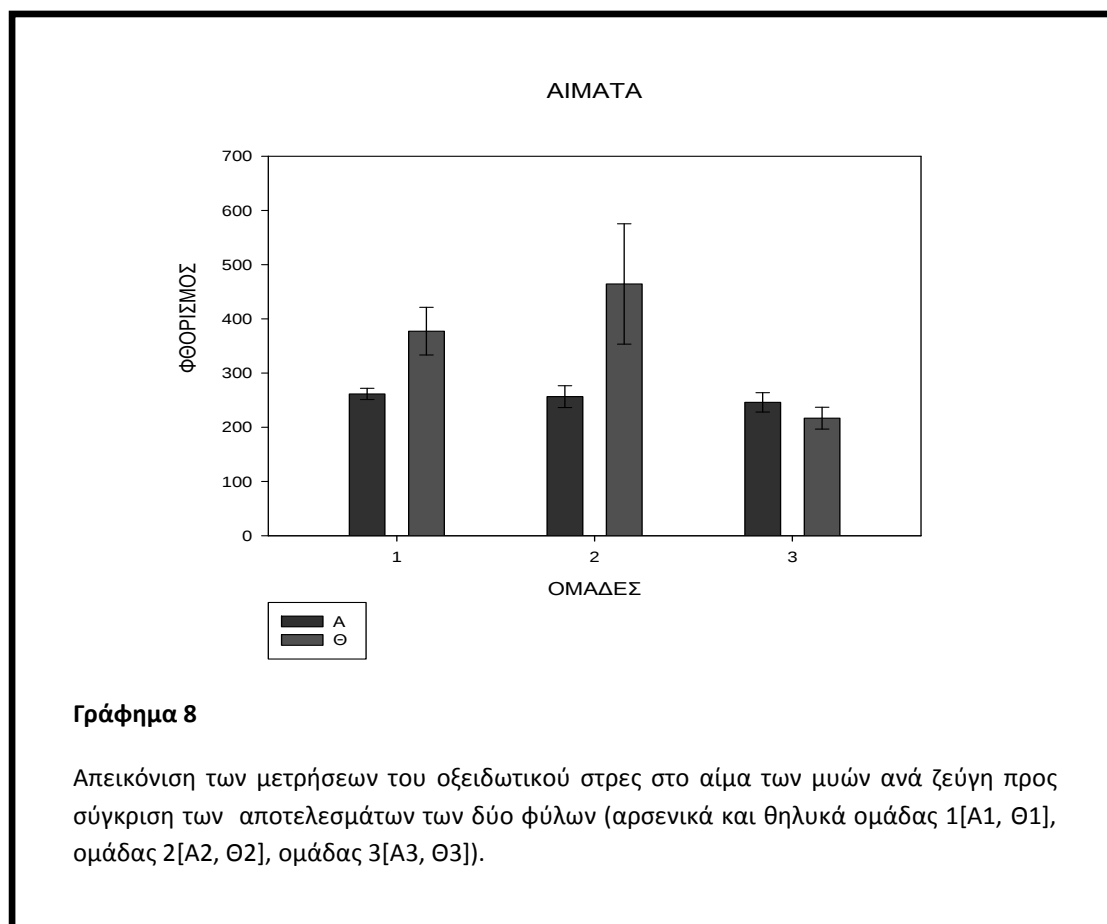
Γράφημα 7 (Α, Β, Γ)

Απεικόνιση των μετρήσεων του οξειδωτικού στρες στο δέρμα των μυών ανά ζεύγη προς σύγκριση των αποτελεσμάτων των δύο φύλων (Θ1: θηλυκοί μύες ομάδας 1, Θ2: θηλυκοί μύες ομάδας 2, Θ3: θηλυκοί μύες ομάδας 3, Α1: αρσενικοί μύες ομάδας 1, Α2: αρσενικοί μύες ομάδας 2, Α3: αρσενικοί μύες ομάδας 3).

Οι μετρήσεις του οξειδωτικού στρες στο δέρμα των μυών δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά υπέρ των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων που εφαρμόστηκαν στους θηλυκούς μύες και των τριών ομάδων. Ενώ οι μετρήσεις στο δέρμα των αρσενικών έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες ήταν στατιστικώς σημαντικά μειωμένο στα σημεία που εφαρμόστηκε αντιοξειδωτικό σκεύασμα με Tayberry στην 2^η (P =

<0,001) και 3^η ομάδα (P = 0,002). Επίσης στην 2^η ομάδα των αρσενικών και τα άλλα 2 αντιοξειδωτικά σκευάσματα (*Pinus halepensis*: P = 0,012, Γύρη: P = 0,011) έδειξαν να έχουν στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στη μείωση του οξειδωτικού στρες στο δέρμα. Αξίζει, ακόμη, να αναφερθεί ότι στην 1^η ομάδα των αρσενικών φάνηκε να προκαλείται στατιστικώς σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες στο δέρμα που εφαρμόστηκε Tayberry (P = <0,001), σε σύγκριση με την περιοχή που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας. Τέλος στην 3^η ομάδα των μυών παρατηρείται ομοιομορφία/αντιστοιχία των αποτελεσμάτων στα 2 φύλα.

Γ.8 Αποτελέσματα μετρήσεων οξειδωτικού στρες στο αίμα



Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες στο αίμα των αρσενικών και στις τρεις ομάδες κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, ενώ στα θηλυκά παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές, στις τιμές του οξειδωτικού στρες στο αίμα, μεταξύ των τριών ομάδων. Επιπλέον χρήζουν επισημάνσης τα υψηλότερα επίπεδα (στατιστικώς σημαντικά) του οξειδωτικού στρες στο αίμα των θηλυκών μυών των ομάδων 1 και 2 σε σύγκριση με αυτά των αρσενικών.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα ενότητα παρατίθεται μια προσπάθεια περαιτέρω ερμηνείας των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων:

• ΕΠΙΠΕΔΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν **στατιστικώς σημαντική πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όλων των μυών** κατά την 2^η μέτρηση, συγκρινόμενη με την 1^η μέτρηση. Δηλαδή, πιο συγκεκριμένα:

- Όλοι οι μύες της 1^{ης} ομάδας, που είχαν εκτεθεί σε εφάπαξ ακτινοβολία UV δόσης 3 MED για 15 sec, σε διάστημα 7 ημερών (10 ημέρες επάλειψη με αντιοξειδωτικά σκευάσματα) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.
- Όλοι οι μύες της 2^{ης} ομάδας, που είχαν εκτεθεί σε 5 μέρες ακτινοβολία UV δόσης 1 MED για 5 sec/ ημέρα, σε διάστημα 12 ημερών (15 ημέρες επάλειψη με αντιοξειδωτικά σκευάσματα) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.
- Όλοι οι μύες της 3^{ης} ομάδας, που είχαν εκτεθεί σε 15 μέρες ακτινοβολία UV δόσης 1 MED για 5 sec/ ημέρα, σε διάστημα 23 ημερών (26 ημέρες επάλειψη με αντιοξειδωτικά σκευάσματα) παρουσίασαν στατιστικώς σημαντική πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα.

Η αξιοσημείωτη πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα των μυών, παρατηρήθηκε και στα δύο φύλα, κατά τη χρονική περίοδο που θεωρητικά ο φραγμός του δέρματος υφίστατο ρήξη γεγονός που οφείλεται στη συνεργιστική δράση δύο παραγόντων (σακχαρώδης διαβήτης, UV). Ο σακχαρώδης διαβήτης προκαλεί πολλές παθοφυσιολογικές αλλαγές στο δέρμα όπου παρατηρείται μειωμένη περιεκτικότητα σε νερό της κεράτινης στιβάδας και διαταραχή του κύκλου εργασιών της επιδερμίδας^{79,88}, ενώ η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία επιτείνει τις επιπλοκές αυτές (φωτογήρανση)^{19,34} διαταράσσοντας περαιτέρω τη λειτουργία του δερματικού φραγμού. Σε μια προσπάθεια να ερμηνεύσουμε τα αποτελέσματα των επιπέδων γλυκόζης, θα στραφούμε αρχικά στη βασική αρχή της από του δέρματος απορρόφησης που το θέλει να αποτελεί ταχύτατη πύλη εισόδου ουσιών όταν έχει διαταραχθεί η φυσιολογική λειτουργία του²¹². Υπό αυτές τις συνθήκες τα τοπικώς

χορηγούμενα αντιοξειδωτικά σκευάσματα φαίνεται να διαπέρασαν τον διαταραγμένο φραγμό του δέρματος και δεδομένου ότι στην υπεργλυκαιμία διαπιστώνεται αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών που ευθύνονται για την εμφάνιση των επιπλοκών του σακχαρώδους διαβήτη, αλλά και για το ίδιο το φαινόμενο αντίστασης στην δράση της ινσουλίνης ⁸⁹, **τα αποτελέσματα που προέκυψαν είναι δείγμα πιθανής υπογλυκαιμικής δράσης των τοπικώς χορηγούμενων αντιοξειδωτικών σκευασμάτων (κάποιου εξ αυτών ή συνδυασμού τους).** Είναι πολύ πιθανό, η μείωση του οξειδωτικού στρες των κυττάρων (ως αποτέλεσμα της δράσης των αντιοξειδωτικών) να προκάλεσε ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών που άμεσα συνδέονται με τη δράση της ινσουλίνης, έτσι ώστε η μεταγωγή του σήματος από τους υποδοχείς της ινσουλίνης να ακολουθεί ένα φυσιολογικό ρυθμό.

Επιπλέον παρατηρήθηκε σταθεροποίηση της γλυκόζης του αίματος σε χαμηλά επίπεδα ακόμη και όταν ο φραγμός του δέρματος φαίνεται να είχε επανέλθει στη φυσιολογική του κατάσταση. Τα διατηρούμενα χαμηλά επίπεδα γλυκόζης στο αίμα των μυών εντείνουν την ανάγκη εκτενέστερη και πιο εξειδικευμένη μελέτη προς επιβεβαίωση, τεκμηρίωση αλλά και ακριβέστερη ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

- ΑΔΗΛΗ ΑΠΩΛΕΙΑ ΝΕΡΟΥ

Τα αποτελέσματα της άδηλης απώλειας νερού δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην ανατομική περιοχή του δέρματος που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας και στις υπόλοιπες 3 περιοχές που εφαρμόστηκαν τα αντιοξειδωτικά σκευάσματα, γεγονός που εξηγείται εν μέρει από τη θεωρία οριζόντιας/πλάγιας διάχυσης των ουσιών. Ωστόσο, παρατηρήθηκε εκδήλωση ξηροδερμίας/ έντονη απολέπιση στην περιοχή που εφαρμοζόταν ο μάρτυρας. Επιπλέον, παρατηρήθηκε, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των πρώτων μετρήσεων (που έλαβαν χώρα 4 ημέρες μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων) των τριών ομάδων, σημαντική μείωση της άδηλης απώλειας νερού όσο αυξάνεται ο χρόνος ακτινοβολήσεως των μυών, ακριβώς το αντίθετο από αυτό που θα αναμενόταν καθώς και οι δύο παράμετροι που εξετάζονται (διαβήτη, υπεριώδης ακτινοβολία) με την πάροδο του χρόνου επιτείνουν την άδηλη απώλεια νερού ^{79,88,213}. Το φαινόμενο αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί με το γεγονός ότι αυξανόταν παράλληλα και ο χρόνος εφαρμογής των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων, μια ερμηνεία αποδεκτή βιβλιογραφικά ²¹⁴. Ακόμη, στην 1^η μέτρηση που διεξάχθηκε, παρατηρείται

στατιστικώς σημαντική διαφορά στις τιμές που ελήφθησαν, μεταξύ των δύο φύλων και των τριών ομάδων. Πιο συγκεκριμένα, στις δύο πρώτες ομάδες μυών, παρατηρείται **στατιστικώς σημαντικά αυξημένη άδηλη απώλεια νερού** στο δέρμα των θηλυκών σε σύγκριση με τα αρσενικά των αντίστοιχων ομάδων (ενώ στην 3^η ομάδα παρατηρείται ακριβώς το αντίθετο), γεγονός που καταδεικνύει ότι η διαφορετική φυσιολογία των δύο φύλων αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που πρέπει να συνυπολογιστεί για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων. Ομοίως πρέπει να μελετηθεί και η μακροσκοπική παρατήρηση που θέλει τους αρσενικούς διαβητικούς μύες να έχουν μικρότερο ποσοστό εκδήλωσης ξηροδερμίας σε σύγκριση με τους θηλυκούς. Αξίζει, επίσης, να σημειωθεί σχετικά με την 1^η μέτρηση, ότι αν και μετά την εφάπαξ και μέση χρόνια δόση ακτινοβολίας UV, τα θηλυκά παρουσιάζουν πιο αυξημένη άδηλη απώλεια νερού, μετά τη μακρά χρόνια δόση UV η άδηλη απώλεια νερού είναι μειωμένη σε σύγκριση με τα αρσενικά, ίσως αναπτύσσοντας κάποιο μηχανισμό προστασίας. Ακόμη παρατηρήθηκε, στις ομάδες 1 και 2 (και στα δύο φύλα) **στατιστικώς σημαντική πτώση** της άδηλης απώλειας νερού όσο απομακρυνόμασταν από το πέρας των ακτινοβολήσεων και αυξανόμενου του συνολικού χρόνου εφαρμογής των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων, ενώ στην 3^η ομάδα των μυών τα αποτελέσματα έδειξαν ότι την 7^η ημέρα μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων, συνεχίζει να **αυξάνει στατιστικώς σημαντικά** η άδηλη απώλεια νερού στο δέρμα (και στα δύο φύλα), γεγονός που δικαιολογείται από τη μεγαλύτερη δόση ακτινοβολίας που δέχτηκαν, την συνεργιστική δράση του διαβήτη που δρα εκφυλιστικά με το χρόνο, αλλά πιθανότατα καταδεικνύει και την ανεπάρκεια της δόσης των αντιοξειδωτικών για την αποκατάσταση των φυσιολογικών επιπέδων ύδατος στο δέρμα. Ωστόσο, η μακροσκοπική παρατήρηση έδειξε ότι η ομάδα 3 συγκρινόμενη με τις άλλες δύο είχε πολύ μεγαλύτερα ποσοστά μυών που δεν εμφάνισαν καθόλου απολέπιση, γεγονός που ερμηνεύεται από τις σημαντικά χαμηλότερες τιμές άδηλης απώλειας νερού που σημειώθηκαν σε σύγκριση με τις άλλες δύο ομάδες.

- ΕΡΥΘΡΗΤΗΤΑ

Αν και δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα της ερυθρότητας ανάμεσα στην ανατομική περιοχή του δέρματος που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας και στις υπόλοιπες 3 περιοχές που εφαρμόστηκαν τα αντιοξειδωτικά σκευάσματα (γεγονός που εξηγείται από τη θεωρία της μερικής

οριζόντιας διάχυσης των ουσιών), αξίζει να παρατηρήσουμε τη **στατιστικώς σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων της ερυθρότητας μεταξύ των δύο φύλων** αλλά και τις μακροσκοπικές παρατηρήσεις που θέλουν τα θηλυκά να εκδηλώνουν δερματική ερυθρότητα σε μεγαλύτερο ποσοστό, αποτελέσματα που καταδεικνύουν ότι η διαφορετική φυσιολογία των δύο φύλων αποτελεί έναν ακόμη παράγοντα που πρέπει να συνυπολογιστεί για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων. Φαίνεται ότι η φυσιολογία των αρσενικών είναι πιο δεκτική στη αντηλιακή και πιθανότατα στην αντιφλεγμονώδη δράση¹⁸ των τοπικώς εφαρμοζόμενων αντιοξειδωτικών, καθώς δεν παρατηρήθηκε φλεγμονή (ή δεν ήταν εμφανής), ίσως επειδή οι διαβητικοί μύες δεν είχαν τους μηχανισμούς να την εκδηλώσουν. Επιπλέον αξίζει να σημειωθεί ότι η 3^η ομάδα, σε μεγαλύτερο ποσοστό μυών, δεν εκδήλωσε καθόλου ερυθρότητα., παρατήρηση που δείχνει την πιθανή προστατευτική δράση των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων όταν εφαρμόζονται τοπικά για μεγάλο χρονικό διάστημα.

- ΧΡΟΝΟΣ ΕΠΑΝΑΦΟΡΑΣ ΔΕΡΜΑΤΟΣ (ΕΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ)

Στην 3^η ομάδα των μυών παρατηρήθηκε, όπως αναμέναμε σταδιακή αύξηση του χρόνου επαναφοράς του δέρματος (μείωση της ελαστικότητας) καθώς η μειωμένη ελαστικότητα και ο σχηματισμός ρυτίδων φέρονται ως συμπτώματα της φωτογήρανσης αλλά και του διαβήτη^{34,50-54,68,88}. Ωστόσο στις ομάδες 1 και 2 παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και **στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου επαναφοράς του ακτινοβολημένου δέρματος** κατά την 4^η μέτρηση (την 7^η και 4^η αντίστοιχα ημέρα μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων). Η μείωση του χρόνου επαναφοράς του δέρματος τη χρονική περίοδο που θεωρητικά ο φραγμός του δέρματος υφίστατο ρήξη ύστερα από την ακτινοβολήσή του με UV, δείχνει την πιθανή αντιοξειδωτική δράση των σκευασμάτων όταν οι συνθήκες επιτρέπουν την διαπέραση του δερματικού φραγμού²¹³.

- ΧΡΟΝΟΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ

Παράλληλα, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και **στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης των μυών**, τη χρονική περίοδο που θεωρητικά ο φραγμός του δέρματος υφίστατο ρήξη ύστερα από την ακτινοβολήσή του με UV. Πιο συγκεκριμένα, στις ομάδες 1 και 2 παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη και στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης κατά την 4^η μέτρηση (7^η και 4^η ημέρα

αντίστοιχα μετά το πέρας της ακτινοβολήσεως), ενώ στην 3^η ομάδα παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του χρόνου αντίδρασης στην 6^η και στην 7^η μέτρηση (7^η και 14^η ημέρα μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων). Η παρατήρηση αυτή θα μπορούσε δείχνει και πάλι την πιθανή αντιοξειδωτική δράση των σκευασμάτων στο δέρμα όταν οι συνθήκες επιτρέπουν την διαπέραση του δερματικού φραγμού ²¹³, αφού, φυσιολογικά θα αναμέναμε σταδιακή αύξηση του χρόνου αντίδρασης των μυών, καθώς ο σακχαρώδης διαβήτης συσχετίζεται με τον εντοπισμό βλαβών του νευρικού συστήματος που εκδηλώνονται με τη διαταραχή αίσθησης και φέρονται ως συμπτώματα μίας εκ των κυριότερων επιπλοκών του, της Διαβητικής Νευροπάθειας⁸²⁻⁸⁵.

- ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΒΑΡΟΣ ΜΥΩΝ

Όπως ήταν αναμενόμενο, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του σωματικού βάρους των μυών κατά την εξέλιξη του πειράματος, αν και αξίζει να συγκριθεί με την απότομη πτώση που παρατηρήθηκε πριν την έναρξη των επαλείψεων καθώς και μετά το πέρας των ακτινοβολήσεων, γεγονός που δείχνει ότι το σωματικό βάρος των μυών διατηρήθηκε κατά τη διάρκεια των ακτινοβολήσεων σε σχετικά σταθερά επίπεδα. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να δείξουν την πιθανή αντιοξειδωτική δράση των σκευασμάτων στο δέρμα όταν υπάρχει ρήξη του δερματικού φραγμού ύστερα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία ²¹³.

- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΔΕΡΜΑ

Οι μετρήσεις του οξειδωτικού στρες στο δέρμα των μυών δεν έδειξαν στατιστικώς σημαντική διαφορά υπέρ των αντιοξειδωτικών σκευασμάτων που εφαρμόστηκαν στους θηλυκούς μύες και των τριών ομάδων. Ωστόσο, στους αρσενικούς μύες που εκτέθηκαν σε χρόνιες δόσεις UV, παρατηρήθηκε **στατιστικώς σημαντική μείωση του οξειδωτικού στρες στα σημεία που εφαρμόστηκε αντιοξειδωτικό σκεύασμα με Tayberry**. Επίσης στην 2^η ομάδα των αρσενικών και **τα άλλα 2 αντιοξειδωτικά σκευάσματα (*Pinus halepensis*, γύρη)** έδειξαν να έχουν **στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα στη μείωση του οξειδωτικού στρες στο δέρμα**. Αξίζει, ακόμη, να αναφερθεί ότι στην 1^η ομάδα των αρσενικών φάνηκε να προκαλείται **στατιστικώς σημαντική αύξηση του οξειδωτικού στρες στο δέρμα που εφαρμόστηκε Tayberry** σε σύγκριση με την περιοχή που εφαρμόστηκε το σκεύασμα μάρτυρας, γεγονός που επιβεβαιώνει την άποψη που θέλει τα αντιοξειδωτικά να δρουν ως προ-

οξειδωτικά σε διαφορετικές δόσεις. Τέλος στην 3^η ομάδα των μυών παρατηρείται ομοιομορφία/ αντιστοιχία των αποτελεσμάτων στα 2 φύλα, γεγονός που δείχνει ότι η διαφορετική φυσιολογία των δύο φύλων δεν χρειάζεται να συνυπολογιστεί για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων.

- ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟ ΑΙΜΑ

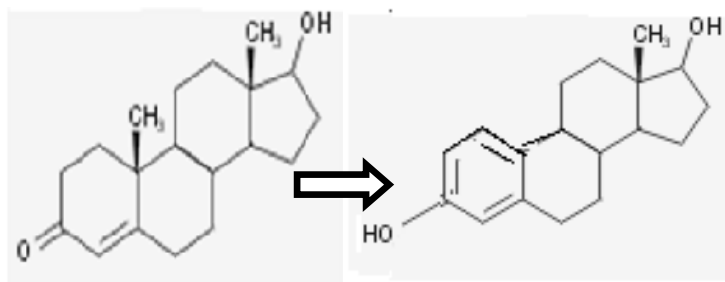
Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το οξειδωτικό στρες στο αίμα των αρσενικών, ανεξαρτήτως χρονικής διάρκειας και δόσης ακτινοβολίας, κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα, ενώ στα θηλυκά παρατηρήθηκαν **στατιστικώς σημαντικές διαφορές**, στις τιμές του οξειδωτικού στρες στο αίμα, μεταξύ των τριών ομάδων. Επιπλέον χρήζουν επισήμανσης τα **υψηλότερα επίπεδα (στατιστικώς σημαντικά) του οξειδωτικού στρες στο αίμα των θηλυκών μυών των ομάδων 1 και 2 σε σύγκριση με αυτά των αρσενικών**, καθώς καταδεικνύεται η ανάγκη συνυπολογισμού του παράγοντα των διαφορετικών φύλων για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων. Τέλος, παρατηρείται για μία ακόμη η 3^η ομάδα να παρουσιάζει καλύτερα αποτελέσματα (χαμηλότερα επίπεδα οξειδωτικού στρες σε σύγκριση με τις άλλες δύο), μη αναμενόμενα καθώς και οι δύο μελετώμενοι παράγοντες (σακχαρώδης διαβήτης, υπεριώδης ακτινοβολία) αυξανόμενου του χρόνου επίδρασής τους, ευθύνονται για την αυξημένη παραγωγή ελευθέρων ριζών και άρα πρόκληση οξειδωτικού στρες^{100,101,119-122}. Οι παρατηρήσεις αυτές θα μπορούσαν να δείξουν την πιθανή αντιοξειδωτική δράση των σκευασμάτων αυξανόμενου του χρόνου εφαρμογής τους στο δέρμα όταν υπάρχει ρήξη του δερματικού φραγμού ύστερα από έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία²¹³.

- ΕΡΜΗΝΕΙΑ ΤΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑ ΔΥΟ ΦΥΛΑ

Στα αποτελέσματα που αφορούσαν την άδηλη απώλεια νερού, την ερυθρότητα αλλά και το οξειδωτικό στρες στο δέρμα και το αίμα των μυών, παρατηρήθηκαν **στατιστικώς σημαντικές διαφορές** στις τιμές που ελήφθησαν, μεταξύ των δύο φύλων και των τριών ομάδων. Σε μια προσπάθεια ερμηνείας τους θα ανατρέξουμε στην δομή, στη βιοσύνθεση των οιστρογόνων από τα ανδρογόνα καθώς και στο μεταβολισμό τους:

Η αντίδραση μετατροπής των ανδρογόνων σε οιστρογόνα, καταλύεται από μία μονοοξυγονάση που ονομάζεται αρωματάση του κυτοχρώματος P-450. Η

αρωματοποίηση γίνεται με 3 διαδοχικές αντιδράσεις υδροξυλίωσης, κατά τις οποίες χρησιμοποιείται μοριακό O₂ και το ανηγμένο συνένζυμο NADPH.



Ανδρογόνα

Οιστρογόνα

Τα 3 είδη των κυκλοφορούντων οιστρογόνων στον άνθρωπο είναι η 17β-οιστραδιόλη (E2), η οιστρόνη (E1) και η οιστριόλη (E3).

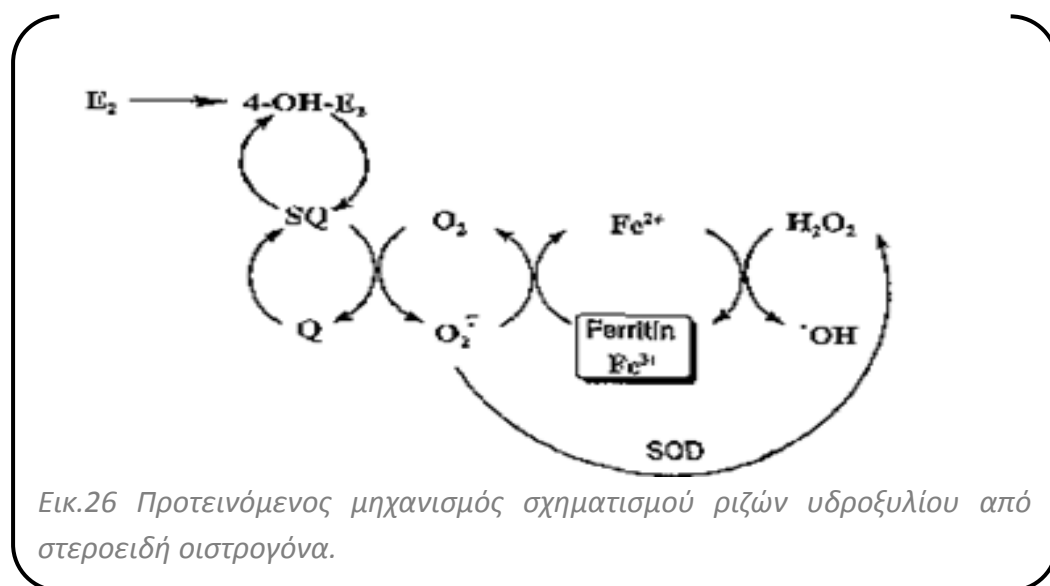
Αντιοξειδωτική δράση οιστρογόνων

Η αντιοξειδωτική δράση των οιστρογόνων συνδέεται με τη φαινολική δομή της 17β-οιστραδιόλης και των μεταβολιτών της με πιθανό αποτέλεσμα το σχηματισμό φαινόξυ-ριζών που μπορούν πάλι να μετατραπούν σε φαινόλες από άλλα κυτταρικά αντιοξειδωτικά ¹³¹. Ακόμη, αποδεικνύεται ότι τα οιστρογόνα μειώνουν την βιοδιαθεσιμότητα ανιόντων υπεροξειδίου *in vivo* και ότι η αντιοξειδωτική τους δράση μπορεί να εξαρτάται από την άμεση ρυθμιστική δράση των οιστρογόνων με τη δραστηριότητα του NADPH ²³². Επιπλέον, *in vitro* πειράματα σε ηπατοκύτταρα αρουραίων έδειξαν ότι η 17β-οιστραδιόλη εμποδίζει την κυτταρική οξείδωση των λιπιδίων που προκαλείται από το Fe(III)/ADP συγκρότημα ²³³.

Προ-οξειδωτική δράση των οιστρογόνων ²³⁴

Τα οιστρογόνα μεταβολίζονται με τη δράση είτε σουλφατασών είτε γλυκουρονιδασών αλλά και μέσω υδροξυλίωσης και επακόλουθης μεθυλίωσής τους προς τα υδροξυλιωμένα και μεθυλιωμένα παράγωγά τους. Τα υδροξυλιωμένα παράγωγα των οιστρογόνων συμμετέχουν σε μια σειρά αντιδράσεων κατά τις οποίες παρατηρείται **σχηματισμός ελευθέρων ριζών** και ενδιάμεσων κινόνης. Πιο αναλυτικά, τα στεροειδή οιστρογόνα μετατρέπονται σε κατεχολικούς μεταβολίτες μέσω οξείδωσης που διαμεσολαβείται από το κυτόχρωμα P-450. Για παράδειγμα η 4-υδροξυεστραδιόλη (μεταβολίτης της 17β-οιστραδιόλης) οξειδώνεται περαιτέρω σε ημικινόνες (SQ) και κινόνες (Q) σε μεγαλύτερα ποσοστά από ότι σε 2-υδροξυοιστρογόνα.

Οι κινόνες δύνανται να αναχθούν από την NADPH-εξαρτώμενη αναγωγή του κυτοχρώματος P-450. Ακολούθως σχηματίζονται ρίζες υπεροξειδίου που ανάγουν το F_3^+ της φερριτίνης σε F_2^+ που με τη σειρά του ανάγει το H_2O_2 σχηματίζοντας ρίζες υδροξυλίου [Εικ.26].



Επομένως, τα οιστρογόνα έχουν προ-οξειδωτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες που εξαρτώνται από τη διαθεσιμότητα σε ιόντα μετάλλων ή από τη συγκέντρωσή τους. Στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με τα παραπάνω, η ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι διττή:

1. Τα τοπικώς χορηγούμενα αντιοξειδωτικά σκευάσματα δεν φάνηκε να δρουν θετικά στη μείωση του οξειδωτικού στρες, της άδηλης απώλειας νερού και της ερυθρότητας στο δέρμα των θηλυκών μυών γιατί πιθανώς η αντιοξειδωτική δράση των οιστρογόνων υπερκάλυψε την δράση των σκευασμάτων.
2. Τα τοπικώς χορηγούμενα αντιοξειδωτικά σκευάσματα δεν φάνηκε να δρουν θετικά στη μείωση του οξειδωτικού στρες, της άδηλης απώλειας νερού και της ερυθρότητας στο δέρμα των θηλυκών μυών γιατί πιθανώς η προ-οξειδωτική δράση των οιστρογόνων ανταγωνίστηκε την αντιοξειδωτική δράση των σκευασμάτων.

Οι δύο προηγούμενες ερμηνείες καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι η δόση των αντιοξειδωτικών ήταν μικρή για την εμφάνιση αξιοποιήσιμων αποτελεσμάτων στα θηλυκά και προτείνεται στο εξής ο συνυπολογισμός του παράγοντα «φύλο» κατά το

σχεδιασμό πειραμάτων (και τον υπολογισμό της χορηγούμενης δόσης) που αφορούν τη μελέτη αντιοξειδωτικών ουσιών.

- ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

Κατά το σχεδιασμό των πειραμάτων της παρούσας μελέτης επιλέχθηκε η τοπική εφαρμογή 4 σκευασμάτων (3 αντιοξειδωτικά σκευάσματα προς μελέτη και 1 μάρτυρας) σε κάθε μυ προς εξάλειψη ενδοατομικών διαφορών, χωρίς όμως να έχει συνυπολογιστεί το φαινόμενο της μερικής οριζόντιας διάχυσης των ουσιών στο δέρμα, γεγονός που δεν κατέστησε δυνατή τη διεξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων για κάθε ένα από προς μελέτη σκευάσματα. Στο εξής δεν προτείνεται η υothήτηση παρόμοιας μεθοδολογίας για διεξαγωγή αποτελεσμάτων σε περιπτώσεις μελέτης διαφορετικών τοπικώς χορηγούμενων ουσιών/ σκευασμάτων.

Συμπερασματικά, τα μελετώμενα σκευάσματα έδειξαν να ασκούν αντιοξειδωτική δράση εφαρμοζόμενα τοπικώς, καθώς και πιθανή υπογλυκαιμική δράση γεγονός που θα μπορούσε να επιβεβαιωθεί σε επόμενη πειραματική μελέτη με εκτενέστερη παρακολούθηση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Επιπλέον, σε όλες τις επιμέρους μετρήσεις που διενεργήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, φάνηκε ότι τη χρονική περίοδο που η έκθεση στο UV είχε προκαλέσει λύση του φραγμού του δέρματος, εισχωρούμενα τα σκευάσματα στις εσωτερικές στιβάδες του δέρματος, έδρασαν προστατευτικά αναστέλλοντας/ μειώνοντας την άδηλη απώλεια νερού από το δέρμα, την πρόκληση δερματικής φλεγμονής και την εμφάνιση ερυθρότητας (αποτελέσματα συγκρινόμενα με αυτά σε φυσιολογικούς μύες), βελτιώνοντας την ελαστικότητα του δέρματος και το χρόνο αντίδρασης των μυών και διατηρώντας το σωματικό βάρος των μυών. Επίσης παρατηρήθηκε ότι στις επιμέρους μετρήσεις που διενεργήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος, τα αρσενικά δίνουν σαφέστατα καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με αυτά των θηλυκών, γεγονός που καταδεικνύει την ανάγκη συνυπολογισμού του παράγοντα φύλο σε παρόμοιες μελέτες, για την εξαγωγή ακριβέστερων αποτελεσμάτων. Περαιτέρω πειράματα θα μπορούσαν να προταθούν για την διερεύνηση του ιδανικού συνδυασμού των προαναφερθέντων εκχυλισμάτων που οδηγεί σε καλύτερα και επαναλήψιμα αποτελέσματα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν:

- Στατιστικώς σημαντική πτώση των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα όλων των μυών
- Σημαντική μείωση της άδηλης απώλειας νερού όσο αυξάνεται ο χρόνος ακτινοβολήσης των μυών
- Στατιστικώς σημαντικά αυξημένη άδηλη απώλεια νερού στο δέρμα των θηλυκών σε σύγκριση με τα αρσενικά των αντίστοιχων ομάδων
- Οι αρσενικοί διαβητικοί μύες έχουν μικρότερο ποσοστό εκδήλωσης ξηροδερμίας σε σύγκριση με τους θηλυκούς
- Στατιστικώς σημαντική διαφορά των αποτελεσμάτων της ερυθρότητας μεταξύ των δύο φύλων
- Τα θηλυκά εκδήλωσαν δερματική ερυθρότητα σε μεγαλύτερο ποσοστό
- Μικρότερο ποσοστό εκδήλωσης ερυθρότητας αυξανόμενου του χρόνου ακτινοβολήσης των μυών
- Στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου επαναφοράς του ακτινοβολημένου δέρματος τη χρονική περίοδο που θεωρητικά ο φραγμός του δέρματος υφίστατο ρήξη ύστερα από την ακτινοβολήσή του με UV
- Στατιστικώς σημαντική μείωση του χρόνου αντίδρασης των μυών, τη χρονική περίοδο που θεωρητικά ο φραγμός του δέρματος υφίστατο ρήξη ύστερα από την ακτινοβολήσή του με UV
- Σχετική διατήρηση του σωματικού βάρους των μυών
- Στα αρσενικά στατιστικώς σημαντική μείωση του οξειδωτικού στρες στα σημεία που εφαρμόστηκαν αντιοξειδωτικά σκευάσματα με Tayberry, *Pinus halepensis* και γύρη
- Υψηλότερα επίπεδα (στατιστικώς σημαντικά) του οξειδωτικού στρες στο αίμα των θηλυκών μυών (στις ομάδες που εκτέθηκαν σε εφάπαξ και μέση χρόνια δόση UV) σε σύγκριση με αυτά των αρσενικών

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Essam A. Elmohandes, Principles of histology, Principles of histology Part-II, faculty of medicine, mansoura university;1(1):1.
2. David J. Gawkrödger, Basic principles: Microanatomy of the skin, Dermatology third edition: An illustrated colourtext;1(3):?
3. Afaq F., Natural agents: cellular and molecular mechanisms of photoprotection, Arch Biochem Biophys. 2011 Apr 15;508 (2):144-51.
4. Τεκνετζής Α., Επαγγελματικές δερματοπάθειες, Επαγγελματικές παθήσεις Σιγλετίδης, κεφ.17.
5. Denda M, Tsutsumi M. Roles of transient receptor potential proteins (TRPs) in epidermal keratinocytes. Adv Exp Med Biol. 2011;704:847-60.
6. Cummings B., Campbell, Reece, 'The Body's Defenses', in Biology 6th edition, 2002; 1(3): chap 43.
7. Παπαϊωάννου Γ.Θ., Κοσμητολογία, 2006;1(4): 9-10.
8. Candi E, Schmidt R, Melino G. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;4:328–40.
9. Fuhlbrigge RC, Chaiban R., The immune system, the skin, and childhood rheumatic disease, Curr Rheumatol Rep. 2011 Apr;13(2):103-9
10. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from Staphylococcus epidermidis, a normal resident of the skin. J Invest Dermatol. 2010;130:192–200.
11. Nakatsuji T, Kao MC, Zhang L, Sebum free fatty acids enhance the innate immune defense of human sebocytes by upregulating beta-defensin-2 expression. J Invest Dermatol. 2010;130:985–94.
12. Lai Y, Di Nardo A, Nakatsuji T, Commensal bacteria regulate Toll-like receptor 3-dependent inflammation after skin injury. Nat Med. 2009;15:1377–82.
13. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. Trends Immunol. 2009;30:131–41.
14. Gallo RL, Huttner KM. Antimicrobial peptides: an emerging concept in cutaneous biology. J Invest Dermatol. 1998;111:739–43.

15. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 2009;30:131–41.
16. Borkowski AW, Gallo RL, The coordinated response of the physical and antimicrobial peptide barriers of the skin, *J Invest Dermatol.* 2011; 131(2):285-7
17. Saundry P., Cleveland C., Sunlight, *Encyclopedia of Earth.* 2010 November
18. Nichols A. Joi, Katiyar K. Santosh, Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, anti-oxidant and DNA repair mechanisms, *Arch Dermatol Res.* 2010;302(2):71-83.
19. Βασικές Γνώσεις Εργασίας με Υπεριώδη Ακτινοβολία, The Center for research & Tecnology Hellas (2010) (ανακτήθηκε 2010-01-13)
20. Gruijl FR, Van der Leun JC. Estimate of the wavelength dependency of ultraviolet carcinogenesis in humans and its relevance to the risk assessment of stratospheric ozone depletion. *Health Phys.* 1994;67:319–325.
21. Ichihashi M, Ueda M, Budiyo A. UV-induced skin damage. *Toxicology.* 2003;189:21–39.
22. Mukhtar H, Elmetts CA. Photocarcinogenesis: mechanisms, models and human health implications. *Photochem Photobiol.* 1996;63:355–447.
23. Kripke ML. Photoimmunology. *Photochem Photobiol.* 1990;52:919–924.
24. Meunier L, Raison-Peyron N, Meynadier J. UV-induced immunosuppression and skin cancers. *Rev Med Interne.* 1998;19:247–254.
25. Parrish JA. Photoimmunology. *Adv Exp Med Biol.* 1983;160:91–108.
26. Hruza LL, Pentland AP. Mechanisms of UV-induced inflammation. *J Invest Dermatol.* 1993;100:35S–41S.
27. Katiyar SK, Mukhtar H. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen presenting cells and oxidative stress. *J Leukoc Biol.* 2001;69:719–726.
28. Taylor CR, Stern RS, Leyden JJ, Gilchrest, Photoaging/photodamage and photoprotection. *J Am Acad Dermatol.* 1990;22:1–15.
29. Wang SQ, Setlow R, Berwick M. Ultraviolet A and melanoma: a review. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:837–846.

30. Bachelor MA, Bowden GT. UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression. *Semin Cancer Biol.* 2004;14:131–138.
31. Di Giovanni J. Multistage carcinogenesis in mouse skin. *Pharmacol Ther.* 1992;54:63–128.
32. Gruijl FR. Photocarcinogenesis: UVA vs UVB. Singlet oxygen, UVA, and ozone. *Methods Enzymol.* 2000;319:359–366.
33. Runger TM. Role of UVA in the pathogenesis of melanoma and non-melanoma skin cancer. A short review. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1999;15:212–216.
34. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) "Health effects of UV radiation". <http://www.who.int/uv/health/en/>. (ανακτήθηκε 2011 Μάιος)
35. Zierath J.R., Krook A., Wallberg H.- Henriksson. Insulin action and insulin resistance in human skeletal muscle. *Diabetologia* 2000;43:821-835.
36. Maverakis E, Miyamura Y, Bowen MP, Correa G, Ono Y, Goodarzi H, Light, including ultraviolet, *J Autoimmun.* 2010 May;34(3):J247-57
37. Holick MF., Vitamin D: A millenium perspective. *J Cell Biochem.* 2003;88(2):296-307.
38. Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358:1500-1503.
39. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *Am J Clin Nutr* 2004;79:362-371. Erratum in: *Am J Clin Nutr* 2004;79:890.
40. Hypponen E. Micronutrients and the risk of type 1 diabetes: vitamin D, vitamin E, and nicotinamide. *Nutr Rev* 2004;62:340-347.
41. Zella JB, DeLuca HF. Vitamin D and autoimmune diabetes. *J Cell Biochem* 2003;88:216-222.
42. Bartley J, Vitamin D: emerging roles in infection and immunity, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(12):1359-69.
43. Wood, DNA repair in eukaryotes. R.D., 1996; *Annu. Rev. Biochem.* 65, 135–167. 67
44. Matsumura Y., Ananthaswamy. Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. H.N., 2002 ;*Front. Biosci.* 7, D765– D783.
45. Prives C., Hall. The p53 pathway. *J. Pathol.* , P.A., 1999; 112– 126.

46. Harper J.W., Adami G.R., Wei N., Keyomarsi K., Elledge, The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclindependent kinases. *S.J.*,1993; 75, 805– 816.
47. Mullauer L., Gruber P., Sebinger D., Buch J., Wohlfart S., Chott A., Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat. Res.* 2001;488, 211 –231.
48. Dawe, R.S,A randomized controlled trial of narrowband ultraviolet B vs. bath-psoralen plus ultraviolet A photochemotherapy for psoriasis, *British Journal of Dermatology*, 2003; 148 (6): 1194–1204.
49. Kirke, Sandra M, A Randomized Comparison of Selective Broadband UVB and Narrowband UVB in the Treatment of Psoriasis, *Journal of Investigative Dermatology*, 2007; 127 (7): 1641–1646.
50. American Academy of Dermatology, <http://www.aad.org/> (ανακτήθηκε: 2011 Μάιος)
51. American Cancer Society, <http://www.cancer.org/>(ανακτήθηκε 201: Μάιος)
52. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), <http://www.cdc.gov/>(ανακτήθηκε 201: Μάιος)
53. National Cancer Institute <http://www.cancer.gov/>(ανακτήθηκε 201: Μάιος)
54. National Skin Cancer Foundation <http://www.skincancer.org/>(ανακτήθηκε 201: Μάιος)
55. Afaq F, Adhami VM, H. *Mutat. Res.* 2005; 571:153–173.
56. Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. *J Photochem Photobiol B.* 2001; 63:19–27.
57. Cooke MS, Loft S, Olinski R, Evans MD, Bialkowski K, Wagner JR, Dedon PC, Møller P, Greenberg MM, Cadet J. *Chem. Res. Toxicol.* 2010; 23:705–707.
58. Cadet J, Douki T, Pouget J-P, Ravanat J-L. Singlet oxygen DNA damage products: formation and measurement. *Methods Enzymol* 2000;319:143-53.
59. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol* 2002;138:1462-70.
60. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997;272:20313-6.

61. Wlaschek M, Tantcheva-Poor I, Naderi L, Ma W, Schneider LA, Razi-Wolf Z, Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:41-51.
62. Tornaletti, S., Pfeifer. UV damage and repair mechanisms in mammalian cells, G.P., 1996; *BioEssays* 18, 221– 228.
63. Ananthaswamy, Ultraviolet light as a carcinogen. In: Bowden, G.T., Fischer, S.M. (Eds.), *Comprehensive Toxicology, Chemical Carcinogens and Anticarcinogens*, H.N., 1997;12:255– 279.
64. Kochevar IE. Molecular and cellular effects of UV radiation relevant to chronic photodamage. In: Gilchrest BA, editor. *Photodamage*. Cambridge: Blackwell Science, 1995;51-67.
65. Bissett DL, Hannon DP, Orr TV. Wavelength dependence of histological, physical, and visible changes in chronically UV-irradiated hairless mouse skin. *Photochem Photobiol* 1989;50:763-9.
66. Kligman L, Sayre RM. An action spectrum for ultraviolet induced elastosis in hairless mice: quantification of elastosis by image analysis. *Photochem Photobiol* 1991;53:237-42.
67. Masaki H, Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects, *J Dermatol Sci*. 2010;58(2):85-90.
68. Talwar HS, Griffiths CEM, Fisher GJ, Hamilton TA, Voorhees JJ. Reduced type I and type III procollagens in photodamaged adult human skin. *J Invest Dermatol* 1995; 105: 285-90.
69. Burke KE, Photoaging: the role of oxidative stress. *G Ital Dermatol Venereol*. 2010;145(4):445-59.
70. Kosmadaki MG, Yaar M, Arble BL, Gilchrest BA. UV induces VEGF through a TNF-alpha independent pathway. *FASEB J* 2003;17:446-8.
71. Yano K, Kajiya K, Ishiwata M, Hong YK, Miyakawa T, Detmar M. Ultraviolet B-induced skin angiogenesis is associated with a switch in the balance of vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression. *J Invest Dermatol* 2004; 122:201-8.
72. Howell BG, Wang B, Freed I, Mamelak AJ, Watanabe H, Sauder DN. Microarray analysis of UVB-regulated genes in keratinocytes: downregulation of angiogenesis inhibitor thrombospondin-1. *J Dermatol Sci* 2004;34:185-94.

73. Kripke ML. Immunology and photocarcinogenesis: new light on an old problem. *J Am Acad Dermatol* 1986;14:149-55.
74. Toews GB, Bergstresser P, Streilein JW. Epidermal Langerhans cell density determines whether contact hypersensitivity or unresponsiveness follows skin painting with DNFB. *J Immunol* 1980;124:445-53.
75. Torma H, Berne B, Vahlquist A, "UV irradiation and topical vitamin A modulate retinol esterification in hairless mouse epidermis". *Acta Derm. Venereol* 1988; 68 (4): 291–299.
76. Ελληνική Ενδοκρινολογική Εταιρεία - Πανελλήνια Ένωση Ενδοκρινολόγων, <http://www.endo.gr/> (ανακτήθηκε 2011 Ιούνιος)
77. McPhee S, Moutsopoulos H. Dysfunction of pancreas. *Pathologic physiology* 2000; 18:643-680.
78. Ελληνική ομοσπονδία για το Διαβήτη <http://www.elodi.org/> (ανακτήθηκε 2011 Ιούνιος)
79. American Diabetes Association, <http://www.diabetes.org/> (ανακτήθηκε 2011 Ιούνιος)
80. Zimmet P, Alberti K.G.M.M, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 2001;414:782-784.
81. International Diabetes Federation, Diabetes Atlas, fourth edition, www.eatlas.idf.org
82. Ράπτης Σ. Σακχαρώδης Διαβήτης, Εσωτερική Παθολογία. Παρισιάνος, Αθήνα 1998; 2144-2220
83. Nathan DM, Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1995;328: 1676-1684
84. Wong M, Chung WYJ, Wong KST. Effects of treatments for symptoms of painful diabetic neuropathy: systematic review. *BMJ* 2007;335(7610): 87
85. Stillman M. Clinical approach to patients with neuropathic pain. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 2006;73(8):726-38.
86. Loe H. Periodontal disease: the sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1990;13: 836-840
87. American Academy of Periodontology. Position Paper. Diabetes and Periodontal Diseases. *J Periodontol* 2000;71: 664-678
88. Sakai S, Endo Y, Ozawa N, Sugawara T, Kusaka A, Sayo T, Tagami H, Inoue S, Characteristics of the epidermis and stratum corneum of hairless mice with

- experimentally induced diabetes mellitus. *J Invest Dermatol.* 2003;120(1):79-85
89. Νικολόπουλος Α., Τεντορούλης Ν., Κατσιλάμπρος Ν., Mechanisms of the complications of diabetes: Newer aspects, *Archives of Hellenic Medicine* 2006; 23(2):131-139.
 90. Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW., Chemical modification of proteins by methylglyoxal. *Cell Mol Biol* 1998; 44:1139–1145.
 91. Stitt AW, Li YM, Gardiner TA, Bucala R, Archer DB, Vlassara H., Advanced glycation end-products (AGEs) co-localize with AGE-receptors in the retinal vasculature of diabetic and of AGE-infused rats. *Am J Pathol* 1997; 150:523–531.
 92. Nishio T, Horii Y, Shiiki H, Yakamoto H, Makita Z, Bukala R, Immunohistochemical detection of advanced Glycosylation end-products within the vascular lesions and glomeruli in diabetic nephropathy. *Hum Pathol* 1995; 26:308–313.
 93. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW., Mechanism of autoxidative glycosylation: Identification of glyoxale and arabinose intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995;34:3702–3709.
 94. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M., Non enzymatic Glycosylation in vitro and in bovine endothelial cells alters basic fibroblast growth factor activity: A model for intracellular glycosylation in diabetes. *J Clin Invest* 1994; 94:110–117.
 95. Tanaka S, Avigad G, Brodsky B, Eikenberry EF., Glycation induces expansion of the molecular packing of collagen. *J Mol Biol* 1988; 263:4392–4398.
 96. Pigeon H, Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. *Pathol Biol (Paris)*, 2010;58(3):226-31.
 97. Yerneni R, Bai W, Khan BV, Medford RM, Natarajan R., Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappa B in vascular smooth muscle cells. *Diabetes* 1999; 48:855–864.

98. Sayeski ĆĆ, Kudlow JE. Glucose metabolism to glucosamine is necessary for glucose stimulation of transforming growth factor-alpha gene transcription. *J Āil Chem* 1996; 271:15237– 15243.
99. Kolm-Litty V, Sauer U, Nerlich Ā, Lehmann R, Schleicher ED., High glucose-induced transforming growth factor beta 1 production is mediated by hexosamine pathway in porcine glomerular mesangial cells. *J Clin Invest* 1998; 101:160–169.
100. Brownlee M., Biochemistry end molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414:813–820.
101. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov ĀĀ., High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 416:15–18.
102. NishikaWA Ō, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsamura T, Kaneda Y., Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404:787–790.
103. Ceriello A., New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a causal antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003; 26:1589–1596.
104. Faulkner ĒĬ, Liochev SĒ, Fridovich Ē., Stable Ĭn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. *J Biol Chem* 1994; 269:23471–23476.
105. Doctrow SR, Huffman Ē, Marcus CB, Musleh W, Bruce A, Baundry M., Salen-manganese complexes: Combined superoxide dismutase/catalase mimics with broad pharmacological efficacy. *Adv Pharmacol* 1997; 38:247–269.
106. Salvemini D, Wang ZQ, Zweier JL, Samouilov A, Macarthur H, Misko TP., Ā non peptidyl mimic of superoxide dismutase with therapeutic activity in rats. *Science* 1999; 286:304–306.
107. Gutteridge John M. C., Halliwell Barry, Antioxidants in nutrition, health and disease, Oxford University Press 1994
108. Marian Valko, Dieter Leibfritz , Jan Moncol, Mark T.D. Cronin , Milan Mazur, Joshua Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 44–84.
109. Halliwell B, Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82(12): 747- 52.

110. Mette M. Berger., Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*. 2005; 24 : 172–183.
111. Pappas Andreas M., Antioxidant status, diet, nutrition, and health, Noriko Noguchi, Niki, *Chemistry of Active Oxygen Species and Antioxidants*, CRC Press c1999
112. Lili Ji, In Garret W.T., Kirkndall D.T. *Free Radicals and antioxidant in exercise and sports Exercise and Sport Science*, Lipincott Williams and Wilkins Publishers, 2000; 299-317,
113. Halliwell B., Gutteridge J.M.C, *Free radicals in biology and medicine*, Clarendon Press,1985.
114. Jekins R.R Free radical chemistry:relationship to exercise, *Sports Med* 1988; 5:156-170.
115. Stocker, R, Bowry, V., Frei B.Pra.Natl.Acad.Sci. 1988; 1646-1650.
116. Aruoma OI, Halliwell B., Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl-radical from hydrogen peroxide in the presence of iron.Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl-radical generation?, *Biochem J* 1987; 241:273-8.
117. Aruoma OI, Halliwell B, Gajewski W, Disdaroglu M., Copper-iron dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide, *Biochem J* 1991; 273:2601-4.
118. Halliwell B, Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 1989; 82(12): 747-52.
119. Mette M. Berger., Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*. 2005; 24 : 172–183.
120. Evans Patricia, Halliwell B., Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br J Nutr* 2001; 85(Suppl. 2) S67- 74.
121. Halliwell B, Reactive Species and Antioxidants. *Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. Plant Physiol*. 2006;141(2): 312-22.
122. Zádák Z., Hyšpler R., Tichá A., Hronek M., Fikrová P., Rathouská J., Hrnčiariková D., Štětina R.. Antioxidants and Vitamins in Clinical Conditions. *Physiol. Res*. 2009;58 (Suppl. 1):S13-S17.
123. Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160 : 1–40.

124. Wulf Dro^o GE., Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2000;82: 47–95.
125. Sies H., Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, ed. SIES, Academic Press 1985; pp.1-8.
126. Sies H., Biochemistry of oxidative stress. *Angewandte Chemie, International Edition in English* 1986; 25 :1058-1071.
127. Sies H., Oxidative stress: introduction. In *Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants*, ed. SIES, Academic Press 1991; pp. xv-xxii.
128. Halliwell B, Whiteman M, *Br. J. Pharmacol.* 2004; 142, 231–255.
129. Herndon L.A., Schmeissner P.J., Dudaronek J.M., Brown P.A., Listner K.M., Sakano Y., Paupard M.C., Hall D.H., Driscoll M. *Nature* 2002; 419, 808–814.
130. Murphy C.T., Mc Carroll S.A., Bargmann C.I., Fraser A., Kamath R.S., Ahringer J., Li H., Kenyon C. *Nature* 2003; 424, 277–283.
131. Dean P. Jones. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2006; 8(9-10): 1865-1879.
132. Moller P, Wallin H, Knudsen LE., Oxidative stress associated with exercise, physiological stress and lifestyle factors, *Chem-Biol Inter* 1996; 102:17-3.
133. Ames B, Shigenaga MK, Oxidants are a major contributor to aging. *Ann NY Acad Sci* 1992; 663:85–96.
134. Esterbauer H, Schmidt R and Hayn M, Relationships among oxidation of low density lipoprotein, antioxidant protection and atherosclerosis. *Adv Pharmacol* 1997; 38:425–455.
135. Cheeseman KH, Lipid peroxidation and cancer, in *DNA and Free Radicals*, ed. By Halliwell B and Aruoma OI. Ellis Horwood, 1993; pp. 109–144.
136. Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Gaziano JM, Lynch SM, Shyr Y, Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers. *N Engl J Med* 1995; 332:1198–1203.
137. Wood LG, Garg ML, Simpson JL, Mori TA, Croft KD, Wark PAB, Induced sputum 8-isoprostane concentrations in inflammatory airway diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:426–430.
138. Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PS, Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats. *J Appl Toxicol.* 2008 Aug; 28(6):806-13.
139. Halliwell, B., *Trends Biochem. Sci.* 2006; 31: 509–515.

140. Halliwell B, Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. *Adv Pharmacol* 1997; 38:3–20.
141. William A. Pryor, Kendall N. Houk, Christopher S. Foote, Jon M. Fukuto, Louis J. Ignarro, Giuseppe L. Squadrito, and Kelvin J. A. Davies. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006 ; 291: R491–R511.
142. John M.C. Gutteridge , Barry Halliwell. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010; 393 :561–564.
143. Gutteridge JM, Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem–Biol Interactions* 1994; 91:133–140.
144. Sareen S. Gropper, Jack L. Smith, James L. Groff. Διατροφή και μεταβολισμός, Ιατρικές εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης 2007; 4
145. Renata Cozzi, Ruggero Ricordy, Tania Aglitti, Valentina Gatta, Paolo Perticone and Rosella De Salvia. Ascorbic acid and b-carotene as modulators of oxidative damage. *Carcinogenesis* 1997 ;18(1): 223–228.
146. Hitoshi Masaki. Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *J Dermatol Sci.* 2010; 58: 85–90.
147. Maria L. Urso, Priscilla M. Clarkson. Oxidative stress exercise and antioxidant supplementation, *Toxicology*, 2003.
148. Kelvin J. A. Davies, Oxidative Stress, Antioxidant Defenses, and Damage Removal, Repair, and Replacement Systems. *IUBMB Life*, 2000; 50: 279–289.
149. Paglia DE, Valentine WN, Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967; 70:158–169.
150. Abbe MR, Automated assay of SOD in blood. *Clin Chem* 1986; 19:175–180.
151. Aebi H, Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121–126.
152. Sato M., Bremner I. Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med.* 1993; 14: 325-37.
153. Gabriel Gras, Fabrice Porcheray, Boubekeur Samah, and Cathie Leone. The glutamate-glutamine cycle as an inducible, protective face of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2006; 80: 1067–1075.
154. Barry Halliwell. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys.* 2008; 476 :107–112 103.

155. Lars-Oliver Klotz, Klaus-Dietrich Kroncke, Darius P. Buchczyk and Helmut Sies. Role of Copper, Zinc, Selenium and Tellurium in the Cellular Defense against Oxidative and Nitrosative Stress. *J. Nutr.* 2003;133: 1448S–1451S.
156. Peter Brenneisen , Holger Steinbrenner, Helmut Sies . Selenium, oxidative stress, and health aspects. *Mol Aspects Med.* 2005; 26 :256–267.
157. Helmut SIES. Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 1993; 215: 213-219.
158. Fereidoon Shahidi, Antinutrients and Phytochemicals in Foods (Acs Symposium Series, No 662) American Chemical Society Division of agricu. April 1998.
159. Chadwick D. J., Whelan J. Secondary Metabolites: Their Function and Evolution. J. Wiley, Chichester, 1992.
160. Caldwell C. R. Alkylperoxyl radical scavenging activity of red leaf lettuce (*Lactuca sativa* L.) phenolics. *Joyrnal Agricultural Food Chemistry*, Madison, 2003; 51(16): 4589- 4595.
161. Hodnick WF, Ahmad S, Pardini RS. Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 1998; 439:131-150.
162. Lin YL, Cheng CY. Effect of green tea leaves through induction of antioxidant and phase II enzymes including superoxide dismutase, catalase, and glutathione S-transferase in rats. *J Agricult Food Chem* 1998;46:1893-99.
163. Stoclet JC, Chataigneu T, Ndiaye M. Vascular protection by dietary polyphenols. *Europ. J. of Pharmacology* 2004;500:299-313.
164. Kaliora AC, Dedousis GVZ, Sehmid H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2005.
165. Harborne JB, Baxter H. *Phytochemical Dictionary*. Taylor and Francis. 1993.
166. Morton LW, Caccetta RA, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds. *Clin. Exp. Pharmac. and Physiol.* 2000;27:152.
167. Manach C, Scalbert A, Morand C. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79:727–747.

168. Langenbach R, Loftin CD, Lee C, Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;889:52–61.
169. Chapple KS, Cartwright EJ, Hawcroft G, Localization of cyclooxygenase-2 in human sporadic colorectal adenomas. *Am J Pathol.* 2000;156:545–553.
170. Buckman SY, Gresham A, Hale P, COX-2 expression is induced by UVB exposure in human skin: implications for the development of skin cancer. *Carcinogenesis.* 1998;19:723–729.
171. Ullrich SE. Potential for immunotoxicity due to environmental exposure to ultraviolet radiation. *Hum Exp Toxicol.* 1995;14:89–91.
172. Gu M, Dhanalakshmi S, Singh RP, Silibinin protects against photocarcinogenesis via modulation of cell cycle regulators, mitogen-activated protein kinases, and Akt signaling. *Cancer Res.* 2004;64:6349–6356.
173. Gu M, Dhanalakshmi S, Singh RP, Dietary feeding of silibinin prevents early biomarkers of UVB radiation-induced carcinogenesis in SKH-1 hairless mouse epidermis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:1344–1349.
174. Katiyar SK, Challa A, McCormick TS, Prevention of UVB-induced immunosuppression in mice by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate may be associated with alterations in IL-10 and IL-12 production. *Carcinogenesis.* 1999;20:2117–2124.
175. Katiyar SK, Korman NJ, Mukhtar H, Protective effects of silymarin against photocarcinogenesis in a mouse skin model. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89:556–566.
176. Katiyar SK, Matsui MS, Elmetts CA, Polyphenolic antioxidant (–)-epigallocatechin-3-gallate from green tea reduces UVB-induced inflammatory responses and infiltration of leukocytes in human skin. *Photochem Photobiol.* 1999;69:148–153.
177. Katiyar SK, Mukhtar H. Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen presenting cells and oxidative stress. *J Leukoc Biol.* 2001;69:719–726.
178. Katiyar SK, Elmetts CA, Agarwal R, Protection against ultraviolet-B radiation-induced local and systemic suppression of contact hypersensitivity and edema

- responses in C3H/HeN mice by green tea polyphenols. *Photochem Photobiol.* 1995;62:855–861.
179. Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: Relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis.* 2003;24:1379–1388.
 180. Elmets CA, Singh D, Tubesing K, Cutaneous photoprotection from ultraviolet injury by green tea polyphenols. *J Am Acad Dermatol.* 2001;44:425–432.
 181. Katiyar SK, Afaq F, Perez A, Green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate treatment of human skin inhibits ultraviolet radiation-induced oxidative stress. *Carcinogenesis.* 2001;22:287–294.
 182. Kim J, Hwang J-S, Cho Y-K, Protective effects of (–)-epigallocatechin-3-gallate on UVA- and UVB-induced skin damage. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14:11–19.
 183. Stadtman ER. Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci.* 2001;928:22–38.
 184. Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK. Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:995–1005.
 185. Vayalil PK, Mittal A, Hara Y, Green tea polyphenols prevent ultraviolet light-induced oxidative damage and matrix metalloproteinases expression in mouse skin. *J Invest Dermatol.* 2004;122:1480–1487.
 186. Mantena SK, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit UV radiation-induced oxidative stress and activation of MAPK and NF- κ B signaling in human epidermal keratinocytes. *Free Rad Biol Med.* 2006;40:1603–1614.
 187. Zi SX, Ma HJ, Li Y, Oligomeric proanthocyanidins from grape seeds effectively inhibit ultraviolet-induced melanogenesis of human melanocytes in vitro. *Int J Mol Med.* 2009;23:197–204.
 188. Goupy P, Bautista-Ortin AB, Fulcrand H, Dangles O. Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: hydrogen transfer reactions to the dpph radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *J Agric Food Chem.* 2009 Jul 8; 57(13):5762–70.

189. Sariburun E, Sahin S, Demir C, Türkben C, Uylaşer V. Phenolic content and antioxidant activity of raspberry and blackberry cultivars. Dept. of Chemistry, Faculty of Science and Arts, Univ. of Uludag
190. Das DK, Sato M, Ray PS et al. Cardioprotection of red wine : role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res.* 1999;25:115-120.
191. Weinstein A., Geographic Variation and Phenology of *Pinus halepensis*, *P. brutia* and *P. eldarica* in Israel, *Forest Ecology and Management*, Elsevier Science Publishers B.V., 1989; 27(2): 99-108.
192. Schneider B, Torres E, Martín MP, Schröder M, Behnke HD, Seemüller E. 'Candidatus Phytoplasma pini', a novel taxon from *Pinus silvestris* and *Pinus halepensis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005 Jan;55(Pt 1):303-7.
193. Guri A, Kefalas P, Roussis V. Antioxidant potential of six pine species. *Phytother Res.* 2006 Apr;20(4):263-6.
194. Ahmed SB, Sghaier RM, Guesmi F, Kaabi B, Mejri M, Attia H, Laouini D, Smaali I. Evaluation of antileishmanial, cytotoxic and antioxidant activities of essential oils extracted from plants issued from the leishmaniasis-endemic region of Sned (Tunisia). *Nat Prod Res.* 2011 Jul;25(12):1195-2010.
195. Jerez M., Sineiro J., Guitian E., Nunez M., Identification of polymeric proanthocyanidins from pine bark by mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* , 2009; 23(24): 4013-4018.
196. Winterhalter P., Application of countercurrent chromatography (CCC) to the analysis of natural pigments, *Trends in Food Science and Technology*, Elsevier Ltd., 2007 ;18(10): 507-513.
197. Pantelidis G.E., Vasilakakis M., Manganaris G.A., Diamantidis Gr., Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries, *Food Chemistry*, Elsevier Ltd., 2007;102(3): 777-783.
198. Garcia M., Perez-Arquillue C., Juan T., Juan M., Herrera A. Note: pollen analysis and antibacterial activity of Spanish honeys. *Food Science Technology International*, 2001; 7(2): 155-158.
199. Proestos C., Chorianopoulos N., Nychas G. J. E., Komaitis, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 2005;53(4):1190-1195.

200. Solange Teresinha Carpes, Rosicler Begnini, Severino Matias de Alencar, Maria Lucia Masson, Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity ,*Ciênc. agrotec.* 2007; 31(6).
201. Almeda- Muradian L. B., Pamplona L. C., Coimbra S., Barth O.M. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *Joyrnal Food Composition and Analysis*, 2005; 18(1): 105-111.
202. Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiroudis G, Chondrogianni N, Gonos E, Chinou I. Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J.* 2011 Jun 23;5(1):33.
203. Human H, Nicolson SW: Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). *Phytochemistry* 2006; 67:1486-1492.
204. Shin-Jyung Kang, Cun Liu Bao, Soojin Park and Ae-Jung Kim. Hypoglycemic effect of *Rehmannie Radix Preparata* (Sookjihwang) extract in streptozotocin-induced diabetic rats , *Nutrition research and practice.* 10/2010; 4(5):438-42.
205. Revsin Y, Rekers NV, Louwe MC, Saravia FE, De Nicola AF, de Kloet ER, Oitzl MS. Glucocorticoid receptor blockade normalizes hippocampal alterations and cognitive impairment in streptozotocin-induced type 1 diabetes mice. *Neuropsychopharmacology.* 2009 Feb;34(3):747-58.
206. Fujii E, Tsukahara F, Nomoto T. Changes in pentobarbital hypnosis and hepatic metabolism in streptozotocin-diabetic mice *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1987 Aug;90(2):83-9.
207. Fujii E, Nomoto T. Changes in arachidonic acid-induced respiratory distress in streptozotocin-diabetic mice, *Nihon Yakurigaku Zasshi.* 1992 Feb;99(2):109-14.
208. Tanko Y, Yerima M, Mahdi MA, Yaro AH, Musa KY, Mohammed A, Hypoglycemic Activity of Methanolic Stem Bark of *Adansonia digitata* Extract on Blood Glucose Levels of Streptozocin-Induced Diabetic Wistar Rats *International Journal of Applied Research in Natural Products* 2008; 1 (2): 32-36
209. Senshang Lin, Li-Lan H. Chen, Yie W. Chien, Comparative Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Studies of Human Insulin and Analogues in Chronic Diabetic Yucatan Minipigs ,*The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998; 286 (2):959–966.

210. Ramachandran S., Asokkumar K., Maheswari M. Uma, Ravi T. K., Sivashanmugam A. T., Saravanan S., Rajasekaran A., Dharman J., Investigation of Antidiabetic, Antihyperlipidemic, and In Vivo Antioxidant Properties of *Sphaeranthus indicus* Linn. in Type 1 Diabetic Rats: An Identification of Possible Biomarkers Evid Based Complement Alternat Med. 2011.
211. Kuhad A, Sharma S, Chopra K, Lycopene attenuates thermal hyperalgesia in a diabetic mouse model of neuropathic pain., Eur J Pain. 2008 Jul;12(5):624-32
212. Κουτσελίνης Αντ., Τοξικολογία, Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., 2004; Τόμος Α: 31.
213. Thiele J.J., Dreherb F., Maibachb H.I., Packera L., Impact of Ultraviolet Radiation and Ozone on the Transepidermal Water Loss as a Function of Skin Temperature in Hairless Mice, Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology 2003; 16:283-290.
214. Thiele J., Elsner P., Oxidants and Antioxidants in cutaneous biology, Current problems in dermatology 2001; 29.
215. Bevan P., Insulin signaling. J. Cell Sci., 2001;114, 1429-1430
216. Kido Y., Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets. J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001; 86, 972-979
217. Liang C.P., Han S., Okamoto H., Carnemolla R., Tabas I., Accili D., Tall A.R. Increased CD36 protein as a response to defective insulin signaling in macrophages, J Clin Invest, 2004;113(5):764-73.
218. Saltiel AR, Pessin JE. Insulin signaling pathways in time and space. Trends Cell Biol. 2002; 12(2):65-71.
219. Saltiel AR, Kahn CR, Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. Nature 2002; 414, 799-806.
220. Fantl W.J., Johnson D.E., Williams L.T., Signalling by receptors tyrosine kinases, Annu. Rev. Biochem., 1993, 62, 453-481
221. Hubbard SR., Wei L., Ellis L., Hendrickson WA., Crystal structure of the tyrosine kinase domain of the human insulin receptor, Nature, 1994, 372, 746-754
222. Alberts A., D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter: Essential Cell Biology, 1998, 549-550

223. Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signaling transduction, *Science* 1995;270:296-299.
224. Hoidal JR, Reactive oxygen species and cell signaling, *Am J Respir Cell Mol. Biol.* , 2001; 25:661-663
225. Rhee SG, Chang T-S, Bae YS, Lee S-R, Kang SW, Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide, *J Am Soc Nephrol*, 2003; 14:S211-S215.
226. Nindl G, Hydrogen Peroxide - From Oxidative Stressor to Redox Regulator, *Cellscience Reviews*, 2004; 1 (2).
227. Rhee SG, Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, *Science*, 2006; 312:1882-1883.
228. EMBO Conference Series, Redox Signaling in Human Disease and Ageing, Rome, Italy, 2006; 20-23.4.
229. Linnane AW, Eastwood H, Cellular redox regulation and prooxidant signaling system: A new perspective on the free radical theory of aging, *Ann NY Acad Sci*, 2006; 1067:47-55.
230. Tonks NK, Redox redux: revisiting PTPs (protein tyrosine phosphatase) and the control of cell signaling, *Cell*, 2006; 121:667-670.
231. Gruber J C., Tschugguel W., Schneeberger C., Huber C. J., Production and Actions of Estrogens, *N Engl J Med* 2002; 346:340-352
232. Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH, In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats, *Hypertension* 2002;39(2 Pt 2):405-11.
233. Ruiz-Larrea MB, Leal AM, Martín C, Martínez R, Lacort M, Antioxidant action of estrogens in rat hepatocytes, *Rev Esp Fisiol.* 1997 ;53(2):225-9.
234. Liehr JG, Roy D., Pro-oxidant and antioxidant effects of estrogens, *Methods Mol Biol.* 1998;108:425-35.

EIKONEΣ

1. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/8912.html>
2. <http://www.nku.edu/~dempseyd/SKIN.html>
3. <http://physrev.physiology.org/content/87/1/165/F10.expansion.html>
4. <http://neuromedia.neurobio.ucla.edu/campbell/skin/wp.html>
5. <http://www.healthy-skin-guide.com/skin-diagram.html>
6. http://sps.nus.edu.sg/~gireedha/Final%20website/index_application.html
7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835849/figure/F3/>
8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2835849/figure/F3/>
9. <http://carcin.oxfordjournals.org/content/22/6/851.full>
11. http://www.dermalinstitute.com/us/library/23_article_What_Causes_Skin_Aging_.html
12. http://www.nature.com/jid/journal/v130/n1/fig_tab/jid2009217f3.html#figure-title
13. Trends in Cell Biology 2002, 12, 65-7
15. <http://accessmedicine.net/search/searchAMResultImg.aspx?searchStr=diabetic+coma+with+ketoacidosis&searchType=1&rootTerm=diabetic%20dermopathy&rootID=12453>
16. http://drugster.info/img/ail/117_118_3.jpg
17. <http://www.health32.com/acanthosis-nigricans-treatment-and-prevention/>
23. <http://www.google.gr/search?q=pinus+halepensis&hl=el&biw=1366&bih=573&prmd=imvns&tbm=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ei=2iCbTuCaHcbo-gbIqKXRBQ&sqi=2&ved=0CBwQsAQ>
24. <http://www.priceinspector.co.uk/p/iron%20fence/f/desc,True/>
25. Γύρη <http://www.healthenlightenment.com/bee-pollen.shtml>
26. <http://www.springerlink.com/content/p5647xq388026145/#section=93792&page=1&locus=49>