ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η Επίδραση του Μεσογειακού Τρόπου Ζωής σε δείκτες οξειδωτικού στρες ασθενών με Μη-Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του Ήπατος

Διπλωματική Εργασία

ΣΤΑΘΗ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ



ΑΘΗΝΑ, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΚΛΙΝΙΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Φραγκοπούλου Ελισάβετ (Επιβλέπουσα)
Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Μερόπη Κοντογιάννη
Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Γιαννακούρης Νικόλαος,
Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας–Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Η Στάθη Ευαγγελία

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών Προϊόντων, για την υπέροχη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου, για τη βοήθεια της, τη καθοδήγηση της, την υπομονή της και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε στη πρωτόγνωρη για εμένα διεκπεραίωση των πειραμάτων. Οι συμβουλές της και οι παρατηρήσεις της για την υλοποίηση της εργασίας μου, θα με συνοδεύουν σε όλη τη μελοντική μου επαγγελματική πορεία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στην κα Μερόπη Κοντογιάννη, Επίκουρη Καθηγήτρια Κλινικής Διατροφής, καθώς και στον κο Γιαννακούρη Νικόλαο, αναπληρωτή καθηγητή Βιολογίας, για τη συμμετοχή της στην εξεταστική επιτροπή και την αξιολόγηση της παρούσας διατριβής.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες αξίζουν στην κα Χριστίνα Κατσαγώνη, Διδάκτωρ του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, για την προθυμία της και το ενδιαφέρον που μου έδειξε, κάθε φορά που ζήτησα τη βοήθεια της. Χωρίς τη παροχή των απαραίτητων δεδομένων και την εμπιστοσύνη της στο πρόσωπο μου δεν θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα τεράστιο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, στις φίλες μου Ελένη, Αντωνία και Κική που γνώρισα μέσα σε αυτό το όμορφο ταξίδι του μεταπτυχιακού προγράμματος, αλλά και στους φίλους μου εκτός πανεπιστημίου. Ο κάθε ένας ξεχωριστά μου παρείχε συνεχή συμπαράσταση και δύναμη, δείχνοντας μου υπομονή και κατανόηση για το χρόνο που τους στέρησα. Χωρίς τη στήριξη τους, δεν θα μπορούσα να καταφέρω, όσα μέχρι σήμερα κατάφερα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ **7**

ABSTRACT **8**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ **10**

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ **11**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... **16**

1.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ..... **16**

1.1.1 ΕΛΕΥΘΕΡΕΣ ΡΙΖΕΣ 16

1.1.2 ΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΚΑΙ ΑΖΩΤΟΥ..... 16

1.1.3 ΠΗΓΕΣ RONS ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ..... 19

1.1.4 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ..... 21

1.1.5 Ο ΔΙΤΤΟΣ ΡΟΛΟΣ ΤΩΝ ΕΛΕΥΘΕΡΩΝ ΡΙΖΩΝ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ..... 23

1.1.6 ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗ ΑΜΥΝΑ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ..... 25

1.1.7 ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΙΝΟ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟ 33

1.1.8 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ..... 37

1.1.9 Η ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΑ ΩΣ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΔΙΑΤΗΤΙΚΟ ΠΡΟΤΥΠΟ..... 40

1.2 ΜΗ-ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ..... **46**

1.2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΗ ΕΞΕΛΙΞΗ ΝΟΣΟΥ..... 46

1.2.2 ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΝΟΣΟΥ..... 48

1.2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ 48

1.2.4 ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΙΚΟΝΑ- ΣΥΜΠΤΩΜΑΤΑ..... 53

1.2.5 ΔΙΑΓΝΩΣΗ..... 53

1.2.6 ΠΑΘΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ NAFLD..... 54

1.2.7 ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ..... 57

1.2.7.1 ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΙΤΑΣ..... 57

1.2.7.2 ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΑΣΚΗΣΗΣ..... 66

1.2.7.3 ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ..... 70

1.3 ΜΗ-ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ..... **74**

1.3.1 ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΒΙΟΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΚΑΙ ΑΝΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΗΣ ΑΜΥΝΑΣ ΤΟΥ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ ΣΤΗ ΜΗ-ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΝΟΣΟ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ..... 74

1.3.2 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΑΣΘΕΝΩΝ NAFLD ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ..... 79

2. ΣΚΟΠΟΣ..... **82**

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ..... **83**

3.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ..... 83
3.2 ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 85
3.3 ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΟΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ..... 87
3.4 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ..... 93
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... **95**
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... **104**
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... **109**

Περίληψη

Εισαγωγή: Η NAFLD αποτελεί τη συχνότερη αιτία ηπατικής διαταραχής στις δυτικές κοινωνίες. Επί του παρόντος, οι αλλαγές στον τρόπο ζωής παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος για τη θεραπεία των ασθενών. Τα τελευταία χρόνια, η Μεσογειακή δίαιτα και ο Μεσογειακός τρόπος ζωής διερευνώνται ως τρόποι διαχείρισης της μη αλκοολικής λιπώδους νόσου του ήπατος. Παράλληλα, εξετάζονται οι παράγοντες οι οποίοι συμμετέχουν στην εξέλιξη της νόσου όπως οι δείκτες οξειδωτικού στρες, καθώς και οι πιθανές τροποποιήσεις των δεικτών αυτών, από τις παρεμβάσεις αντιμετώπισης της νόσου.

Σκοπός: Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι να διερευνήσει την επίδραση διαφόρων συνιστωσών του τρόπου ζωής σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε ασθενείς με NAFLD.

Μεθοδολογία: Σχεδιάστηκε μία μονά-τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή διάρκειας 6 μηνών, στην οποία συμμετείχαν 63 υπέρβαροι ή παχύσαρκοι ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση NAFLD που παρακολουθούνταν από την Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό» καθώς και την Β’ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο». Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν ισάριθμα είτε α) στην ομάδα μεσογειακής δίαιτας (ΜΔ), ή β) στην ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (ΜΤΖ), είτε γ) στην ομάδα ελέγχου (ΟΕ). Οι ομάδες παρέμβασης έλαβαν, μέσω ενός εντατικοποιημένου προγράμματος παρέμβασης 7 συνεδριών, κατευθύνσεις για αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ, παράλληλα με απώλεια σωματικού βάρους, ενώ η ομάδα ΜΤΖ έλαβε επιπλέον οδηγίες για αύξηση της φυσικής δραστηριότητας και βελτίωσης του ύπνου. Η ΟΕ έλαβε ένα υπόδειγμα διαιτολογίου κατά την ένταξη στη μελέτη και γραπτές οδηγίες για έναν ισορροπημένο τρόπο ζωής. Στο χρόνο 0 (έναρξη της παρέμβασης) και μετά από 6 μήνες (τέλος παρέμβασης) οι εθελοντές αξιολογήθηκαν ως προς κοινωνικοοικονομικά και ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, πραγματοποιήθηκε διατροφική αξιολόγηση και εκτίμηση της προσκόλλησης στη Μεσογειακή δίαιτα, μέσω του δείκτη MedDietScore, αξιολόγηση της ηπατικής ακαμψίας και προσδιορισμός βιοχημικών δεικτών, συμπεριλαμβανομένων και δεικτών οξειδωτικού στρες. Συγκεκριμένα, στη παρούσα διατριβή, μετρήθηκαν τα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης TBARS τα οποία είναι δείκτες οξειδωτικού στρες.

Αποτελέσματα: Με το πέρας της εξάμηνης παρέμβασης, οι δύο ομάδες παρέμβασης ΜΔ και ΜΤΖ σημείωσαν σημαντική αύξηση της προσκόλλησης στη ΜΔ ($p<0,001$) καθώς και απώλεια στο σωματικό τους βάρος ($p=0,01$) συγκριτικά με την ΟΕ, στην οποία φάνηκε μικρή απώλεια βάρους (~2%). Οι ομάδες παρέμβασης δε διέφεραν σημαντικά ως προς αυτούς τους παράγοντες [Προσαρμοσμένη διαφορά: 1,66, (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης-ΔΕ: -1,28, 4,61) και -0.85, (95% ΔΕ: -0,45, 1,6), αντίστοιχα]. Επιπλέον, στις ομάδες παρέμβασης συγκριτικά με την ΟΕ παρατηρήθηκε βελτίωση της ηπατικής ακαμψίας ($p=0.002$) και μια μη στατιστικά σημαντική μείωση επιπέδων ALT και GGT ($p>0,05$) μετά από διόρθωση για την απώλεια βάρους. Όσον αφορά τους δείκτες οξειδωτικού στρες, δηλαδή τα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης TBARS, δεν φάνηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων ($p>0,05$) στο τέλος της παρέμβασης.

Συμπεράσματα: Η εξάμηνη παρέμβαση με στόχο την αύξηση της προσκόλλησης στη Μεσογειακή δίαιτα είτε στον Μεσογειακό τρόπο ζωής, παράλληλα με απώλεια σωματικού βάρους, φάνηκε να βελτιώνει σημαντικά την ηπατική ακαμψία ασθενών με NAFLD. Ωστόσο, δεν

αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδα των TBARS μεταξύ των ομάδων στο τέλος της παρέμβασης.

Λέξεις κλειδιά: Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος, Μεσογειακή δίαιτα, Μεσογειακός τρόπος ζωής, δείκτες οξειδωτικού στρες.

Abstract

Introduction: NAFLD is the most common cause of hepatic impairment in western societies. Currently, lifestyle changes remain the cornerstone for treating patients. In recent years, the Mediterranean diet and the Mediterranean lifestyle have been investigated as ways to manage non-alcoholic fatty liver disease. At the same time, factors involved in the development of the disease such as oxidative stress indices, as well as possible modifications of these indices, from disease response interventions are examined.

Purpose: The purpose of this postgraduate thesis is to investigate the effect of various lifestyle components on oxidative stress markers in patients with NAFLD.

Methodology: A single-blind, randomized, controlled, 6-month clinical trial was designed, involving 63 overweight or obese patients with a recent diagnosis of NAFLD who were being monitored by the Gastroenterology Clinic of the G.H.A. "Laiko" as well as the 2nd University Pathological Clinic of the General Hospital "Hippocrates". Patients were randomly assigned to either a) the Mediterranean diet group (MD), or b) the Mediterranean Lifestyle group (MLG), or c) the control (CG) group. The intervention groups received, through an intensified 7-session intervention program, directions to increase adherence to the MD, along with weight loss, while the MLG group received additional instructions to increase physical activity and improve sleep. The CG received a dietary template when enrolled in the study and written guidelines for a balanced lifestyle. At time 0 (start of intervention) and after 6 months (end of intervention) volunteers were assessed for socioeconomic and anthropometric characteristics, nutritional evaluation and adherence to the Mediterranean diet, using the MedDietScore index, evaluation of liver stiffness and determination of biochemical markers, including oxidative stress markers. Specifically, in this thesis, TBARS lipid oxidation products, which are indicators of oxidative stress, were measured.

Results: At the end of the six months intervention, patients of MDG and MLG increased adherence to the MD ($p<0,001$) and showed a greater weight loss compared to CG ($p=0,01$), which showed less weight loss (~2%). The difference between intervention groups was not significant [Adjusted difference: 1,66, (95% Confidence Interval-CI: -1.28, 4.61) and -0.85, (95% CI:-0.45, 1.6), respectively]. In addition, improvement in hepatic stiffness ($p = 0.002$) and a non-statistically significant decrease in ALT and GGT levels ($p> 0.05$) were observed in the intervention groups compared with CG after a weight loss correction. Regarding the oxidative stress markers, that is the TBARS lipid oxidation products, there was no significant difference between the three groups ($p> 0.05$) at the end of the intervention.

Conclusions: A six month intervention, aiming at weight loss, along with increasing the adherence either to the MD or the Mediterranean lifestyle, showed a significant improvement in liver stiffness of patients with non-alcoholic fatty liver disease. However, no significant differences were found in TBARS levels between the groups at the end of the intervention.

Keywords: Non-alcoholic fatty liver disease, Mediterranean diet, Mediterranean lifestyle, oxidative stress markers.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1. Δημιουργία Οξειδωτικού στες……σ.23

Εικ.2. Πυραμίδα Μεσογειακής Δίαιτας……σ.45

Εικ.3. Φυσική εξέλιξη της NAFLD……σ.47

Εικ.4. Θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων……σ.57

Εικ.5. Αλλαγές στην ηπατική στεάτωση και ινσουλινοευαισθησία μετά από Μ.Δ και δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος/υψηλή σε Υδατάνθρακες……σ.61

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίν.1.1: Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου σ.19

Πίν.1.2: Παρεμβάσεις μέσω δίαιτας σε ασθενείς με NAFLD σ.63

Πίν.1.3: Παρεμβάσεις μέσω άσκησης σε ασθενείς με NAFLD σ.68

Πίν.1.4: Παρεμβάσεις μέσω τροποποίησης του τρόπου ζωής σε ασθενείς με NAFLD σ.72

Πίν.1.5: Μεταβολές δεικτών οξειδωτικού στρες σε ασθενεις NAFLD/NASH σ.78

Πίν.1.6: Κλινικές παρεμβάσεις ασθενών NAFLD σε δείκτες οξειδωτικού στρες σ.81

Πίν.4.1: Χαρακτηριστικά των εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης σ.97

Πίν.4.2: Βιοχημικά χαρακτηριστικά των εθελοντών στην αρχή της παρέμβασης σ.98

Πίν.4.3: Χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης σ.99
.
Πίν.4.4: Ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης σ.100
.
Πίν.4.5: Κλινικά και Βιοχημικά χαρακτηριστικά στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης σ.101

Πίν.4.6: Δείκτες οξειδωτικού στρες των εθελοντών στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.....σ.102

Πίν.4.7: Συσχετίσεις των TBARS με διάφορους δείκτες της νόσου στην αρχή της μελέτης σ.103

Πίν.4.8: Συσχετίσεις των TBARS με διάφορους δείκτες της νόσου στο τέλος της μελέτης σ.103

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχ.1: Διάγραμμα ροής πληθυσμού Κλινικής Μελέτης……..σ.84

Σχ.2: Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου της μελέτης ……σ.86

Σχ.3: Παράδειγμα κατασκευής πρότυπης καμπύλης για ποσοτιαία έκφραση μηλονυλοαλδεΰδης (MDA) ……σ.91

Σχ.4: Λιποειδική Υπεροξείδωση……σ.91

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

ΑΠ	***Arterial pressure***	***Αρτηριακή πίεση***
ΔΜΣ	***Body Mass Index***	***Δείκτης μάζας σώματος***
ΗΚΚ	***Hepatocellular carcinoma***	***Ηπατοκυτταρικό Καρκίνωμα***
ΜΔ	***Mediterranean diet***	***Η Μεσογειακή Δίαιτα***
MET	***Metabolic equivalent of task***	***Μεταβολική μονάδα παραγωγής έργου***
ΜΣ	***Metabolic syndrome***	***Μεταβολικό Σύνδρομο***
ΜΤΖ	***Mediterranean lifestyle***	***Μεσογειακός τρόπος ζωής***
ΟΕ	***Control group***	***Ομάδα ελέγχου***
ΠΜ	***Waist circumference***	***Περίμετρος μέσης***
ΣΒ	***Body weight***	***Σωματικό βάρος***
ΣΔτ2	***Diabetes type 2***	***Σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2***
ΣΕΠ	***Total energy intake***	***Συνολική ενεργειακή πρόσληψη***
ΣΒ	***Body weight***	***Σωματικό βάρος***
AASLD	***American Association for the Study of Liver Disease***	***Αμερικανική εταιρεία μελέτης νοσημάτων του ήπατος***
AGEs	***Advanced glycation end products***	***Προηγμένα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης***
ALT	***Alanine aminotransferase***	***Αμινοτρανσφεράση της αλανίνης***
APAQ	***Athens Physical Activity Questionnaire***	***Ερωτηματολόγιο σωματικής άσκησης της Αθήνας***
N	***Asparagine acid***	***Ασπαραγινικό οξύ***
AST	***Aspartate aminotransferase***	***Αμινοτρανσφεράση του ασπαραγινικού οξέος***
ATP	***Adenosine Tri-Phosphate***	***Τριφωσφορική αδενοσίνη***
BHT	***Butylated hydroxytoluene***	***Βουτυλιωμένο υδροξυτολουόλιο***
BLC	***Bright liver score Δείκτης***	***Υπερηχογένειας ήπατος***
CAT	***Catalase***	***Καταλάση***
CG	***Control group***	***Ομάδα ελέγχου***
CHO	***Carbohydrate***	***Υδατάνθρακες***
CRP	***C Reactive Protein***	***C αντιδρώσα πρωτεΐνη***
CU	***Cuprum***	***Χαλκός***
DNA	***Deoxyribonucleic Acid***	***Δε(σ)οξυριβο(ζο)νουκλεϊ(νι)κό οξύ***
DNL	***De novo lipogenesis***	***Εξ'υπαρχής λιπογένεση***
EASL	***European Association for the Study of the Liver***	***Ευρωπαϊκή εταιρεία μελέτης του ήπατος***

FE	***Ferrum***	***Σίδηρος***
FFA	***Free Fatty Acids***	***Ελεύθερα λιπαρά οξέα***
FFQ	***Food Frequency Questionnaire***	***Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων***
GCKR	***Glucokinase Regulator***	***Ρυθμιστής γλυκοκινάσης***
GGT	***Gamma-Glutamyl Transferase***	***γ-γλουταρυλο-τρανσπεπτιδάση***
GPx	***Glutathione peroxidase***	***Υπεροξειδάση γλουταθειόνης***
GR	***Glutathione Reductase***	***Αναγωγάση γλουταθειονίνης***
GRX	***Glutaredoxin***	***Γλουταρεδοξίνη***
GSH	***Glutathione***	***Γλουταθειονίνη***
GSSG	***Glutathione disulfide***	***Δισουλφιδική γλουταθειόνη***
GSSH	***Oxidized glutathione***	***Οξειδωμένη γλουταθειονίνη***
1H- MRS	***Proton magnetic resonance Spectroscopy***	***Μαγνητική φασματοσκοπία συντονισμού πρωτονίων***
HCL	***Hydrochloric acid***	***Υδροχλωρικό οξύ***
HDL-C	***High density lipoprotein***	***Χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών***
HIIT	***High intensity interval training***	***Υψηλής έντασης διαλειμματική προπόνηση***
HIT	***High intensity training***	***Υψηλής έντασης προπόνηση***
4-HNE	***4-Hydroxynonenal***	***4-υδροξυενενάλη***
HO	***Heme oxygenase***	***Οξυγονάση της αίμης***
HOMA-IR	***Homeostatic model assessmentinsulin resistance***	***Ομοιοστατικό μοντέλοεκτίμησης της ινσουλινοαντίστασης***
IHTG	***Intra-hepatic triglycerides***	***Ενδοηπατικά τριγλυκερίδια***
IL-6	***Interleukine-6***	***Ιντερλευκίνη-6***
IL-8	***Interleukine-8***	***Ιντερλευκίνη-8***
IR	***Insulin resistance***	***Αντίσταση στην ινσουλίνη***
Kcals	***Kilocalories***	***Θερμίδες***
LDL	***Low Density Lipoprotein***	***Πρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας***
LPS	***Lipopolysaccharides***	***Λιποπολυσακχαρίτες***
MD	***Mediterranean diet***	***Μεσογειακή Δίαιτα***
MDA	***Malondialdehyde***	***Μαλλονιδαλδεϋδη***
MLG	***Mediterranean lifestyle group***	***Ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής***
MedDietScore	***Mediterranean Diet Score***	***Δείκτης υιοθέτησης της μεσογειακής δίαιτας***
MN	***Manganese***	***Μαγγάνιο***
mRNA	***Messenger RNA***	***Αγγελιοφόρο RNA***
MUFA	***Monounsaturated fatty acids***	***Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα***
NAFLD	***Non Alcoholic Fatty Liver Disease***	***Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος***
NAOH	***Sodium hydroxide***	***Υδροξείδιο του νατρίου***
NASH	***Non alcoholic steatohepatitis***	***Μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα***
NF-kB	***Nuclear factor kappa B***	***Πυρηνικός παράγοντας kappa B***

8-OhdG	***8-hydroxy-2' -deoxyguanosine***	***8-υδροξυ-2'-δεοξυγουανοσίνη***
8-OhG	***8-hydroxy-2' -guanosine***	***8-υδροξυ-2'-γουανοσίνη***
PPAR-α	***Peroxisome proliferator-activated receptor alpha***	***Υποδοχέας που επάγει τον πολλαπλασιασμό των υπεροξεισωμάτων α***
PP1R3B	***Protein Phosphatase 1, Regulatory Subunit 3B***	***Πρωτεϊνική φωσφατάση 1, ρυθμιστική υπομονάδα 3Β***
PON1	***Serum paraoxonase/arylesterase 1***	***παραοξονάση / αρυλεστεράση ορού 1***
PUFA	***Polyunsaturated fatty acids***	***Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα***
RNS	***Reactive nitrogen species***	***Δραστικές μορφές Αζώτου***
ROS	***Reactive oxygen species***	***Δραστικές μορφές οξυγόνου***
SFA	***Saturated fatty acids***	***Κορεσμένα λιπαρά οξέα***
SOD	***Superoxide dismutase***	***Υπεροξείδιο δισμουτάσης***
TAC	***Total antioxidant capacity***	***Ολική αντιοξειδωτική ικανότητα***
TBA	***tert-Butyl alcohol***	***Τριτ - βουτυλική αλκοόλη***
TBARS	***Thiobarbituric acid reactive substances***	***Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ***
TG	***Triglycerides***	***Τριακυλογλυκερόλες***
TGF-β	***Transforming Growth Factor-β***	***Μετασχηματιστικός αυξητικός παράγοντας β***
TH cells	***T helper cells***	***Βοηθητικά κύτταρα Τ***
TMP	***2,2,6,6-Tetramethylpiperidine***	***2,2,6,6-Τετραμεθυλοπιπεριδίνη***
TM6SF2	***Transmembrane 6 superfamily 2***	***Ανθρώπινο γονίδιο διαμεμβρανικής 6 υπεροικογένειας 2***
TNF-a	***Tumor necrosis factor-alpha***	***Παράγοντας νέκρωσης των όγκων-α***
TRX	***Thioredoxin***	***Θειορεδοξίνη***
UCP2	***Mitochondrial uncoupling protein 2***	***Μιτοχονδριακή πρωτεΐνη αποσύνδεσης 2***
VLCD	***Very low calories diet***	***Δίαιτα πολύ χαμηλών θερμίδων***
VLDL	***Very low density lipoprotein***	***Πολύ χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνες***
WHR	***Waist to Hip Ratio***	***Λόγος της περιφέρειας της μέσης και της περιφέρειας των ισχύων***
ZN	***Zinc***	***Ψευδάργυρος***

ΚΕΦ. 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟ ΣΤΡΕΣ

1.1.1 Ελεύθερες Ρίζες: Ορισμός

Ελεύθερη ρίζα είναι ένα άτομο ή μόριο το οποίο έχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια (μονήρη) σε ατομικά ή μοριάκα τροχιακά (Halliwell, 1999). Χαρακτηριστικό της είναι η ικανότητα ύπαρξη της να υπάρχει ως αυτόνομη μορφή σε χημικά η βιολογικά συστήματα. Έχουν μεγάλη δραστικότητα και ικανότητα να αποσπούν ηλεκτρόνια από γειτονικά μόρια ώστε να συμπληρώνουν τα δικά τους τροχιακά. Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ονομάζεται ένα ηλεκτρόνιο που κινείται μόνο του σε μία τροχιά, γύρω από τον πυρήνα του ατόμου, σε αντίθεση με το σύνηθες φαινόμενο της ύπαρξης δύο ηλεκτρονίων, σε κάθε τροχιά, τα οποία παρουσιάζουν αντίθετη στροφορμή ή spin (μαγνητική ροπή που δημιουργείται από την περιστροφή του ηλεκτρονίου γύρω από τον άξονά του) (Γιαννακοπούλου, 2009). Τα τελευταία χρόνια, έναντι του όρου «ελεύθερες ρίζες» χρησιμοποιείται ο όρος «δραστικές μορφές».

1.1.2 Δραστικές μορφές Οξυγόνου και Αζώτου

Δραστικές μορφές Οξυγόνου

Δραστικές μορφές Οξυγόνου (ROS), ορίζονται οι χημικές ενώσεις, οι οποίες μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες ή όχι και έχουν ως δραστικό κέντρο το άτομο του οξυγόνου (Cadenas and Sies, 1998). Οι ενώσεις του οξυγόνου που δεν είναι ελεύθερες ρίζες συμπεριφέρονται όπως αυτές, διότι είναι πολύ χημικά δραστικές και μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό ελευθέρων ριζών. Οι παραγώμενες από οξυγόνο, ελεύθερες ρίζες αποτελούν τη σπουδαιότερη ομάδα ελευθέρων ριζών στους ζώντες οργανισμούς (Γιαννακοπούλου, 2009). Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) παράγονται σε όλους τους τύπους κυττάρων και χρησιμεύουν ως σημαντικοί κυτταρικοί αγγελιοφόροι στην κανονική μεταγωγή σήματος, στη ρύθμιση των γονιδίων και του κυτταρικού κύκλου. Η κυτταρική σηματοδότηση που προκαλούν οι ελεύθερες ρίζες, περιλαμβάνει δύο γενικούς μηχανισμούς: τις μεταβολές στην ενδοκυτταρική οξειδοαναγωγική κατάσταση και την οξειδωτική τροποποίηση πρωτεϊνών (Lepetsos & Papavassiliou, 2016).

Το μοριακό οξυγόνο έχει μια μοναδική ηλεκτρονιακή διαμόρφωση και θεωρείται και το ίδιο ρίζα (Bhat et al, 2015). Το O_2 είναι “biradical”, αποτελείται δηλαδή από δύο μονήρη ηλεκτρόνια σε διαφορετικά τροχιακά. Παρά το γεγονός ότι το O_2 είναι πολύ δραστικό θερμοδυναμικά, για να μπορέσει να αποσπάσει ηλεκτρόνια από άλλα μόρια που θα «ζευγαρώσουν» με τα μονήρη ηλεκτρόνια του απαιτεί μέταλλα ως καταλύτες, ενώ διαφορετικά αντιδρά με αργό τρόπο (Sies et al., 2017).

Το O_2 μπορεί να δεχτεί μέχρι και 4 e- που το ανάγουν στο νερό. Όταν δεχτεί ένα ηλεκτρόνιο ανάγεται σε ανιόν υπερυπεροξειδίου $O_2^{\cdot -}$. Η παραγωγή του συγκεκριμένου ανιόντος, πραγματοποιείται κυρίως εντός των μιτοχονδρίων του κυττάρου (Cadenas and Sies, 1998). Παράγεται σε μεγάλα ποσά από φλεγμονώδη κύτταρα με σκοπό την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών. Το ανιόν υπεροξειδίου, που προκύπτει μέσω μεταβολικών διεργασιών μετά από την ενεργοποίηση του οξυγόνου μέσω φυσικής ακτινοβολίας, θεωρείται το "πρωτογενές" ROS, και μπορεί να αλληλεπιδράσει περαιτέρω με άλλα μόρια ώστε να δημιουργήσει "δευτερεύοντα" ROS, είτε άμεσα είτε έμμεσα κατά κύριο λόγο μέσω ενζύμων ή διαδικασιών που καταλύονται από μέταλα (Valko et al., 2006) . Το αρνητικό φορτίο του ανιόντος δεν του επιτρέπει τη διάχυση του από τις βιολογικές μεμβράνες με ευκολία. Συγκριτικά όμως με άλλες ελεύθερες ρίζες, το $O_2^{\cdot -}$ έχει μεγάλο χρόνο ζωής, που του επιτρέπει να διαχέεται διαμέσου των κυττάρων και να οξειδώνει μεγάλο αριθμό βιομορίων (Cadenas and Sies, 1998).

Από την άλλην, οταν το $O_2^{\cdot -}$ λαμβάνει ένα e- μετατρέπεται σε υπεροξείδιο του υδρογόνου H_2O_2, το οποίο αν και δεν είναι ρίζα, θεωρείται ROS, επειδή περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο (Liochev and Fridovich, 2002). Είναι σταθερό, διαπερνάει τις κυτταρικές μεμβράνες και έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ζωής μέσα στο κύτταρο. Είναι κυτταροτοξικό αλλά θεωρείται γενικότερα ασθενής οξειδωτικός παράγοντας. Το υπεροξείδιο του υδρογόνου μπορεί να παραχθεί από οποιοδήποτε σύστημα που αποδίδει υπεροξείδιο, καθώς η ρίζα του ανιόντος διασπάται εύκολα (Pisoschi & Pop, 2015 ; Byon et al, 2016). Το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι σε θέση να παράγει πολύ δραστικές ρίζες ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής του με μεταλλικά ιόντα (Pisoschi & Pop, 2015 , Byon et al, 2016).

Η προσθήκη ενός ακόμα ηλεκτρονίου μετατρέπει το H_2O_2 σε ρίζα υδροξυλίου $OH^{\cdot}$ η οποία επίσης αποτελεί ένα πολύ δραστικό ROS με πολύ μικρό χρόνο ημιζωής in vivo (Paston et al., 2000). Οι ρίζες $^{\cdot}OH$ είναι οι πιο δραστικές ελεύθερες ρίζες και έχουν υψηλή οξειδωτική ικανότητα. Καταστρέφουν τα μόρια που βρίσκονται κοντά στο σημείο παραγωγής τους και

εξαιτίας της μεγάλης δραστικότητας τους δεν μπορούν να διαπεράσουν μεμβράνες. Είναι οι πιο καταστρεπτικές ελεύθερες ρίζες, και αντιδρούν τόσο γρήγορα που δεν είναι δυνατόν να ανιχνευτούν στα βιολογικά συστήματα παρά μόνο τα προϊόντα των αντιδράσεων τους (Pisoschi & Pop, 2015). Τέλος η προσθήκη ενός ακόμα e- μετατρέπει τη ρίζα υδροξυλίου σε νερό. (Lepetsos & Papavassiliou, 2016).

Άλλες δραστικές ρίζες οξυγόνου που μπορούν να παραχθούν στους ζώντες οργανισμούς είναι οι ρίζες υπεροξειδίου ROO•. Η απλούστερη ρίζα υπεροξειδίου είναι η HOO•, η οποία είναι η πρωτονιωμένη μορφή του O_2^- και είναι γνωστή ως ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου είναι υπεύθυνη για την έναρξη της υπεροξείδωσης των λιπιδίων. Τα υπεροξεισώματα υπό φυσιολογικές συνθήκες παράγουν H_2O_2 αλλά όχι O_2^-. Τα υπεροξεισώματα είναι κύρια οργανίδια, τα οποία καταναλώνουν οξυγόνο στο κύτταρο και συμμετέχουν σε πολλές βιολογικές διεργασίες που χρησιμοποιούν οξυγόνο. Η κατανάλωση οξυγόνου στα υπεροξεισώματα οδηγεί στην παραγωγή H_2O_2, το οποίο, στη συνέχεια, χρησιμοποιείται για την οξείδωση μεγάλου αριθμού μορίων (Γιαννακοπούλου, 2009).

Δραστικές μορφές Αζώτου

Δραστικές μορφές αζώτου (RNS) είναι χημικές μορφές, οι οποίες μπορεί να είναι ελεύθερες ρίζες ή όχι και έχουν ως δραστικό κέντρο το άτομο του αζώτου. Η ρίζα του μονοξειδίου του αζώτου (NO·) αποτελεί ένα μικρό μόριο, το οποίο περιέχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο και συνεπώς αποτελεί ελεύθερη ρίζα. Συντίθεται κατά την οξείδωση της L-αργινίνης προς κιτρουλίνη, με μια διεργασία που καταλύεται από τις συνθετάσες του NO (NOSs) (Ghafourifar and Cadenas, 2005).

Το NO• αποτελεί σημαντικό μόριο μεταγωγής σήματος σε ορισμένες φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού, όπως η αγγειοδιαστολή η νευροδιαβίβαση, οι μηχανισμοί άμυνας, η ρύθμιση της αρτηριακής πίεσης η χαλάρωση των λείων μυών (Pisoschi & Pop, 2015 , Bhat et al, 2015). Είναι επίσης σημαντικό για την μη ειδική άμυνα του ξενιστή, και βοηθά στο να σκοτώνονται όγκοι και ενδοκυττάρια παθογόνα (Bergendi et al., 1999). Αποτελεί ελεύθερη ρίζα και σαν αέριο χαρακτηρίζεται από μεγάλη διαχυτική ικανότητα. Μπορεί να μετατραπεί σε πολλές άλλες δραστικές ρίζες αζώτου, όπως NO^+, (NO) και υπεροξεινιτρώδες (ONOO). Το ONOO παράγεται από την αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου με το ανιόν υπεροξειδίου $NO.+O_2. - \rightarrow ONOO-$ (Fang et al., 2002).

Συνολικά, οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου αναφέρονται και ως RONS (reactive oxygen and nitrogen species). Οι RONS αποσπούν e- από άλλες ενώσεις (συνήθως υπό τη μορφή H·) για να συμπληρώσουν τα δικά τους τροχιακά και δημιουργούν μία νέα ελεύθερη ρίζα και με αυτό τον τρόπο εκκινούν αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου (Czerska et al., 2015 ; Devasagayam et al., 2004).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.1: ***Δραστικές μορφές οξυγόνου και αζώτου***

Χημικός Τύπος	*Ονομασία*
O_2 • -	Ανιόν υπεροξειδίου
HO_2 •	Υδροϋπεροξειδική ρίζα
H_2O_2	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
•OH	Ρίζα υδροξυλίου
RO •	Ρίζα αλκοξειδίου
ROO•	Ρίζα υπεροξειδίου
ROOH	Οργανικό υδροϋπεροξείδιο
$^1O_2$	Μονήρες οξυγόνο
O3	Όζον
HOCl	Υποχλωριώδες οξύ
NO •	Ρίζα μονοξειδίου του αζώτου
NO_2 •	Νιτρώδες
ONOO-	Υπεροξυνιτρώδες ανιόν

1.1.3 Πηγές RONS στον ανθρώπινο οργανισμό

Ελεύθερες ρίζες δημιουργούνται στον οργανισμό μας είτε από φυσιολογικές διαδικασίες του είτε από εξωτερικές πηγές. Η παραγωγή τους είναι συνεχής και έχει υπολογιστεί ότι το 3-5% του καταναλισκόμενου O_2 μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες. Οι κυριότερες από τις φυσιολογικές διαδικασίες παραγωγής ελευθέρων ριζών περιλαμβάνουν:

(α) <u>Την παραγωγή τους ως παραπροϊόντα φυσιολογικών ενζυμικών αντιδράσεων :</u>

Παραγωγή ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου, ως παραπροϊόν κατά τη λειτουργία της αναπνευστικής αλυσίδας των μιτοχονδρίων των κυττάρων. Κατά τη διαδικασία αυτή ορισμένα ηλεκτρόνια ξεφεύγουν από τα μόρια που μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στην αναπνευστική αλυσίδα και περνούν στο οξυγόνο ανάγοντας το σε υπεροξείδιο.

(β) <u>Τη παραγωγή τους ως προϊόντα φυσιολογικών ενζυμικών αντιδράσεων:</u>

Φυσιολογική δράση οξειδωτικών ενζύμων όπως, οι λιποξυγονάσες, οι κυκλοοξυγονάσες, οι υπεροξειδάσες και οι αφυδρογονάσες κατά την οποία παράγονται ελεύθερες ρίζες ως παραπροϊόντα των ενζυμικών αντιδράσεων.

(γ) Τη παραγωγή τους ως τοξικές ενώσεις για την καταστροφή μικροοργανισμών στην φλεγμονώδη απόκριση:

Παραγωγή ελευθέρων ριζών ως μέρος της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος. Ορισμένα από τα κύτταρα του συστήματος αυτού παράγουν ελεύθερες ρίζες για να εξουδετερώσουν βακτήρια εισβολείς. Σε περιπτώσεις που η διαδικασία αυτή είναι εκτός ελέγχου, όπως συμβαίνει με τις αυτοάνοσες ασθένειες, μερικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται προκαλούν βλάβες στα ίδια μας τα κύτταρα.

Ένας αριθμός παραγόντων που βρίσκεται εκτός του σώματος μπορεί επίσης να αποτελέσει πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών, όταν έρθει σε επαφή με το σώμα. Μερικά παραδείγματα τέτοιων εξωγενών πηγών αποτελούν το κάπνισμα και ο καπνός του τσιγάρου, οι ακτίνες-Χ, η υπεριώδης ακτινοβολία, διάφορες χημικές ενώσεις και φάρμακα καθώς επίσης το νέφος της ατμοσφαιρικής ρύπανσης (όζον, νιτροξείδια) (Lobo V. et al., 2010).

Οι κύριες τοποθεσίες παραγωγής τους είναι τα μιτοχόνδρια (μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης), η μη-μιτοχονδριακή - δεσμευμένη στη μεμβράνη οξειδάση του νικοτιναμιδο – αδενίνου φωσφορικού δινουκλεοτιδίου (NADPH), και η οξειδάση της ξανθίνης (XO) (Lepetsos & Papavassiliou, 2016). Από αυτές, η πιο πιθανή πηγή είναι τα μιτοχόνδρια. Εκτιμάται ότι 2 – 3% του συνολικού οξυγόνου που καταναλώνεται από τη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάγεται ατελώς σε υπεροξειδικό ανιόν (O_2-) και όχι σε νερό. Τα ένζυμα της οξειδάσης του NADPH (NOXes) είναι οι κύριες πηγές των ελεύθερων ριζών οξυγόνου στα φαγοκύτταρα, μέσω της παρακάτω αντίδρασης (Lepetsos & Papavassiliou, 2016).:

$$2O_2 + NADPH \rightarrow 2O_{2^-} + NADP_+ + H_+$$

Η παραγωγή O_2-. γίνεται κυρίως από τα σύμπλοκα I, III της αναπνευστικής αλυσίδας όπου έχουμε μεταφορά e- από τα NADH και FADH2 στο O_2. Το O_2-. που παράγεται στο σύμπλοκο I εκκρίνεται μόνο στη μήτρα του μιτοχονδρίου, ενώ αυτό που παράγεται στο σύμπλοκο III εκκρίνεται και στη μήτρα και στον ενδιάμεσο χώρο. Εκτός από τα σύμπλοκα της αναπνευστικής αλυσίδας, το O_2-. μπορεί να συντεθεί και από άλλα ένζυμα των μιτοχονδρίων όπως η μονοάμινο οξειδάση (MAO), η αναγωγάση του κυτοχρώματος b5 (Cb5R) που βρίσκονται στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων καθώς και η αφυδρογονάση της 3-φωσφογλυκερόλης (GPDH) που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Επίσης, πολλά ένζυμα της μήτρας μπορούν να παράγουν O_{2^-}. όπως ακονιτάση, πυροσταφυλική αφυδρογονάση (PDH) και αφυδρογονάση του α-κετογλουταρικού (αKGDH). Αν και οι αντιδράσεις μεταφοράς ενός

ηλεκτρονίου επικρατούν, μπορούν να παρατηρηθούν και μεταφορές δύο ηλεκτρονίων από τα αναγωγικά ισοδύναμα στο O_2 προς παραγωγή H_2O_2. Τέτοιες μεταφορές γίνονται από το κυτόχρωμα C και το ένζυμο p66shc.

Μόλις σχηματιστεί το O_2-. αυτό, μετατρέπεται σε H_2O_2 το οποίο ανάγεται περαιτέρω σε H_2O με τη δράση των ενζύμων καταλάση (CAT), υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) και υπεροξυρεδοξίνες (Prx3). Το ποσοστό του συνολικά καταναλισκώμενου O_2 που μετατρέπεται σε O_2-. δεν έχει υπολογιστεί επακριβώς. Αν και σε in vitro κυτταρικά πειράματα, φαίνεται ότι αυτό είναι γύρω στο 2% σε πραγματικές in vivo συνθήκες το ποσοστό αυτό είναι ακόμα μικρότερο. Σχεδόν το 90% των ROS προέρχεται από τα μιτοχόνδρια.

Οι οξειδάσες, οξυγονάσες και υπεροξυδάσες, είναι ένζυμα που δεσμεύουν O_2 και μεταφέρουν μονήρη ηλεκτρόνια σε αυτό μέσω ενός μετάλλου. Ελεύθερες ρίζες, που είναι ενδιάμεσα αυτών των αντιδράσεων μπορούν να απελευθερωθούν τυχαία πριν ολοκληρωθεί η αναγωγή του O_2. Μία βασική πηγή ελευθέρων ριζών μέσω αυτών των αντιδράσεων είναι το κυτόχρωμα P450. Επαγωγή του P450 από αιθανόλη, φάρμακα ή τοξικές ενώσεις αυξάνουν την απελευθέρωση ελευθέρων ριζών από αυτό. Το H_2O_2 και τα λιπιδικά υπεροξείδια παράγονται ενζυμικά από αρκετές οξειδάσες που βρίσκονται στα υπεροξυσωμάτια, τα μιτοχόνδρια και στο ενδοπλασματικό δίκτυο. Παραδείγματα τέτοιων ενζύμων είναι:

Α) Η μονοάμινοοξειδάση, που αποκοδομεί οξειδωτικά την ντοπαμίνη παράγει H_2O_2 στη μιτοχονδριακή μεμβράνη συγκεκριμένων νευρώνων,
Β) Η υπεροξυσωμιακή οξειδάση των λιπαρών οξέων παράγει H_2O_2 κατά την οξείδωση λιπαρών οξέων,
Γ) Η οξειδάση της ξανθίνης παράγει H_2O_2 στο κυτταρόπλασμα η οποία προέρχεται από την πρωτεόλυση της αφυδρογονάσης της ξανθίνης.
Δ) Τα λιπιδικά υπεροξείδια δημιουργούνται ως ενδιάμεσα της ενζυμικής σύνθεσης πολλών εικοσανοειδών, όπως οι προσταγλανδίνες και τα λευκοτριένια (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009).

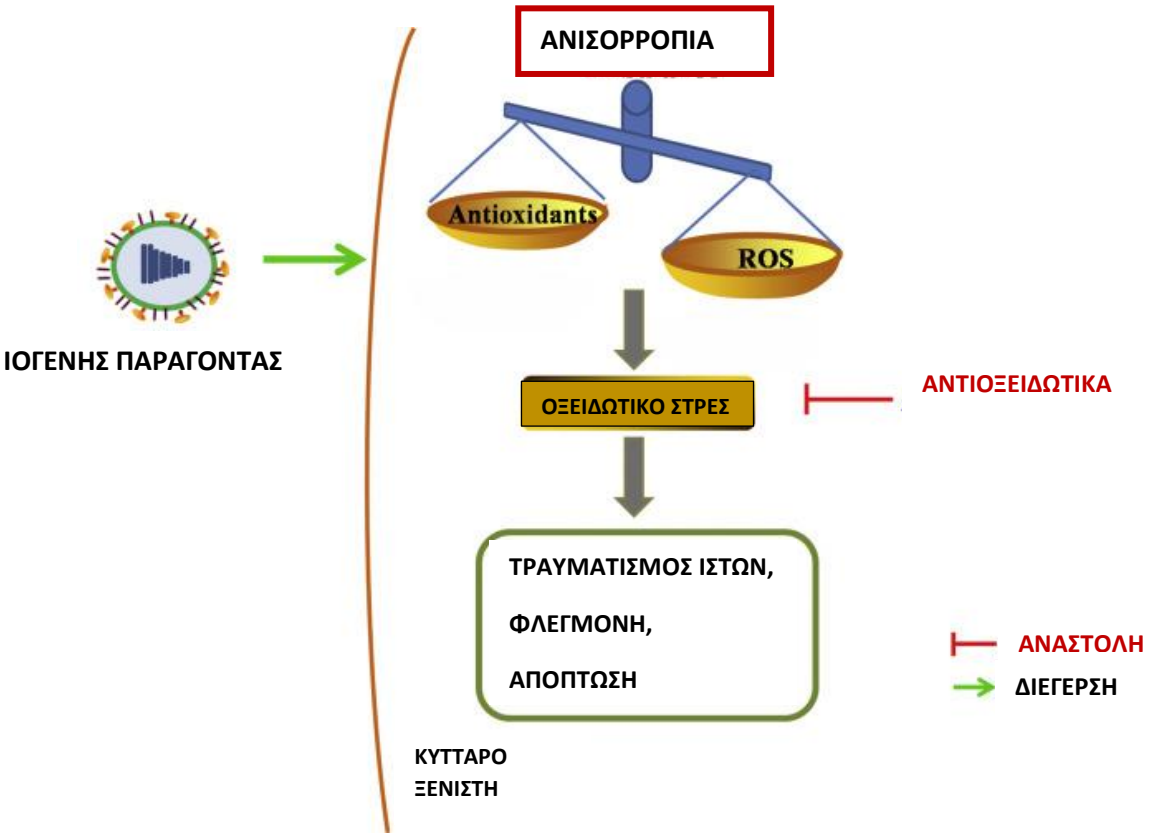
1.1.4 Οξειδωτικό στρες

Το 1985, ο H. Sies, όρισε το «οξειδωτικό στρες» ως: Η διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ παραγωγής ελευθέρων ριζών και της απενεργοποίησης τους από τον οργανισμό (Sies and

Cadenas, 1985). Η ορολογία όμως αυτή, δεν είναι απολύτως σωστή δεδομένου ότι η οξείδωση συνοδεύεται πάντοτε από την αναγωγή. Συνεπώς ένας πιο σωστός όρος είναι «οξειδοαναγωγικό στρες, redox στρες». Για τον λόγο αυτά, τα επόμενα χρόνια, πραγματοποιήθηκε μία τροποποίηση του ορισμού, με αποτέλεσμα με τον όρο «οξειδωτικό στρες» να αναφερόμαστε σε: ανισορροπία μεταξύ της ύπαρξης ελευθέρων ριζών οξυγόνου / αζώτου και της ικανότητας του οργανισμού να αντιμετωπίσει τη δράση τους μέσω αντιοξειδωτικών προστατευτικών μηχανισμών (Sies and Jones, 2007).

Κατά τη περίοδο οξειδωτικού στρες οι προ-οξειδωτικές ρίζες επικρατούν της αντιοξειδωτικής άμυνας με αποτέλεσμα την αύξηση στη συγκέντρωση ελευθέρων ριζών και άλλων προ-οξειδωτικών μορίων, τη μείωση των επιπέδων των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μορίων, τη διαταραχή στην οξειδοαναγωγική ισορροπία του κυττάρου και τις οξειδωτικές βλάβες σε κυτταρικά συστατικά (Sies et al., 2017).

Δεδομένου του μεγάλου εύρους, αντιοξειδωτικών και οξειδωτικών ενζύμων και ενώσεων, έγιναν προσπάθειες ταξινόμησης των υπο-μορφών του οξειδωτικού στρες (Sies and Jones, 2007) και την εισαγωγή εννοιολογικών κλιμάκων έντασης που κυμαίνονται από το φυσιολογικό οξειδωτικό στρες έως το υπερβολικό και τοξικό οξειδωτικό στρες (Lushchak, 2014 & Yan, 2014). Σύμφωνα με τις εννοιολογικές κλίμακες, γίνεται αναφορά σε οξεία, χρόνια και επαναλαμβανόμενη οξειδωτική καταπόνηση (Pickering et al., 2013). Η ομοιόσταση μεταξύ οδοξειδωτικών και αντιοξειδωτικών ενώσεων έχει διατυπωθεί ως "το χρυσό μέσο της υγιεινής διαβίωσης" (Ursini et al., 2016).



Εικ.1. *Δημιουργία Οξειδωτικού στρες (Liu et al., 2017)*

1.1.5 Ο διττός ρόλος των ελεύθερων ριζών στον ανθρώπινο οργανισμό

Οι ελεύθερες ρίζες αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και διαδραματίζουν διττό ρόλο για τον ανθρώπινο οργανισμό: Ο ρόλος τους στον ανθρώπινο οργανισμό είναι άλλοτε ευεργετικός και άλλοτε βλαπτικός ανάλογα με το ρυθμό παραγωγής και εκκαθάρισης τους (Valko et al., 2006).

Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών οξυγόνου παρατηρούνται σε χαμηλές/μέτριες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή, στη φαγοκυττάρωση, στη χημειοταξία κυττάρων του ανοσοποιητικού, στην απόπτωση και στη σηματοδότηση για τη πήξη του αίματος (Rice et al., 1994).

Οι βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών οξυγόνου και αζώτου, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν βιολογική βλάβη, είναι γνωστές ως οξειδωτικό στρες και στρες αζώτου, αντίστοιχα. Το οξειδωτικό στρες, συμβαίνει στα βιολογικά συστήματα, όταν από τη μια πλευρά υπάρχει υπερπαραγωγή δραστικών ριζών ενώ από την άλλη πλευρά ανεπάρκεια των ενζυμικών και των μη ενζυμικών αντιοξειδωτικών μηχανισμών. Η περίσσεια αυτή των δραστικών ριζών προκαλεί αναστολή συμπλεγμάτων ενζύμων στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα τη διακοπή της μιτοχονδριακής αναπνοής. Επομένως, ο βλαπτικός ρόλος τους είναι γνωστός για τις προκαλούμενες βλάβες στα κυτταρικά λιπίδια, τις πρωτεΐνες ή το DNA, αναστέλλοντας έτσι τη λειτουργία τους. Κατά συνέπεια, το οξειδωτικό στρες ενοχοποιείται στην παθοφυσιολογία πολλών νοσημάτων καθώς και στη διεργασία της γήρανσης (Kenneth et al., 2007).

Οι δραστικές μορφές αζώτου και οξυγόνου έχουν επίσης βλαπτική επίδραση στα βιολογικά μόρια, όπως είναι οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Η λιποειδική υπεροξείδωση πραγματοποιείται όταν ένα άτομο υδρογόνου αφαιρείται από ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ μέσω μιας ελεύθερης ρίζας, με αποτέλεσμα την έναρξη μιας αλυσιδωτής αντίδρασης που οδηγεί στη δημιουργία των λιποειδικών υπεροξειδίων (Benzie, 1996). Αυτά οδηγούν στην καταστροφή των μεμβρανών και στην παραγωγή δραστικών μεταβολιτών, όπως είναι η μηλονυλοδιαλδεΰδη (MDA) και η 4 - υδροξυ - 2,3 - trans εννεανάλη (4HNE), ενώσεις που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και οι οποίες οδηγούν σε κυτταρική δυσλειτουργία (Reid, 2001). Ο βαθμός λιποειδικής υπεροξείδωσης συσχετίζεται με τη διαθεσιμότητα των λιπαρών οξέων (Benzie IF., 1996). Άλλα παράγωγα λιποειδικής υπεροξείδωσης είναι τα ισοπροστάνια και η 3 – νιτροτυροσίνη. Τα F2 – ισοπροστάνια είναι αποτέλεσμα της ενζυμικής υπεροξείδωσης του αραχιδονικού οξέος. Επιπλέον, η αυξημένη ενδοηπατική συσσώρευση χοληστερόλης σε συνδυασμό με την αύξηση των ROS προάγει την οξείδωση της LDL και, συγκεκριμένα, την παραγωγή οξυστερολών που προέρχονται από την υδροξυλίωση της πλευρικής αλυσίδας της χοληστερόλης σε διάφορες θέσεις μέσω του μηχανισμού της αυτοοξείδωσης ή από τη δράση μονοοξυγενασών της οικογένειας του CYP450 (Musso et al., 2012).

Η οξείδωση των πρωτεϊνών από τις ενεργές μορφές οξυγόνου ROS επηρεάζει τη δραστικότητα και τη τριτοταγή δομή των πρωτεϊνών, ενώ παράλληλα τις κάνει πιο ευάλωτες απέναντι στους μηχανισμούς των κυττάρων που εξαλείφουν κατεστραμμένες πρωτεΐνες. Επίσης τα αμινοξέα επηρεάζονται και αυτά με διαφορετικό τρόπο από τα ROS (Wu et al., 2003).Τα ROS , και

ιδιαίτερα η ρίζα υδροξυλίου (OH•) αντιδρούν με τις πρωτεΐνες, απομακρύνοντας ένα άτομο υδρογόνου από τη πολυπεπτιδική αλυσίδα, σχηματίζοντας έτσι μια ρίζα που αντιδρά σε αερόβιες συνθήκες, άμεσα με οξυγόνο προς ρίζα υπεροξειδίου (ROO•) (Stadtman et al., 1992).

Τα ROS , και ιδιαίτερα η ρίζα υδροξυλίου (OH•) μπορούν να αντιδράσουν με το DNA, με προσθήκη OH• στον διπλό δεσμό μεταξύ τον άνθρακα C5 και C6 στις πυριμιδίνες (ουρακίλη, θυμίνη και κυτοσίνη) οδηγώντας σε οξείδωση του πυρηνικού και μιτοχονδριακού DNA (Nomoto et al., 2008). Η 8 – υδροξυ – 2 δεοξυγουανοσίνη (8 – OhdG) είναι ένα προϊόν τροποποιημένης βάσης του DNA που παράγεται από τη δράση των ROS και η έκφραση του σχετίζεται με το βαθμό της φλεγμονής (Seki et al., 2002). Σε άτομα με αυξημένο οξειδωτικό στρες, παρατηρείται αυξημένη έκφραση της 8 – OhdG στο ήπαρ, ενώ η αποβολή 8 – OhdG από τα ούρα χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδωτικού στρες (Kadiiska et al., 2005). Όπως έχει φανεί μία δίαιτα υψηλή σε λίπος οδήγησε σε αύξηση της ηπατικής παραγωγής H2O2 και αύξηση του ποσοστού των θετικών σε 8 – OhdG ηπατοκυττάρων (Daugherity et al., 2012).

Η λεπτή ισορροπία ανάμεσα στις ευεργετικές και τις βλαβερές δράσεις των δραστικών ριζών έχει ιδιαίτερη σημασία για τους ζώντες οργανισμούς και διαφυλάσσεται με μηχανισμούς γνωστούς ως «οξειδοαναγωγική ρύθμιση» (redox regulation). Η οξειδοαναγωγική ρύθμιση διατηρεί την οξειδοαναγωγική ομοιόσταση και προστατεύει τους ζώντες οργανισμούς από το οξειδωτικό στρες (Γιαννακοπούλου, 2009).

1.1.6 Αντιοξειδωτική Άμυνα του Οργανισμού

Για την επιβίωση σε ένα αφιλόξενο περιβάλλον, ο οργανισμός έχει αναπτύξει μια σειρά προστατευτικών μηχανισμών που περιλαμβάνουν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης, φυσικά μέτρα προστασίας και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Σύμφωνα με τους Halliwell & Gutteridge (1989), αντιοξειδωτικό είναι κάθε υπόστρωμα που όταν βρίσκεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, συγκρινόμενο με κάθε οξειδώσιμο υπόστρωμα, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτού του υποστρώματος (Siti et al, 2015). Ακόμα, για να χαρακτηρισθεί ένα αντιοξειδωτικό ως αποτελεσματικό, θα πρέπει ο λόγος της συγκέντρωσης των ελεύθερων ριζών προς τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού να είναι 100:1 (Litescu et al, 2010). Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων, από

τις οποίες προκύπτουν οι ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης (Γιαννακοπούλου, 2009).

Οι βασικοί μηχανισμοί με τους οποίους τα αντιοξειδωτικά συστήματα προστατεύουν τον οργανισμός, είναι οι εξής:

α) Αναστολή της παραγωγής ελευθέρων ριζών.

Πρόκειται για αναστολείς των ενζύμων τα οποία δημιουργούν ελεύθερες ρίζες (π.χ. αλλοπουρινόλη για την οξειδάση της ξανθίνης) και για χημικά αντιδραστήρια που δεσμεύουν ιόντα στοιχείων μετάπτωσης και εμποδίζουν την καταλυτική τους δράση προς σχηματισμό ελευθέρων ριζών.

β) Δέσμευση των ελευθέρων ριζών ή μετατροπής τους σε μη δραστικές, μη τοξικές ενώσεις

γ) Αποικοδόμηση και απομάκρυνση των οξειδωτικά τροποποιημένων βιομορίων

δ) Διαμερισματοποίηση παραγωγής RONS

ε) Διατήρηση μεταλλικών ιόντων σε δεσμευμένη μορφή

(Rice et al., 1995)

Τα ενδογενή αντιοξειδωτικά συστήματα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: α)τα ενζυμικά συστήματα μετατροπής των ελευθέρων ριζών σε μη τοξικές ενώσεις και β) τα μη ενζυμικά βιομόρια με αντιοξειδωτική δράση.

Ενδογενή ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα:

- Υπεροξειδικές δισμουτάσες (superoxide dismutases, SOD).

  Οι υπεροξειδικές δισμουτάσες είναι μέρος του ενζυματικού αμυντικού συστήματος ενάντια στην οξειδωτική φθορά, μετατρέποντας το ανιόν της ρίζας υπεροξειδίου σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (Davis &Pennypacker, 2016 , Pisoschi & Pop, 2015). Στους ζωικούς ιστούς μπορούν να βρεθούν 3 είδη αυτού του ενζύμου οι οποίες όλες απαιτούν ένα, οξειδοαναγωγικά δραστικό μέταλλο μετάπτωσης για να επιτευχθεί η οξειδοαναγωγική αντίδραση:

  α. Zn-Cu SOD : βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα και διαθέτει 2 υπομονάδες, η καθεμία από τις οποίες διαθέτει 1 άτομο Zn και 1 άτομο Cu στο ενεργό της κέντρο.

  β. Mn SOD : βρίσκεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και διαθέτει 4 υπομονάδες, η κάθε μία από τις οποίες διαθέτει 1 άτομο Mn .

γ. εξωκυττάρια SOD (EC SOD): βρίσκεται κυρίως στα εξωκυττάρια υγρά και διαθέτει και αυτή Zn και Cu όπως και η Zn-Cu SOD αλλά διαφέρουν μεταξύ τους. Συντίθεται μόνο σε μερικούς ιστούς, όπως οι ινοβλάστες και τα ενδοθηλιακά κύτταρα και εκφράζεται στην επιφάνεια των κυττάρων όπου συνδέεται λόγω αυξημένης συγγένειας με την θεϊική ηπαράνη και ηπαρίνη, η οποία ενισχύει και την απελευθέρωση της EC SOD στην κυκλοφορία .
(Pisoschi & Pop, 2015).

- Υπεροξειδάσες της γλουταθειονίνης (Glutathione peroxidases, GPXs).

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, ένα ένζυμο που περιέχει σελήνιο, καταλύει την αναγωγή του H2O2 και των οργανικών υδροϋπεροξειδίων σε νερό ή στις αντίστοιχες αλκοόλες. Η ανηγμένη γλουταθειόνη λειτουργεί ως αποτελεσματικός δότης ηλεκτρονίων στη διαδικασία, καθώς οι ελεύθερες ομάδες θειόλης οξειδώνονται σε δισουλφιδικούς δεσμούς (Pisoschi & Pop, 2015). Κατά την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό, η γλουταθειόνη αναγεννάται με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (glutathione reductase), του αναγωγικού ισοδυνάμου που προέρχεται από το NADPH (Ruszkiewicz & Albrecht, 2015). Έχουν βρεθεί 5 ισομορφές GPX1-5, οι οποίες διαφέρουν στην εξειδίκευση για το υπόστρωμα και την κυτταρική τοπολογία. Τουλάχιστον 2 από αυτές, βρίσκονται στα μιτοχόνδρια: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 1, η οποία εκφράζεται παντού, και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης 4, η οποία κυρίως ανάγει φωσφολιπιδικά υδροϋπεροξείδια (Ruszkiewicz & Albrecht, 2015).

- Καταλάση (Catalase).

Η καταλάση είναι ένα φυσικό συστατικό των κυτταρικών υπεροξυσωμάτων και είναι υπεύθυνη για τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και μοριακό οξυγόνο. Απαιτεί Fe στο ενεργό της κέντρο και αν και έχει το ίδιο υπόστρωμα με την GPX η καταλάση έχει πολύ μικρότερη συγγένεια για το υπεροξείδιο του υδρογόνου σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Εντοπίζεται κυρίως στα υπεροξυσωμάτια και η υψηλότερη δραστικότητα εντοπίζεται σε ιστούς με υψηλό υπεροξυσωμιακό περιβάλλον (νεφρά και ήπαρ). Στα λευκοκύτταρα, έχει ως σκοπό την προστασία του κυττάρου από το H_2O_2 που παράγεται κατά την αναπνευστική έκρηξη (Pisoschi & Pop, 2015). Από παλαιότερες μελέτες έχει φανεί ότι ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο ή νόσο Parkinson είχαν μειωμένα επίπεδα δραστικότητας καταλάσης στον εγκέφαλο (Davis & Pennypacker, 2016).

- Σύστημα θειοredοξίνης (TRXs)

Το σύστημα της θειοredοξίνης αποτελείται από την θειοredοξίνη (TRX) και την αναγωγάση της θειοredοξίνης. Η θειοredοξίνη είναι μία πρωτεΐνη μοριακού βάρους ~12-kDa και έχει απομονωθεί από πολλούς ευκαρυωτικούς αλλά και προκαρυωτικούς οργανισμούς. Συναντάται

σε πολλά κυτταρικά διαμερίσματα, όπως στο κυτταρόπλασμα, στο ενδοπλασματικό δίκτυο και στα μιτοχόνδρια. Τα κύτταρα περιέχουν δύο συστήματα θειοredοξίνης, ένα κυτταρπλασματικό (TRX1) και ένα μιτοχονδριακό (TRX2). Η θειορεδοξίνη στην ανηγμένη της μορφή έχει 2 –SH ομάδες, οι οποίες όταν βρουν ένα κατάλληλο οξειδωμένο υπόστρωμα, το ανάγουν μετατρεπόμενες σε –S-S-. Στη συνέχεια η οξειδωμένη θειορεδοξίνη αναγεννιέται στην αρχική ανηγμένη μορφή από την TRX αναγωγάση, η οποία χρησιμοποιεί το NADPH ως αναγωγικό (Chae et al., 1994).

- Σύστημα γλουταρεδοξίνης (glutaredoxin system, GRXs)

Το σύστημα της θειορεδοξίνης και γλουταρεδοξίνης δρα συνεργιστικά ώστε να διατηρείται η ανηγμένη κατάσταση πρωτεϊνικών και μη πρωτεϊνικών θειολών. Στην περίπτωση του συστήματος της γλουταρεδοξίνης, τα ηλεκτρόνια προέρχονται επίσης από το NADPH, αλλά διοχετεύονται στη γλουταρεδοξίνη μέσω της αναγωγάσης της γλουταθειόνης και της γλουταθειόνης. Όπως και η θειορεδοξίνη, η γλουταρεδοξίνη έχει την ικανότητα αναγωγής πρωτεϊνικών δισουλφιδικών δεσμών, αλλά επιπλέον μπορεί και ανάγει δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ γλουταθειόνης και πρωτεϊνών, ρυθμίζοντας μ' αυτόν τον τρόπο τα επίπεδα της γλουταθειονυλίωσης στα κύτταρα (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009).

- Οξυγονάση της Αίμης (Heme, oxygenase HO)

Οι οξυγονάσες της αίμης βρίσκονται εντός του ενδοπλασματικού δικτύου, όπου καταλύουν την οξειδωτική διάσπαση της αίμης σε χολοπρασίνη, ελεύθερο σίδηρο Fe μονοξείδιο του άνθρακα (CO). Η χολοπρασίνη μεταβολίζεται περαιτέρω στη χολική χοληστερόλη , και τη χολερυθρίνη , μέσω της αναγωγάσης της χολοπρασίνης (μεταβατικά μέταλλα, υπεριώδες φως, κυτταροκίνες Τ βοηθητικών κυττάρων (Th1), προσταγλανδίνες , λιποπολυσακχαρίτες , ντοπαμίνη,). Επειδή η αίμη έχει προ-οξειδωτική δράση, η αντιοξειδωτική δράση της HO οφείλεται στην ικανότητα της να αποικοδομεί την αίμη. Παράλληλα, η χολερυθρίνη που παράγεται έχει ικανότητα εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών ενώ μπορεί και άμεσα να αναστείλει τη δραστικότητα της NADPH οξειδάσης. Το μονοξείδιο του άνθρακα έχει αντιυπερπλαστικές, αντιφλεγμονώδεις και αγγειοδιασταλτικές δράσεις. Επίσης, η κυταροτοξική δράση του απελευθερωμένου σιδήρου περιορίζεται με τη ταυτόγχρονη υπερέκφραση φεριτίνης Τουλάχιστον δύο ισομορφές της οξυγονάσης της αίμης, η HO-1 και η HO-2, εκφράζονται σε κύτταρα θηλαστικών. Η βασική έκφραση HO-1 στον εγκέφαλο περιορίζεται σε μικρές ομάδες νευρώνων , ενώ η πρωτεΐνη HO-2 κατανέμεται ευρέως σε όλο το νευρικό σύστημα (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009).

- Παραοξονάσες (paraoxonases, PON)

Οι παραοξονάσες είναι ομάδα ενζύμων που συντίθενται στο ήπαρ και κυκλοφορούν στο πλάσμα συνδεόμενες με HDL. Είναι ένζυμα που περιορίζουν την λιπιδική υπεροξείδωση (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009).

Ενδογενή μη ενζυμικά αντιοξειδωτικά συστήματα:

Πολλά ενδογενή βιομόρια του ανθρώπινου οργανισμού εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση δεσμεύοντας και απενεργοποιώντας τις ελεύθερες ρίζες. Τα βιομόρια αυτά μπορεί να είναι είτε πρωτεΐνες είτε μικρά οργανικά μόρια. Τα περισσότερα είναι δότες του ατόμου του υδρογόνου Η μαζί με το ηλεκτρόνιο του στην ελεύθερη ρίζα. Με αυτό τον τρόπο ανάγουν την ελεύθερη ρίζα αλλά ταυτόχρονα μετατρέπονται και τα ίδια σε ελεύθερες ρίζες. Οι πρωτεΐνες με την ισχυρότερη αντιοξειδωτική δράση είναι η αλβουμίνη, η τρασφερίνη και οι μεταλλοθειονίνες. Οι πρωτεϊνες αυτές έχουν επιβεβαιωθεί ως μη - ενζυματικά αντιοξειδωτικά που δρουν με την δέσμευση ιόντων μετάλλων μετάπτωσης που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή των περισσότερων ελεύθερων ριζών οξυγόνου (Pisoschi & Pop, 2015). Η δραστηριότητα αυτών των πρωτεϊνών καταλήγει στην αναστολή της λιπιδικής υπεροξείδωσης που εξαρτάται από το σίδηρο, αλλά και στην αναστολή παραγωγής ρίζας υδροξυλίου από υπεροξείδιο του υδρογόνου και ιόντα υπεροξειδίου (Pisoschi & Pop, 2015). Η σερουλοπλασμίνη για παράδειγμα, αφαιρεί εύκολα ιόντα δισθενούς σιδήρου και ανάγει το μοριακό οξυγόνο σε νερό, μέσω της μεταβίβασης τεσσάρων ηλεκτρονίων που προκύπτουν στη δραστική θέση. Λόγω της ικανότητάς της να δεσμεύει επίσης ιόντα χαλκού, αυτά εγκλωβίζονται στο πλάσμα με αποτέλεσμα να μειώνονται οι επιβλαβείς επιδράσεις τους (Pisoschi & Pop, 2015).

Τα μικρά οργανικά μόρια, που παράγονται από τον ανθρώπινο οργανισμό και εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση έχουν είτε συζυγιακά συστήματα, είτε αρωματικούς δακτυλίους και είναι:

- Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ έχει αποδείξει την ικανότητά του όσον αφορά την εκκαθάριση ενεργών ριζών που προκύπτουν από διαδικασίες όπως η αυτοοξείδωση της αιμοσφαιρίνης ή η παραγωγή υπεροξειδίων από τα μακροφάγα κύτταρα (Pisoschi & Pop, 2015). Το ουρικό οξύ είναι ένας αποτελεσματικός «εκκαθαριστής» μονήρους οξυγόνου, υπεροξυλίου και ριζών υδροξυλίου και προστατεύει τη μεμβράνη των ερυθροκυττάρων από τη λιπιδική υπεροξείδωση (Pisoschi & Pop, 2015). Έχει εκτιμηθεί ότι το υδρόφοβο περιβάλλον των λιποειδών μπορεί να επηρεάσει

επιβλαβώς την αντιοξειδωτική δράση του ουρικού οξέος, και ότι τα οξειδωμένα λιπίδια είναι σε θέση να μετατρέψουν την αντιοξειδωτική δράση του ουρικού οξέος σε οξειδωτική (Pisoschi & Pop, 2015).

- Λιποικό οξύ

Το α-λιποικό οξύ αποτελεί συμπαράγοντα για α-αφυδρογονάσες και συμμετέχει σε αντιδράσεις μεταφοράς -S-O-.Το λιποικό οξύ, συντίθεται ενδογενώς αλλά μπορεί να παραληφθεί και από τη διατροφή. Γενικότερα, βρίσκεται σε πολύ μικρά ποσά στα κύτταρα και συνδεδεμένο σε ενζυμικά συμπλέγματα και συνεπώς έχει περιορισμένη αντιοξειδωτική δράση σε αυτή τη μορφή. Ως μη δεσμευμένο όμως και στην ανηγμένη μορφή του (διυδρολιποικό οξύ) είναι ισχυρά αντιοξειδωτικό. Μπορεί να συμμετάσχει στην αναγέννηση της βιταμίνης C. Είναι επίσης σε θέση να εξουδετερώσει ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και αζώτου, όπως επιβεβαιώνεται από βιοχημικές δοκιμασίες που περιλαμβάνουν μεγάλους χρόνους επώασης, αλλά δεν υπάρχουν σημαντικές αποδείξεις που να υποστηρίζουν την ικανότητα του να δεσμεύει ρίζες εντός του κυττάρου (Pisoschi & Pop, 2015).

- Γλουταθειόνη (GSH)

Η γλουταθειόνη είναι ένα ολιγοπεπτίδιο, συγκεκριμένα, η πιο άφθονη μη πρωτεϊνική θειόλη με ένα μεγάλο εύρος αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων. Βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα, καθώς τα μιτοχόνδρια δε μπορούν να τη συνθέσουν (Ruszkiewicz & Albrecht, 2015). Συντίθεται στο ήπαρ και μεταφέρεται μέσω της κυκλοφορίας στους ιστούς. Οι ιστοί, οι οποίοι εκτίθενται σε πολλά οξειδωτικά (π.χ. ήπαρ, φακοί ματιού) έχουν τις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλουταθειονίνης. Δρα ως πυρηνόφιλο, δίνοντας ηλεκτρόνια για τη διάσπαση δισουφλιδικών δεσμών οξειδωμένων πρωτεϊνών, και όταν αναχθεί, οι πρωτεΐνες αυτές δεν μπορούν να αντιδράσουν με άλλα κυτταρικά συστατικά και να προκαλέσουν περεταίρω βλάβη (Davis & Pennypacker, 2016). Επιπλέον, το να είναι συμπαράγοντας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης της δίνει τη δυνατότητα να εξουδετερώνει μη – ενζυματικά τι ρίζες υπεροξειδίου και υδροξυλίου, και να αναγεννά άλλα αντιοξειδωτικά στην ενεργή τους μορφή (Ruszkiewicz & Albrecht, 2015). Τα μόρια της οξειδωμένης γλουταθειόνης θα σχηματίσουν δισουλφιδικούς δεσμούς μεταξύ τους μέχρι να μετατραπούν σε ανηγμένη γλουταθειόνη από την αναγωγάση της γλουταθειόνης (Davis & Pennypacker, 2016). Η γλουταθειόνη μπορεί επίσης να μειώσει τη συγκέντρωση προοξειδωτικών ξενοβιωτικών παραγόντων μέσω της εξαρτώμενης σύζευξης με την S – τρανσφεράση της γλουταθειόνης.

Συνοπτικά, οι βιολογικοί ρόλοι της γλουταθειονίνης είναι πολλοί:

1. Αντιδρά με πολλές ελεύθερες ρίζες δίνοντας ένα άτομο υδρογόνου και τις απενεργοποιεί.

2. Αποτελεί υπόστρωμα για τις υπεροξειδάσες της γλουταθειονίνης (GPXs)
3. Διατηρεί στη ανηγμένη μορφή τις βιταμίνες C και E. Αντιδρά τόσο με τις ρίζες βιταμίνης E, όσο και με τη ημιδιυδροασκορβική ρίζα διατηρώντας τα περιορισμένα επίπεδα αυτών των αντιοξειδωτικών στα κύτταρα (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009).

- Ουβικινόλη (ανηγμένο συνένζυμο Q10)

Πρόκειται για τον απαραίτητο μεταφορέα ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα κι έχει αποδείξει τον προστατευτικό του ρόλο μαζί με τη βιταμίνη C και τη βιταμίνη E όσον αφορά τις κυτταρικές μεμβράνες και τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος (Pisoschi & Pop, 2015). Πέρα από την ικανότητά του να παγιδεύει ρίζες λιπιδικών υπεροξειδίων, το ανηγμένο συνένζυμο Q φαίνεται να είναι ένας αποτελεσματικός αναγεννητής της α – τοκοφερόλης από την αντίστοιχη ρίζα της. Τέλος, το ανηγμένο συνένζυμο Q εξουδετερώνει επίσης λιπιδικές ρίζες που επικεντρώνονται στον άνθρακα και ρίζες λιπιδικών υπεροξυλίων (Pisoschi & Pop, 2015).

- Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη επιδεικνύει κύτταρο προστατευτική δράση, καθώς προστατεύει τα κύτταρα από τα τοξικά επίπεδα H_2O_2. Είναι εκκαθαριστής των υπεροξειδικών ριζών. Έχει υποστηριχτεί ότι οι νανομοριακές συγκεντρώσεις της χολερυθρίνης στον ιστό, είναι πάρα πολύ χαμηλές για να εξουδετερώσουν τη δραστηριότητα των δραστικών μορφών οξυγόνου που συναντώνται σε χιλιομορικές συγκεντρώσεις στα περισσότερα κύτταρα (Pisoschi & Pop, 2015). Έχει επιβεβαιωθεί ότι ενώ η υδατοδιαλυτή γλουταθειόνη προστατεύει ουσιαστικά τις υδατοδιαλυτές πρωτεΐνες, η λιπόφιλη χολερυθρίνη αποτρέπει την υπεροξείδωση των λιπιδίων της μεμβράνης (Pisoschi & Pop, 2015). Παρά τις ποσότητες χολερυθρίνης στον ιστό οι οποίες είναι χιλιάδες φορές μικρότερες από εκείνες της γλουταθειόνης, η πρώτη μπορεί να δράσει αποτελεσματικά, λόγω του βιοσυνθετικού της κύκλου, επιτρέποντας την αναγέννηση της από χολοπρασίνη, με τη συμμετοχή της αναγωγάσης της χολοπρασίνης (Pisoschi & Pop, 2015). Μετά την οξείδωση της σε χολοπρασίνη, μπορεί να αναχθεί ταχέως από την αναγωγάση της χολοπρασίνης πίσω σε χολερυθρίνη. Σημαντική είναι επίσης η ικανότητά της χολερυθρίνης, να ελαττώνει τη μεταλλαξογόνο επίδραση των οξειδωτικών ειδών, των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και των ετεροκυκλικών αμινών (Pisoschi & Pop, 2015)

- Μελατονίνη

Η μελατονίνη που εκκρίνεται από την επίφυση, είναι νευροορμόνη που σχετίζεται με τη λειτουργία του κιρκαδιανού ρυθμού και την επαγωγή του ύπνου. Παράλληλα όμως λειτουργεί ως ένα μη ενζυματικό αντιοξειδωτικό όπου δίνοντας ένα υδρογόνο εξουδετερώνει τις ελεύθερες ρίζες. Επίσης, αντιδρά με τις RONS και σχηματίζει προϊόντα που απομακρύνονται από την

κυκλοφορία. Η καλή αντιοξειδωτική της δράση έγκειται στο γεγονός ότι δεν έχει προ-οξειδωτικές δράσεις, ενώ παράλληλα είναι και υδρόφιλη και υδρόφοβη Ο αμφίφιλος χαρακτήρας της, της επιτρέπει να διαπερνάει τις μεμβράνες και τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό. Η ικανότητα της μελατονίνης να εξουδετερώνει ελεύθερες ρίζες μπορεί να επεκταθεί και στους δευτερογενείς, τριτογενείς και τεταρτογενείς μεταβολίτες της. Οι μεταβολίτες αυτοί, με γνωστή αναγωγική δραστηριότητα ρυθμίζουν προοξειδωτικά και προφλεγμονώδη ένζυμα, όπως τη συνθάση του νιτρικού οξέος και την κυκλοξυγενάση (Pisoschi & Pop, 2015).

- Εξωγενή Αντιοξειδωτικά της διατροφής

Η διατροφή περιέχει διάφορες ουσίες με αντιοξειδωτική δράση. Αρχικά ορισμένες βιταμίνες δρουν ως εκκαθαριστές των ελεύθερων ριζών. Παράδειγμα των βιταμινών αυτών, αποτελεί το ασκορβικό οξύ (vitC), η α – τοκοφερόλη (vitE) και τα καροτενοειδή (ειδικά η β – καροτίνη). Πιο συγκεκριμένα η βιταμίνη Ε ως το ευρύτερα διαδεδομένα διαιτητικό αντιοξειδωτικό είναι λιποδιαλυτή και διασπά την αλυσίδα ελευθέρων ριζών στις βιολογικές μεμβράνες. Αποτελείται από τουλάχιστον 8 ισομερής μορφές (τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες). Όταν η βιταμίνη Ε δίνει ένα ηλεκτρόνιο στα λιπιδικά υπεροξείδια, μετατρέπεται η ίδια σε ελεύθερη ρίζα που όμως σταθεροποιείται με συντονισμό (Valko et al., 2004). Το ασκορβικό οξύ αναγεννά τη vitE, ανάγοντας την ελεύθερη ρίζα της, εκκαθαρίζει τα ROS και NOS και ανάγει τα ιόντα σιδήρου (Buettner GR., 1993). Επίσης μπορεί άμεσα να δεσμεύσει υπερυπεροξειδικές, υδροξυλικές και λιπουδρουπεροξειδικές ρίζες Είναι υδρόφιλη και λειτουργεί καλύτερα σε υδατικό περιβάλλον. Σε φυσιολογικά pH το ασκορβικό ανιόν είναι η απαντώμενη μορφή της βιταμίνης C. Φυσιολογικά, το ασκορβικό είναι συνένζυμο σε πολλές οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις και στη σύνθεση κολλαγόνου αλλά είναι ταυτόχρονα και καλό αντιοξειδωτικό (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009). Τα καροτενοειδή, πρόδρομα μόρια της βιταμίνης Α, είναι αντιοξειδωτικά λιπιδικής φύσης και εντοπίζονται στις βιολογικές μεμβράνες. Έχουν συζυγιακά συστήματα και δραστικό οξυγόνο σε δακτυλίους. Κύριοι εκπρόσωποι των καροτενοειδών είναι το β-καροτένιο, η ζεαξανθίνη, η λουτεΐνη και το λυκοπένιο. Οι αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες οφείλονται στα συστήματα συζυγιακών δεσμών που έχουν, τα οποία επιτρέπουν την δέσμευση ελευθέρων ριζών. Ωστόσο, σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις εμφανίζουν προ – οξειδωτικό χαρακτήρα (Young AJ, Lowe GM., 2001). Τέλος, οι πολυφαινολικές ενώσεις, είναι φυτοχημικές ενώσεις με μεγάλη ικανότητα δέσμευσης ελευθέρων ριζών. Ασκούν αντιοξειδωτική δράση πλειοτροπικά καθώς αναστέλλουν ένζυμα, όπως η οξειδάση της ξανθίνης, υπεύθυνα για την παραγωγή υπερυπεροξειδικής ρίζας, λειτουργούν ως χημικά αντιδραστήρια για μεταλλικά ιόντα όπως Fe και Cu αποτρέπουν τα μέταλλα αυτά να συμμετάσχουν σε αντιδράσεις Fenton. Επιπρόσθετα,

λειτουργούν ως εκκαθαριστές ελευθέρων ριζών με το να δίνουν ηλεκτρόνια στην υπερυπεροξειδική ρίζα ή σε λιπιδικά υπεροξείδια (Αντωνοπούλου και Δημόπουλος, 2009). Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή είναι φυσικά αντιοξειδωτικά και δρουν όπως η α – τοκοφερόλη, τερματίζοντας αλυσιδωτές αντιδράσεις (van Acker FA et al., 2000).

1.1.7 Επίδραση Οξειδωτικού στρες στον ανθρώπινο οργανισμό.

Όπως προηγουμένως αναφέρθηκε, φυσιολογικά, οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν σημαντικό βιολογικό ρόλο στον ανθρώπινο οργανισμό όταν βρίσκονται σε ισορροπία με τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς και γι' αυτό το λόγο δεν θα πρέπει να εξαλείφονται. Με το πέρασμα όμως των χρόνων ζωής, η οξειδωτική καταστροφή παραμένει αναπόφευκτο αποτέλεσμα της αερόβιας ζωής, παρά τους αντιοξειδωτικούς και επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που διαθέτει ο οργανισμός. Έτσι, πολλές ενεργές ρίζες είναι ικανές να βλάψουν ιστούς και να οδηγήσουν σε χρόνια νοσήματα (Saeidnia & Abdollahi, 2013). Τα τελευταία χρόνια, το οξειδωτικό στρες έχει συσχετισθεί με πλήθος εκφυλιστικών διαδικασιών, συνδρόμων και νοσημάτων, όπως είναι τα παρακάτω: (Rice et al., 1995)

- <u>Κυτταρική τροποποίηση και καρκίνος:</u>

Μια θανατηφόρος μετάλλαξης στο μόριο του DNA από ROS, η οποία είναι μη αναστρέψιμη από την αντιοξειδωτική DNA συνθάση του οργανισμού, μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ενός αλλαγμένου κυττάρου που μετά από κυτταρική διαίρεση μπορεί να δημιουργήσει όγκους άρα και καρκίνο στον οργανισμό (Valko et al., 2006).

- <u>Αθηροσκλήρωση και καρδιαγγειακά νοσήματα:</u>

Το οξειδωτικό στρες παίζει κεντρικό ρόλο στα καρδιαγγειακά νοσήματα. Οι παράγοντες κινδύνου για τα καρδιαγγειακά νοσήματα, όπως η υπέρταση, η υπερχοληστερολαιμία, ο διαβήτης, το κάπνισμα αλλά και τα ίδια τα καρδιαγγειακά νοσήματα, είναι από μόνοι τους ικανοί να προκαλέσουν σημαντική αύξηση ελεύθερων ριζών στο αγγειακό τοίχωμα, η οποία υπερβαίνει την ενδογενή αντιοξειδωτική απόκριση (Saeidnia & Abdollahi, 2013). Ως αποτέλεσμα, το οξειδωτικό στρες αυξάνει την οξείδωση της LDL επιδεινώνοντας την ενδοθηλιακή λειτουργία. Κατά την οξείδωση της LDL παράγονται οξειδωμένα φωσφολιποειδή PAF στα οποία θεωρείτει ότι οφείλεται η προ-αθηρογόνο δράση της (Ninio, 2005 ; Demopoulos et al., 2003). Επίσης, τα λιπιδικά συστατικά αντιδρούν με ενεργές μορφές οξυγόνου και παράγονται προϊόντα λιπιδικής οξείδωσης, τα οποία αυξάνουν το οξειδωτικό στρες στον

οργανισμό και διαιωνίζουν αυτόν τον φαύλο κύκλο (Wu et al, 2017). Επιπλέον, η οξειδωμένη LDL μπορεί να προκαλέσει πολλές προφλεγμονώδεις καταστάσεις καθώς είναι γνωστό ότι διεγείρει τα μακροφάγα και τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων, επάγοντας τη φλεγμονώδη απάντηση. Τέλος, η οξειδωμένη LDL αυξάνει την έκφραση αυξητικών παραγόντων, όπου ευνοείται η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός κυττάρων που εντείνουν τη φλεγμονή και την αθηρωμάτωση, με αποτέλεσμα την επιδείνωση της καρδιαγγειακής λειτουργίας και την εμφάνιση νοσημάτων (Saeidnia & Abdollahi, 2013).

- Σακχαρώδης διαβήτης:

Η υπεργλυκαιμία στο διαβήτη προκαλεί οξειδωτικό στρες, το οποίο οδηγεί σε επιταχυνόμενη αθηροσκλήρωση και μικροαγγειακές βλάβες του αμφιβληστροειδούς, των νεφρών και των νεύρων. Κατά τη διάρκεια της υπεργλυκαιμίας, προωθείται το μονοπάτι των πολυολών, και η αναγωγάση της αλδόζης, ένα ένζυμο του μονοπατιού των πολυολών μετατρέπει την περίσσεια γλυκόζης σε σορβιτόλη, χρησιμοποιώντας και καταναλώνοντας NADPH. Η δραστικότητα της αναγωγάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται από το NADPH. Άρα, η κατανάλωσή του από την αναγωγάση της αλδόζης ίσως καταλήξει σε μείωση της γλουταθειόνης, που συμβάλει στο οξειδωτικό στρες. Γενικά, η αφυδρογονάση της σορβιτόλης μετατρέπει τη σορβιτόλη σε φρουκτόζη και παράγει NADH, το οποίο επάγει τις ελεύθερες ρίζες μέσω της οξειδάσης του. Από την άλλη πλευρά, η μη ενζυμική γλυκοζυλίωση των πρωτεϊνών και των λιπιδίων θα μπορούσε να οδηγήσει σε ανωμαλίες στην εξωκυττάρια μήτρα και να οξειδώσει τις λιποπρωτεΐνες. Τέλος, η παχυσαρκία μπορεί να επηρεάσει το οξειδωτικό στρες και να το επιδεινώσει (Saeidnia & Abdollahi, 2013).

- Φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου

Η νόσος του Crohn και η ελκώδης κολίτιδα είναι γνωστές ως φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου, χωρίς καθορισμένη αιτιολογία. Φαίνεται ότι η δυσλειτουργία του εντέρου ίσως είναι αποτέλεσμα της ανοσορυθμιστικής δυσλειτουργίας και των υψηλών επιπέδων ελευθέρων ριζών. Ακόμα, υψηλά επίπεδα ελεύθερων ριζών έχουν αναγνωριστεί σε ασθενείς με φλεγμονώδη νοσήματα του εντέρου σε σχέση με υγιή άτομα. Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, η χαμηλή αντιοξειδωτική ικανότητα και τα αυξημένα επίπεδα ελεύθερων ριζών είναι χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών. Τέλος, υπάρχουν κι άλλοι πιθανοί αιτιολογικοί παράγοντες που παρεμβαίνουν στην έναρξη και την εξέλιξη των νοσημάτων αυτών όπως είναι το μικροβιακό περιεχόμενο του γαστρεντερικού σωλήνα, ο παράγοντας NF kB, το μονοξείδιο του αζώτου, η κυκλοξυγονάση και τα λευκοτριένια (Saeidnia & Abdollahi, 2013).

- Διαταραχές του ανασολογικού συστήματος και φλεγμονή:

Η ενεργοποίηση της φυσικής ανοσίας του ανθρώπινου οργανισμού απαιτεί σηματοδότηση μέσω ROS. Κοινά μοτίβα που συναντώνται σε παθογόνα ή και κυτταρικές βλάβες ενεργοποιούν υποδοχείς (TLR, NLR, RLR) που αυξάνουν τα ROS μέσω της NADPH οξειδάσης αλλά και μέσω της παραγωγής τους από τα μιτοχόνδρια. Τα ROS είναι απαραίτητα για την έκκριση προφλεγμονωδών κυτταροκινών που είναι απαραίτητες για μια σωστή ανοσολογική απόκριση. Μειωμένα επίπεδα ROS αναστέλλουν την σωστή ενεργοποίηση των ανοσολογικών μηχανισμών οδηγώντας σε ανοσοκαταστολή. Από την άλλη αυξημένα επίπεδα ROS συνεισφέρουν στην αυτοανοσία μέσω της αύξησης των προφλεγμονωδών κυτταροκινών (Srivastava and Kumar, 2015).

- Διαταραχές Κεντρικού Νευρικού Συστήματος, όπως η νόσος Parkinson και η νόσος Alzheimer:

Ο εγκέφαλος δεν είναι πλούσιος σε αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς άρα είναι πολύ ευαίσθητος στην οξειδωτική βλάβη και τα νευρικά κύτταρα είναι πιο επιρρεπή στο οξειδωτικό στρες σε σύγκριση με άλλους ιστούς (Saeidnia & Abdollahi, 2013). Φυσιολογικά, υπάρχει μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής διαφόρων ελεύθερων ριζών και αντιοξειδωτικών μηχανισμών, αν και κάποιες ρίζες παίζουν διάφορους βιολογικούς ρόλους και γι' αυτό το λόγο δεν πρέπει να απομακρύνονται. Όμως, πολλές ενεργές ρίζες είναι ικανές να βλάψουν ιστούς και να οδηγήσουν σε χρόνια νοσήματα Το γεγονός αυτό συνήθως συμβαίνει στα μετέπειτα χρόνια της ζωής του ανθρώπου επειδή τα μονοπάτια επιδιόρθωσης που εμπλέκονται ίσως αποτύχουν για τον ίδιο λόγο. (Saeidnia & Abdollahi, 2013).

- Το γήρας:

Οφείλεται στην κανονική αλλά μακροχρόνια έκθεση σε ROS και τη συσσώρευση οξειδωμένων και κατεστραμμένων μορίων στα κύτταρα. Μία μικρή συγκέντρωση ROS στα κύτταρα απαιτείται για να ενεργοποιηθούν τα απαραίτητα σηματοδοτικά μονοπάτια που θα οδηγήσουν σε διαφοροποίηση και αναγέννηση των βλαστικών κυττάρων. Μειωμένα επίπεδα ROS οδηγούν σε διαταραγμένη λειτουργία των παραπάνω λειτουργιών των βλαστοκυττάρων ενώ από την άλλη υψηλές συγκεντρώσεις ROS οδηγούν σε εξάντληση των βλαστικών κυττάρων (Simoncini et al., 2015).

- Παθήσεις των οστών (π.χ Οστεοπόρωση):

Η οστεοπόρωση είναι μια ασθένεια που εμφανίζεται συχνά στη τρίτη ηλικία και καταλήγει σε χαμηλή οστική πυκνότητα ακολουθούμενη από οστικά κατάγματα. Η φλεγμονή, οι ορμόνες, οι

αυξητικοί παράγοντες, η ομοκυστεΐνη, το οξειδωτικό στρες και η ευθραυστότητα των οστών είναι παράγοντες οι οποίοι φαίνεται επηρεάζουν την παθογέννεση της οστεοπόρωσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Saeidnia & Abdollahi, 2013). Οι ελεύθερες ρίζες οξυγόνου μπορούν να αποδιατάξουν και να τροποποιήσουν τα μόρια φιμπρονεκτίνης οδηγώντας σε βλάβη και απώλεια λειτουργίας των οστικών οζιδίων. Τέλος, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να αυξήσουν την έκκριση κυτταροκινών μέσω της οστεοπόρωσης (Saeidnia & Abdollahi, 2013).

- Αλκοολοκή ηπατοπάθεια:

Καταστροφή προκαλείται και στα κύτταρα του ήπατος, με αποτέλεσμα την εμφάνιση αλκοολικής ηπατοπάθειας λόγω τη παραγωγή ROS κατά την οξείδωση της αιθανόλης είτε λόγω της συσσώρευσης NADH κατά την επανοξείδωση του οποίου σε NAD+ υπάρχει ροή ηλεκτρονίων, είτε λόγω της δράσης του ενζύμου CYP2E1 του κυτοχρώματος P450 (Elisabetta et al., 2014).

- Μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος :

Μεγάλος αριθμός μελετών σε ανθρώπους, ύστερα από ταυτόχρονες μετρήσεις προ – οξειδωτικών και αντι – οξειδωτικών παραγόντων, καταλήγει στο συμπέρασμα ότι το οξειδωτικό στρες συμβάλλει σημαντικά στην ανάπτυξη και κυρίως στην εξέλιξη της NAFLD. Η διεθνής βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι σε ασθενείς με NASH, η έκφραση των αντιοξειδωτικών ενζύμων μειώνεται με την πρόοδο της νόσου (Perlemuter et al., 2003). Συνεπώς, η ολική αντιοξειδωτική ικανότητα (TAC) δεν επαρκεί για την εξουδετέρωση των ελευθέρων ριζών και των λοιπών προ - οξειδωτικών παραγόντων με αποτέλεσμα την εμφάνιση οξειδωτικού στρες (Sreekumar et al., 2005). Οι συνέπειες του οξειδωτικού στρες περιλαμβάνουν την ενεργοποίηση των ηπατικών αστεροειδών κυττάρων και την παραγωγή προφλεγμονωδών κυτταροκινών από τα κύτταρα του Kupffer, παράγοντες που συντελούν στην φλεγμονώδη διαδικασία και την ανάπτυξη ηπατικής ίνωσης (Rolo et al., 2012).

Πιο συγκεκριμένα, πρόσφατες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι στην μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα NASH και τη μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος NAFLD, η συσσώρευση ελεύθερων λιπαρών οξέων FFAs οδηγεί σε δύο φορές υψηλότερο μιτοχονδριακό οξειδωτικό μεταβολισμό οδηγώντας σε παραγωγή ROS (Day, 2002 ; Sunny et al., 2011).

Αντισταθμιστικά, τα FFAs επάγουν τον PPAR – α (Day, 2002), έναν μεταγραφικό παράγοντα των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της μιτοχονδριακής, υπεροξεισωμιακής και μικροσωμιακής οξείδωσης (Reddy JK., 2001) και του γονιδίου της UCP – 2 (uncoupling protein 2)

(Lee et al., 2003). Η πρωτεΐνη αυτή, που βρίσκεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, σε ασθενείς με NAFLD γίνεται διαπερατή, αυξάνει τη δραστηριότητα της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, περιορίζοντας την παραγωγή ROS (Tilg & Diehl, 2000), όμως ταυτόχρονα μειώνει την βαθμίδωση πρωτονίων στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη, αποδεσμεύοντας την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων από την παραγωγή ATP με αποτέλεσμα την εξάντληση του ATP. (Serviddio et al., 2008)

Όλα τα παραπάνω, σε συνδυασμό με τη δράση του TNFa και των προϊόντων λιποειδικής υπεροξείδωσης φαίνεται να οδηγούν στην καταστροφή του μιτοχονδριακού DNA και στην εξάντληση του κυτοχρώματος C (Pessayre et al., 2001) με αποτέλεσμα τη μιτοχονδριακή δυσλειτουργία και την παραγωγή ROS (Pessayre, 2007). Ποικίλες μελέτες συμφωνούν ως προς τη σημασία της ηπατικής μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της NAFLD και μάλιστα επισημαίνουν ότι η μιτοχονδριακή βλάβη οδηγεί σε δευτερογενή αναστολή της β – οξείδωσης των λιπιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση της στεάτωσης και τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου (Haque & Sanyal, 2002).

Επιπρόσθετα, η δραστικότητα του CYP450 είναι συνεχώς αυξημένη σε ασθενείς με NASH προκαλόντας μέγιστη ηπατοκυτταρική βλάβη (Chalasani et al., 2003). Συγκεκριμένα, στη NAFLD έχει μελετηθεί η δραστικότητα των κυτοχρωμάτων CYP4502E1 και CYP4504A, τα οποία ενσωματώνουν ένα μόριο οξυγόνου στα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου προκειμένου να αποφευχθούν τα τοξικά φαινόμενα της συσσώρευσης λιπαρών οξέων στο ήπαρ, οδηγώντας όμως ταυτόχρονα στην παραγωγή ROS. Ταυτόχρονα, το CYP4502E1 αυξάνει τη δραστικότητα της NADPH οξειδάσης, οδηγώντας στην αυξημένη παραγωγή ROS, όπως είναι το O2- (Malaguarnera et al., 2009).

1.1.8 Προσδιορισμός Οξειδωτικού Στρες

Το οξειδωτικό στρες είναι μια κατάσταση η οποία δεν μπορεί να προσδιορισθεί άμεσα στον ανθρώπινο οργανισμό, καθώς οι ελεύθερες ρίζες είναι εξαιρετικά ασταθή μόρια, γεγονός που καθιστά δύσκολη τη μέτρηση τους . Για τον λόγο αυτό, υπάρχουν κάποιες ουσίες στα ούρα, στο πλάσμα και στα κύτταρα οι οποίες βοηθούν στην εκτίμηση του οξειδωτικού στρες στον ανθρώπινο οργανισμό. Το DNA, τα λιπίδια (και τα φωσφολιπίδια), οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες είναι παραδείγματα μορίων που μπορούν να τροποποιηθούν από υπερβολικές

ποσότητες ελεύθερων ριζών in vivo (Ho et al, 2013) και έτσι, αναφέρονται ως οι πιο σημαντικοί βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες.

Τα προϊόντα οξείδωσης των **λιποειδών**:

Τα ισοπροστάνια και η μηλονική διαλδεΰδη (MDA) αποτελούν τους δύο σημαντικότερους βιοδείκτες οξείδωσης λιποειδών . Άλλα προϊόντα οξείδωσης που έχουν ερευνηθεί ως βιοδείκτες είναι λιπιδικά υδροϋπεροξείδια όπως η 4-υδροξυνονελαϊνη (4-HNE), τα φθορίζοντα προϊόντα λιπιδικής οξείδωσης και οι οξυστερόλες

Η μηλονυλοδιαλδεΰδη είναι μια οργανική ουσία που προκύπτει από την υπεροξείδωση των λιπιδίων και πιο συγκεκριμένα, από την δράση των ελεύθερων ριζών οξυγόνου πάνω στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η μηλονυλοδιαλδεΰδη είναι τοξική ουσία για τα κύτταρα επειδή σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με διάφορες κυτταρικές πρωτεΐνες ενώ έχει επίδραση και στο DNA του κυττάρου προκαλώντας μεταλλάξεις. Η μέτρηση της μηλονυλοδιαλδεΰδης αποτελεί ένα μέτρο της επίδρασης των δραστικών ριζών οξυγόνου πάνω στα λιπίδια και έτσι μια εκτίμηση του οξειδωτικού στρες του οργανισμού. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε απώλεια της ρευστότητας και της ελαστικότητα της, σε μειωμένη κυτταρική λειτουργία και μπορεί να φτάσει ακόμη και στην κυτταρική ρήξη και το θάνατο του κυττάρου. Η υπεροξείδωση των λιπιδίων μπορεί να συμβάλλει στην παθολογία πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένης της αθηροσκλήρωσης, του διαβήτη και της νόσου Alzheimer (Ho et al, 2013 , Montezano et al, 2015). Μετράται στο πλάσμα με την μέθοδο TBARS, ως ουσίες δηλαδή που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (Thiobarbituric Acid Reactive Substances, TBARS), δημιουργώντας μια έγχρωμη ένωση που απορροφά ακτινοβολία στα 535 nm. Η μέτρηση των TBARS χρησιμοποιείται ευρέως ως μια σχετικά απλή και ακριβής μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης των υπεροξειδίων των λιπιδίων σε διάφορα βιολογικά υγρά, συμπεριλαμβανομένων του ορού, του πλάσματος, των ούρων κλπ. Όμως, αν και είναι κατάλληλο για ανάλυση διακίνησης, τα παράγωγα από την αντίδραση του θειοβαρβιτουρικού (TBARS) στερούνται ειδικότητα για τη μηλονυλοδιαλδεΰδη (Ho et al, 2013 , Wang et al, 2015). Αρκετά κιτ ELISA είναι εμπορικά διαθέσιμα για τον εντοπισμό μηλονυλοδιαλδεΰδης. Αυτές οι δοκιμές που βασίζονται σε αντισώματα είναι σταθμισμένες όσον αφορά τη μέτρηση μηλονικής διαλδεΰδης σε σύγκριση με την υγρή χρωματογραφία, και δείχνουν καλή απόδοση με βελτιωμένη εξειδίκευση (Ho et al, 2013).

Τα ισοπροστάνια είναι μια οικογένεια σταθερών συστατικών που μοιάζουν με τις προσταγλαδίνες και παράγονται από το αραχιδονικό οξύ, ένα πολυακόρεστο λιπαρό οξύ που βρίσκεται στα φωσφολιπίδια των μεμβρανών (Ho et al, 2013 , Montezano et al, 2015). Μπορούν να εντοπισθούν στα ούρα, το πλάσμα, το εγκεφαλωνοτιαίο υγρό και τον εμπνεόμενο αέρα. Γενικά προτιμάται ο προσδιορισμός στους στα ούρα καθώς είναι πιο σταθερά μόρια εκεί και η συλλογή τους είναι μη επεμβατική. Τα ισοπροστάνια μπορούν να μετρηθούν με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας, υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μάζας, ενζυμικές ανοσοαπορροφητικές δοκιμές (ELISA) και ακτινοανοσοδοκιμή. Οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας, θεωρούνται gold standard μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση των ισοπροστανίων (Ho et al, 2013).

Τα προϊόντα οξείδωσης των **πρωτεϊνών**:

Ο δείκτης οξείδωσης που χρησιμοποιείται γενικά για την ανίχνευση των προϊόντων οξείδωσης των πρωτεϊνών, είναι τα καρβονύλια των πρωτεϊνών. Επίπεδα γλουταθειονίνης (GSSG) στο αίμα, μπορούν να ανιχνευθούν ως δείκτης για το οξειδωτικό στρες. Η γλουταθειονίνη (GSH), οξειδώνεται σε δισουλφίδιο της γλουταθειονίνης (GSSH) παρουσία ελεύθερων ριζών ή H_2O_2. Με μια τροποποίηση της μεθόδου, η κατανάλωση NADPH, χρησιμοποιείται για να προσδιορίσει το οξειδωμένο περιεχόμενο συγκεκριμένων ιστών μετά τη προσθήκη της αναγωγάσης γλουταθειονίνης NADPH. Από την άλλη πλευρά, τα οξειδωμένα αμινοξέα που προέρχονται από οξειδωμένες πρωτεΐνες , μπορεί να εμφανίζονται στον ορό και τα επίπεδα τους να σχετίζονται με τα επίπεδα στον ιστό. Οι δείκτες αυτοί μετρώνται χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η ανάλυση Western Blot, αλλά πιο αποδοτικές τεχνικές είναι αυτές της φασματομετρίας μάζας ή πιθανόν ELISA με μονοκλωνικά, κατά της γλουταθειόνης αντισώματα (Ho et al, 2013).

Τα προϊόντα οξείδωσης του **DNA**:

Οξειδωμένο DNA: Μέσω απομόνωσης του DNA από ανθρώπινα κύτταρα και ιστούς μπορούμε να προσδιορίσουμε βασικά προϊόντα καταστροφής του DNA. Στη διαδικασία όμως αυτή μπορεί να μην έχουμε ακριβές αποτελέσματα διότι στο DNA ενδέχεται να έχουν ήδη διορθωθεί οι βλάβες μέσω ενζύμων που έχουν την ικανότητα να το επιδιορθώνουν.

Η 8- υδροξυγουανοσίνη (8-OHG) και η 8- υδροξυδεοξυγουανοσίνη (8-OHdG): αποτελούν πολύ συχνούς δείκτες προσδιορισμού του DNA. Ο προσδιορισμός της 8-υδροξυδιγουανίνης γίνεται με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης HPLC συνδεόμενη με ηλεκτροχημική ανίχνευση ECD, είτε με ανοσοτεχνικές (EIA) (Giammarioli et al., 1999) .

Αντιοξειδωτικά ένζυμα και Αντιοξειδωτικές ουσίες:

Μπορούμε να προσδιορίσουμε το οξειδωτικό στρες στον οργανισμό μέσω προσδιορισμού διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων και άλλων αντιοξειδωτικών ουσιών, που ουσιαστικά εκφράζουν την ανάγκη του οργανισμού να αντισταθεί στην οξειδωτική αυτή κατάσταση. Υπάρχει η δυνατότητα να μετρήσουμε τη δραστικότητα ενζύμων όπως η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD),η υπεροξειδάση της γλουταθειονίνης (GPx), της αναγωγάσης της γλουταθειόνης (GR) και της καταλάσης (CAT) (Wang et al, 2015). Από τεχνική άποψη, η δραστικότητα της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης και της υπεροξειδικής δισμουτάσης παραμένουν σταθερές ακόμα και όταν τα ερυθροκύτταρα των δειγμάτων έχουν αιμολυθεί και αποθηκευτεί παγωμένα. Η εμπορική διαθεσιμότητα κιτ για για τη μέτρηση της δραστικότητας των αντιοξειδωτικών ενζύμων, επιτρέπουν σε αυτούς τους πιθανούς βιοδείκτες να αξιολογηθούν σε παρακολούθηση μεγάλων πληθυσμών (Ho et al, 2013).

Ορισμένες από τις αντιοξειδωτικές ουσίες που μπορούν να προσδιορισθούν είναι:

- το ουρικό οξύ
- η βιταμίνη Ε
- η βιταμίνη Α (καροτενοειδή)
- η γλουταθειόνη
- η άμεση χολερυθρίνη
- η βιταμίνη C
- τα φλαβονοειδή
- η ουβικινόνη- 10.

1.1.9 Η Μεσογειακή Δίαιτα ως αντιοξειδωτικό διατητικό πρότυπο

Μία Μεσογειακού τύπου δίαιτα δεν αφορά μια συγκεκριμένη δίαιτα, αλλά σε μία συλλογή διατροφικών συνηθειών που παραδοσιακά ακολουθούσαν οι άνθρωποι των χωρών που συνόρευαν με την Μεσόγειο θάλασσα. Αυτό το διατητικό πρότυπο χαρακτηρίζεται από υψηλή κατανάλωση φυτικών προϊόντων (δημητριακά, φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ξηρούς καρπούς, ελιές), με το ελαιόλαδο να αποτελεί την κύρια πηγή προσλαμβανόμενου λίπους, μαζί με την μέτρια προς υψηλή κατανάλωση ψαριών, μέτρια κατανάλωση αυγών, πουλερικών και γαλακτοκομικών προϊόντων (τυρί και γιαούρτι), χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος και μέτρια πρόσληψη κόκκινου κρασιού κατά τη διάρκεια των γευμάτων. Η αντίστοιχη αναλογία μακροθρεπτικών συστατικών στο καθημερινό διαιτολόγιο είναι 50 – 55% υδατάνθρακες, 15 –

20% πρωτεϊνες και 30 – 35% λιπίδια, εκ των οποίων κορεσμένα < 10%. (Bach – Faig A. et al., 2011).

Η Μεσογειακή δίαιτα , βιβλιογραφικά, αναφέρεται ως ένα διατροφικό πρότυπο με ποικίλες ευεργετικές επιδράσεις για την υγεία. Η προοπτική μελέτη των Trichopoulou και συνεργατών (2003) σε ένα πληθυσμό 22.043 ενηλίκων Ελλήνων έδειξε ότι η συμμόρφωση στην παραδοσιακή Μεσογειακή δίαιτα μειώνει την ολική θνησιμότητα. Επίσης, η μελέτη των Επτά Χωρών είναι η πρώτη μελέτη που αναγνώρισε την ύπαρξη χαμηλότερου κινδύνου εμφάνισης CVD στους πληθυσμούς της Μεσογείου (Keys et al., 1986). Από τότε μέχρι σήμερα, έχει ακολουθήσει μια πληθώρα μελετών που έχουν αποδείξει ότι η συμμόρφωση στο Μεσογειακό διατητικό πρότυπο συσχετίζεται με μείωση του κινδύνου ανάπτυξης ορισμένων νευροεκφυλιστικών παθήσεων και νεοπλασιών, καρδιαγγειακών παθήσεσων και επιτώσεων αυτών, σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και μείωση του κινδύνου γενικής θνησιμότητας (Dinu et al., 2017). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι η Μεσογειακή Δίαιτα, ένα εξαιρετικό παράδειγμα μιας βιώσιμης διατροφής στην οποία η διατροφή, η τοπική παραγωγή τροφίμων, η ασφάλεια των τροφίμων, ο πολιτισμός, η βιοποικιλότητα και η βιωσιμότητα συνδέονται έντονα, με αποτέλεσμα την αύξηση της μακροζωίας (Trichopoulou and Benetou, 2019). Πιθανοί υποκείμενοι μηχανισμοί, σύμφωνα με τα σημερινά βιβλιογραφικά δεδομένα, θεωρούνται: η βελτίωση των δεικτών του μεταβολισμού των λιπιδίων, της IR και της ενδοθηλιακής λειτουργίας καθώς και η μείωση των προφλεγμονωδών παραγόντων και των δεικτών του οξειδωτικού στρες. Η Μεσογιακού τύπου δίαιτα παρουσιάζει αντιθρομβωτική και αντιοξειδωτική δράση καθώς και ευεργετική επίδραση στην εντερική μικροχλωρίδα (Schwingshackl and Hoffmann, 2014). Εκτός από τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης του διατητικού προτύπου της Μεσογειακής Δίαιτας, έχει επίσης διερευνηθεί και η ανεξάρτητη επίδραση των βασικών ομάδων τροφίμων ή μεμονομένων τροφίμων της Μεσογειακής διατροφής, καθώς και διαφόρων βιοδραστικών συστατικών αυτών στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες.

Ένα από τα χαρακτηριστικά του Μεσογειακού τύπου δίαιτας είναι η χρήση ελαιολάδου. Το ελαιόλαδο θεωρείται ένα λειτουργικό τρόφιμο, το οποίο εκτός του ότι αποτελεί την κύρια πηγή λίπους σε αυτού του τύπου διατροφή λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα MUFA, και κυρίως του ελαϊκού οξέος, περιέχει πολλά άλλα συστατικά με σημαντικές βιολογικές ιδιότητες (Gavahian et al., 2019). Αυτά είναι: α)οι πολυφαινολικές ενώσεις (κυρίως ελαιοευρωπαΐνη και υδροξυτυροσόλη), β) η χλωροφύλλη και παράγωγα, γ) οι υδρογονάνθρακες (σκουαλίνη), δ) τα καροτενοειδή και ε) οι τοκοφερόλες. Η περιεκτικότητα του

ελαιολάδου στα παραπάνω συστατικά εξαρτάται από την ποικιλία της ελιάς και τις συνθήκες παραγωγής του ελαιολάδου και είναι υπεύθυνη για τις αντιοξειδωτικές του ικανότητες (Xiang et al., 2017). Χαρακτηριστικά, η μελέτη των Nakbi και συνεργατών (2010) έδειξε ότι το παρθένο ελαιόλαδο αυξάνει τη δραστικότητα των αντιοξειδωτικών ενζυμικών μηχανισμών άμυνας και μειώνει τα επίπεδα MDA στα ερυθροκύτταρα ποντικιών, προστατεύοντας με αυτό τον τρόπο την καταστροφή της μεμβράνης τους λόγω λιποειδικής υπεροξείδωση. Η υψηλή συγκέντρωση MUFA στο ελαιόλαδο έχει επιδείξει σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές δράσεις (Loffredo et al., 2016). Έχει φανεί ότι η αντικατάσταση των κορεσμένων λιπαρών οξέων SFA στη δίαιτα από μονοακόρεστα MUFA οδηγεί σε σημαντική μείωση των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) και διατήρηση των λιποπρωτεϊνών υψηλής πυκνότητας (HDL) σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά που συνεπάγεται η αντικατάσταση των SFA από PUFA ή από υδατάνθρακες. Συνεπεία αυτού, οι LDL που είναι πλούσιες σε ελαϊκό οξύ είναι λιγότερο ευαίσθητες στην οξείδωση απ' ότι οι LDL που είναι πλούσιες σε λινελαϊκό οξύ. Μία δίαιτα πλούσια σε MUFA μειώνει τα μεταγευματικά επίπεδα H_2O_2 και λιποειδικών υπεροξειδίων πλάσματος και αυξάνει τη μεταγευματική GSH καθώς και το λόγο GSH / GSSG σε σχέση με τις άλλες δίαιτες (Gavahian et al., 2019). Επίσης, το ελαιόλαδο, σε αντίθεση με άλλα φυτικά έλαια, περιέχει μεγάλη ποσότητα διαφόρων μικροθρεπτικών συστατικών (φαινολικά συστατικά όπως η υδροξυ-τυροσόλη και η ολευρωπαΐνη) με σημαντική βιολογική δράση (Vilahur and Badimon 2013). Έχει φανεί ότι όταν συγκρίθηκαν διαφορετικές πηγές ελαϊκού οξέος (ελαιόλαδο, σόγια, ηλιέλαιο, σησαμέλαιο, αραβοσιτέλαιο), μόνο στο εκχύλισμα πολικών λιποειδών του ελαιολάδου ανιχνεύθηκαν μόρια με αντι-αιμοπεταλιακή δράση έναντι της συσσώρευσης που επάγεται από PAF. Το εύρημα αυτό υποδεικνύει ότι στα μικροσυστατικά του οφείλεται η βιολογική δράση (Karantonis et al., 2002).

Μεγάλος αριθμός μελετών έχει επισημάνει το διατροφικό όφελος της κατανάλωσης ψαριών στα καρδιαγγειακά νοσήματα (Domingo JL., 2007). Επιπλέον, έχει τεκμηριωθεί ότι η αυξημένη κατανάλωση μακράς αλύσου ω – 3 PUFA από θαλάσσιες πηγές βελτιώνει τα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου και πιθανόν να μειώνει την καρδιαγγειακή θνησιμότητα (Woodside and Kromhout, 2005). Παράλληλα, έχει αποδειχθεί, ότι η ημερήσια πρόσληψη ω -3 PUFA (2,5g – 1,25g – 0g) από υπέρβαρους και υγιείς ενήλικες είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση κατά 15% των επιπέδων F2 –ισοπροστανίων πλάσματος (Kiecolt and Glaser, 2012). Επίσης, η λήψη των ω-3 PUFA, έχει συχετισθεί με μείωση των επιπέδων των λιποειδικών υπεροξειδίων και των τελικών προϊόντων γλυκοζυλίωσης AGEs και με αύξηση των επίπεδων της SOD2 στο ήπαρ σε σχέση με

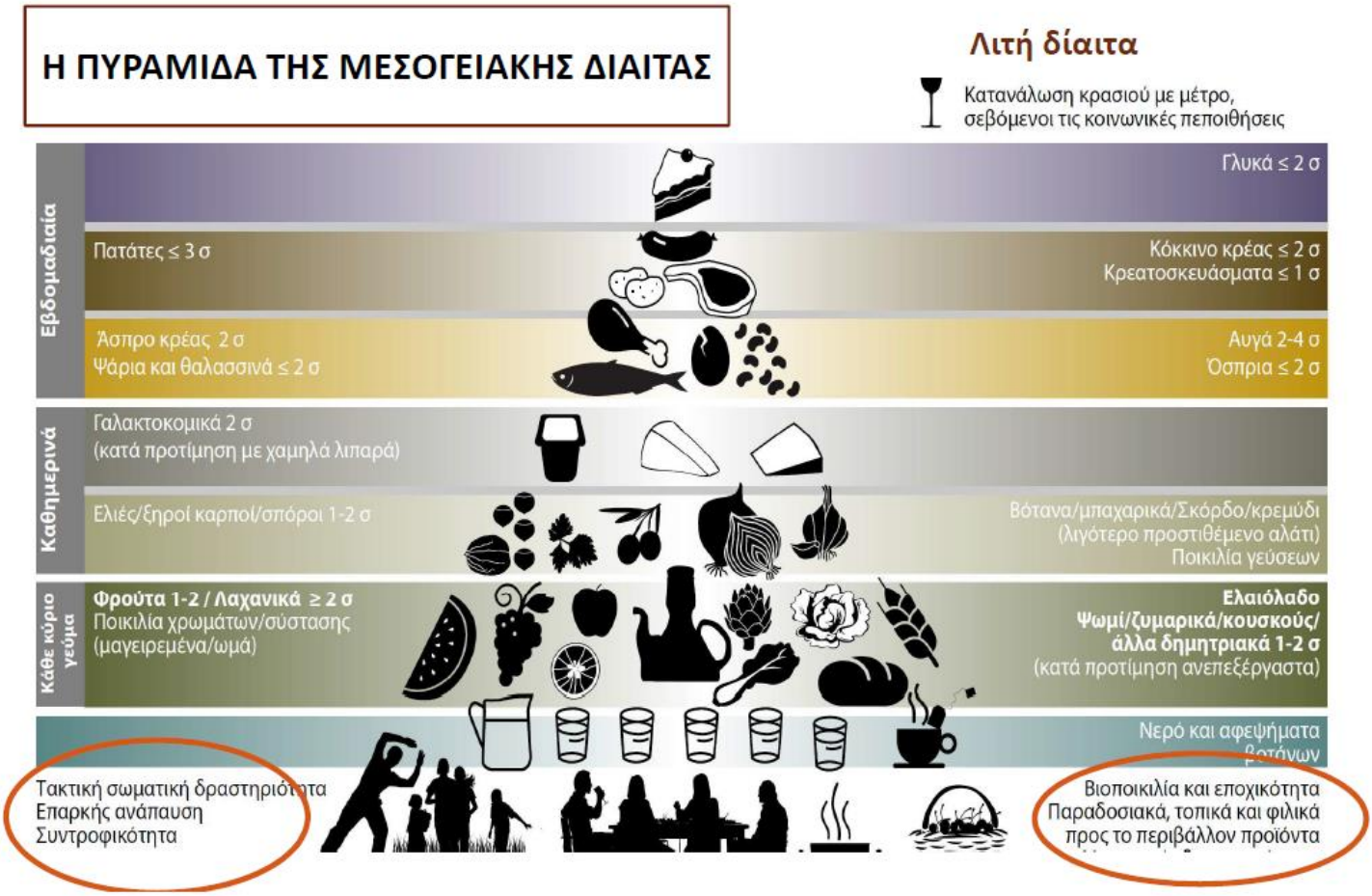
τη μη λήψη ω – 3 PUFA (de Assis et al., 2012). Όμοια σημαντική ποσότητα σε πολυακόρεστα και μονοακόρεστα λιπαρά οξέας καθώς και σε άλλες ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση, όπως φαινολικές ενώσεις, τοκοφερόλες και σκουαλίνη, εμπεριέχονται στους ξήρους καρπούς. Έχει αποδειχθεί ότι η υιοθέτηση μιας ΜΔ πλούσιας είτε σε ελαιόλαδο είτε σε ξηρούς καρπούς οδηγεί σε μείωση της τιμής της οξειδωμένης LDL και των επιπέδων MDA των μονοκυττάρων, ενώ παράλληλα μεταβάλλει τη δραστικότητα της GPx, σε σχέση με μία δίαιτα χαμηλή σε λιπίδια (Fito et al., 2017). Ωστόσο, απαιτούνται περισσότερες μελέτες προκειμένου να τεκμηριωθεί η πιθανή αντιοξειδωτική δράση των ξηρών καρπών.

Από την άλλη μεριά, η ρεσβερατρόλη είναι μια πολυφαινολική ένωση που βρίσκεται στα σταφύλια και στο κόκκινο κρασί και φαίνεται να παρουσιάζει αντιφλεγμονώδεις, αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές και αντιγηραντικές δράσεις, καθώς και ευεργετικές ιδιότητες σε πολλά μεταβολικά νοσήματα (Sadruddin and Arora, 2009). Θεωρείται ισχυρός αγωνιστής της πρωτεΐνης σιρτουίνης – 1 (SIRT1), που ρυθμίζει, μέσω αποακετυλίωσης, πρωτεΐνες του μεταβολισμού και εμφανίζει, επίσης, αντιοξειδωτική δράση (Colak et al., 2011). Συγκεκριμένα σε μία μελέτη, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού (400ml / ημέρα για 2 εβδομάδες), κατέληξε σε μείωση των επιπέδων MDA πλάσματος (Micallef et al., 2007). Σε μια άλλη μελέτη, η κατανάλωση κόκκινου κρασιού αύξησε τα επίπεδα βιταμίνης C, β καροτίνης, ουρικού οξέος, πολυφαινολών και ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του πλάσματος και μείωσε τα επίπεδα 8 – OhdG και νιτροτυροσίνης πλάσματος (Urquiaga, 2010). Η αντιοξειδωτική δράση της ρεσβερατρόλης επιβεβαιώνεται και από μελέτες σε πειραματόζωα. Συγκεκριμένα, μετά από εφαρμογή ενός πρωτοκόλλου ισχαιμίας και επαναιμάτωσης σε ποντίκια που είχαν χωριστεί στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα που λάμβανε ρεσβερατρόλη (20mg/kg), φάνηκε ότι η ρεσβερατρόλη προστατεύει το σκελετικό μυ από την ισχαιμία και την βλάβη λόγω επαναιμάτωσης μέσω μείωσης των επίπεδων του MDA και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο μυ (Ikizler et al., 2006). Επιπλέον, η λήψη διαφορετικών ποσοτήτων ρεσβερατόλης σε ποντίκια) έδειξε μια δοσοεξαρτώμενη μείωση των επιπέδων TBARS και αύξηση του λόγου GSH / GSSG του ήπατος (Gomez et al., 2012) Τέλος, έχει φανεί ότι η ρεσβερατρόλη του κρασιού και η τυροσόλη του ελαιολάδου εμφανίζουν συνεργική δράση όσον αφορά τη μείωση του οξειδωτικού στρες (Vivancos and Moreno, 2008). Τέλος, η μέτρια κατανάλωση κρασιού φάνηκε να μειώνει μεταγευματικά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από PAF σε σχέση με τις ομάδες που κατανάλωναν παράλληλα με το γεύμα αιθανολικό διάλυμα ή νερό (Fragopoulou et al., 2017).

Σημαντικό κομμάτι της Μεσογειακής δίαιτας, αποτελεί και η κατανάλωση οσπρίων. Τα όσπρια, πέραν της υψηλής τους διατροφικής αξίας λόγω των φυτικών ινών, περιέχουν σημαντική ποσότητα πολυφαινολικών ενώσεων, όπως φλαβονοειδή και φαινολικά οξέα. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τα βιβλιογραφικά δεδομένα που υποστηρίζουν ότι τα όσπρια προστατεύουν από τα καρδιαγγειακά νοσήματα και το μεταβολικό σύνδρομο, οδήγησε στη διερεύνηση του πιθανού αντιοξειδωτικού τους ρόλου (Sanchez, 2012). Πιο χαρακτηριστικά, ως αποτέλεσμα μιας μελέτης, παχύσαρκοι ενήλικες που έλαβαν δίαιτα πλούσια σε όσπρια, εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη απώλεια σωματικού σε σχέση με την ομάδα ελέγχου, η οποία συνοδεύτηκε από μείωση των τιμών οξειδωμένης LDL και MDA πλάσματος και από απώλεια ισοπροστανίων από τα ούρα (Crujeiras et al., 2007) Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαιώθηκε και από μια ακόμη μελέτη, η οποία μελέτησε την επίδραση της αυξημένης πρόσληψης οσπρίων στο οξειδωτικό στρες στα πλαίσια μιας υποθερμιδικής δίαιτας χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη (Abete et al., 2008) .

Τα φρούτα και τα λαχανικά είναι βασικό χαρακτηριστικό αυτού του προτύπου διατροφής, καθώς η κατανάλωση τους πραγματοποιείται σε καθημερινή βάση. Τα τρόφιμα αυτά είναι κύριες πηγές διατροφικών αντιοξειδωτικών ουσιών, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε φαινολικές ενώσεις, καροτενοειδή και άλλες αντιοξειδωτικές βιταμίνες (Βιταμίνη C και βιταμίνη E) (Catania et al., 2009). Η αυξημένη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών, στο πλαίσιο του Μεσογειακού διαιτητικού προτύπου, έχει συσχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης νοσημάτων που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Vernaglione L., 2009). Σε μια πρόσφατη μετανάλυση, φάνηκε ότι υπάρχουν ισχυρά αποδεικτικά στοιχεία, ότι η υψηλή κατανάλωση λαχανικών και φρούτων συνδέεται με μειωμένα επίπεδα λιπώδους ιστού, και κατά συνέπεια με χαμηλότερο κίνδυνο υπέρτασης, και σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2. Όμοια αποτελέσματα βρέθηκαν και για τον καρδιαγγειακό κίνδυνο. Έγινε αναφορά, στο γεγονός ότι οι άνθρωποι πρέπει να λαμβάνουν βιοενεργά μικροθρεπτικά συστατικά από μια μεγάλη ποικιλία ολόκληρων τροφών και όχι από συμπληρώματα διατροφής ή από τρόφιμα εμπλουτισμένα σε ίνες δημητριακών ή λαχανικών. Οι προστατευτικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί φαίνεται να περιλαμβάνουν βιοδραστικά θρεπτικά συστατικά, όπως φυτικές ίνες και κάλιο, βιταμίνη E, βιταμίνη C και β-καροτίνη αλλά και λειτουργικές πτυχές της πρόσληψης φρούτων και λαχανικών, όπως το χαμηλό γλυκαιμικό φορτίο και η ενεργειακή πυκνότητα (Alissa et al., 2015). Σε μελέτες με ηλικιωμένο πληθυσμό φάνηκε ότι η αυξημένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών πλούσιων σε φαινολικές ενώσεις αυξάνει την ολική αντιοξειδωτική περιεκτικότητα (TAC) του πλάσματος (Pedret et al., 2012). Επιπλέον, τα επίπεδα βιταμίνης C φαίνεται να συσχετίζονται

αντίστροφα με τα επίπεδα των F2 – ισοπροστανίων πλάσματος σε υγιή πληθυσμό (Sanchez et al., 2004; Hermsdorff et al., 2012). Παράλληλα, μια δίαιτα πλούσια σε φρούτα και λαχανικά παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την μείωση των επιπέδων της οξειδωμένης LDL και την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής περιεκτικότητας (TAC) πλάσματος (Crujeiras et al., 2006). Τέλος, σε μια επιλέον μελέτη φαίνεται ότι η αυξημένη πρόσληψη φρούτων και λαχανικών αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα αντιοξειδωτικών βιταμινών στο πλάσμα και μειώνει τους δείκτες του οξειδωτικού στρες. Παρόλο αυτά, υπάρχουν μελέτες οι οποίες δεν συμφωνούν με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα (Baldrick et al., 2012 ; Rytter et al., 2010 ; Martinez et al., 2012), και για αυτό τον λόγο, υπάρχει ανάγκη για περεταίρω έρευνες.



Εικ.2. *Η πυραμίδα της Μεσογειακής Δίαιτας (Public Health Nutrition 2011; 14(12A), 2274–2284)*

1.2 Μη αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος

1.2.1 Ορισμός και Φυσική εξέλιξη της νόσου

Τα τελευταία χρόνια, ο επιπολασμός των νοσημάτων είναι σε μία συνεχή αύξηση με τα αποτελέματα αυτών να απειλούν ολοένα και περισσότερο τη δημόσια υγεία . Για τον λόγο αυτό ο χώρος της επιστήμης τα τελευταία χρόνια, έχει στραφεί τόσο στην πρόληψη όσο και στην αντιμετώπιση των νοσημάτων αυτών. Μεταξύ των συχνότερων νοσημάτων των τελευταίων ετών, η μη αλκοολική λιπώδης νόσος του ήπατος (Non Alcoholic Fatty Liver Disease, NAFLD) αποτελεί τη συχνότερη αιτία ηπατικής διαταραχής στις δυτικές κοινωνίες, ακολουθώντας τον ολοένα αυξανόμενο επιπολασμό της παχυσαρκίας (Fazel et al, 2016). Η νόσο αυτή είναι συχνά αναφερόμενη και ως «η ηπατική εκδήλωση του μεταβολικού συνδρόμου» (Marchesini et al., 2001)

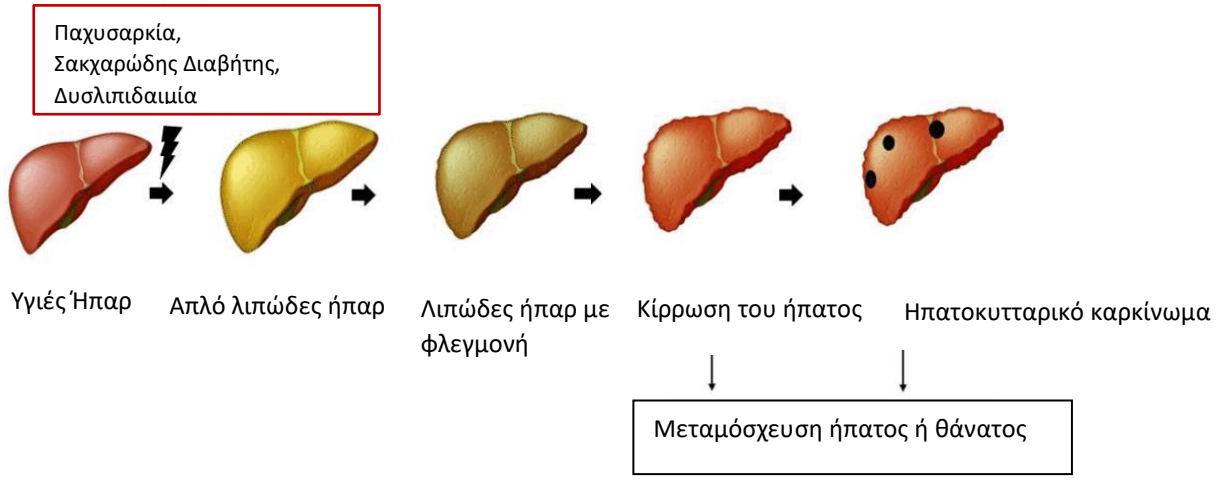
Με βάση τις τελευταίες κατευθυντήριες οδηγιές για τη διαχείριση της NAFLD που εκδόθηκαν από την Ευρωπαϊκή Εταιρεία Μελέτης του Ήπατος (European Association for the Study of the Liver, EASL) το 2016, ο ορισμός της νόσου αναφέρεται ως εξής:

«Η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ (στεάτωση), που σχετίζεται με την παρουσία ινσουλινοαντίστασης, σε ποσοστό >5% των ηπατοκυττάρων, έτσι όπως διαγιγνώσκεται ιστολογικά, ή σε ποσοστό >5,6%, όπως διαγιγνώσκεται μέσω μαγνητικής φασματοσκοπίας συντονισμού πρωτονίων (1H-MRS) ή ποσοτικά μέσω μαγνητικής τομογραφίας» (EASL, 2016).

Τόσο η Ευρωπαϊκή Εταιρία Μελέτης του Ήπατος, όσο και η η αντίστοιχη Αμερικανική εταιρεία μελέτης του ήπατος (American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD), υποστηρίζουν πως για τη διαφορική διάγνωση μεταξύ της NAFLD και της αλκοολικής αιτιολογίας στεάτωση, θα πρέπει να μην καταναλώνονται >20 g αιθανόλης από τις γυναίκες (ισοδύναμο με 2 μερίδες αλκοολούχου ποτού) και >30 g από τους άνδρες (ισοδύναμο με 3 μερίδες αλκοολούχου ποτού) ανά ημέρα. Αυτά τα ορία, ορίζουν τη διαφορική διάγνωση μεταξύ μη αλκοολικής και αλκοολικής αιτιολογίας ηπατικής στεάτωσης ή στεατοηπατίτιδας (Dowman et al., 2010). Ο ορισμός της λιπώδους διήθησης του ήπατος δαικρίνεται σε δύο κατηγορίες βάσει της αιτιολογίας της, τη πρωτοπαθή και δευτεροπαθή. Στην πρώτη, η συσσώρευση λίπους στο ήπαρ ή όπως καλείται το λιπώδες ήπαρ, φαίνεται να σχετίζεται με τις συνιστώσες του μεταβολικού συνδρόμου, δηλαδή την κοιλιακή παχυσαρκία, τη διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, την

αρτηριακή πίεση και τη δυσλιπιδαιμία. Από την άλλη πλευρά, η δευτεροπαθής, ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα άλλων παραγόντων, όπως η ολική παρεντερική διατροφή, η ασιτία και η χρήση φαρμακευτικής αγωγής, όπως για παράδειγμα τα κορτικοστεροειδή (Kneeman et al., 2012).

Όσο αναφορά της εξέλιξη της νόσου, φαίνεται να κυμαίνεται σε ένα μεγάλο φάσμα που εκτείνεται από την απλή στεάτωση και τη μη αλκοολική στεατοηπατίτιδα (non alcoholic steatohepatitis, NASH) με προοδευτική ίνωση ως τηνκίρρωση ήπατος με ενδεχόμενη την εμφάνιση ηπατοκυτταρικού καρκίνου (ΗΚΚ) (Buzzetti et al., 2016). Ιστολογικά, ως NASH ορίζεται η παρουσία ηπατικής στεάτωσης μαζί με φλεγμονή και ηπατοκυτταρικό τραύμα (ballooning) με ή χωρίς ίνωση (Chalasani et al., 2012). Οι ασθενείς με απλή στεάτωση εμφανίζουν χαμηλό ρυθμό εξέλιξης της νόσου, με πρόσφατη μετα-ανάλυση 11 προοπτικών μελετών να καταλήγει σε μέση εξέλιξη ενός σταδίου στα 14 χρόνια για τους ασθενείς με ηπατική στεάτωση και στα 7 χρόνια για τους ασθενείς με NASH (Singh et al., 2015). Ωστόσο, ο ρυθμός εξέλιξης είναι διπλάσιος στους ασθενείς με NASH, ενώ μπορεί να υπάρξουν άτομα, στα οποία η νόσος θα εξελιχθεί ταχύτατα, από την απουσία ίνωσης σε προχωρημένη ίνωση, περίπου σε διάστημα έξι χρόνων (McPherson et al., 2015). Επιπλέον, οι ασθενείς με NAFLD φαίνεται να έχουν αυξημένο κίνδυνο για ΗΚΚ (Yasui et al., 2011). Και πιο συγκεκριμένα, από τους ασθενείς με κίρρωση, το 30% - 40% αναπτύσσουν ηπατική ανεπάρκεια και τελικά θα καταλήγουν μέσα στα επόμενα 10 χρόνια (Levene and Goldin, 2012). Επί του παρόντος, επίσημος θεραπευτικός αλγόριθμος δεν υπάρχει και η αντιμετώπιση της νόσου βασίζεται στη θεραπεία των σχετιζόμενων με τη νόσο κλινικών καταστάσεων, μέσω της αλλαγής του τρόπου ζωής και της απώλειας βάρους.



Εικ.3. *Φυσική Εξέλιξη της NAFLD (Rinde et al.,2018)*

1.2.2 Επιδημιολογία Νόσου

Τα δεδομένα σχετικά με τον επιπολασμό και την επίπτωση της νόσου είναι δύσκολο να εκτιμηθούν, καθώς στις υπάρχουσες μελέτες έχουν χρησιμοποιηθεί διαφορετικά διαγνωστικά εργαλεία, με διαφορετική διαγνωστική αξία το καθένα, και επιπλέον αρκετοί ασθενείς παραμένουν ασυμπτωματικοί . Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατης μετα-ανάλυσης ο συνολικός επιπολασμός για την NAFLD σε παγκόσμιο επίπεδο, που διαγνώστηκε με απεικονιστικές μεθόδους είναι περίπου 25% (Younossi ZM, 2016). Τα υψηλότερα επίπεδα επιπολασμού για την NAFLD καταγράφονται στη Μέση Ανατολή (32% και στη Νότια Αμερική (30,5%), ενώ τα χαμηλότερα επίπεδα στην Αφρική (13,5%) (Younossi ZM, 2016). Ο επιπολασμός της NASH μεταξύ των ασθενών με NAFLD που είχαν βιοψία ήπατος με κλινική ένδειξη εκτιμάται ότι είναι 59%, ενώ σε ασθενείς χωρίς κάποια συγκεκριμένη κλινική ένδειξη υπολογίζεται από 6,7% έως 29,9%. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα ο επιπολασμός για την NASH στο γενικό πληθυσμό εκτιμάται μεταξύ 1,5% και 6,5% (Younossi ZM, 2016). Είναι επίσης αξιοσημείωτο το γεγονός, πως τα ποσοστά αυξάνονται, παράλληλα με την αύξηση των ποσοστών της παχυσαρκίας και του ΣΔτ2, όπως φάνηκε και στην προαναφερθείσα μελέτη των Younossi και συν. (2012), στην οποία κατέδειξαν μια αύξηση του επιπολασμού της νόσου, από το 15% το 2005 στο 25% το 2010. Οι ίδιοι ερευνητές, έδειξαν ότι ποσοστό της τάξης του 51% των ασθενών με NAFLD και το 82% των ασθενών με NASH είναι παχύσαρκοι. Επιπλέον, όσον αφορά την παρουσία NAFLD σε ασθενείς με ΣΔτ2, το ποσοστό φαίνεται να φτάνει το 70% (Blachier et al., 2013). Η νόσος είναι, επίσης, παρούσα σε ένα ποσοστό περίπου 7% σε άτομα φυσιολογικού βάρους, κυρίως γυναίκες σε νεαρή ηλικία, με φυσιολογικά ηπατικά ένζυμα (EASL, 2016, Younossi et al., 2012).

1.2.3 Παράγοντες Κινδύνου

Μη τροποποιήσιμοι παράγοντες

- Ηλικία-Φύλο:

Όσον αφορά την ηλικία, η νόσος φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται η ηλικία καθώς το ποσοστό από το 20% σε νεαρά άτομα φαίνεται να ξεπερνάει το 40% στα άτομα άνω των 60 ετών (Brea and Puzo, 2013). Επιπλέον, η επίπτωση της NASH καθώς και της κίρρωσης αυξάνονται

στους ασθενείς άνω των 50 ετών συγκριτικά με τα πιο νεαρά άτομα (Sayiner et al., 2016). Περιστασιακά, κάποιες μελέτες δείχνουν ότι η η NAFLD πιθανόν να ξεκινά από την εβρυϊκή ζωή, καθώς έχουν παρατηρηθεί σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά στεάτωσης σε βρέφη από μητέρες με διαβήτη κύησης σε σχέση με βρέφη από υγιείς μητέρες (Benedict et al., 2017). Σχετικά με το φύλο, αρκετές μελέτες έχουν καταδείξει ότι η NAFLD και η NASH είναι περισσότερο συχνές στους άνδρες (Williams et al., 2011 ; Browning et al., 2004 ; Caballeria et al., 2010). Τα μεγαλύτερα ποσοστά μάλιστα, εμφανίζονται μέχρι τα 50-60 έτη, ακολουθούμενα από μια μείωση ύστερα από την ηλικία αυτή. Αντίθετα, όσον αφορά το γυναικείο φύλο, φάνηκε μια διάδωση της νόσου στις μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες, με αύξηση της επίπτωσης μετά την ηλικία των 50 ετών, πιθανόν λόγω διακοπής της προστατευτικής επίδραση των οιστρογόνων των και την πλειονότητα των μελετών να καταδεικνύουν σοβαρότερη ιστολογία της NASH σε σύγκριση με τους άνδρες (Lonardo et al., 2015).

- Εθνικότητα:

Ο επιπολασμός της νόσου φαίνεται να επηρεάζει άτομα όλων των εθνικοτήτων. Ωστόσο, σύμφωνα με τη μελέτη *Dallas Heart Study* στις ΗΠΑ (Browning et al., 2004) φαίνεται ότι οι Ισπανόφωνοι παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά ηπατικής στεάτωσης (45%) αν και νεότεροι, ακολουθούμενοι από τους Λευκούς (33%) και τους Αφρικανούς (24%). Επιπλέον οι Ισπανόφωνοι φαίνεται παρουσιάζουν μεγαλύτερη επίπτωση της NASH και της κίρρωσης (Kalia and Gaglio, 2016, Satapathy and Sanyal, 2015), αναδεικνύοντας το σημαντικό ρόλο του γενετικού υποβάθρου.

- Γενετικοί Παράγοντες:

Αρκετές μελέτες αναδεικνύουν μια σειρά γονιδίων, τα οποία φαίνεται να εμπλέκονται στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD. Είναι αλήθεια ότι, ο βαθμός ηπατικής στεάτωσης μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ ατόμων που έχουν τα ίδια ποσοστά λίπους. Ο βαθμός της ηπατικής στεάτωσης φαίνεται σε πολλές μελέτες ότι κληρονομείται σε ποσοστό περίπου 27% (Feldstein, 2010). Η μελέτη των Romeo και συν. (2008) κατέδειξε τη σχέση ενδοηπατικής συσσώρευσης τριακυλογλυκερολών και του γονιδίου PNPLA3 (Patatin-like phospholipase domain containing 3) και συγκεκριμένα του αλληλίου I148M. Πολυμορφισμοί του I148M αλληλίου οδηγούν στη σύνθεση πρωτεΐνης με ελαττωμένη λιπολυτική δράση και σε επακόλουθη αυξημένη κυτταρική εναπόθεση τριγλυκεριδίων στο ήπαρ (Vernon et al., 2011). Σχετικά με τη προηγούμενη αναφορά στους Ισπανόφωνους, φάνηκε ότι αλληλόμορφο αυτό είναι πιο διαδεδομένο σε εκείνους σε σχέση με τους Καυκάσιους και τους Αφρικανοαμερικανούς (Vernon et al., 2011). Επιπροσθέτως, φαίνεται μια αρνητική συχέτιση,

μεταξύ του γονιδίου TM6SF2 (Transmembrane 6 superfamily member 2), και την έκκριση των ενδοηπατικών τριακυλογλυκερολών (Kozlitina et al., 2014), αυξάνοντας, παράλληλα, τον κίνδυνο για ηπατική στεάτωση (Sookoian et al., 2015) και ίνωση (Dongiovanni et al., 2015). Τέλος, πολυμορφισμοί των γονιδίων GCKR και PPP1R3B έχει φανεί πως συσχετίζονται θετικά με την ηπατική στεάτωση, διαγνωσμένη μέσω υπερήχου (Hernaez et al., 2013).

Τροποποιήσιμοι παράγοντες

- Παχυσαρκία:

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ένα σημαντικό ποσοστό ατόμων με NAFLD και NASH είναι παράλληλα και παχύσαρκοι (Younossi et al., 2016) με τιον ο επιπολασμός της νόσου Σνα φτάνει έως το 80% ανάμεσα σε παχύσαρκους ασθενείς (ΔΜΣ ≥ 30 kg / m2) (Younossi et al., 2016).. Πρόσφατη μετα-ανάλυση από τους Pang και συν. (2015) κατέδειξε πως η κεντρικού τύπου παχυσαρκία αποτελεί ανεξάρτητο παράγοντα εμφάνισης της NAFLD. Τόσο ο αυξημένος ΔΜΣ, όσο και τα αυξημένα επίπεδα σπλαχνικού λίπους έχουν συσχετισθεί θετικά με τη νόσο (Chalasani et al., 2012). Επιπλέον, σε μια πρόσφατη φάνηκε, πως οι παχύσαρκοι έχουν 3,5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο ανάπτυξης NAFLD σε σχέση με άτομα φυσιολογικού βάρους, και βρήκε μια δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ του Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ) και του κινδύνου για NAFLD, αναδεικνύοντάς τη ως ανεξάρτητο παράγοντα ανάπτυξης της νόσου (Li et al., 2016).

- Μεταβολικό Σύνδρομο:

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η NAFLD έχει χαρακτηριστεί ως η ηπατική εκδήλωση του Μεταβολικού συνδρόμου (ΜΣ) (Marchesini et al., 2001) και πράγματι υπολογίζεται πως σχεδόν το 90% των ασθενών παρουσιάζει τουλάχιστον ένα από τα χαρακτηριστικά του συνδρόμου, ενώ το 33% εμφανίζει όλους τους παράγοντες. Επίσης, σε τα άτομα που έχουν ΜΣ παρουσιάζουν σημαντικά πιο αυξημένα επίπεδα ενδοηπατικού λίπους, σε σύγκριση με τα υγιή άτομα, ανεξάρτητα από το φύλο, την ηλικία και το ΔΜΣ (Kotronen et al., 2007). Ωστόσο, τα χαρακτηριστικά της NAFLD, ενδέχεται να εμφανίζονται και σε μη παχύσαρκα άτομα, δηλαδή άτομα φυσιολογικού βάρους, με αυξημένη περιφέρεια μέσης ή ιστορικό πρόσφατης αύξησης βάρους (Larter et al., 2010).

- Δυσλιπιδαιμία:

Το ποσοστό της NAFLD σε ασθενείς με δυσλιπιδαιμία μπορεί να φτάσει και το 50%
(Chalasani et al., 2012). Το επιστημονικό ενδιαφέρον, έχει στραφεί τόσο στη σημασία της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (Low Density Lipoprotein, LDL) η οποία οδηγεί σε αύξηση

του κινδύνου εμφάνισης της νόσου (Sun et al., 2016), όσο και στα αυξημένα επίπεδα τριγλυκεριδίων (TG) και τα χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεϊνών (HDL-C) τα οποία είναι χαρακτηριστικά των ασθενών αυτών (Chalasani et al., 2012).

- Σακχαρώδης διαβήτης και αντίσταση στην ινσουλίνη:

Ο ΣΔτ2 και η NAFLD συχνά συνυπάρχουν, καθότι μοιράζονται κοινούς παθογενετικούς μηχανισμούς, όπως είναι η ινσουλινοαντίσταση. Συγκεκριμένα, το 18-33% των ασθενών με NAFLD φαίνεται να πάσχει από ΣΔτ2 και παράλληλα το 66-83% ανιχνεύεται με αντίσταση στην ινσουλίνη (Browning et al., 2004, Lopez-Velazquez et al., 2014). Οι ασθενείς με NAFLD, οι οποίοι παράλληλα πάσχουν από ΣΔτ2, έχει φανεί ότι ανάλογα με το βαθμό της ινσουλινοαντίστασης που διαθέτουν, αυξάνεται και η σοβαρότητα του σταδίου της νόσου στο οποίο βρίσκονται (Kang et al., 2006). Γενικότερα, τα διαβητικά άτομα σε σχέση με τα υγιή παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά ηπατικής στεάτωσης (Lonardo et al, 2015), με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη πιθανότητα εμφάνισης επιπλοκών (Sung et al., 2014).

Συμπεριφοριστικοί παράγοντες

- Διατροφή:

Η διατροφή, είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που εμπλέκονται στην εμφάνιση της NAFLD. Αρχικά, το θερμιδικό ισοζύγιο όπως φαίνεται και από μελέτες επηρεάζει τον επιπολασμό της νόσου. Συγκεκριμένα, το σταθερά θετικό ισοζύγιο ενέργειας, που προκύπτει από έναν συνδυασμό αυξημένης ενεργειακής κατανάλωσης και μειωμένης σωματικής δραστηριότητας, οδηγεί, μεταξύ άλλων, σε παχυσαρκία, αυξημένο σπλαχνικό λίπος, ινσουλινοαντίσταση και ΜΣ τα οποία είναι ανεξάρτητοι παράγοντες της νόσου (Larter et al., 2010). Επιπλεόν η υψηλή θερμιδική πρόσληψη μπορεί να οδηγήσει, άμεσα στην εμφάνιση ηπατικής στεάτωσης (Brons et al., 2009), μέσω αύξησης των ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων (intrahepatic triglycerides, IHTG), ανεξάρτητα από τησύσταση της δίαιτας σε μακροθρεπτικά συστατικά. Ομοίως, ο περιορισμός των θερμίδων μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των IHTG κατά 20%, εντός 48ωρών (Kirk et al., 2009).

Σε επίπεδο θρεπτικών συστατικών, έχουν πραγματοποιηθεί κυρίως επιδημιολογικές μελέτες αναδρομικού σχεδιασμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά τους, οι ασθενείς με NAFLD φαίνεται να καταναλώνουν μια δίαιτα αυξημένη σε λιπίδια και υδατάνθρακες και μειωμένη σε πρωτεϊνες. (de Piano et al., 2007, Thuy et al., 2008), αυξημένη σε κορεσμένα λιπαρά οξέα (Musso et al., 2003), ω-6 λιπαρά οξέα (Cortez-Pinto et al., 2006), σάκχαρα και κυρίως φρουκτόζη

(Abdelmalek et al., 2010) και μειωμένη σε ω-3 λιπαρά οξέα (Allard et al., 2008) και βιταμίνες A, C και E (Musso et al, 2003 ; Musso et al., 2007), χωρίς ωστόσο, να αποδεικνύεται ξεκάθαρη επιβαρυντική σχέση μεταξύ της κατανάλωσής τους και της εμφάνισης NAFLD.

Σε επίπεδο τροφίμων, τα δεδομένα προέρχονται κυρίως από συγχρονικές μελέτες. Οι ασθενείς με NAFLD φαίνεται ότι καταναλώνουν μικρότερες ποσότητες ευεργετικών για τη νόσο τροφίμων, όπως ολικής άλεσης προϊόντα (Georgoulis et al, 2014), λαχανικά, φρούτα και καφέ (Birerdinc et al., 2012, Oliveira et al., 2016). Αντίθετα, φαίνεται να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες τροφίμων, όπως κόκκινο κρέας (Zelber-Sagi et al., 2007), ροφήματα υψηλής περιεκτικότητας σε σάκχαρα, γλυκά (Assy et al., 2008, Katsagoni et al., 2017a) καθώς και επεξεργασμένα δημητριακά (Georgoulis et al., 2014), σε σύγκριση με υγιή άτομα.

Σχετικά με τα διατροφικά πρότυπα, αναλύσεις μελετών έχουν καταδείξει θετική σχέση μεταξύ μια δίαιτας πλούσιας σε υδατάνθρακες με τη μορφή σακχάρων και της παρουσίας NAFLD (Jia et al., 2015). Αντίθετα, η προσκόλληση σε μία δίαιτα, που περιλαμβάνει φρούτα, λαχανικά και τρόφιμα υψηλής περιεκτικότητας σε διαιτητικές ίνες έχει συσχετιστεί αρνητικά με την παρουσία της νόσου (Adriano et al., 2016). Επιπλέον, η υψηλή κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, λαχανικών και ψαριών έχει συσχετιστεί με χαμηλότερα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη και ηπατικής ακαμψίας, παράλληλα βέβαια με ιδανική διάρκεια ύπνου (Katsagoni et al., 2017c). Τέλος, η προσκόλληση στη Μεσογειακή Δίαιτα έχει συσχετισθεί με μειωμένα επίπεδα αντίστασης στην ινσουλίνη (Kontogianni et al., 2014), καθώς και με μειωμένη πιθανότητα παρουσίας ΜΣ σε ασθενείς με NAFLD (Georgoulis et al., 2015).

- <u>Φυσική δραστηριότητα και ύπνος :</u>

Διάφοροι παράγοντες κινδύνου για τη νόσο έχουν διερευνηθεί, μεταξύ αυτών και οι συνήθειες άσκησης και ύπνου. Έχει αποδειχθεί, ότι οι ασθενείς με NAFLD, σε σχέση με υγιείς εθελοντές ίδιας ηλικίας, είναι λιγότερο δραστήριοι, και φανερώνουν χαμηλότερα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας (Perseghin et al., 2007, St George et al., 2009), συμμετέχοντας περισσότερο σε χαμηλής έντασης δραστηριότητες (Williams, 2012, Gerber et al., 2012a, Krasnoff et al., 2008). Παράλληλα, αφιερώνουν περισσότερο χρόνο σε καθιστικές δραστηριότητες (Ryu et al., 2015) και μεγαλύτερη επιρρέπεια στην κόπωση (Newton et al., 2008) συγκριτικά με υγιείς. Όσον αφορά τον ύπνο, τα ερευνητικά δεδομένα είναι περιορισμένα. Υπάρχουν επιδημιολογικές μελέτες που συσχετίζουν τη μικρή διάρκεια ύπνου (<5 ώρες), την κακή ποιότητα ύπνου και την υπνηλία (>9 ώρες), με την πιθανότητα παρουσίας της NAFLD (Kim et al., 2013). Από την άλλη πλευρά όμως, υπάρχουν και δεδομένα που δεν επιβεβαιώνουν την σχέση αυτή στα δύο φύλα

(Hsieh et al., 2011, Imaizumi et al., 2015) Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 8 επιδημιολογικών μελετών σε 97.371 ασθενείς με NAFLD, δεν φάνηκε κάποια σχέση μεταξύ της διάρκειας του ύπνου και της πιθανότητας εμφάνισης NAFLD (Shen et al., 2016).

1.2.4 Κλινική εικόνα – Συμπώματα

Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι ασθενείς με NAFLD ή NASH εμφανίζονται συμπτωματικοί στα πρώτα στάδια της νόσου. Ωστόσο, ορισμένοι από αυτούς τους ασθενείς, εμφανίζουν ήπια συμπτώματα, όπως για παράδειγμα κόπωση και δυσφορία στο άνω δεξιό τεταρτημόριο, υπνηλία κατά τη διάρκεια της ημέρας, ηπατομεγαλία και ναυτία. Παρόλο αυτα προαναφερόμενα συμπτώματα δεν θεωρούνται ακριβής και αξιόπιστοι δείκτες για τη διάγνωση της νόσου (Torres et al., 2012). Ακόμα και στα αρχικά στάδια της νόσου, οι ασθενείς διαμαρτύρονται για διαφορά στη ποιότητα της ζωής τους, γεγονός ακόμη πιο έντονο στη περίπτωση των κιρρωτικών ασθενών (Sayiner et al., 2016). Οι ασθενείς με προχωρημένη ίνωση ενδέχεται να παρουσιαστούν με κλινικές εκδηλώσεις της κίρρωσης, που περιλαμβάνουν σπληνομεγαλία, θρομβοπενία, ασκίτη ίκτερο, μώλωπες ή ακόμα και ηπατική εγκεφαλοπάθεια (Rinella, 2016 ; Paschos and Paletas, 2009). Επιπλέον, εφόσον η NAFLD, παρομοιάζεται με το μεταβολικό σύνδρομο, οι ασθενείς συχνά όπως είναι λογικό, παρουσιάζονται με διάγνωση παχυσαρκίας ή/και ΣΔτ2, προδιαβήτη, υπέρταση και δυσλιπιδαιμία (Milic et al., 2014 ; Rinella, 2016).

1.2.5 Διάγνωση

Σύμφωνα με τον πρόσφατο οδηγό αξιολόγησης των ασθενών με μη αλκοολική διήθηση του ήπατος, η υποψία για την ύπαρξη της νόσου ξεκινά από τυχαίες βιοχημικές εξετάσεις καθώς και υπερήχους, που πραγματοποιούνται συνήθως για άλλους λόγους (Glen et al., 2016). Χαρακτηριστικό των εξετάσεων αυτών, είναι η τιμή της δραστικότητας των ηπατικών ενζύμων. Στους ασθενείς αυτούς, παρατηρούνται αυξημένα επίπεδα των ηπατικών ενζύμων και συγκεκριμένα των αμινοτρανσφερασών (ελαφρώς αυξημένη τρανσαμινάση της αλανίνης, ALT και εμφανώς αυξημένη τρανασμινάση του ασπαραγινικού οξέος, AST), εύρημα, το οποίο αποτελεί συχνά το μόνο κλινικό σύμπτωμά τους. (Dowman et al., 2011). Ο λόγος AST/ALT, είναι ένας δείκτης που υπολογίζεται κατά τη διάγνωση της νόσου, έχοντας κλινική σημασία ότι είναι μικρότερος της μονάδας (Rinella et al,

2016). Στη περίπτωση που ο λόγος AST/ALT > 1,5, τότε είναι πιθανή η παρουσίας αλκοολικής λιπώδους διήθηση του ήπατος (Sattar et al., 2014).

Το επόμενο βήμα είναι οι απεικονιστικές μεθόδοι διάγνωσης της νόσου (US), όπως είναι ο υπέρηχος, η αξονική τομογραφία και η μαγνητική τομογραφία. Στις μεθόδους αυτές μπορεί να απεικονιστεί η συσσώρευση του λίπους στο ήπαρ (Tuyama and Chang, 2012). Μέχρι σήμερα όμως, καμία από αυτές δεν είναι αξιόπιστες στην διάκρισης της απλής στεάτωσης από την στεατοηπατίτιδα. Για τον λόγο αυτό, η βιοψία ήπατος παραμένει η gold standard μεθοδος, η οποία εκτός από τη διάκρισης απλής στεάτωσης και στεατοηπατήτιδας, είναι ικανή να διακρίνει και το βαθμό της ηπατικής ίνωσης. Ωστόσο, λόγω του υψηλού κόστους και της παρεμβατικότητας της μεθόδου, χρησιμοποιείται στην κλινική πρακτική και μόνο σε πολύ συγκεκριμένες περιπτώσεις (Attar and Van Thiel, 2013). Αναφορές επίσης έχουν γίνει και για το κίνδυνο εμφάνισης επιπλοκών, συμπεριλαμβανομένου του πόνου και της αιμορραγίας (Bedossa, 2016, Chalasani et al., 2012).

Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, έχει στραφεί στην εύρεση μη επεμβατικών μεθόδων αξιολόγησης της ηπατικής ίνωσης. Παρά τον αριθμό των μεθόδων αυτών, καμία μέθοδος δεν είναι ακόμα επιστημονικά τεκμηριωμένη. Ένα μη επεμβατικό εργαλείο, με απεδεδειγμένα υψηλότερο βαθμό ακρίβειας, ευαισθησίας και ειδικότητας για τη πρόβλεψη της ίνωσης, σε σύγκριση με άλλα εργαλεία, αποτελεί η ελαστογραφία ήπατος. Η ελαστογραφία μετρά τον βαθμό της ηπατικής ακαμψίας ως συνάρτηση του βαθμού της ηπατικής διήθησης (Koplay et al., 2015). Βασικό της όμως μειωνέκτημα είναι η παρουσία σφάλματος με την αύξηση του ΔΜΣ (Ratziu et al, 2010). Οι κατευθυντήριες οδηγίες από την AASLD προτείνουν τη χρήση του NAFLD Fibrosis Score (NFS) (Chalasani et al, 2012), ενώ το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας και Φροντίδας της Μεγάλης Βρετανίας (National Institute for Health and Care Excellence, NICE) θεωρεί ως πιο οικονομικό και αποτελεσματικό το δείκτη Enhanced Liver Fibrosis (ELF) (Glen et al., 2016).

1.2.6 Παθοφυσιολογία της NAFLD

Η παθογένεια της NAFLD είναι περίπλοκη και συχνά μη κατανοητή. Στην προσπάθεια εντόπισης των μηχανισμών της παθοφυσιολογίας της νόσου, έχουν προταθεί αρκετές θεωρίες. Η «θεωρία των δύο χτυπημάτων» (Day and James, 1998) υπήρξε η επικρατέστερη για τουλάχιστον μια

δεκαετία. Παρόλα αυτά, αποδείχθηκε ιδιαίτερα απλή και ανεπαρκής στο να περιγράψει με ακρίβεια την πολυπλοκότητα της παθογένειας της NAFLD. Για τον σκοπό αυτό λοιπόν, προτάθηκε η θεωρία των «πολλαπλών χτυπημάτων» , η οποία αποτελεί πλέον την πιο αποδεκτή υπόθεση σχετικά με την κατανόηση της παθογένειας της NAFLD. Σύμφωνα με αυτή, προερχόμενα από το έντερο και τον λιπώδη ιστό, είναι υπεύθυνα για την δημιουργία φλεγμονής και την περαιτέρω βλάβη του ήπατος (Tilg and Moschen, 2010) . Κύρια χαρακτηριστικά της θεωρίας των πολλαπλών χτυπημάτων, θεωρούνται η αντίσταση στην ινσουλίνη, η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων, η λιποτοξικότητα, η φλεγμονή αλλά και η δυσβίωση του εντέρου (Cheung, 2008).

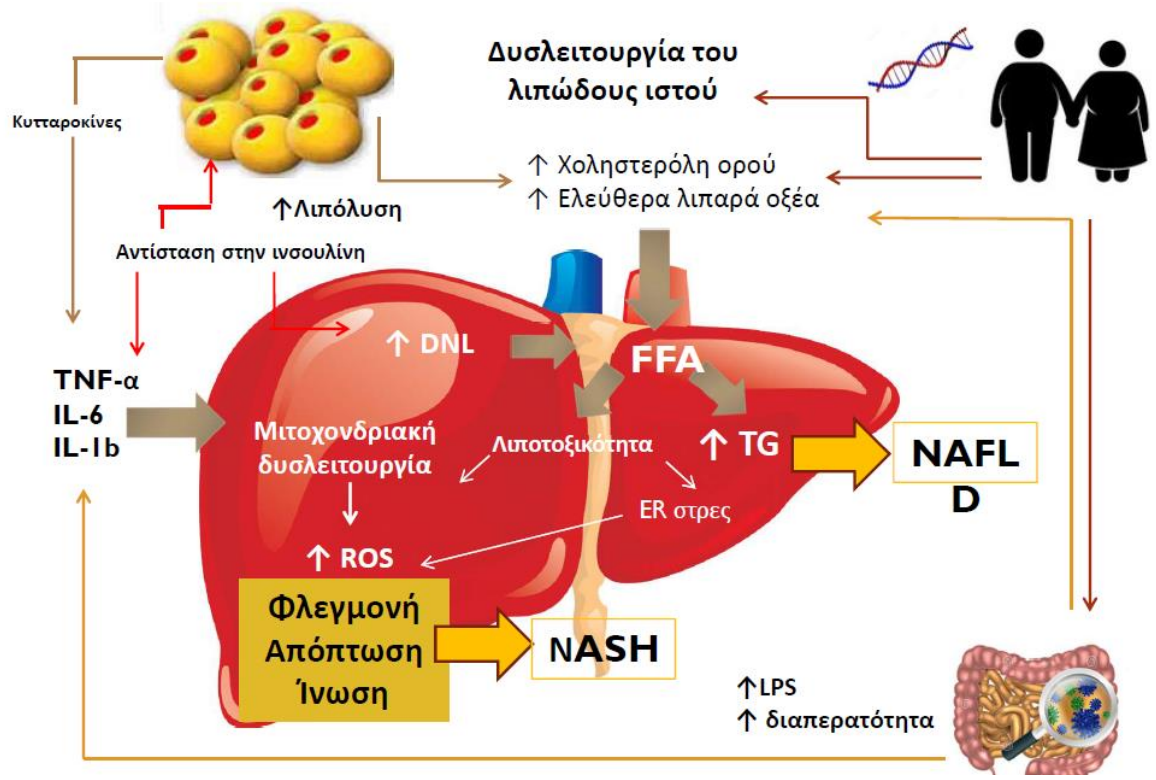
Υπό φυσιολογικές περιπτώσεις τα ελεύθερα λιπαρά οξέα σε κανονικές συνθήκες εστεροποιούνται σε τριγλυκερίδια, τα οποία απομακρύνονται από τα ηπατοκύτταρα ως λιποπρωτεΐνες πολύ χαμηλού μοριακού βάρους (very low-density lipoproteins, VLDL) (Buzzetti et al., 2016). Στην περίπτωση όμως της NAFLD/NASH η ανισορροπία μεταξύ των ενζυμικών συστημάτων πρόσληψης και παραγωγής FFA και των αντίστοιχων ενζύμων οξείδωσης και απομάκρυνσής τους, οδηγεί σε εναπόθεση των τριγλυκεριδίων στα κύτταρα του ήπατος (Buzzetti et al., 2016).

Η αντίσταση στην ινσουλίνη και η επακόλουθη υπερινσουλιναιμία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της NAFLD. Μάλιστα, η σοβαρότητα της ινσουλινοαντίστασης έχει συσχετιστεί με τη βαρύτητα της νόσου (Marchesini et al., 2003). Πιο συγκεκριμένα η ινσουλινοαντίσταση, προκαλείται αύξηση της δεξαμενής των μη-εστεροποιημένων ελεύθερων λιπαρών οξέων μέσω αύξησης της λιπόλυσης στο λιπώδη ιστό και την κυκλοφορία αυξημένης ποσότητας FFA και μέσω της υπερινσουλιναιμίας (Buzzetti et al., 2016). Παράλληλα, παρατηρείται αναστολή της β-οξείδωσης και διαταραχή της έκκρισης των λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (Very Low Density Lipoprotein, VLDL), με τελικό αποτέλεσμα τη συσσώρευση λίπους στα ηπατοκύτταρα. Ο συνδυασμός των ανωτέρω έχει συσχετιστεί με αυξημένη λιποτοξικότητα, εξαιτίας των υψηλών επιπέδων FFA, της ελεύθερης χοληστερόλης και άλλων λιποειδικών μεταβολιτών (Musso et al., 2010).

Η πρόσληψη των FFA από τα ηπατοκύτταρα οδηγεί σε κορεσμό των μιτοχονδριακών ενζυμικών συστημάτων οξείδωσης, οπότε ενεργοποιείται ο μεταβολισμός τους από μικροσωμιακά ενζυμικά συστήματα (κυτόχρωμα P-450 2E1 και 4A), με αποτέλεσμα την παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου που δρουν τοξικά (οξείδωση) στις κυτταρικές μεμβράνες (Buzzetti et al., 2016). Η υπερινσουλιναιμία επίσης, αυξάνει τη σύνθεση FFA στα ηπατοκύτταρα με αύξηση της

γλυκόλυσης, που συνοδεύεται από εναπόθεση των τριγλυκεριδίων στο κυτταρόπλασμα λόγω μειωμένης παραγωγής απολιποπρωτεΐνης Β-100. Οι ρίζες οξυγόνου προκαλούν την παραγωγή κυτταροκινών, όπως ο παράγοντας νέκρωσης του όγκου-α (TNF-a), ο αυξητικός παράγοντας μετατροπής–transforming growth factor–β (TGF-β) η ιντερλευκίνη-8 (interleukine-8, IL-8) η ινερλευκίνη 6 (interleukine-6, IL-6), καθώς και της αδιπονεκτίνης τον που έχει προστατευτικό ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της νόσου. (Buzzetti, et al., 2016). Οι TNF-a και TGF-β, μέσω διαφόρων μηχανισμών, οδηγούν στο θάνατο των ηπατοκυττάρων (Buzzetti et al., 2016). Η ιντερλευκίνη-8, έχει έντονη χημειοτακτική δράση, προσελκύοντας τα πολυμορφοπύρηνα. Ο TNF-a δυσχεραίνει την κυκλοφορία ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα των μιτοχονδρίων. Παράλληλα, οι ρίζες οξυγόνου που παράγονται στα μιτοχόνδρια μειώνουν τις αποθήκες αντιοξειδωτικών στο ήπαρ δημιουργώντας φαύλο κύκλο. Έχει φανεί, από μελέτες σε ζωικά μοντέλα η βλαπτική επίδραση των κυτταροκινών στις ιστολογικές αλλαγές του ήπατος, όπως η νέκρωση και η απόπτωση των ηπατοκυττάρων, καθώς και η ενεργοποίηση αστεροειδών κυττάρων (Tomita et al., 2006). Δεδομένα επίσης υπάρχουν πως τα αυξημένα επίπεδα του TNF-a σε ασθενείς με NASH συσχετίστηκαν με τη βαρύτητα της ηπατικής δυσλειτουργίας (Crespo et al., 2011). Επιπλέον, χαμηλές συγκεντρώσεις αδιπονεκτίνης και υψηλές TNF-a έχουν συσχετιστεί με αύξηση της πιθανότητας εμφάνισης NAFLD και μάλιστα ανεξάρτητα της παρουσίας ινσουλινοαντίστασης (Polyzos et al., 2010b).

Είναι αξιοσημείωτο ότι και παράγοντες του περιβάλλοντος ευθύνονται ως ένα βαθμό για την ανάπτυξη της NAFD (De Alwis N and Day, 2007). Από αυτούς η διατροφή και η υπερανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας είναι πολύ σημαντικοί (De Alwis N and Day, 2007). Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι ασθενείς με NAFLD παρουσιάζουν αυξημένη εντερική διαπερατότητα και βακτηριακή υπερανάπτυξη συγκριτικά με τα υγιή άτομα (Miele et al., 2009). Ο λιποπολυσακχαρίτης (LPS)] είναι ένα από τα κύρια τοξικά βακτηριακά παράγωγα που οδηγεί σε φλεγμονή, ενισχύοντας την ινσουλινοαντίσταση, τη συσσώρευσης λίπους και την εξέλιξη της νόσου (Ceccarelli et al., 2015). Ακόμη, οι επαγόμενες της βακτηριακής υπερανάπτυξης, παραγωγής αιθανόλης και απελευθέρωση λιποσακχαριτών από το εντερικό μικροβίωμα, μπορεί να ενεργοποιήσουν τον TNF-a στα κύτταρα Kupffer και να επάγουν την ηπατική φλεγμονή (Buzzetti et al, 2016).



Εικ.4. *Θεωρία πολλαπλών χτυπημάτων (Buzzetti et al., 2016)*

1.2.7 Θεραπευτικές Παρεμβάσεις στην εξέλιξη της νόσου

Ποικίλες παρεμβάσεις έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με τη νόσο της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος, με σκοπό την εύρεση μη φαρμακευτικών μέσων θεραπείας. Οι παρεμβάσεις αυτές αφορούν μικρές ή μεγάλες αλλαγές των συνηθειών της καθημερινότητας των ασθενών. Πιο συγκεκριμένα έχουν πραγματοποιηθεί παρεμβάσεις μέσω δίαιτας, παρεμβάσεις μέσω άσκησης και παραμβάσεις μέσω γενικότερης τροποποίησης του τρόπου ζωής των ασθενών.

1.2.7.1 Θεραπευτικές παρεμβάσεις μέσω δίαιτας

Πολυάριθμες μελέτες έχουν διεξαχθή με βάση την τροποποίση των διαιτητικών συνηθειών των ασθενών. Οι περισσότερες, στόχευαν στην απώλεια του σωματικού βάρους, ενώ υπήρχαν άλλες που διερευνούσαν την επίδραση των μακροθρεπτικών συστατικών της δίαιτας ή συγκεκριμένων

προτύπων, όπως η δίαιτα DASH και η Μεσογειακού Τύπου δίαιτα. Οι παρεμβάσεις οι οποίες στόχευαν στην απώλεια του σωματικού βάρους με μοναδικό μέσο τη τροποποίηση της διαιτητικής πρόσληψης, πραγματοποιήθηκαν κυρίως μέσω θερμιδικού περιορισμού, χωρίς, αλλαγή στη σύσταση των μακροθρεπτικών συστατικών της δίαιτας (Lin et al., 2009 ; Elias et al., 2010 ; Yamamoto et al., 2007 ; Partaky et al., 2016). Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών συμφωνούν, και καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ,μια απώλεια σωματικού βάρους, της τάξης του 3 - 5% μπορεί να βελτιώσει την ηπατική στεάτωση, με παράλληλη της δραστικότητας των ηπατικών ενζύμων (ALT, AST, γGT) και της ινσουλινοαντίστασης (HOMA-IR). Ωστόσο, για τη βελτίωση των ιστολογικών χαρακτηριστικών της νόσου ή την πλήρη ύφεση απαιτείται μεγαλύτερη απώλεια (έως και πάνω από 10%) (Musso et al., 2012), ποσοστό όμως που φαίνεται ότι μόνο το 50% των ασθενών μπορεί να επιτύχει (Hossain et al., 2016). Από την άλλη, η υπερβολική απώλεια βάρους (>2Kg / εβδομάδα) λόγω ασιτίας μπορεί να οδηγήσει σε επιδείνωση της ιστολογίας του ήπατος, λόγω επιτάχυνσης της διαδικασίας της φλεγμόνης, οπότε δεν συνιστάται (Rafiq and Younossi, 2008).

Σε μια πρόσφατη τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή διάρκειας 3 μηνών, με στόχο την απώλεια σωματικού βάρους, φάνηκε ότι μια δίαιτα με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά μακροθρεπτικών συστατικών (1,651,34 ± 263,25 kcal, 47% υδατάνθρακες, 28% λιπίδια, Πρωτεΐνες 25%, ίνες 30 g) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου στην οποία δόθηκαν απλές συμβουλές διατροφής, οδήγησε σε μείωση σωματικού βάρους, βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ, μείωση των επιπέδων της γ-GT στο ήπαρ, αλλά και μειωμένη συχνότητα υπερανάπτυξης βακτηρίων του λεπτού εντέρου (De Faria Ghetti et al., 2019). Ο ρόλος της εντερικής μικροχλωρίδας είναι κρίσιμος για την εξέλιξη της NAFLD, καθώς το ήπαρ αποτελεί ένα από τα πιο εκτεθειμένα όργανα σε τοξικούς παράγοντες του εντέρου. Είναι αλήθεια, ότι πάνω από το 50% της αιματικής παροχής του ήπατος, προέρχεται από το έντερο μέσω της πυλαίας φλέβας, αντιπροσωπεύοντας την πρώτη γραμμή άμυνας ενάντια σε βακτηριακά υποπροϊόντα (Compare et al., 2012).

Διάφορες μελέτες παρέμβασεις έχουν επικεντρωθεί στη μείωση του περιεχομένου διατροφής σε υδατάνθρακες και λίπος σε ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση του ήπατος (Ahn et al., 2019 ; Katsagoni et al., 2017 ; Yamamoto et al., 2007 ; Elias et al., 2010). Αναφορικά με τους υδατάνθρακες, μια πρόσφατη μετα-ανάλυση 11 κλινικών μελετών, έδειξε ότι η πρόσληψη 26-30γρ υδατανθράκων την ημέρα έχει την τάση να βελτιώσει τον λόγο ALT/AST και τα ενδοηπατικά τριγλυκερίδια, όταν συγκρίθηκε με διαφορετικών ειδών δίαιτας (π.χ υποθερμιδικές, δίαιτα

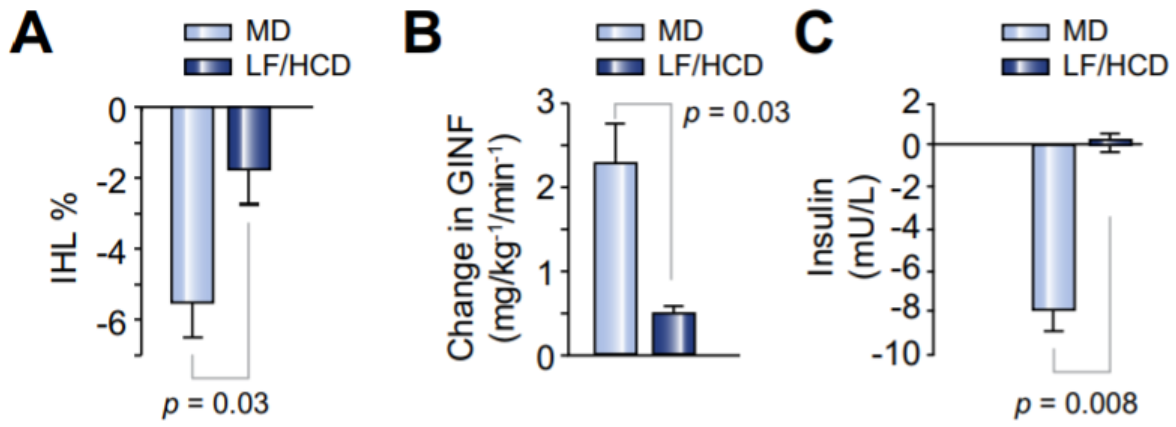
πλούσια σε θερμίδες υδατάνθρακες κ.α). Ωστόσο η διαφορά αυτή μεταξύ των 2 ομάδων φάνηκε μη σημαντική. Παράλληλα παρατηρήθηκαν ιστολογικές βελτιώσεις φλεγμονής, στεάτωσης και ίνωσης. Εντούτοις, τα επίπεδα ηπατικού λίπους μειώθηκαν σε όμοιο βαθμό με τις δίαιτες ελέγχου (Ahn et al., 2019). Όταν όμως οι δίαιτες μέτριας περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες (≤45% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης / ημέρα) συγκρίθηκαν με δίαιτα χαμηλής (<25% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης / ημέρα) ή μέτριας περιεκτικότητας λίπους (≤30% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης / ημέρα) φάνηκε σημαντική βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, η οποία όμως δεν οφειλόταν στη σύσταση της δίαιτας σε μακροθεπτικά συστατικά (Katsagoni et al., 2017). Το 2007, ο Yammamoto και οι συνεργάτες του, πραγματοποίησαν μια προοπτική μελέτη διάρκειας 6 μηνών στην οποία συμμετείχαν 12 ενήλικες πάσχοντες NAFLD. Από αυτούς 9 έπασχαν από NASH και 3 από απλή ίνωση. Οι ασθενείς αυτοί ακολούθησαν μια δίαιτα περιορισμένη σε θερμίδες, λίπος, και σίδηρο. Μετά την 6μηνη παρέμβαση παρατηρήθηκε μια απώλεια 3-5% του ΔΜΣ και μια σημαντική βελτίωση των παραγόντων της νόσου. Επίσης η μείωση φερριτίνης εμφάνησε θετική συσχέτιση με τη μείωση του οξειδωτικού στρες του ήπατος. Εντούτοις, η απώλεια του σωματικού βάρους ως συγχητικός παράγοντας δεν ελέγχθηκε (Yammamoto et al., 2007). Από την άλλη μεριά, μια τυχαιοποϊημένη κλινική δοκιμή, επέδειξε τη Μεσογειακή δίαιτα χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη, ως ανεξάρτητο παράγοντα βελτίωσης του δείκτη NAFLD-score και της σοβαρότητας τη νόσου (Misciagna et al., 2016).

Αναφορικά με τις πρωτεΐνες, υπάρχουν λίγες παρεμβάσεις δίαιτας με αυξημένη περιεκτικότητα σε αυτές. Συγκεκριμένα σε μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή, έγινε σύγκριση μεταξύ μιας δίαιτας πλούσια σε ζωϊκή πρωτεΐνη και μιας δίαιτας πλούσια σε πρωτεΐνη φυτικής προέλευσης. Οι δίαιτες ήταν ισοθερμιδικές, και η διάρκεια τους ήταν 6 εβδομάδες. Συμπερασματικά, φάνηκε μια μη σημαντική μείωση ενδοηπατικού λίπους και στις δύο ομάδες, ανεξαρτήρτως της απώλειας σωματικού βάρους. Παράλληλα παρατηρήθηκε αρνητική ρύθμιση της λιπόλυσης (Markova et al., 2016). Σε μια προοπτική μελέτη 75 ημερών ο Bezerra και οι συνεργάτες του μελέτησαν την επίδραση μιας υποθερμιδικής δίαιτας αυξημένης περιεκτικότητας πρωτεΐνης τόσο ζωϊκής όσο και φυτικής προέλευσης (35% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης / ημέρα). Στο τέλος της μελέτης, παρόλο που δεν παρατηρήθηκε μεταβολή στο δείκτη μάζας σώματος, τη περιφέρεια μέσης, και τη λιπώδη μάζα σώματος, διαπιστώθηκε μείωση των ηπατικών ενζύμων ALT, AST και GGT, μείωση της αλκαλικής φωσφατάσης, της γλυκόζης αίματος νηστείας και της γλυκοζυλιωμένης αιμοσφαιρίνης. Το λιπιδαιμικό προφίλ, βελτιώθηκε σημαντικά (Bezerra et al., 2014).

Αξίζει να σημειωθεί, μια διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή διάρκειας 10 εβδομάδων, η οποία αφορά τη διαιτητική παρέμβαση μέσω μιας δίαιτας πλούσια σε πολυακόρεσα λιπαρά οξέας (PUFA) σε σύγκριση με μια δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέας (SFA). Στη δοκιμή αυτή, συμμετείχαν 67 παχύσαρκοι ασθενείς με μη αλκοολική λιπώδη διήθηση του ήπατος. Το 15% των ασθενών ήταν παράλληλα και πάσχοντες Σακχαρώδους Διαβήτη τύπου 2. Τελικά η αυξημένη πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων συγκριτικά με την πρόληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων, οδήγησε σε μεγαλύτερη μείωση ηπατικού λίπους και μεγαλύτερη μείωση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήθηκε απώλεια σωματικού βάρους, επισημαίνει τη σημασία των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων ως ανεξάρτητος παράγοντας βελτίωσης παραγόντων της νόσου της μη αλκοολικής λιπώδους διήθηση του ήπατος (Bjermo et al., 2012).

Σχετικά με τα πρότυπα διατροφής, ιδιαίτερα μελετημένες είναι οι παρεμβάσεις με δίαιτες Μεσογειακού Τύπου (Katsagoni et al., 2016 ; Biolato et al., 2019 ; Trovato et al., 2015 ; Kaliora et al., 2019 ; Misciagna et al., 2016), συγκριτικά με δίαιτες τύπου DASH (Razavi et al.,2016 ; Hekmatdoost et al., 2016). Στη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή της Katsagoni και τους συνεργάτες της το 2016, συμμετείχαν 28 ενήλικες, αυξημένου σωματικού βάρους και πάσχοντες NAFLD οι οποίοι για 6 μήνες ακολούθησαν είτε μεσογειακή δίαιτα, είτε συμβατική δίαιτα με απλές γραπτές συστάσεις. Μετά από 6 μήνες, η ομάδα παρέμβασης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση σωματικού βάρους και μεγαλύτερη βελτίωση της δραστικότητας ALT, αλλά και της ινσουλινοαντίστασης (Katsagoni et al., 2016). Η πρόσφατη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, επέδειξε ότι η Μεσογειακή Δίαιτα οδήγησε σε σημαντική μείωση σωματικού βάρους και περιφέρεια μέσης, αλλά και μείωση των ηπατικών ενζύμων. Η μελέτη αυτή, είναι σπουδαία καθώς τα αποτελέσματα της παρέμβασης φαίνεται να διατηρούνται, τόσο 16 εβδομάδες μετά την ολοκλήρωση της, όσο και 16 εβδομάδες μετά από μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας λίπους (Biolato et al., 2019). Η προσκόλληση στη Μεσογειακή Δίαιτα για 24 εβδομάδες, φαίνεται ότι εκτός από την βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, οδήγησε και σε μείωση επιπέδων αλβουμίνης, κρεατινίνης, ουρικού οξέος αλλά και δεικτών οξειδωτικού στρες (Kaliora et al., 2019). Ωστόσο, παλαιότερη παρέμβαση, έδειξε ότι τα πλεονεκτήματα της Μεσογειακής Δίαιτας, και συγκεκριμένα η μείωση του ενδοηπατικού λίπους, φάνηκαν μόνο μετά από τη χρονική διάρκεια των 6 μηνών (Trovato et al., 2015). Αξίζει να σημειωθεί η τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή του Ryan και των συνεργατών το 2013, η οποία ξεχωρίζει από τις προηγουμένες διότι μελετάει 2 διαφορετικής

περιεκτικότητας δίαιτες, επί απουσίας όμως απώλειας σωματικού βάρους. Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε σε 12 παχυσάρκους μη διαβητικούς ασθενείς εκτών οποίων οι 6 ήταν γυναίκες, όλοι πάσχοντες NAFLD επιβεβαιωμένη με βιοψία. Οι 2 χρονικές περιόδοι της μελέτης ήταν 6 εβδομάδες με μια περίοδο 6 εβδομάδων κάθαρσης μεταξύ τους. Η διαιτητική παρέμβαση περιελάμβανε τη Μεσογειακού Τύπου δίαιτα (33% Υδ, 44% Λίπος) και μια δίαιτα χαμηλή σε λίπος/ υψηλή σε υδατάνθρακες (49% Υδ, 20% Λίπος). Στα αποτελέσματα της μελέτης, μέσω μαγνητικής φασματοκοπίας με παράλληλη διατήρηση του σωματικού βάρους των ασθενών φάνηκε η σημασία της Μεσογειακής Δίαιτας. Πιο αναλυτική στην χρονική περίοδο που ακολουθήθηκε παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα ενδοηπατικά TG, βελτιωμένη ινσουλινοευαισθησία όπως εκτιμήθηκε μέσω του ρυθμού έγχυσης γλυκόζης (3-h-hyperinsulinemic-euglycemic clamp) και μεγαλύτερη μείωση ινσουλίνης ορού, όπως φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικ.5. *Αλλαγές στην ηπατική στεάτωση και ινσουλινοευαισθησία μετά από Μ.Δ και δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος/υψηλή σε Υδατάνθρακες (Ryan et al., 2013)*

Τόσο σε μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή (Razavi et al.,2016), όσο και σε μια μελέτη πατατήρησης (Hekmatdoost et al., 2016), συγκρίθηκε η δίαιτα τύπου DASH με μια δίαιτα ελέγχου. Και στις δύο μελέτες συμμετείχαν ασθενείς της νόσο NAFLD. Τα αποτελέσματα τους συμφωνούσαν, καθώς φάνηκε ότι η προσκόλληση στο συγκέκριμενο πρότυπο δίαιτας συγκρητικά με την ομάδα ελέγχου, κατέληξε σε απώλεια σωματικού βάρους, μείωση αμινοτρασφερασών, μείωση δυσλιπιδαιμίας και ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων, μείωση ινσουλινοαντίστασης, αλλά και σημαντική μείωση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες. Ο Hekmatdoost και οι συνεργάτες του, επιβεβαίωσαν αντίστροφη σχέση μεταξύ της δίαιτας DASH και του κινδύνου εμφάνισης της νόσου.

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας Υδατανθράκων: (26-30γρ CHO/d)**Vs** διαφορετικών ειδών δίαιτας (π.χ υποθερμιδικές, δίαιτα πλούσια σε θερμίδες υδατάνθρακες κ.α)	5-110 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Ανασκόπηση και Μετα-ανάλυση 11 Κλινικών μελετών (7 τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες δοκιμές)	2 εβδομάδες – 6 μήνες η κάθε μελέτη	• Βελτίωση του λόγου ALT/AST (Μη στατιστικά σημαντικό). • Μείωση ενδοηπατικών TRG (Στατιστικά σημαντική) • Μείωση ηπατικού λίπους (Όμως όχι παραπάνω από δίαιτες ελέγχου) • Ιστολογικές βελτιώσεις φλεγμονής, στεάτωσης και ίνωσης	Ahn et al., 2019
1) Δίαιτα μέτριας περιεκτικότητας Υδατανθράκων (≤45%) 2) Δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε Λίπος (<25%) 3) Δίαιτα μέτριας περιεκτικότητας σε Λίπος (≤30%)	75 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μετα-ανάλυση 4 μελετών (παρέμβαση συστασης δίαιτας) {Συνολικά 20 μελέτες}	Από 4 εβδομάδες – 6 μήνες η κάθε μελέτη	*Βελτίωση ηπατικής λειτουργίας* ***ανεξαρτήτως*** *της σύστασης σε μακροθρεπτικά συστατικά:* • Μείωση του σωματικού βάρους • Μείωση ηπατικών ενζύμων: ALT, AST • Μείωση ινσουλινοαντίστασης και συγκέντρωσης γλυκοζιλιωμένης	Katsagoni et al., 2017
Δίαιτες πολύ χαμηλών θερμίδων VLCD (450 ή 800 θερμίδων)	132 ενήλικες, Παχύσαρκοι και Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή	12 εβδομάδες	• 56 συμμετέχοντες συνολικά: Απώλεια βάρους **>10%** • Θετική συσχέτιση μεταξύ απώλειας σ.β. και βελτίωση της νόσου. • 50% των ατόμων κάθε ομάδας: Υπερηχογραφική βελτίωση NAFLD • 16% κάθε ομάδας: Πλήρη ύφεση νόσου	Lin et al., 2009
Μεσογειακή δίαιτα χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη χωρίς θερμιδικό περιορισμό, ή απλές συμβουλές (ομάδα ελέγχου)	98 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη Κλινική Δοκιμή	6 μήνες	Ομάδα παρέμβασης: • Βελτίωση δείκτη NAFLD-score και σοβαρότητα νόσου (3 και 6 μήνες) • Μείωση συγκέτρωσης GGT	Misciagna et al., 2016
1) Δίαιτα πλούσια σε ω6 PUFA φυτικής προέλευσης 2) Δίαιτα πλούσια σε SFA προερχόμενα από βούτυρο Ισοθερμιδικές, όχι αλλαγή σε μακροθρεπτικά)	67 ενήλικες, παχύσαρκοι (15%: ΣΔτ2)	Διπλά Τυφλά Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή	10 εβδομάδες	Δίαιτα πλούσια σε PUFA Vs SFA χωρίς απώλεια σ.βάρους: Μεγαλύτερη μείωση ηπατικού λίπους και μεγαλύτερη μείωση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες	Bjermo et al., 2012

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD (συνέχεια)***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Δίαιτα DASH Ή δίαιτα ελέγχου (Ενεργειακό έλλειμα 300-750 θερμ, 52-55% υδατάνθρακες, 16-18% πρωτεΐνες και 30% Λιπίδια).	60 ενήλικες, Υπέρβαροι και Παχύσαρκοι και Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη Κλινική Δοκιμή	8 εβδομάδες	Δίαιτα DASH Vs έλέγχου: • Μεγαλύτερη απώλεια βάρους • Μεγαλύτερη μείωση αμινοτρασφερασών, • Μεγαλύτερη μείωση TRG, ινσουλίνης, δείκτη HOMA-IR, ενώ • Σημαντική μείωση φλεγμονής και οξειδωτικού στρες.	Razavi et al., 2016
1) Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε ζωική πρωτεΐνη 2) Δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε φυτική πρωτεΐνη (Ισοθερμιδικές: Πρωτ:30%, Υδ:40%, Λίπος:30%)	44 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD με ΣΔτ2	Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή	6 εβδομάδες	• Μείωση ενδοηπατικού λίπους και στις δύο ομάδες, ανεξαρτήρτως απώλειας βάρους (μη στατιστικά σημαντική) • Αρνητική ρύθμιση λιπόλυσης	Markova et al., 2016
Δίαιτα (1,651,34 ± 263,25 kcal, 47% υδατάνθρακες, 28% λιπίδια, Πρωτεΐνες 25%, ίνες 30 g) και συμβουλευτική Vs απλή συμβουλευτική (ομάδα ελέγχου)	40 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή	3 μήνες	Ομάδα με διατροφική παρέμβαση: • Μείωση σ. βάρους και Π.Μ, • Μείωση επιπέδων TRG, και ολικής χοληστερόλης, • Μείωση επιπέδων GGT, • Μειωμένη συχνότητα υπερανάπτυξης βακτηρίων του λεπτού εντέρου	De Faria Ghetti et al., 2019
Μεσογειακή Δίαιτα ή απλές γραπτές συστάσεις (ομάδα ελέγχου)	28 ενήλικες, Υπέρβαροι και Παχύσαρκοι, Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή	6 μήνες	Ομάδα παρέμβασης Vs ομάδα ελέγχου: • Μεγαλύτερη μείωση σ.βάρους • Στατιστικά σημαντική μείωση ALT και ινσουλινοαντίστασης Πτωτική τάση AST	Katsagoni et al., 2016
1)Μεσογειακή Δίαιτα (33% Υδ, 44% Λίπος) Vs 2) Δίαιτα χαμηλή σε λίπος/ υψηλή σε υδατάνθρακες (49% Υδ, 20% Λίπος),	12 ενήλικες, Παχύσαρκοι, Μη Διαβητικοί, Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη Διασταυρούμενη κλινική Δοκιμή	6 εβδομάδες και 6 εβδομάδες περίοδος κάθαρσης	Στην περίοδο της Μ.Δ παρατηρήθηκαν: • Σημαντική μείωση στα ενδοηπατικά TG • Βελτιωμένη ινσουλινοευαισθησία • Μεγαλύτερη μείωση ινσουλίνης ορού	Ryan et al., 2013
1η περίοδος: Μεσογειακή Δίαιτα 2η: Περίοδος επώασης συμπτωμάτων 3η: Δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος Δίαιτες: Υποθερμιδικές	20 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Διασταυρούμενη Κλινική Δοκιμή	3 περιόδοι των 16 εβδομάδων	Τέλος 1ης περιόδου: Μ.Δ: • Στατιστικά σημαντική μείωση σωματικού βάρους και Π.Μ, • Μείωση ηπατικών ενζύμων ALT,AST *Τα αποτελέσματα παρέμειναν και μετά το τέλος των 3 περιόδων*	Biolato et al., 2019

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.2: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΔΙΑΙΤΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD (συνέχεια)***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Πρόγραμμα ενίσχυσης της προσκόλλησης στη Μεσογειακή Δίαιτα	90 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μη ελεγχόμενη μελέτη παρέμβασης	6 μήνες	Σημαντική μειωση ενδοηπατικού λίπους { δείκτη *bright liver score* (BLS),} μόνο στο τέλος της παρεμβάσης: 6 μήνες	Trovato et al., 2015
Υποθερμιδική (1000 kcal/d) δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε Πρωτεΐνη (41% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης/ d) και διαιτητικές ίνες (21g/d)	60 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Μελέτη Παρατήρησης	14 ημέρες	• Μείωση σωματικού βάρους (4,6% του αρχικού, εκ του οποίου 61,9% ήταν λιπώδη μάζα • Μείωση συγκέντρωσης λιπιδίων ορού, • Μείωση ηπατικής ακαμψίας, • Μείωση ηπατικού ενζύμου GGT και αλκααλικής φωσφατάσης • Όχι μείωση σε ALT,AST	Arslanow et al., 2016
Υποθερμιδική δίαιτα (1200Kcal για τις γυναίκες και 1400 Kcal για τους άντρες) υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεϊνη φυτικής και ζωϊκής προέλευσης (Cho: 40%, Πρωτ: **35%,** Λίπος: 25% της ΣΕΠ / d)	48 ενήλικες, Γυναίκες και Άνδρες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Κλινική Μελέτη	75 ημέρες	• Όχι μεταβολή σε ΔΜΣ, Π.Μ και λιπώδης μάζας σώματος ***Όμως:*** • *Μείωση ηπατικών ενζύμων* ALT, AST, GGT, • Μείωση αλκαλικής φωσφατάσης, γλυκόζης αίματος νηστείας και γλυκοζυλιωμένης Βελτίωση λιπιδαιμικού προφίλ	Bezerra et al., 2014
Μόνο με διατροφή: Υποθερμιδική (-500 kcals, 15% πρωτ., 55% CHO και 30% λίπος)	31 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Μελέτη	6 μήνες	Η απώλεια 3-5% του ΔΜΣ συσχετίστηκε με: • Μείωση ALT, • Μείωση AST, • Μείωση GGT,Μείωση ινσουλινοανίστασης	Elias et al., 2010
Μόνο με διατροφή: Δίαιτα περιοριστική σε θερμίδες, σίδηρο και λίπος (12 άτομα)	12 ενήλικες, Πάσχοντες NASH (9 άτομα) ή απλή ίνωση (3 άτομα)	Προοπτική Μελέτη	6 μήνες	• Απώλεια 3-5% του ΔΜΣ • Μείωση ALT, • Μείωση AST, • Μείωση φερριτίνης = Μείωση οξειδωτικού στρες ήπατος *Η απώλεια σ.β ως συγχητικός παράγοντας δεν ελέγχθηκε*	Yamamoto et al., 2007

1.2.7.2 Θεραπευτικές παρεμβάσεις μέσω τροποποίηση συνηθειών της άσκησης

Εκτός από τις παρεμβάσεις τροποποίησης της δίαιτας, η άσκηση πέφτει στο μικροσκόπιο των επιστημόνων, με σκοπό να εξετάσουν σε ποιο βαθμό η ίδια ή σε συνδιασμό με τη δίαιτα μπορεί να επηρεάσει την εξέλιξη της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος. Οι μελέτες με μοναδική παρέμβαση την άσκηση (Sargeant et al., 2018 ; Chao et al., 2016 ; Zou et al., 2018 ; Katsagoni et al., 2017 ; Huber et al.,2019 ; Orci et al., 2016), έδειξαν ότι λειτουργεί ως ανεξάρτητος από την απώλεια βάρους παράγοντας μείωσης ενδοηπατικών τριγλυκεριδίων και των επιπέδων ινσουλινοαντίστασης HOMA-IR και HbA1c. Ωστόσο, η συστηματική ανασκόπηση του Zou και των συνεργατών του, καταλήγει στο συμπέρασμα, ότι η παρέμβαση άσκησης συγκρτικά με μία ομάδα ελέγχου, υπερτερεί στη μείωση της ινσουλινοαντίστασης, αλλά μη σημαντική στη μείωση του Δείκτη μάζας σώματος (Zou et al., 2018). Στις περισσότερες μελέτες, φάνηκε ότι η διάρκεια και η ένταση της άσκησης ήταν ανάλογη της επίδρασης της στα ενδοηπατικά τριγλυκερίδια (Katsagoni eti al., 2007). . Ωστόσο, η συστηματική ανασκόπηση του Zou και των συνεργατών του, καταλήγει στο συμπέρασμα, ότι η παρέμβαση άσκησης συγκρτικά με μία ομάδα ελέγχου, υπερτερεί στη μείωση της ινσουλινοαντίστασης, αλλά μη σημαντικά στη μείωση του Δείκτη μάζας σώματος (Zou et al., 2018). Στις περισσότερες μελέτες, φάνηκε ότι η διάρκεια και η ένταση της άσκησης ήταν ανάλογη της επίδρασης της στα ενδοηπατικά τριγλυκερίδια (Katsagoni eti al., 2007). Ωστόσο αυτό δεν φάνηκε στη μελέτη του Orci και των συνεργατών του, καθώς η ένταση της άσκησης δεν φάνηκε να επηρεάζει τα ευρήματα της μελέτης (Orci et al., 2016). Η συστηματική ανασκόπηση και μετα- ανάλυση 16 τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών, μελέτησε την επίδραση των διαφορετικών τύπων άσκησης στην ηπατική λειτουργία ασθενών με NAFLD. Η άσκηση αντιστάσεων αποδείχθηκε ως η πιο αποτελεσματική σε ασθενείς με NAFLD που δεν μπορούν να ακολουθήσουν την άσκηση αερόβιου τύπου. Τέτοιοι ασθενείς είναι οι έχοντες μειωμένη καρδιοαναπνευστική ικανότητα ή σαρκοπένια (Chao et al., 2016). Η υψηλής έντασης διαλλειματική άσκηση (HIIT), αποδείχθηκε αποτελεσματική με ευεργετικά αποτελέσματα σε λιγότερο απαιτούμενο χρόνο σε σχέση με τις άλλες μορφές άσκησης (Chao et al., 2016 ; Katsagoni et al., 2017).

Τέλος, στη συστηματική ανασκόπηση και μετα-ανάλυση 12 τυχαιοποιημένων κλινικών δοκιμών του Keating και των συνεργατών του, 8 μελέτες αφορούσαν αποκλειστικά την επίδραση της άσκησης σε σχέση με μία ομάδα ελέγχου, και οι υπόλοιπες 4 αφορούσαν παρεμβάσεις άσκησης

με δίαιτα ή μόνο με δίαιτα. Ανάμεσα σε αυτές, η ευεργετική επίδραση της άσκησης φάνηκε μόνο μετά από αποκλεισμό μελετών που συνδύαζαν άσκηση με δίαιτα ή δίαιτα μόνο. Η άσκηση μόνο, δε φάνηκε να έχει κάποιο σηματικό όφελος στη δραστικότητα της ALT, αλλά φάνηκε να είναι ιδιαίτερα ευεργετική στα επίπεδα ηπατικού λίπους (Keating et al., 2012).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Παρέμβαση άσκησης (HIT, αερόβια, αναερόβια ή συνδιασμός) Vs Όχι άσκηση (ομάδα ελέγχου)	373 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μετα-ανάλυση 17 Μελετών	1-24 εβδομάδες	Ομάδες παρέμβασης Vs ομάδες ελέγχου: • Μείωση ηπατικών TRG ανεξάρτητα της απώλειας βάρους, αλλά μεγαλύτερη υπό παρουσίας απώλειας σ. βάρους, • Βελτίωση ινσουλιοευαισθησίας	Sargeant et al., 2018
Αερόβια άσκηση Vs Άσκηση αντιστάσεων, Vs Υψηλής έντασης διαλλειματική άσκηση (HIIT)	Ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Συστηματική Ανασκόπηση και Μετα-ανάλυση 16 Τυχαιοποιημένων Δοκιμών		• Άσκηση αντιστάσεων: πιο αποτελεσματική σε ασθενείς NAFLD με μειωμένη καρδιοαναπνευστική ικανότητα ή σαρκοπένια (μη ανεχτοί στην αερόβια). • Υψηλής έντασης διαλλειματική άσκηση (HIIT): Ευεργετικά αποτελέσματα σε λιγότερο απαιτούμενο χρόνο	Chao et al., 2016
Δίαιτα Vs Αερόβια άσκηση συνδιαστικά με δίαιτα Vs μη παρέμβαση (ομάδα ελέγχου)	11-154 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Συστηματική Ανασκόπηση και Μετα-ανάλυση 19 Τυχαιοποιημένων Δοκιμών	1-7 εβδομάδες Η κάθε μελέτη	*<u>Και οι δύο ομάδες παρέμβασεις Vs ελέγχου:</u>* Στατιστικά σημαντική μείωση επιπέδων ALT *<u>Άσκηση και Δίαιτα Vs μόνο δίαιτα:</u>* Μεγαλύτερη μείωση επιπέδω AST *<u>Άσκηση και Δίαιτα Vs ελέγχου:</u>* Στατιστικά σημαντική μείωση ΔΜΣ και ινσουλινοαντίστασης *<u>Άσκηση μόνο Vs ελέγχου:</u>* Μείωση ινσουλιννοαντίστασης αλλά μη στατιστικά σημαντική μείωση ΔΜΣ	Zou et al., 2018

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.3: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΑΣΚΗΣΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD (συνέχεια)***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Παρεμβάσεις άσκησης (Αερόβιας ή Αντιστάσεων) ή βασική φροντίδα (ομάδα ελέγχου) 1 μελέτη: Αερόβια άσκηση Vs αναερόβια	564 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μετα-ανάλυση 12 Τυχαιοποιημένων Κλινικών Δοκιμών (Παρεμβάσεις άσκησης μόνο)	2-12 μήνες	Επίδραση άσκησης, ανεξάρτητη της απώλειας βάρους: • Μείωση ενδοηπατικών ενζύμων ALT,AST,GGT • Μείωση ενδοηπατικών Τριγκλυκεριδίων (Πτώση ανάλογη με την ένταση της άσκησης) • Υψηλής έντασης διαλλειματική άσκηση: Αποτελεσματική	Katsagoni et al., 2017
Παρεμβάσεις άσκησης (Αερόβιας ή Αντιστάσεων) [ή και δίαιτας] **Ή** μη άσκησης Ή δίαιτας μόνο (ομάδες ελέγχου)	9-196 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD, ή NASH ή παχύσαρκοι/ υπέρβαροι	Μετα-ανάλυση 28 Τυχαιοποιημένων Κλινικών Δοκιμών		Η άσκηση ανεξάρτητα από την δίαιτα συσχετίστηκε με: • Μείωση ενδοηπατικών ενζύμων ALT,AST • Μείωση επιπέδων ενδοηπατικού λίπους Η ένταση της άσκησης δεν επηρέασε τα αποτελέσματα	Orci et al.,2016
Παρεμβάσεις άσκησης ή μη άσκηση (8 μελέτες) Παρεμβάσεις άσκησης με δίαιτα ή μόνο δίαιτα (4 μελέτες)	14-130 ενήλικες, Υπέρβαροι και Παχύσαρκοι Πάσχοντες NAFLD	Συστηματική ανασκόπηση και Μετα- Ανάλυση 12 Τυχαιοποιημένων Κλινικών Δοκιμών		• Βελτίωση επιπέδων ηπατικής στεάτωσης • Μείωση επιπέδων ALT πλάσματος (Η ευεργετική επίδραση της άσκησης φάνηκε μόνο μετά από αποκλεισμό μελετών που συνδύαζαν άσκηση με δίαιτα ή δίαιτα μόνο). Η άσκηση μόνο, δε φάνηκε να έχει κάποιο όφελος στα επίπεδα της ALT, αλλά φάνηκε όφελος σε επίπεδα ηπατικού λίπους.	Keating et al.,2012
Εξατομικευμένο πρόγραμμα άσκησης	41 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Μελέτη	8 εβδομάδες	• Μείωση επιπέδων ALT και AST κατά 14,3% 18,2% αντίστοιχα, αποτελέμσατα που παρέμειναν σε αυτό το επίπεδο στον επανέλεγχο μετά το τέλος της μελέτης. • Μείωση δεικτών φλεγμονής. • Σημαντική μείωση στεάτωσης ίνωσης, συμπεριλαμβανομένου • Συνολική βελτίωση στην ποιότητα ζωής που σχετίζεται με την υγεία.	Huber et al.,2019

1.2.7.3 Θεραπευτικές παρεμβάσεις μέσω τροποποίηση συνηθειών του τρόπου ζωής

Με τη λογική ότι μια σφαιρική τροποποίηση του συνολικού τρόπου ζωής, θα ήταν μια πιο ολοκληρωμένη παρέμβαση θεραπείας της νόσου της μη αλκοολικής λιπώδους διήθησης του ήπατος, οι μελέτες έστρεψαν το ενδιαφέρον τους σε παρεμβάσεις με τροποποίηση δίαιτας συνδιαστικά με άσκηση. Συγκεκριμένα, μελέτες που εξέτασαν την άμεση επίδραση της τροποποίησης του τρόπου ζωής (Musso et al., 2012 ; Vilar-Gomez et al., 2015 ; Eckard et al., 2008), κατέληξαν σε σημαντική μείωση του δείκτη μάζας σώματος των ασθενών, η οποία έδειξε θετική συσχέτιση με την βελτίωση της ηπατικής λειτουργίας, τη μείωση της εξέλιξης της νόσου και της στεάτωσης, τη βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ και τη μείωση του οξειδωτικού στρες. Παράλληλα ενώ η μελέτη του Vilar-Gomez και των συνεργατών του, επιβεβαιώνει ότι με μείωση πάνω από 10% του δείκτη μάζας σώματος, είναι ικανή να οδηγήσει σε ύφεση της NASH, υποχώρηση ίνωσης και ιστολογική βελτίωση (Vilar-Gomez et al., 2015), η παλαιότερη μετα-ανάλυση του Musso και των συνεργατών του, δείχνει ότι αυτή η αύξηση δεν προσφέρει κανένα επιπλέον όφελος (Musso et al., 2012). Πλήθος μελετών (Koutoukidis et al., 2019 ; Caro-Sabido et al., 2019 ; Zou et al., 2018 ; Utz-Melere et al., 2018 ; Thoma et al., 2012 ; Katsagoni et al., 2017) , χρησιμοποίησαν ομάδα ελέγχου με σκοπό τη σύγκισή της με τη γενικότερη τροποποίηση διαφορετικών παραμέτρων του τρόπου ζωής. Στα αποτελέσματα της σύγκρισης αυτής, η συνδιαστική παρέμβαση υπερτερούσε από την ομάδα ελέγχου στην οποία δόθηκαν απλές διατροφικές συμβουλές. Πιο συγκεκριμένα, φάνηκε, μεγαλύτερη μείωση του Δείκτη μάζας σώματος, μεγαλύτερη βελτίωση επιπέδων ηπατικών ενζύμων και ηπατικής στεάτωσης, σημαντικότερη ιστολογική βελτίωση της νόσου, καθώς και μείωση της αντίστασης στην ινσουλίνη και βελτίωση ινσουλινοευαισθησίας.

Η συστηματική ανασκόπηση του Zou και των συνεργατών του, συνέκρινε επίσης τη συνδιαστική παρέμβαση δίαιτας και άσκησης με παρεμβάσεις δίαιτας μόνο. Ενώ και με τους δύο τρόπους επιτυγχάνεται η μείωση της δραστικότητας της ALT, αξίζει να σημειωθεί ότι η μείωση της AST ήταν πιο έντονη στη συνδιαστική παρέμβαση (Zou et al., 2018). Από την άλλη μεριά, οι παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα, σε σχέση με παρεμβάσεις άσκησης μόνο έχουν αποδειχθεί και σε αυτή τη περίπτωση αποτελεσματικότερες στη βελτίωση μετρούμενων καταλητικών σημείων νόσου και κυρίως των ενδοηπατικών ενζύμων (Badford et al., 2014).

Τέλος η πολύ πρόσφατη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή της Katsogni και των συνεργατών της, συγκέντρωσε 63 ασθενείς NAFLD, οι οποίοι χωρίστηκαν σε τρείς ομάδες. Η πρώτη ομάδα ακολούθησε πρόγραμμα Μεσογειακής Δίαιτας, η δεύτερη ακολούθησε ένα συνολικό Μεσογειακό τρόπο ζωής, ενώ η τρίτη ήταν η ομάδα ελέγχου. Αυτή η 6μηνη παρέμβαση, κατέληξε στο συμπέρασμα, ότι η προσκόλληση σε ένα Μεσογειακό τρόπο ζωής, παρουσιάζει περισσότερα οφέλη σε σχέση με τις υπόλοιπες δυο ομάδες. Πιο συγκεκριμένα, ο Μεσογειακός τρόπος ζωής σε σχέση με την ομάδα ελέγχου κατέληξε σε μείωση επιπέδων ALT κατά 50% και βελτίωση ακαμψίας ήπατος, ενώ την ίδια στιγμή, στην ίδια σύγκριση η ομάδα της Μεσογειακής Δίαιτας παρουσίασε κυρίως βελτίωση της ηπατικής ακαμψίας (Katsagoni et al., 2018).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Τροποποίηση του τρόπου ζωής	400 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD ή NASH	Συστηματική Ανασκόπηση και Μετα-ανάλυση 78 Τυχαιοποιημένων Δοκιμών (παρέμβαση απώλειας σ.β)		Απώλεια βάρους η οποία προκάλεσε : • Μείωση της ενεργότητας της νόσου • Μείωση βαθμού στεάτωσης, • Μείωση ηπατικών ενζύμων ALT, AST, • Μείωση των δεικτών οξειδωτικού στρες • Μείωση συσσώρευσης λιπιδίων <u>Μείωση ≥ 5% του ΔΜΣ</u>: βελτίωση ηπατικής στεάτωσης, <u>Μείωση ≥ 7% ΔΜΣ</u>: απαραίτητη για τη βελτίωση του δείκτη NAS <u>Μείωση >10% ΔΜΣ</u>: όχι επιπλέον όφελος	Musso et al., 2012
Παρεμβάσεις απώλειας σωματικού βάρους μέσω τροποιποίσηση του τρόπου ζωής **Vs** Ήπιες παρεμβάσεις απώλειας σ.βάρους ή μη απώλειας σ.βάρους (ομάδα ελέγχου)	2588 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Συστηματική Ανασκόπηση και Μετα-ανάλυση 22 Τυχαιοποιημένων Δοκιμών	3-8 μήνες (διάρκεια κάθε παρέμβασης)	Έντονες παρεμβάσεις απώλειας βάρους Vs ήπιες παρεμβάσεις: Μεγαλύτερη απώλεια σωματικού βάρους, Μεγαλύτερη βελτίωση σε επίπεδα ηπατικών ενζύμων (ALT, AST, GGT) Μεγαλύτερη μείωση ηπατικής στεάτωσης, Μεγαλύτερη ιστολογική βελτίωση νόσου NAFLD	Koutoukidis et al., 2019
Δίαιτα Vs Αερόβια άσκηση συνδιαστικά με δίαιτα Vs μη παρέμβαση (ομάδα ελέγχου)	11-154 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Συστηματική Ανασκόπηση και Μετα-ανάλυση 19 Τυχαιοποιημένων Δοκιμών	1-7 εβδομάδες Η κάθε μελέτη	*<u>Και οι δύο ομάδες παρέμβασεις Vs ελέγχου:</u>* Στατιστικά σημαντική μείωση επιπέδων ALT *<u>Άσκηση και Δίαιτα Vs μόνο δίαιτα:</u>* Μεγαλύτερη μείωση επιπέδω AST *<u>Άσκηση και Δίαιτα Vs ελέγχου:</u>* Στατιστικά σημαντική μείωση ΔΜΣ και ινσουλινοαντίστασης *<u>Άσκηση μόνο Vs ελέγχου:</u>* Μείωση ινσουλιννοαντίστασης αλλά μη στατιστικά σημαντική μείωση ΔΜΣ	Zou et al., 2018
Παρεμβάσεις δίαιτας, ή παρεμβάσεις δίαιτας συνδιαστικά με άσκηση (κυρίως αερόβια) **Vs** απλή συμβουλευτική (ομάδα ελέγχου)	Παιδιά σχολικής ηλικίας και έφηβοι Πάσχοντες NAFLD	Μετα-ανάλυση 19 Μελετών	2 μέρες-12 μήνες (διάρκεια κάθε παρέμβασης)	Οι παρεμβάσεις Vs ομάδας ελέγχου: • Βελτίωση του ΔΜΣ • Μείωση των επιπέδων ALT, AST • Βελτίωση ηπατικής στεάτωσης	Utz-Melere et al., 2018

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.4: ***ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΜΕΣΩ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΜΕ NAFLD (συνέχεια)***

ΤΡΟΠΟΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ:	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	ΠΗΓΗ
Παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα ή μόνο άσκηση	Ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD, ή NASH ή παχύσαρκοι/ υπέρβαροι	Ανασκόπηση 14 μελετών Παρέμβασης		Παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα πιο αποτελεσματικές στη βελτίωση μετρούμενων καταλητικών σημείων νόσου σε σχέση με παρεμβάσεις άσκησης μόνο [Βελτίωση κυρίως ενδοηπατικών ενζύμων].	Badford et al., 2014
Παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα ή καμία παρέμβαση (ομάδα ελέγχου)	10-76 Ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μετα-ανάλυση 12 Τυχαιοποιημένων Κλινικών Δοκιμών (Παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα)	12-52 εβδομάδες (διάρκεια παρέμβασεις)	• Απώλεια σ.βάρους 4,2-10,6% • Σταθερή μείωση ενδοηπατικού λίπους • Μείωση ηπατικών ενζύμων ALT,AST, • Μείωση αντίσταση ινσουλίνης και βελτίωση ινσουλινοευαισθησίας 2 από αυτές: Μείωση φλεγμονής στην ιστολογία του ήπατος	Thoma et al., 2012
Παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα ή βασική φροντίδα (ομάδα ελέγχου)	357 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μετα-ανάλυση 4 Τυχαιοποιημένων Κλινικών Δοκιμών (Παρεμβάσεις άσκησης συνδιαστικά με δίαιτα)	1-10 μήνες (διάρκεια παρέμβασεις)	• Μείωση ενδοηπατικών ενζύμων ALT,AST,GGT • Μείωση σωματικού βάρους και ΔΜΣ • Μείωση ινσουλινοαντίστασης	Katsagoni et al., 2017
• Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) • Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) • Ομάδα τροποποίησης του τρόπου ζωής (MTZ) Στόχος: Απώλεια σωματικού βάρους	63 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD, Υπέρβαροι/ Παχύσαρκοι	Μονά Τυφλή Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή	6 μήνες	Ομάδες παρέμβασης Vs ελέγχου μετά το 6μηνο: • Μεγαλύτερη απώλεια σωματικού βάρους και βελτίωση ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών *<u>Ομάδα MTZ:</u>* Βελτίωση ηπατικής ακαμψίας και μεγάλη μείωση επιπέδων ALT, ενώ ομάδα ΜΔ μόνο βελτίωση ηπατικής ακαμψίας	Katsagoni et al., 2018
Με δίαιτα (Χαμηλή σε CHO και σε λιπίδια) σε συνδιασμό με μέτρια άσκηση Ή μέτρια άσκηση μόνο	56 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή	6 μήνες	Η απώλεια βάρους με κάθε τρόπο: • Μείωση της ενεργότητας της νόσου • Μείωση βαθμού στεάτωσης, • Μείωση ηπατικών ενζύμων ALT, AST, • Μείωση ολικής και LDL χοληστερόλης, Μείωση συσσώρευσης λίπους	Eckard et al.,2008
Τροποποίηση του τρόπου ζωής με στόχο τη μείωση σ.β.	293 ενήλικες, Πάσχοντες NASH	Προοπτική Μελέτη	52 εβδομάδες	• <u>Μείωση ≥ 5% του ΔΜΣ</u>: • 58%:Ύφεση NASH, 82%: Μείωση NAS κατά 2 μονάδες • <u>Μείωση ≥ 7% ΔΜΣ</u>: Μείωση NAS και παραγόντων κινδύνου • <u>Μείωση **≥10% ΔΜΣ**</u>: 90%: Ύφεση NASH, 45%: Υποχώρηση ίνωσης *Η τελευταία συσχετίστηκε με μεγαλύτερη ιστολογική βελτίωση*	Vilar-Gomez et al.,2015

1.3 ΜΗ ΑΛΚΟΟΛΙΚΗ ΛΙΠΩΔΗ ΔΙΗΘΗΣΗ ΤΟΥ ΗΠΑΤΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ

1.3.1 Μεταβολές βιοδεικτών οξειδωτικού στρες του οργανισμού στη Μη-αλκοολική λιπώδη νόσο του ήπατος

Στη νόσο της μη Αλοολικής Λιπώδους δίήθησης του ήπατος, βασικό χαρακηριστικό των ασθενών είναι η αύξηση των επιπέδων των δεικτών οξειδωτικού στρες σε όλα τα επίπεδα. Στο μιτοχονδριακό επίπεδο, η μελέτη των Sunny και συνεργατών το 2011 κατέληξε ότι ο οξειδωτικός μεταβολισμός του μιτοχονδρίου είναι δύο φορές υψηλότερος σε ασθενείς με NAFLD. Ομοίως, η πειραματική μελέτη των Sánchez-Valleia και συνεργατών το 2012 που καλλιέργησαν ηπατοκύτταρα παρουσία αυξημένων συγκεντρώσεων παλμιτικού και ελαϊκού οξέος έδειξε αύξηση της παραγωγής ROS. Εδώ αξίζει να σημειώσουμε ότι η κλινική δοκιμή των Kotronen και συνεργατών το 2009 αναφέρει ότι η ηπατική οξείδωση λιπιδίων δεν αλλάζει στη NAFLD, τονίζοντας ότι η αυξημένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα δεν αφορά μόνο το ήπαρ αλλά ολόκληρο το σώμα στα πλαίσια της IR. Ποικίλες μελέτες συμφωνούν ως προς τη σημασία της ηπατικής μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας στην παθογένεια της NAFLD και μάλιστα επισημαίνουν ότι η μιτοχονδριακή βλάβη οδηγεί σε δευτερογενή αναστολή της β – οξείδωσης των λιπιδίων με αποτέλεσμα την αύξηση της στεάτωσης και τη δημιουργία ενός φαύλου κύκλου (Haque and Sanyal., 2002).

Στα μικροσωμάτια, το κυτοχρώμα P450 (CYP450) είναι ένα ένζυμο το οποίο αφορά το μεταβολισμό ενδογενών (χοληστερόλη, λιπαρά οξέα, χολικά οξέα) και εξωγενών (αλκοόλ, φάρμακα) χημικών ενώσεων (Anzenbacher and Anzenbacherova., 2001). Συγκεκριμένα, στη NAFLD έχει μελετηθεί η δραστικότητα των κυτοχρωμάτων CYP4502E1 και CYP4504A, τα οποία ενσωματώνουν ένα μόριο οξυγόνου στα λιπαρά οξέα μακράς αλύσου με σκοπό την αποφυγή τοξικών φαινομένων της συσσώρευσης λιπαρών οξέων στο ήπαρ, με αποτέλεσμα όμως τη ταυτόχρονη παραγωγή ROS (Malaguarnera et al., 2009). Η δραστικότητα του CYP450 είναι συνεχώς αυξημένη σε ασθενείς με NASH, γεγονός που επιβεβαιώβεται από ποικίλες μελέτες. Η μελέτη τους οι Chalasani και συνεργατών (2003), οι οποίοι μέτρησαν τη δραστικότητα του CYP4502E1 σε 20 μη διαβητικούς ασθενείς με NASH και σε 17 υγιείς εθελοντές μέσω του προσδιορισμού της κάθαρσης χλωροζοξαζόνης που έλαβαν από το στόμα. Ταυτόχρονα, το CYP4502E1 αυξάνει τη δραστικότητα της NADPH οξειδάσης, οδηγώντας στην αυξημένη

παραγωγή ROS, όπως είναι το O2-. Συγκεκριμένα, οι Matsunami και συνεργάτες το 2010 έδειξαν ότι ποντίκια με NASH είχαν αυξημένη ηπατική έκφραση του mRNA των υπομονάδων gp91phox και p22phox της NADPH οξειδάσης σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου (Matsunami et al., 2010) Από την άλλη μεριά, το ένζυμο CYP4504A, συμμετέχει στην ω – οξείδωση των λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, παράγοντας δικαρβονικά οξέα που περαιτέρω υφίστανται β – οξείδωση στα υπεροξεισωμάτια. Σε συνθήκες μειωμένων επιπέδων CYP4502E1 ή συσσώρευσης λιπαρών οξέων μακράς αλύσου, όπως στη NAFLD, αναλαμβάνει σημαντικό ρόλο όσον αφορά το μεταβολισμό των λιπιδίων (Enriquez et al., 1999).

Στη συνέχεια αξίζει να αναφερθεί ο βαθμός της λιποειδικής υπεροξείδωσης που παρατηρείται σε ασθενείς με NAFLD. Συγκεκριμένα, έχει αποδειχθεί ότι η συγκέντρωση των προϊόντων λιποειδικής υπεροξείδωσης TBARS στο αίμα, δρα ως μεμονομένος παράγοντας κινδύνου εμφάνισης της νόσου NAFLD, ανεξάρτητα συνολικής πρόσληψης αντιοξειδωτικών ουσίων μέσω της δίαιτας. Επιλέον τα επίπεδα TBARS στο αίμα των ασθενών, φάνηκε να συσχετίζονται θετικά τόσο με τα επίπεδα λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) (P = .003) όσο και με τα επίπεδα αδιπονεκτίνης (P = .03), και αρνητικά με τα επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) (P <.001) (Georgoulis et al., 2015). Είναι αλήθεια πως, ο βαθμός αυτός συσχετίζεται με τη διαθεσιμότητα των λιπαρών οξέων (Benzie., 1996). Πιο συγκεκριμένα στην επιδημιολογική μελέτη των Loguercio και συνεργατών το 2001 φάνηκε ότι τα επίπεδα MDA και 4 – HNE ορού ήταν αυξημένα στο 90% των ασθενών με NASH σε σχέση με τους υγιείς. Επίσης στην επιδημιολογική μελέτη των Uysal και συνεργατών το 2011 που περιελάμβανε 60 ασθενείς που χωρίστηκαν σε 4 ομάδες σύμφωνα με τον βαθμό ηπατικής βλάβης, αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα MDA ορού συσχετίζονται θετικά με το στάδιο της νόσου. Παλαιότερη επιδημιολογική μελέτη έρχεται σε συμφωνία με τα παραπάνω καθώς δείχνει τη συσχέτιση των επιπέδων 4 – HNE στο ήπαρ με το βαθμό της ηπατικής φλεγμονής και ίνωσης, επισημαίνοντας την αυξημένη συγκέντρωσή του στη λοβιδιακή ζώνη 3 (Seki et al., 2002).

Άλλα παράγωγα λιποειδικής υπεροξείδωσης είναι τα ισοπροστάνια και η 3 – νιτροτυροσίνη. Τα F2 – ισοπροστάνια, όπως επισημαίνεται από τη η βιβλιογραφία είναι αυξημένα σε ασθενείς με NASH (Haukeland et al., 2006 ; Kojima et al., 2007; Xu et al., 2011). Το ίδιο φαίνεται να συμβαίνει και σε στεατωτικά ποντίκια σε σχέση με τα ποντίκια ελέγχου (Zhu et al., 2008). Επιπλέον, οι Morita και συνεργάτες το 2012 δημιουργώντας ένα πειραματικό μοντέλο ποντικιών με NAFLD, κατέληξαν ότι οι τιμές τους συσχετίζονται θετικά με την αύξηση των ενδοηπατικών TG. Επιπλέον, μελέτες σε πειραματόζωα έχουν επιβεβαιώσει την αύξηση των επιπέδων της

οξειδωμένης LDL και των οξυστερολών σε ασθενείς με NASH (Ferre et al., 2009 ; Musso et al., 2012). Ωστόσο, αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα σε ανθρώπους είναι περιορισμένα, όμως υποστηρίζουν τα πειραματικά αποτελέσματα (Gambino et al., 2007; Chalasani et al., 2004).

Σε ασθενείς με NASH, παρατηρούνται επίσης αυξημένα επίπεδα 8 – OhdG στο ήπαρ, ενώ η αποβολή 8 – OhdG από τα ούρα χρησιμοποιείται ως δείκτης οξειδωτικού στρες (Kadiiska et al., 2005). Μάλιστα, στη μελέτη των Daugherity και συνεργατών το 2012 που περιελάμβανε ποντίκια που έλαβαν είτε δίαιτα υψηλή σε λίπος είτε δίαιτα ελέγχου για 8 εβδομάδες, έδειξε ότι η δίαιτα υψηλή σε λίπος οδήγησε σε αύξηση της ηπατικής παραγωγής H_2O_2 και αύξηση του ποσοστού των θετικών σε 8 – OhdG ηπατοκυττάρων. Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι, οι ασθενείς με NASH, εμφανίζουν αυξημένα επίπεδα AGEs, (Nobili and Manco, 2007). Μάλιστα, τα AGEs που προέρχονται από την γλυκεραλδεΰδη έχει φανεί ότι σχετίζονται με την πορεία της ίνωσης και την ηπατοκυτταρική απόπτωση (Takino et al., 2010). Όπως είναι γνωστό, κατά την οξείδωση των πρωτεϊνών οι πλευρικές αλυσίδες των αμινομάδων μετατρέπονται σε καρβονύλια, τα οποία είναι δυνατόν να προσδιοριστούν στο πλάσμα. Οι Liu και οι συνεργάτες του το 2011, προσδιόρισαν τα επίπεδα πρωτεϊνικών καρβονυλίων στο πλάσμα 404 ασθενών με NAFLD και 800 υγιών εθελοντών και έδειξαν σημαντική συσχέτιση των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων πλάσματος με τον κίνδυνο ανάπτυξης NAFLD.

Οι ασθενείς με NAFLD, παρουσιάζουν επίσης μη φυσιολογική ενζυμική αντιοξειδωτική άμυνα. Για παράδειγα, τα βιβλιογραφικά δεδομένα δείχνουν ότι σε ασθενείς με NAFLD, η έκφραση της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD), που είναι συνδεδεμένη με χαλκό και ψευδάργυρο (Cu/Zn SOD) είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με τους υγιείς εθελοντές (Perlemuter et al., 2005). Από την άλλη μεριά η δισμουτάση που είναι συνδεδεμένη με μαγγάνιο (MnSOD), φαίνεται αυξημένη στα ηπατοκύτταρα ασθενών με NASH. Επιπλέον επισημαίνεται ότι οι τιμές MnSOD αυξάνονται αναλόγως του βαθμού της ίνωσης (Takami et al., 2010). Αναφορικά με τη καταλάση, στην επιδημιολογική μελέτη των Perlemuter και συνεργατών το 2005, που αφορούσε ασθενείς με NAFLD (n = 16) και υγιείς εθελοντές (n = 16) φάνηκε ότι η δραστικότητα της στο πλάσμα αυξάνεται ανάλογα με την εξέλιξη της νόσου. Η υπεροξειδάση της γλουταθειονίνης (GPx) παρέμενε για αρκετά χρόνια αμφιλεγόμενο ζήτημα. Το 2011 αναφέρθηκε στη μελέτη των Samy και συνεργατών, ότι οι ασθενείς NAFLD παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένες τιμές δραστικότητας της GPx σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά, ένα άλλο αντιοξειδωτικό ένζυμο, την παραοξονάση 1 (PON1), η οποία παράγεται από το ήπαρ και υδρολύει τα λιποειδικά υπεροξείδια, επισημαίνεται από τη βιβλιογραφία ότι η δραστικότητά της είναι μειωμένη σε

ασθενείς με NASH (Baskol et al., 2007; Samy and Hassanian, 2011). Στη μελέτη των Duan και συνεργατών το 2010, που δημιούργησαν ένα πειραματικό μοντέλο NAFLD σε 48 ποντίκια, αποδείχθηκε ότι τα επίπεδα του mRNA της θειορεδοξίνης είναι σημαντικά μειωμένα σε NAFLD και ότι αυξάνονται με την πρόοδο της νόσου.

Σχετικά με τους μη ενζυμικούς μηχανισμούς άμυνας, σημαντικός είναι ο λόγος οξειδωμένη γλουταθειόνη / ανηγμένη γλουταθειόνη (GSSG / GSH), ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης της κυτταρικής τοξικότητας και του οξειδωτικού στρες ενώ οι μελέτες δείχνουν να αυξάνεται στο ήπαρ με την πρόοδο της NAFLD (Hardwick et al., 2010 ; Okabe et al., 1994). Όμοια αποτελέσματα βλέπουμε σε μελέτη ασθενείς με NAFLD και ΣΔ στους οποίους ο λόγος GSH / GSSG στον ορό είναι σημαντικά μειωμένος (Sandhya et al., 2010). Στη μελέτη των Garcia και συνεργατών το 2011 καλλιεργήθηκαν ανθρώπινα ηπατοκύτταρα παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ελαϊκού οξέος ή παλμιτικού οξέος ή συνδυασμού αυτών και μετρήθηκαν τα επίπεδα GSH. Αποτελεσματικά φάνηκε μια δοσοεξαρτώμενη αύξηση της GSH, η οποία όμως παρουσία παλμιτικού υποστρέφει στις 24 ώρες, τονίζοντας την διαφορετική αντιοξειδωτική απάντηση στα διάφορα λιπαρά οξέα. Σε επίπεδα βιταμινών, δεν είναι σαφές αν τα επίπεδα βιταμίνης Ε διαφέρουν ανάμεσα σε ασθενείς με NASH και υγιείς εθελοντές, ενώ το ασκορβικό οξύ παρουσιάζει μείωση (Perlemuter et al., 2005 ; Machado et al., 2008 ; Strauss, 1999).

Επιδημιολογικές μελέτες έχουν επισημάνει ότι οι ασθενείς με NAFLD έχουν αυξημένα επίπεδα χολερυθρίνης (Kumar et al., 2012) και ουρικού οξέος (Lee et al., 2010). Επιπλέον, πειραματικές μελέτες δείχνουν ότι η μελατονίνη αναστέλλει την πρόοδο της NAFLD και η αντιοξειδωτική της δράση συνεπάγεται αύξηση της δραστικότητας GPx, SOD, GSH σε ποντίκια με NASH (Tahan et al.,2004; Tahan et al., 2010; Tahan et al., 2009). Τέλος, έχει φανεί ότι σε NAFLD ο μεταβολισμός του συνενζύμου Q διαταράσσεται, μεταβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο την αντιοξειδωτική του δράση (Bravo et al., 2012).

Οι μεταβολές των δεικτών οξειδωτικού στρες και αντιοκειδωτικής άμυνας σε ασθενείς με NAFLD και NASH, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο παρακάτω πίνακα:

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.5:
ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΔΕΙΚΤΩΝ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ NAFLD/NASH

ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΟΞΕΙΔΩΣΗΣ ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΩΝ	**NAFLD/NASH**
δραστικότητα του CYP450	↑
MDA	↑
4 – HNE	↑
F2 – ισοπροστάνια	↑
3 – νιτροτυροσίνη	↑
οξειδωμένης LDL και οξυστερόλες	↑
πρωτεΐνη 8 – OhdG	↑
Ηπατική παραγωγή H_2O_2	↑
AGEs,	↑
Πρωτεϊνικά καρβονύλια	↑
ΕΝΔΟΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	
TAC	↓
Cu/Zn SOD	↑
MnSOD	↑
Καταλάση	↑
GPx	↑
PON1	↓ *δραστικότητας*
GSSG / GSH	↑
GSH	↓ / ↑ *(Ανάλογα με το λ. οξύ)*
Ουρικό οξυ	↑
mRNA θειοredοξίνη	↓
Χολερυθρίνη	↑
Μελατονίνη	↑
Συνένζυμο Q	↓ *δραστικότητας*
ΕΞΩΓΕΝΗ ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΑ ΕΝΖΥΜΑ	
Βιταμίνη Ε	*Ασαφές*
Ασκορβικό Οξύ	↓

1.3.2 Κλινικές παρεμβάσεις ασθενών NAFLD που επιδρούν στους δείκτες οξειδωτικού στρες

Ελάχιστες μελέτες παρέχουν δεδομένα σχετικά με τη μεταβολή των δεικτών οξειδωτικού στρες, ως αποτέλεσμα παρεμβάσεων που πραγματοποιήθηκαν σε ασθενείς με NAFLD. Στη πρόσφατα δημοσιευμένη μονά τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή της Katsagoni και συνεργατών το 2018, φάνηκε ότι τα άτομα που ακολουθούσαν μια Μεσογειακή Δίαιτα και εκείνα που είχαν ένα γενικότερο Μεσογειακό τρόπο ζωής παρουσίασαν σημαντικές βελτιώσεις σε επίπεδα οξειδωτικού στρες σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Συγκεκριμένα, τόσο στην ομάδα ΜΔ όσο και στην ομάδα MTZ παρατηρήθηκε σημαντική μείωση των επιπέδων οξειδωμένων γουανοσινών και 8-ισοπροστανίων σε σύγκριση με την ΟΕ. Αξίζει να σημειωθεί ότι εντός της ΟΕ αυξήθηκαν τα επίπεδα των 8-ισοπροστανίων, ενώ υπήρξε τάση αύξησης και των επιπέδων οξειδωμένων γουανοσινών. Ωστόσο, μεταξύ των ομάδων εντατικής παρέμβασης δεν παρατηρήθηκε κάποια σημαντική διαφορά στους παραπάνω δείκτες . Οι βελτιώσεις αυτές μεταξύ των ομάδων ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους (Katsagoni et al., 2016). Η τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή του Razavi και των συνεργατών του το 2016 που πραγματοποιήθηκε σε 60 ενήλικες αυξημένου σωματικού βάρους και πάσχοντες NAFLD, έδειξε ότι μια δίαιτα τύπου DASH συγκριτικά με μια δίαιτα ελέγχου, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του οργανισμού (TAC), την αύξηση της ανηγμένης γλουταθειονίνης (GSH), την αύξηση νιτρικού οξέος (NO) και τη μείωση της μηλονυλοδιαλδεΰδης (MDA). Αναφορικά με τα επίπεδα ισοπροστανιών, όταν συγκρίθηκε μια δίαιτα πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα με μια ισοθερμιδική δίαιτα πλούσια σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, δεν βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά, μετά από 10 εβδομάδες σε 67 ασθενείς NAFLD (Bjermo et al., 2012). Δύο μελέτες (Arslanow et al., 2016 ; Kaliora et al., 2019) αφορούν παρεμβάσεις διατροφής σε ασθενείς με NAFLD. Συγκεκριμένα στη προοπτική μελέτη του Arslanow και των συνεργατών το 2016, χρησιμοποιήθηκε μια υποθερμιδική δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη σε 60 πάσχοντες NAFLD για 14 ημέρες, με αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση επιπέδων ουρικού οξέος. Από την άλλη μερία, στη μελέτη παρατήρησης της Kaliora και συνεργατών διάρκειας 24 εβδομαδών, σε 44 ενήλικες πάσχοντες NAFLD, διερευνήθηκε η επίδραση της προσκόλλησης σε μια δίαιτα Μεσογειακού Τύπου. Στο τέλος της μελέτης, φαίνεται μια μείωση των επιπέδων οξειδωμένης LDL. Επίσης, στη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή του Lin και των συνεργατών το 2009, στην οποία έγινε παρέμβαση με δίαιτα χαμηλών θερμίδων σε 132 παχύσαρκους και

πάσχοντες NAFLD για 12 εβδομάδες παρουσιάστημε μία μη σημαντική μείωση ουρικού οξέος. Όταν η διατροφική παρέμβαση συνδιάστηκε με άσκηση, και γενικότερες τροποποιήσεις του τρόπου ζωής, σε 293 πάσχοντες NASH σε μια προοπτική μελέτη 52 εβδομάδων, τα αποτελέσματα για τα επίπεδα ουρικού οξέος ήταν όμοια με τα ήδη αναφερόμενα (Vilar-Gomez et al., 2015). Από την άλλη μεριά, η μείωση της φερριτίνης αναφέρεται ως δείκτης μείωσης του οξειδωτικού στρες ήπατος (Yamamoto et al., 2007) και σε αυτό το συμπέρασμα κατέληξαν παρεμβάσεις διατροφής σε πάσχοντες NAFLD, NASH ή με απλή ίνωση, τόσο μέσω μιας υποθερμιδικής δίαιτας υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη όσο και μιας υποθερμιδικής δίαιτας περιορισμένου ποσοστού λίπους και σιδήρου (Bezerra et al., 2014 ; Yamamoto et al., 2007). Η προοπτική μελέτη των Bezerra και των συνεργατών το 2014, έδειξε επίσης μια μη σημαντική αύξηση των επιπέδων σιδήρου σε 48 ασθενείς NAFLD μετά από μια υποθερμιδική δίαιτα αυξημένη σε πρωτεΐνη. Τέλος σε μια πρόσφατη προοπτική μελέτη, 41 ενήλικες πάσχοντες NAFLD, ακολούθησαν ένα εξατομικευμένο πρόγραμμα άσκησης διάρκειας 8 εβδόμαδων. Στο τέλος της μελέτης, βρέθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ προσκόλλησης στο πρόγραμμα άσκησης και επιπέδων φερριτίνης (Huber et al., 2019).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1.6: ***ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΕΙΣ ΑΣΘΕΝΩΝ NAFLD ΣΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ***

ΤΡΟΠΟΙ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΕ ΕΠΙΠΕΔΟ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ	ΠΗΓΗ
Δίαιτες πολύ χαμηλών θερμίδων VLCD (450 ή 800 θερμίδων)	132 ενήλικες, Παχύσαρκοι και Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή	12 εβδομάδες	Μείωση επιπέδων ουρικού οξέος (μη στατιστικά σημαντική)	Lin et al., 2009
Δίαιτα DASH Ή δίαιτα ελέγχου (Ενεργειακό έλλειμα 300-750 θερμ, 52-55% υδατάνθρακες, 16-18% πρωτεΐνες και 30% Λιπίδια).	60 ενήλικες, Υπέρβαροι και Παχύσαρκοι Πάσχοντες NAFLD	Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη Κλινική Δοκιμή	8 εβδομάδες	Δίαιτα DASH Vs έλέγχου: • Μεγαλύτερη αύξηση TAC • Μεγαλύτερη αύξηση GSH • Μεγαλύτερη αύξηση NO • Μεγαλύερη μείωση MDA	Razavi et al., 2016
• Ομάδα ελέγχου (ΟΕ) • Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) • Ομάδα τροποποίησης του τρόπου ζωής (MTZ) Στόχος: Απώλεια σωματικού βάρους	63 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD, Υπέρβαροι/ Παχύσαρκοι	Μονά Τυφλή Τυχαιοποιημένη Κλινική Δοκιμή	6 μήνες	Ομάδες παρέμβασης Vs Ομάδα ελέγχου μετά το 6μηνο: Μείωση των επιπέδων οξειδωμένων γουανοσινών και 8-ισοπροστανίων ανεξάρτητα από την απώλεια σ.β	Katsagoni et al., 2016
1) Δίαιτα πλούσια σε ω6 PUFA φυτικής προέλευσης 2) Δίαιτα πλούσια σε SFA προερχόμενα από βούτυρο (Ισοθερμιδικές, όχι αλλαγή σε μακροθρεπτικά)	67 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD, παχύσαρκοι (15%: ΣΔτ2)	Διπλά Τυφλά Τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή	10 εβδομάδες	Baseline Vs Τέλος μελέτης: • Όχι διαφορές στα επιπέδα ισοπροστανίων (Urinary 8-iso-$PGF_{2\alpha}$ και Urinary 15-keto-dihydro-$PGF_{2\alpha}$)	Bjermo et al., 2012
Υποθερμιδική δίαιτα (1200Kcal για τις γυναίκες και 1400 Kcal για τους άντρες) υψηλής περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη φυτικής και ζωϊκής προέλευσης (Cho: 40%, Πρωτ: **35%,** Λίπος: 25% της ΣΕΠ / d)	48 ενήλικες, Γυναίκες και Άνδρες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Κλινική Μελέτη	75 ημέρες	Baseline Vs Τέλος μελέτης: • Μείωση επιπέδων φερριτίνης • Αύξηση επιπέδων σιδήρου (μη στατιστικά σημαντικά)	Bezerra et al., 2014
Μόνο με διατροφή: Δίαιτα περιοριστική σε θερμίδες, σίδηρο και λίπος (12 άτομα)	12 ενήλικες, Πάσχοντες NASH (9 άτομα) ή απλή ίνωση (3 άτομα)	Προοπτική Μελέτη	6 μήνες	Στατιστικά σημαντική μείωση φερριτίνης = Μείωση οξειδωτικού στρες ήπατος	Yamamoto et al., 2007
Υποθερμιδική (1000 kcal/d) δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε Πρωτεΐνη (41% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης/ d) και διαιτητικές ίνες (21g/d)	60 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Μελέτη Παρατήρησης	14 ημέρες	Baseline Vs Τέλος μελέτης: Στατιστικά σημαντική μείωση ουρικού οξέος κατά 7,6 μονάδες	Arslanow et al., 2016
Συμβουλευτικές οδηγίες προσκόλλησης στη Μεσογειακή Δίαιτα	44 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Μελέτη Παρατήρησης	24 εβδομάδες	Baseline Vs Τέλος μελέτης: • Μείωση οξειδωμένης LDL	Kaliora et al., 2019
Εξατομικευμένο πρόγραμμα άσκησης	41 ενήλικες, Πάσχοντες NAFLD	Προοπτική Μελέτη	8 εβδομάδες	Αρνητική συσχέτιση μεταξύ προσκόλλησης στο πρόγραμμα άσκησης και επιπέδων φερριτίνης.	Huber et al., 2019
Τροποποίηση του τρόπου ζωής με στόχο τη μείωση σ.β.	293 ενήλικες, Πάσχοντες NASH	Προοπτική Μελέτη	52 εβδομάδες	Baseline Vs Τέλος μελέτης: Μείωση επιπέδων ουρικού οξέος	Vilar-Gomez et al., 2015

Κεφ. 2: Σκοπός

Η NAFLD, καθώς και η στεατοηπατίτιδα αποτελούν τις επικρατέστερες μορφές ηπατικής νόσου στις δυτικές κοινωνίες. Οι ασθενείς με NAFLD εμφανίζονται επιδημιολογικά σε υψηλότερο κίνδυνο για την εμφάνιση διαφόρων νοσημάτων αλλά και θνησιμότητας. Πιο συγκεκριμένα η NAFLD, παρουσιάζει θετική συσχέτιση με την εμφάνιση σακχαρώδους διαβήτη τύπου 2 και καρδιαγγειακών νοσημάτων. Οι επιπτώσεις της νόσου που αποτελούν μονοπάτι για την εμφάνιση άλλων μοιραίων νοσημάτων είναι ποικίλες. Μία από τις πιο σημαντικές είναι η αύξηση δεικτών οξειδωτικού στρες στον ανθρώπινο οργανισμό. Το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας, έχει στραφεί στην αναζήτηση μηχανισμών αντιμετώπισης της νόσου NAFLD αλλά και στη συνολική βελτίωση του κλινικού προφίλ των ασθενών. Προς το παρόν, δεν υπάρχει καμία αποδεδειγμένη, ασφαλής και αποτελεσματική φαρμακευτική ή χειρουργική θεραπεία για την αντιμετώπιση της NAFLD ή της NASH, και η τροποποίηση του τρόπου ζωής παραμένει το σπουδαιότερο μέσο της θεραπείας τους.

Οι αλλαγές του τρόπου ζωής, που περιλαμβάνουν μια ισορροπημένη διατροφή, αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, βελτίωση ποιότητας και διάρκειας ύπνου και μια γενικότερη βελτίωση της ποιότητας ζωής, παραμένουν ο ακρογωνιαίος λίθος στην αντιμετώπιση της NAFLD. Τα τελευταία χρόνια η Μεσογειακή δίαιτα ερευνάται για την πιθανή επίδρασή της στη νόσο από ποικίλες μελέτες. Ωστόσο, δεν υπάρχουν έως σήμερα δεδομένα που να αφορούν την επίδραση των κλινικών παρεμβάσεων αντιμετώπισης της νόσου στις μεταβολές των δεικτών οξειδωτικού στρες.

Για το σκοπό αυτό, σχεδιάστηκε μία τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική δοκιμή, η οποία διερεύνησε τα πιθανά οφέλη της τροποποίησης του τρόπου ζωής, μέσω μίας παρέμβασης, που βασίστηκε είτε στη Μεσογειακή δίαιτα είτε στον Μεσογειακό τρόπο ζωής παράλληλα με απώλεια βάρους ή μη, συγκριτικά με τη συνήθη κλινική αντιμετώπιση, σε ασθενείς με NAFLD. Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία αποτελεί μέρος αυτής της κλινικής δοκιμής, εστιάζοντας σε αλλαγές, που πιθανώς επέφερε η παρέμβαση, σε δείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα στα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης

Κεφ. 3: Μεθολογία

3.1 Πληθυσμός Μελέτης

Η παρούσα μελέτη πρόκειται για μια τυχαιοποιημένη, μονά-τυφλή, ελεγχόμενη κλινική δοκιμή, με συνολική χρονική διάρκεια 3 ετών. Συγκεκριμένα ξεκίνησε τον Απρίλιο του 2013 έως και ολοκληρώθηκε τον Απρίλιο του 2016. Στη μελέτη συμμετείχαν προοπτικά ασθενείς οι οποίοι είχαν πρόσφατα διαγνωσθεί με NAFLD. Οι ασθενείς αυτοί παρακολουθούνταν από την Πανεπιστημιακή Γαστρεντερολογική Κλινική του Γ.Ν.Α. «Λαϊκό» καθώς και την Β' Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική του ΓΝΑ «Ιπποκράτειο». Μεταξύ 76 ασθενών που αξιολογήθηκαν αρκετά, μόνο οι 63 κρίθηκαν κατάλληλοι για συμμετοχή στη μελέτη. Αυτοί οι ασθενείς εμφάνιζαν υπέρβαρο-παχυσαρκία (ΔΜΣ ≥ 25-40 kg/m^2). Η διάγνωση της νόσου, πραγματοποιήθηκε με συγκεκριμένα κριτήρια. Τα κριτήρια αυτά, περιελάμβαναν την αξιολόγηση αυξημένων τιμών δραστικότητας ηπατικών ενζύμων (αυξημένη τρανσαμινάση της αλανίνης, ALT με ή χωρίς αυξημένη γ-γλουταμυλο-τρανσπεπετιδάση, γGT), παρουσίας ηπατικής στεάτωσης, η οποία διαγιγνώσκεται μέσω υπερήχου ή/και βιοψίας του ήπατος, επί απουσίας άλλης αιτιολογίας, που οδηγεί σε ηπατική στεάτωση ή βλάβη.

Πιο συγκεκριμένα, τα κριτήρια εισόδου στη μελέτη ήταν:

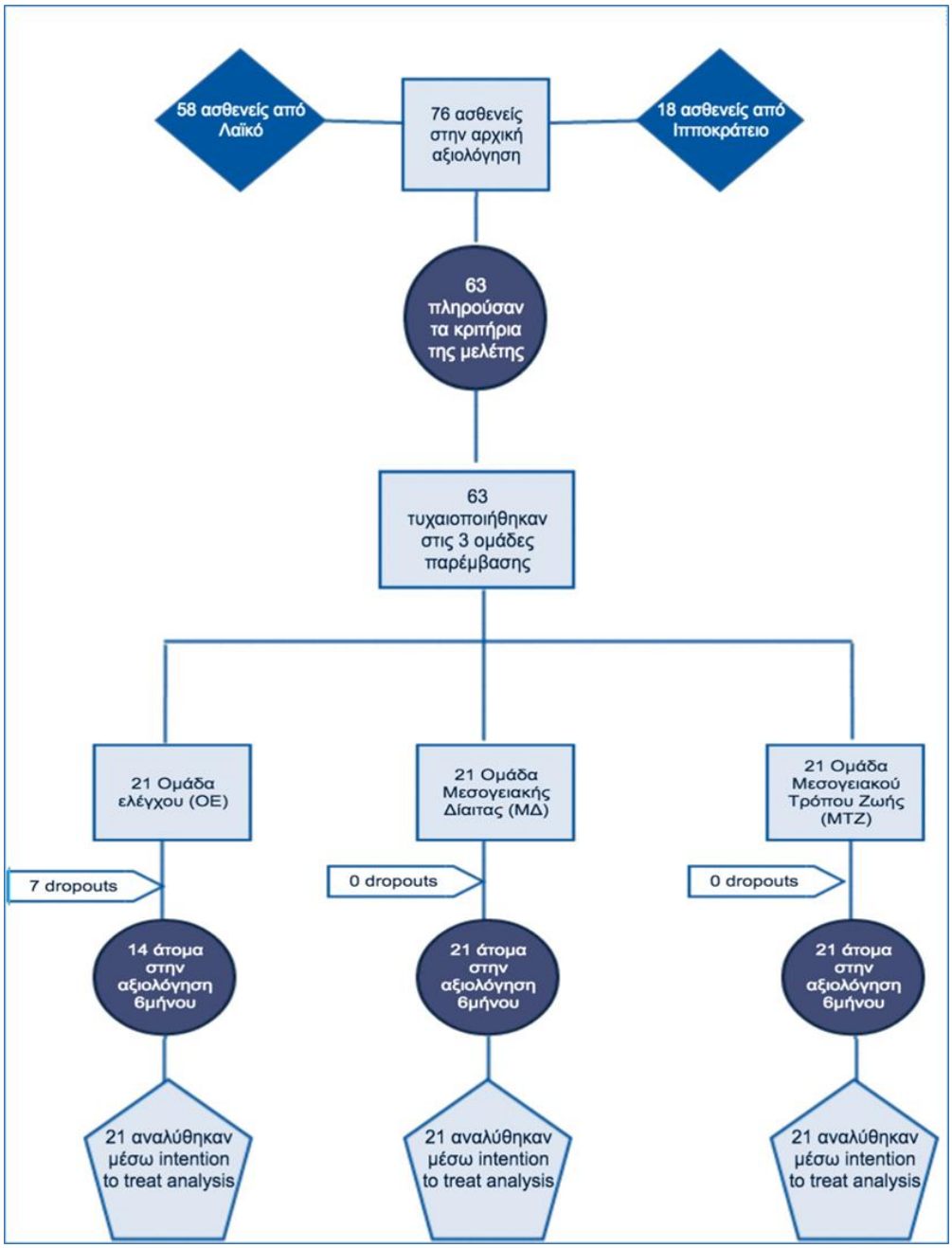
- ΔΜΣ ≥25-40 kg/m^2.
- Ηλικία 18-65 ετών
- Τρανσαμινάση της αλανίνης (ALT) μεγαλύτερη από 1,5 φορά από την ανώτερη φυσιολογική τιμή με ή χωρίς αυξημένη γ-γλουταμυλο-τρανσπεπτιδάση (γGT)
- Ηπατική στεάτωση σε υπέρηχο του ήπατος

Αντίθετα τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν:

- Κατανάλωση αλκοόλ σε ποσότητα > 210 και > 140 g/εβδομάδα για άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα
- Ανίχνευση αντιγόνου επιφανείας του ιού της ηπατίτιδας Β (HBsAg) ή αντισωμάτων έναντι του ιού της ηπατίτιδας C (anti-HCV) ή αντισωμάτων έναντι του HIV
- Σακχαρώδης Διαβήτης
- Λήψη δυνητικά ηπατοτοξικού φαρμάκου

- Παρουσία νοσημάτων με πιθανή ηπατική συμμετοχή
- Πρόσφατη μεταβολή του σωματικού βάρους ή αλλαγή διατροφικών συνηθειών

Πριν την έναρξη της μελέτης, κάθε συμμετέχων, ενημερώθηκε σχετικά με τις διαδικασίες που θα ακολουθούνταν και υπέγραψε ένα συμφωνητικό συμμετοχής στη μελέτη.



ΣΧΗΜΑ 1: *Διάγραμμα ροής πληθυσμού κλινικής μελέτης* (**dropouts**: εγκαταλείψαντες, **intention to treat analysis**: ανάλυση «πρόθεση για θεραπεία»).

3.2 Σχεδιασμός Μελέτης

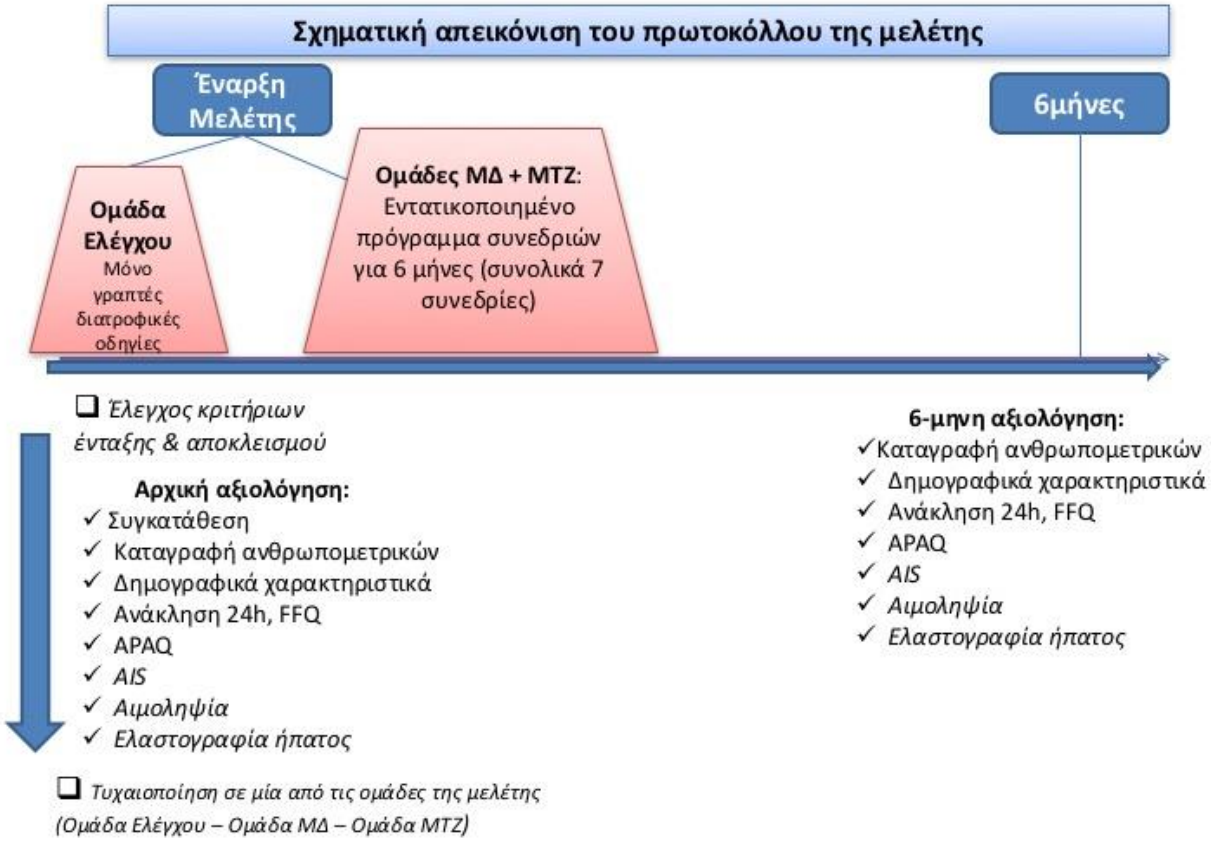
Πρόκειται για μια τυχαιοποιημένη, μονά-τυφλή και ελεγχόμενη κλιμική δοκιμή διάρκειας 6 μηνών. Οι ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν με ένα σύστημα τυχαίων αριθμών. Συγκεκριμένα, κάθε ασθενής λάμβανε έναν μοναδικό κωδικό αριθμό που αντιστοιχούσε σε μία εκ των τριών ομάδων παρέμβασης, ενώ δεν είχε καμία ενημέρωση για τον πραγματικό σκοπό της μελέτης, ούτε για την ύπαρξη των άλλων ομάδων. Ωστόσο, όλοι οι ερευνητές και το προσωπικό της μελέτης ήταν πλήρως ενημερωμένοι για τους σκοπούς της μελέτης.

Κατά την πρώτη συνεδρία των εθελοντών πραγματοποιήθηκε πλήρη κλινική εξέταση, σύνηθες βιοχημικός έλεγχος καθώς και διατροφική αξιολόγηση. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε η τυχαία κατάταξη των ασθενών σε μία από τις ακόλουθες ομάδες: Α)ομάδα ελέγχου (ΟΕ), Β) Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) και Γ) ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής (MTZ). Αρχικά, σε όλους τους εθελοντές και των τριών ομάδων δόθηκε ενδεικτικό υποθερμιδικό διαιτολόγιο, το οποίο παρείχε 1500 Kcal στις γυναίκες και 1800 Kcal στους άνδρες, με παρόμοια ποσοστιαία ανάλυση μακροθρεπτικών συστατικών: 45% υδατάνθρακες, 20% πρωτεΐνες και 35% λιπίδια. Στους ασθενείς της ΟΕ εκτός από το διαιτολόγιο, δόθηκαν γραπτές γενικές οδηγίες σχετικά με έναν υγιεινό τρόπο ζωής, χωρίς κανένα άλλο είδος παρέμβασης μέχρι το τέλος της μελέτης. Στα άτομα της ομάδας ΜΔ το υποθερμιδικό διαιτολόγιο των ατόμων ήταν βασισμένο στη Μεσογειακή Δίαιτα και στα τρόφιμα που περιέχονται σε αυτή, χωρίς τη λήψη κάποιας άλλης κατεύθυνσης για αλλαγή του τρόπου ζωής. Στην ομάδα MTZ δόθηκαν, επιπλέον πληροφορίες για την εποχικότητα και την εντοπιότητα των τροφίμων, καθώς και τον κοινωνικό χαρακτήρα των γευμάτων. Παράλληλα, μόνο σε αυτή την ομάδα, δόθηκαν οδηγίες σχετικά με την αύξηση της φυσικής δραστηριότητας, μέσω μέτριας προς έντονης έντασης προγράμματα, διάρκειας τουλάχιστον 30 λεπτών/ημέρα (γρήγορο ή πολύ γρήγορο περπάτημα, αργό ή γρήγορο τρέξιμο, χορός, τένις κ.α.). Επιπλέον, δόθηκαν οδηγίες για βελτίωση της διάρκειας ύπνου (≥7 και ≤9 ώρες/ημέρα) και αφιέρωση χρόνου για μεσημεριανή ξεκούραση.

Οι ομάδες παρέμβασης (ΜΔ και MTZ) ακολούθησαν ένα πιο εντατικοποιημένο πρόγραμμα, το οποίο αποτελούνταν από επτά 60 λεπτες συνεδρίες. Οι συνεδρίες αυτές, απευθύνονταν σε 3-5 άτομα και πραγματοποιούνταν κάθε δύο εβδομάδες για τους πρώτους 2 μήνες και κάθε μήνα για τους επόμενους 4 μήνες. Βασικό στόχος των συνεδριών και των δύο ομάδων παρέμβασης, ήταν η μείωση σωματικού βάρους σε ποσοστό 5-10% του αρχικού βάρους, ενώ για τους ασθενείς της ομάδας MTZ εκτός από τη προαναφερόμενη μείωση του σωματικού βάρους, στόχο

αποτελούσε και η αύξηση της φυσικής δραστηριότητας τουλάχιστον 30 λεπτά/ημέρα. Η κάθε συνεδρία είχε διαφορετική θεματική ενότητα .Συγκεκριμένα, αφορούσε διαφορετικές ομάδες τροφίμων κάθε φορά (πχ: φρούτα- λαχανικά, γαλακτοκομικά- δημητριακά, ελαιόλαδο- ξήροι καρποί- ελιές, λευκό κρέας- ψάρια, πατάτες- γλυκά, κόκκινο κρέας- κρεατοσκευάσματα, όσπρια- αυγά), για τις οποίες τα άτομα λάμβαναν συγκεκριμένες διαιτητικές συμβουλές.

Η διαδικασία της παρέμβασης και της παρακολούθησης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Διατροφής και Κλινικής Διαιτολογίας του Χαροκόπειου Πανεπιστημίου Αθηνών με τη βοήθεια έμπειρων διαιτολόγων. Η συμβουλευτική βασίστηκε στη θεωρία θέσπισης στόχων.



ΣΧΗΜΑ 2: *Σχηματική απεικόνιση πρωτοκόλλου της μελέτης.*

APAQ: Ερωτηματολόγιο εκτίμησης φυσικής δραστηριότητας (Athens Physical Activity Questionnaire) (Kavouras et al., 2016), **AIS:** Ερωτηματολόγιο διάρκειας & ποιότητας ύπνου (Athens Insomnia Scale) (Soldatos et al., 2003) **FFQ:** Ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (Bountziouka et al., 2012), **Ομάδα ΜΔ:** ομάδα μεσογειακής δίαιτας, **Ομάδα ΜΤΖ:** ομάδα μεσογειακού τρόπου ζωής.

3.3 Εξεταζόμενοι Παράμετροι

Ανθρωπομετρικά και κοινωνικοοικονομικά Χαρακτηριστικά

Για τους σκοπούς της μελέτης, πραγματοποιήθηκαν διάφορες ανθρωπομετρικές μετρήσεις σε κάθε συμμετέχον, τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της παράμβασης. Οι μετρήσεις αυτές αφορούσαν το βάρος, το ύψος και την περίμετρο μέσης των ασθενών. Συγκεκριμένα το σωματικό βάρος των εθελοντών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ψηφιακού ζυγού με ακρίβεια ± 100 g. Για τη σωστή μέτρηση του σωματικού βάρους, τα άτομα έπρεπε να βρίσκονται σε κατάσταση νηστείας και να μην φορούν παπούτσια κατά τη ζύγιση. Επίσης, το σωματικό βάρος των ασθενών των ομάδων ΜΔ και ΜΤΖ μετρούνταν και σε κάθε συνεδρία.

Ομοίως με γυμνά πόδια, χαλαρούς ώμους, ελεύθερα χέρια, ίσια πλάτη και ευθύ βλέμμα, πραγματοποιήθηκε η μέτρηση του ύψους των ασθενών. Η συγκεκριμένη μέτρηση έγινε μόνο μια φορά με τη χρήση αναστημόμετρου τύπου Seca ακρίβειας ± 0,5 cm. Ακολουθούσε στρογγυλοποίηση του αποτελέσματος στο πλησιέστερο 0,5 cm του μέτρου.

Μέσω των δύο παραπάνω συνιστώσες, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του ΔΜΣ του κάθε ασθενή, ο οποίος ορίζεται ως το πηλίκο του σωματικού βάρους (σε kg) προς το τετράγωνο του ύψους (σε m^2).

Τέλος, μετρήθηκε η περιφέρεια μέσης, η οποία υπολογίστηκε στο μέσο μεταξύ της 12ης πλευράς και της λαγόνιας ακρολοφίας (ύψος ομφαλού) και η περιφέρεια ισχίου η οποία μετρήθηκε γύρω από τους γλουτούς, στο ύψος της μέγιστης έκτασης. Για τη πραγματοποίηση αυτών των μετρήσεων, χρησιμοποιήθηκε μη-εκτατή ταινία (seca) με ακρίβεια ± 0,1 εκ. Επιπλέον, υπολογίστηκε και ο λόγος της περιφέρειας μέσης προς την περιφέρεια ισχίων (WHR).

Οι ασθενείς επίσης ερωτήθηκαν για πληροφόριες σχετικά με το φύλο, την εθνικότητα και την ηλικία τους. Το μορφωτικό επίπεδο τους αποτελούσε άλλο ένα στοιχείο με βάση το οποίο έγινε κατάταξη των εθελοντών σε ομάδες. Το επίπεδο του μορφωτικού επιπέδου, καθορίστηκε ανάλογα με τα χρόνια εκπαίδευσης τους. Συγκεκριμένα οι ασθενείς διακρίθηκαν σε τρεις κατηγορίες: Στη πρώτη κατηγορία εντάχθηκαν τα άτομα με εκπαίδευση μικρότερη των 9 σχολικών ετών, στη δεύτερη οι απόφοιτοι λυκείου ή τεχνικών σχολών (10-14 έτη) ενώ στη τρίτη και ανώτερη κατηγορία οι εθελοντές που ήταν απόφοιτοι από μια πανεπιστημιακή σχολή ή μια σχολή ανωτέρων σπουδών.

Στη συνέχεια, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι λήφθηκε υπόψην η οικογενειακή κατάσταση (έγγαμος, άγαμος, διαζευγμένος ή χηρεία) του κάθε ατόμου. Παράλληλα πραγματοποιήθηκε αξιολόγηση του καπνίσματος. Ειδικότερα ως καπνιστές θεωρήθηκαν όσοι κάπνιζαν τουλάχιστον ένα τσιγάρο/ημέρα, πρώην καπνιστές εκείνοι, που διέκοψαν το κάπνισμα τουλάχιστον ένα χρόνο πριν τη μελέτη, ενώ μη καπνιστές τα άτομα που δεν κάπνισαν ούτε ένα τσιγάρο κατά τη διάρκεια της ζωής τους.

Η κατανάλωση αλκοόλ αξιολογήθηκε μέσω ερωτήσεων, οι οποίες έγιναν τόσο στα ίδια τα άτομα, όσο και στο φιλικό ή οικογενειακό τους περιβάλλον με σκοπό τη διαφοροποίηση της λκοολικής με τη μη αλκοολική νόσο του ήπατος. Με το τρόπο αυτό, σημειώθηκε ο αριθμός των ποτών που καταναλώνονταν ανά εβδομάδα. Με βάση τον αριθμό αυτό, πραγματοποιήθηκε κατηγοριοποίηση ανάμεσα στα άτομα που δεν κατανάλωναν αλκοόλ (ποτέ ή σπάνια, 0-1 ποτό/εβδομάδα) και στα άτομα που κατανάλωναν αλκοόλ (>1 ποτό/εβδομάδα).

Αξιολόγηση προσκόλλησης στη Μεσογειακή Δίαιτα

Οι διαιτητικές συνήθειες των εθελοντών, αξιολογήθηκαν τόσο στην αρχή όσο και μετά από μήνες. Η αξιολόγηση αυτή, πραγματοποιήθηκε μέσω ενός ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (Food Frequency Questionnaire, FFQ) και δύο ανακλήσεων 24ώρου, η μία πραγματοποιούμενη μέσω τηλεφώνου και η άλλη κατά κατ' ιδίαν με τον ασθενή στις αντίστοιχες συνεδρίες. Το FFQ αποτελούταν από 76 συνολικά ερωτήσεις εκτον οποίων όλες εκτός 7 από αυτές αφορούσαν τη συχνότητα κατανάλωσης των κύριων ομάδων τροφίμων και ποτών. Οι 7 ερωτήσεις ήταν σχετικές με τις γενικότερες διατροφικές συμπεριφορές των ατόμων. Οι ερωτήσεις αφορούσαν τις διαιτητικές συνήθειες των εθελοντών σε χρονικό διάστημα δύο τελευταίων μηνών πρίν την έναρξη της παρεμβάσης. Με βάση μια κλίμακα 6 βαθμίδων: «ποτέ/ σπάνια», «1-3 φορές/ μήνα», «1-2 φορές/ εβδομάδα», «3-6 φορές/ εβδομάδα», «1 φορά/ ημέρα» και «≥2 φορές/ ημέρα», τα άτομα απαντούσαν στις ερωτήσεις τους FFQ. Στο τέλος, μέσω των απαντήσεων στο ερωτηματολόγιο, αξιολογήθηκε ο βαθμός προσκόλλησης των εθελοντών στη Μεσογειακή δίαιτα, με τη χρήση του σχετικού δείκτη MedDietScore (Panagiotakos et al., 2006).

Αξιολόγηση Φυσικής Δραστηριότητας

Για την αξιολόγηση της φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών, χρησιμοποιήθηκε το ερωτηματολόγιο APAQ (Athens Physical Activity Questionnaire), ένας δείκτης ενεργειακής

κατανάλωσης/εβδομάδα. Το ερωτηματολόγιο, ήταν χωρισμένο σε 3 ενότητες. Στις ερωτήσεις αναφορικά με τις τυχόν δραστηριότητες των ατόμων στο πλαίσιο της εργασίας (π.χ.χρόνος βαδίσματος από και προς τη δουλειά), στο σπίτι (π.χ. χρόνος που χρειάστηκε είτε για ελαφριές είτε για βαριές δουλειές στο σπίτι) και στις δραστηριότητες με σκοπό τη ψυχαγωγία (π.χ. χρόνος που αφιερώθηκε για χορό). δραστηριότητα κατά τον ελεύθερο χρόνο, την εργασία και τις οργανωμένες σωματικές δραστηριότητες. Το APAQ συμπληρώθηκε από όλους τους συμμετέχοντες τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της παρέμβασης, αξιολογώντας τη φυσική δραστηριότητα κατά το διάστημα των προηγούμενων 7 ημερών. Τα δεδομένα από το APAQ αναλύθηκαν με τη χρήση ενός εργαλείου, που δημιουργήθηκε για το σκοπό αυτό σε πρόγραμμα Excel. Στα πλαίσια αυτού, υπολογίστηκαν τα MET για κάθε δραστηριότητα και στη συνέχεια έγινε υπολογισμό των συνολικών δαπανώμενων θερμιδών/εβδομάδα και ο μέσος όρος για κάθε μέρα.

Βιοχημικές και κλινικές παράμετροι

Τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της παρέμβασης πραγματοποιήθηκε λήψη βιολογικών δειγμάτων. Η συλλογή των δειγμάτων αίματος για κάθε εθελοντή γινόταν νωρίς το πρωί, από τις 8.30π.μ. έως τις 10.00π.μ., έπειτα από 12-ωρη νηστεία και με τον ίδιο τρόπο σε κάθε χρονική στιγμή της μελέτης. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η διαδικασία της φυγοκέντρησης του αίματος και η συλλογή του ορού ή του πλάσματος. Αμέσως μετά ακολούθησε κατάψυξη των δειγμάτων στους -80 ^{o}C Μέσω αυτών των δειγμάτων, προσδιορίσθηκαν οι δείκτες μεταβολισμού της γλυκόζης και της ηπατικής λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα, Τα επίπεδα της γλυκόζης, ολικής χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων αναλύθηκαν με τη χρήση χρωματογραφικής ενζυμικής μεθόδου (Cobas® 8000 analyzer, Roche). Ως υπερτριγλυκεριδαιμία ορίστηκε η κατάσταση, όπου τα επίπεδα τριγλυκεριδίων ορού ήταν 150 mg/dl και ως διαταραγμένη γλυκόζη νηστείας, τα επίπεδα γλυκόζης 100-125 mg/dl.Η ινσουλίνη αναλύθηκε με τη μέθοδο χημειοφωταύγειας (αναλυτής E170 modular, Roche). Έπειτα, η αξιολόγηση της αντίστασης στην ινσουλίνη πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του τύπου από του Matthews και συν. (Matthews et al., 1985). Η τρανσαμινάση της αλανίνης (ALT), η τρανσαμινάση του ασπαραγινικού οξέος (AST) και η γ-γλουταμυλο τρανσπεπτιδάση (γ-GT) αναλύθηκαν, επίσης, με τη χρήση ενζυμικής φωτοτομετρικής μεθόδου (Cobas® 8000 analyzer, Roche). Ως φυσιολογική δραστικότητα της ALT ορίστηκε η ALT <40 IU/L, ενώ για την γ-GT η δραστικότητα <30 IU/L. Η υψηλής ευαισθησίας CRP (hsCRP) μετρήθηκε με τη μέθοδο της νεφελομετρίας (BN II νεφελομετρητής, Siemens).

Η μέτρηση της αρτηριακής πίεσης (ΑΠ) πραγματοποιήθηκε σε όλους τους ασθενείς τόσο στην αρχή της μελέτης (baseline) όσο και μετά το πέρας της παρέμβασης. Η διαδικασία μέτρησης πραγματοποιήθηκε στο δεξί χέρι με τους εθελοντές σε καθιστή θέση και σε κατάσταση ηρεμίας. Επιπλέον, στους εθελοντές των ομάδων παρέμβασης, πραγματοποιούνταν μέτρηση ΑΠ και σε κάθε συνεδρία. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μέτρηση των οξειδωμένων γουανοσινών στα ούρα με τη μέθοδο EIA (8-hydroxy-2-deoxy Guanosine EIA Kit, Cayman Chemical). Τα επίπεδα 8 ισοπροστανίων (8-isoprostane PGF2a ELISA kit, Cayman Chemical) μετρήθηκαν επίσης στα ούρα. Οι συντελεστές ενδο-διακύμανσης για τα 8-ισοπροστάνια και τις οξειδωμένες γουανοσίνες ήταν 7,2% και 4,7% αντίστοιχα και δια-διακύμανσης 15,5% και 5,5% αντίστοιχα.

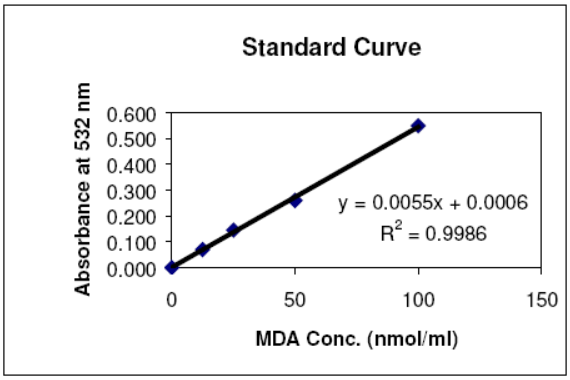
Όλοι οι ασθενείς τόσο στην αρχή της μελέτης όσο και μετά από 6 μήνες, πραγματοποίησαν αξιόπιστες μετρήσεις ηπατικής ακαμψίας (LSM) (σε kPa) μέσω της μεθόδου ελαστογραφίας. Η μέθοδος αυτή, γίνεται με βάση εγκάρσια κύματα 2 διαστάσεων, εκτελούμενα με τη χρήση του συστήματος υπερήχων Aixplorer MultiWave TM (Supersonic Imagine S.A., Aix-en-Provence, France) σε συχνότητες 1-6MHz. Η εξέταση θεωρήθηκε αξιόπιστη, αν είχαν πραγματοποιηθεί τουλάχιστον 5 έγκυρες μετρήσεις βασισμένες σε καλό υπερηχοτομογραφικό σήμα συνδυαστικά με χαμηλό κλάσμα της διακύμανσης προς τη μέση τιμή όλων των έγκυρων μετρήσεων ανά εξέταση (< 25%). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της, οι ασθενείς με NAFLD χωρίστηκαν στα άτομα που παρουσίαζαν σημαντικό βαθμό ίνωσης, και σε εκείνα που δεν παρουσίαζαν ίνωση (LSM > 6,6 και LSM ≤ 6,6 αντίστοιχα), σύμφωνα με τα δημοσιευμένα όρια από τους Abenavoli και Beaugrand (Abenavoli and Beaugrand, 2012).

Προσδιορισμός λιποειδικών υπεροδειδίων σε πλάσμα (TBARS)

Αρχή Μεθόδου

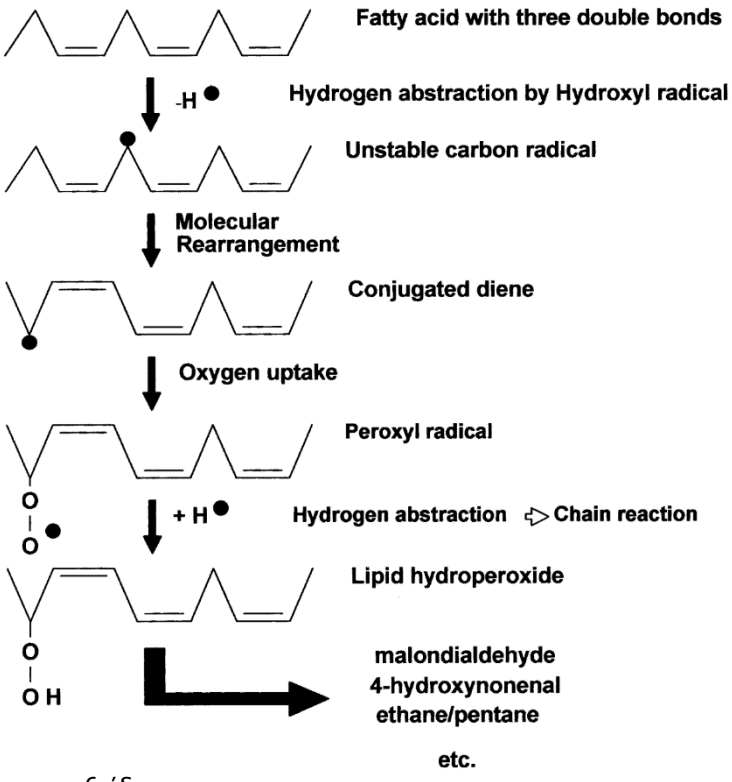
Κατά την διαδικασία του οξειδωτικού στρες στον ανθρώπινο οργανισμό, παράγονται λιποειδικά υπεροξείδια τα οποία όμως είναι ασταθή και διασπώνται κυρίως σε αλδεύδες (κυρίως μηλονυλοαλδεϋδη και 4-υδροξυνονενάλη) και σε συζευγένα διένια. Οι ουσίες αυτές αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) και μπορούν να ανιχνευτούν φωτομετρικά.

Για την ποσοτική έκφραση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιείται πρότυπο διάλυμα μηλονυλοαλδεΰδης (MDA) για την κατασκευή πρότυπής καμπύλης. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol μηλονυλοαλδευδη /ml ορού.



ΣΧΗΜΑ 3: *Παράδειγμα κατασκευής πρότυπης καμπύλης για ποσοτιαία έκφραση μηλονυλοαλδεΰδης (MDA)*

Όσο περισσότερα mol μηλονυλοαλδευδης υπάρχουν στον ορό τόσο περισσότερα προϊόντα οξειδωτικού στρες υπάρχουν στο δείγμα.



ΣΧΗΜΑ 4: *Λιποειδική υπεροξείδωση*

Όργανα

- Πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μL
- Φυγόκεντρος
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο

Αναλώσιμα

- Tips κίτρινα, μπλε
- Eppendorfs

Στερεά αντιδραστήρια

- 1,1,3,3-Tetramethoxypropane, TMP (Aldrich, 10838)
- BHT
- Thiobarbirutic acid TBA

Διαλύτες

- Φωσφορικό οξύ H3PO4, 85%
- Βουτανόλη

Διαλύματα

- HCl 0,01 M : 250 μL π.HCl σε 250 ml απιονισμένο νερό
- NaoH 0,1 N
- BHT (5 μM) : 0,0055 g σε 5 ml μεθανόλη
- Φωσφορικό οξύ 0,2 M
- TBA 0,11 M : 0,0793g TBA σε 5 ml NaoH 0,1 N

- Πρότυπο διάλυμα MDA 200 μM : Υδρολύονται 0,672 μL TMP σε 20 ml HCl 0,01 M για 10 min σε Θδωμ. Το διάλυμα MDA που προκύπτει έχει συγκέντρωση 200 μM.

Από αυτό το διάλυμα φτιάχνονται τα πρότυπα δ/τα με συγκεντρώσεις 0,1-0,5-1-2-2,5-3 μM.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά σε eppendorfs σωλήνες προστίθενται 200 μL φωσφορικό οξύ 0,2 M, 25 μL BHT (5 μM), 100 μL ορού ή 200 μL πρότυπο διάλυμα TMP ή απεσταγμένο νερό (τυφλό). Στην περίπτωση του ορού πραγματοποιείται συμπλήρωση του όγκου μέχρι τα 200 μL με νερό (προσθήκη 100 μL νερού στα δείγματα) και 25 μL TBA 0,11 M. Στη συνέχεια ακολουθεί έντονη ανάδευση των δειγμάτων και παραμονή τους σε υδατόλουτρο στους 90 ^{o}C για 60 min. Αμέσως μετά την θέρμανση σειρά έχει η τοποθέτηση των σωλήνων στο ψυγείο στους 4^{o}C για 5-10 λεπτά. Μετά την ψύξη, προσθέτουμε 500 μL βουτανόλη σε όλα τα δείγματα και πραγματοποιούμε έντονη ανάδευση. Ακολουθεί η φυγοκέντρηση τους σε 12000 rpm για 10 min ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις. Όταν τελείωσει η φυγοκέτρηση, παραλαμβάνουμε με μία ειδική πιπέτα 450μλ από τη πάνω φάση, η οποία είναι η βουτανολική φάση. Στην συνέχεια, πραγματοποιείται δεύτερη φυγοκέντρηση σε 12000 rpm για 10 min σε νέα Eppendorf τα οποία περιέχουν μόνο τη βουτανολική φάση που παραλάβαμε στο προηγούμενο βήμα. Έπειτα, με τη βοήθεια μιας πιπέτας μεταφέρουμε 200 μL του δείγματος σε plate και τέλος γίνεται η μέτρηση της απορρόφησης στα 535 nm σε ειδικό φωτόμετρο.

3.4 Στατιστική Ανάλυση

Προκειμένου να παρατηρηθεί σημαντική διαφορά μεταξύ θεραπευτικών ομάδων και ομάδα ελέγχου (με 5% και 10% πιθανότητες στατιστικού σφάλματος τύπου I και II, αντίστοιχα), υπολογίστηκε πως κάθε ομάδα παρέμβασης χρειαζόταν 21 ασθενείς (συμπεριλαμβανομένου ενός 10% των ασθενών, που πιθανώς να εγκατέλειπε τη μελέτη). Αυτό υπολογίστηκε, εκτιμώντας ότι το κύριο καταληκτικό σημείο της παρέμβασης, δηλαδή η κλινικά ωφέλιμη μείωση της ALT εντός φυσιολογικών ορίων, θα μπορούσε να επιτευχθεί στο 50% των ασθενών με NAFLD, που τυχαιοποιήθηκαν στις ομάδες της παρέμβασης και στο 10% της ομάδας ελέγχου.

Οι συνεχείς παραμετρικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέσες τιμές ± τις τυπικές αποκλίσεις (mean ± SD), ενώ οι συνεχείς μη παραμετρικές μεταβλητές ως διάμεσοι (25ο τεταρτημόριο, 75ο τεταρτημόριο). Επίσης, οι ποιοτικές-κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως απόλυτες (n)

και σχετικές συχνότητες (%). Ο έλεγχος της κανονικότητας των μεταβλητών πραγματοποιήθηκε μέσω της δοκιμασίας Shapiro-Wilk και γραφικά μέσω ιστογραμμάτων.

Οι περισσότερες αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τη μέθοδο «πρόθεση για θεραπεία» (Intention To Treat, ITT), εκτός από τους δείκτες οξειδωτικού στρες, οι οποίοι αναλύθηκαν «βάσει πρωτοκόλλου» (Per Protocol Analysis, PPA), κατά την οποία δεν αναλύθηκαν τα άτομα, τα οποία εγκατέλειψαν τη μελέτη από την ΟΕ, n=7/33%).

Για τις συνεχείς μεταβλητές που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων στην αρχή της παρέμβασης πραγματοποιήθηκαν με το Kruskal-Wallis τεστ για τις συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, ενώ για τις συνεχείς μεταβλητές οι οποίες ακολουθούν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ANOVA. Το τεστ X^2, χρησιμοποιήθηκε για τις κατηγορικές μεταβλητές. Στο τέλος της παρέμβασης, οι συγκρίσεις των συνεχών παραμετρικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων, πραγματοποιήθηκαν μέσω του μοντέλου της ανάλυσης συνδιακύμανσης (Analysis of Covariance, ANCOVA), κατά την οποία η κάθε ομάδα τοποθετούνταν ως ανεξάρτητος παράγοντας (Fixed Effect), η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στο τέλος της παρέμβασης, ως εξαρτημένη μεταβλητή (Dependent Variable) και η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στην αρχή της παρέμβασης καθώς και η % απώλεια σωματικού βάρους ως συμμεταβλητές (Covariates). Αντίστοιχα, οι συγκρίσεις των συνεχών μη παραμετρικών μεταβλητών, μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα υπολογίστηκε ο λογάριθμός τους (log). Τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται ως απολογαριθμοποιημένος αριθμός.

Με τη χρήση της λογιστικής παλινδρόμησης, υπολογίστηκαν οι αλλαγές στις κατηγορικές δίτιμες μεταβλητές, χρησιμοποιώντας τις ίδιες ανεξάρτητες μεταβλητές και συμμεταβλητές, όπως στην ανάλυση της ANCOVA.

Η στατιστική συσχέτιση μεταξύ μιας συνεχούς παραμετρικής και μιας συνεχούς μη παραμετρικής μεταβλητής, πραγματοποιήθηκε με το κριτήριο Spearman's rho.

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5%. Όπου υπολογίστηκαν, παρουσιάζονται τα 95% διαστήματα εμπιστοσύνης. Επίσης, η διόρθωση του Bonferroni χρησιμοποιήθηκε για τη σύγκριση ανά ζεύγη μεταξύ των τριών ομάδων της παρέμβασης. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με το στατιστικό πακέτο SPSS (έκδοση 23.0 for Windows, SPSS 2015, Chicago,USA).

Κεφ. 4: Αποτελέσματα

Αφού πραγματοποιήθηκε η τυχαιοποίηση των ασθενών στις ομάδες, κάθε ομάδα αποτελούνταν από 21 ασθενείς. Μετά το πέρας της παρέμβασης, στους 6 μήνες, 7 άτομα από την ομάδα ελέγχου εγκατέλειψαν τη μελέτη. Από τις ομάδες της ΜΔ και του MTZ, όλοι οι εθελοντές ολοκλήρωσαν την παρέμβαση.

Στον **Πίνακα 4.1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με τα χαρακτηριστικά των ασθενών όλων των ομάδων, όπως αξιολογήθηκαν κατά την εισαγωγή των ασθενών στη μελέτη. Όπως φαίνεται, οι εθελοντές της ομάδας του MTZ είχαν σημαντικά πιο αυξημένο δείκτη MedDietScore συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες (p = 0,007). Παράλληλα, στην αρχή της μελέτης, οι ασθενείς της ομάδας MTZ, ανέφεραν σημαντικά λιγότερες ώρες ύπνου συγκριτικά με την ΟΕ και την ομάδα ΜΔ (μη στατιστικά σημαντικά).

Στον **Πίνακα 4.2** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σχετικά με τα βιοχημικά χαρακτηριστικά των ασθενών όλων των ομάδων, όπως αξιολογήθηκαν κατά την εισαγωγή των ασθενών στη μελέτη. Όπως φαίνεται, δεν υπήρξε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ τους.

Αναφορικά με τα χαρακτηριστικά του τρόπου ζωής, μετά το τέλος της παρέμβασης, και μετά από διόρθωση για την απώλεια βάρους, τόσο η ομάδα του MTZ, όσο και η ομάδα της ΜΔ, φάνηκε να παρουσιάζουν μια σημαντική αύξηση στην προσκόλληση τους στη Μεσογειακή δίαιτα, η οποία εκτιμήθηκε με το δείκτη MedDietScore (P<0,001), σε σύγκριση με την ΟΕ (**Πίνακας 4.3)** Μεταξύ των ομάδων παρέμβασης, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά [Προσαρμοσμένη διαφορά: 1,66 (95% Διάστημα Εμπιστοσύνης-ΔΕ: -1,28, 4,61]. Μετά το 6μηνο παρέμβασης, μόνο στην ομάδα MTZ παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων φυσικής δραστηριότητας συγκριτικά με τις άλλες δύο ομάδες της μελέτης (P<0,001). Εντούτοις, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς το συνολικό επίπεδο φυσικής δραστηριότητας (PAL) (P=0,27). Επίσης, αναφορικά με τις συνήθεις ώρες ύπνου,δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων (P=0,41). Η μέση ημερήσια ανάπαυση αυξήθηκε μόνο στην ομάδα MTZ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (P=0,04).

Σχετικά με τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, στο τέλος της εξάμηνης παρέμβασης, οι ομάδες ΜΔ και MTZ εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη μείωση στην % απώλεια σωματικού βάρους (περίπου 6%) (P=0,01) συγκριτικά με την ΟΕ, η οποία παρουσίασε μικρή απώλεια σωματικού βάρους, η οποία υπολογίστηκε περίπου 2,1% (**Πίνακας 4.4**). Επιπλέον, οι ομάδες παρέμβασης

παρουσίασαν μεγαλύτερη μείωση τόσο στον ΔΜΣ όσο και στο παθολογικό ποσοστό WHR συγκριτικά με την ΟΕ.

Όσο αναφορά, τα ηπατικά χαρακτηριστικά, μετά το πέρας της παρέμβασης, οι ασθενείς των ομάδων ΜΔ και MTZ βελτίωσαν σημαντικά την ηπατική ακαμψία (τιμές κάτω από 6,6), όπως εκτιμήθηκε μέσω ελαστογραφίας (P=0,002) σε σύγκριση με την ΟΕ. Για τον παραπάνω υπολογισμό πραγματοποιήθηκε πρώτα διόρθωση για την απώλεια σωματικού βάρους **(Πίνακας 4.5)**. Μεταξύ των ομάδων παρέμβασης δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά [MTZ συγκριτικά με ΜΔ: Προσαρμοσμένη διαφορά: -0,95 (95% ΔΕ: -0,8, 1,12)]. Επίσης συγκριτικά με την αρχή και το τέλος της μελέτες, οι τιμές ALT και GGT των δύο ομάδων παρέμβασης παρουσίασαν μείωση η οποία όμως ήταν μη σημαντική στη τελική σύγκριση των τριών ομάδων. Αναφορικά με την αντίσταση στην ινσουλίνη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων ως προς τα επίπεδα HOMA-IR (P > 0,05) **(Πίνακας 4.5)**.

Στον **Πίνακα 4.6**, παρουσιάζονται οι δείκτες οξειδωτικού στρες των εθελοντών στη αρχή και στο τέλος της παρέμβασης. Όπως φαίνεται μετά από 6 μήνες, δεν παρατηρείται σημαντική τροποποίηση των τιμών TBARS συγκριτικά με την έναρξη της μελέτης, και η διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων βρέθηκε μη σημαντική (P=0,23). Επίσης ενώ στο τέλος της παρέμβασης παρατηρήθηκε μια μείωση κατά 9,6% και 5,9% των τιμών TBARS για την ομάδα ΜΔ και MTZ αντίστοιχα, μετά από τη τελική σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ των τριών ομάδων, η %αλλαγή TBARS και η % Δ αλλαγή TBARS βρέθηκε μη σημαντική (P= 0,222).

Στον **Πίνακα 4.7**, παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών TBARS στην αρχή της παρέμβασης (baseline) με τους διάφορους δείκτες της νόσου. Αποτελεσματικά φαίνεται να υπάρχει μια σημαντική συσχέτιση μόνο μεταξύ TBARS και δραστικότητας αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT) . Αντίστοιχα στον **Πίνακα 4.8** , παρουσιάζονται οι συσχετίσεις μεταξύ των τιμών TBARS στο τέλος της παρέμβασης (εξάμηνο) με τους διάφορους δείκτες της νόσου. Αποτελεσματικά δεν φάνηκε φαίνεται να υπάρχει καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ TBARS και των υπόλοιπων δεικτών στο χρόνο αυτό.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.1: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

Μεταβλητές	Ομάδα Ελέγχου (ΟΕ) N=21	Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) N=21	Ομάδα Μεσογειακού Τρόπου Ζωής (MTZ) N=21	p value
Φύλο (άνδρες) N (%)	13 (61,9)	13 (61,9)	17 (81)	0,31
Ηλικία (έτη)	47 (42-60)	44 (41-60)	48 (38-60)	0,90
Εκπαίδευση (έτη)	16 (12-16,5)	16 (12-16)	16 (12-16,5)	0,95
Οικογενειακή κατάσταση (παντρεμένοι) N (%)	15 (71,4)	20 (95,2)	13 (61,9)	0,10
Κάπνισμα (ναι) N (%)	3 (14,3)	5 (23,8)	5 (23,8)	0.67
Κατανάλωση αλκοόλ	0,07 (0-0,53)	0,14 (0,04-0,57)	0,21 (0,04-0,56)	0,94
Συνήθης διάρκεια ύπνου (ώρες/ημέρα)	7,1 ± 1,25	7,1±1,3	6,2±1,30	0,06
Επίπεδο Σωματικής Δραστηριότητας (PAL)	1,3 ± 0,14	1,3 ± 0,16	1,29 ± 0,2	0,97
MedDietScore (0-55)	31 ± 4,6	32 ± 3,9	35 ± 3,6	**0,007**
Σωματικό Βάρος (kg)	89,3 (79,4-95,2)	96,7 (79,6-101)	96 (82-104)	0,70
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m2)	30,04 (28,23-33,1)	31,67 (27,4-33,6)	32,44 (28,4-31,5)	0,69
Μη φυσιολογική Περιφέρεια Μέσης (%)	90,5	76,2	71,4	0,39
Συστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	129 (118-132)	127 (114-143)	129 (118-152)	0,53
Διαστολική αρτηριακή πίεση (mmHg)	83 (77-89)	82 (75-89)	82 (76-92)	0,91

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή διάμεσος (διατερταμοριακό εύρος, 25ο-75ο)

Για τις συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων (p value) πραγματοποιήθηκε με το Kruskal-Wallis τεστ, ενώ η μέθοδος ANOVA χρησιμοποιήθηκε για τις συνεχείς μεταβλητές, οι οποίες ακολουθούν κανονική κατανομή. Το τεστ X^2 χρησιμοποιήθηκε για τις κατηγορικές μεταβλητές.

Για την ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε ITT μέθοδος.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.2: ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

Μεταβλητές	Ομάδα Ελέγχου (ΟΕ) N=21	Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) N=21	Ομάδα Μεσογειακού Τρόπου Ζωής (MTZ) N=21	p value
Γλυκόζη (mg/dL)	90 ± 7,9	92 ± 11,5	89 ± 9,5	0,56
Ινσουλίνη (μL/ml)	11,9 (8,0-17,0)	16,2 (10,0-20,6)	14,0 (9,0-20,5)	0,59
HOMA-IR	2,5 (1,7-4,0)	3,4 (1,9-5,1)	3,3 (2,0-5,0)	0,66
ALT (IU/L)	44 (24-64)	51 (30-73)	54 (39-81)	0,23
GGT (IU/L)	64 (34-170)	65 (28-96)	71 (37-178)	0,27
AST (IU/L)	28 (20,5-36,5)	29 (23-38)	32 (27-43,5)	0,40
Ηπατική Ακαμψία (kPa)	7,8 (5,5-10,9)	6,6 (5,5-9,8)	7,1 (6,3-8,8)	0,72
TBARS (MDA nmol/ml)	3,6 (2,9 - 4,6)	2,97 (2,59 – 4,0)	3,46 (2,82 – 4,0)	0,60
8-ισοπροστάνια (ng/mmol CRE)	683,85 (390,0 – 944,4)	662,18 (351,17 – 1272,87)	786,96 (576,36 – 1055,86)	0,46
Οξειδωμένα παράγωγα γουανοσίνης (μg/mmol CRE)	41772,76 (23888,73 –54148,51)	66121,61 (31052,42 –93456,0)	46322,20 (36553,79-67098,6)	0,11

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (P<0.005)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή διάμεσος (διατερταμοριακό εύρος, 25ο-75ο)

Για τις συνεχείς μεταβλητές, που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, οι συγκρίσεις μεταξύ των ομάδων (p value) πραγματοποιήθηκε με το Kruskal-Wallis τεστ, ενώ η μέθοδος ANOVA χρησιμοποιήθηκε για τις συνεχείς μεταβλητές, οι οποίες ακολουθούν κανονική κατανομή. Το τεστ Χ2 χρησιμοποιήθηκε για τις κατηγορικές μεταβλητές.

HOMA-IR: Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη, **ALT**: τρανσαμινάση της αλανίνης, **GGT**: γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση **AST**: τρανσαμινάση του ασπαραγινικού οξέος, **MDA:** Μηλονυλοαλδεΰδη

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.3: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΖΩΗΣ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

	Ομάδα Ελέγχου (ΟΕ) N=21		**Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) N=21**		**Ομάδα Μεσογειακού Τρόπου Ζωής (MTZ) N=21**		**P value**	**Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) ΜΔ vs ΟΕ**	**Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) MTZ vs ΟΕ**
	Αρχή παρέμβασης	**6μηνο**	**Αρχή παρέμβασης**	**6μηνο**	**Αρχή παρέμβασης**	**6μηνο**			
MedDietScore (0-55)	31 ± 4,6	32 ± 4,9	32 ± 3,9	38 ± 4,0	35 ± 3,6	41 ± 3,0	**<0,001**	**5,3 (2,3 , 8,3)**	**6,9 (3,7 , 10,1)**
Επίπεδο Σωματικής Δραστηριότητας (PAL)	1,3 ± 0,14	1,29 ± 0,15	1,3 ± 0,16	1,34 ± 0,18	1,29 ± 0,20	1,37 ± 0,21	0,27	0,03 (-0,08 , 0,1)	0,07 (-0,04 , 0,2)
Συνήθεις ώρες ύπνου (ώρες/ημέρα)	7,1 ± 1,25	7,1±1,35	7,1 ± 1,30	6,9 ± 1,0	6,2 ± 1,30	6,8 ± 1,25	0,41	-0,2 (-0,9 , 0,4)	0,1 (-0,5 , 0,8)

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή διάμεσος (διατερταμοριακό εύρος, 25ο-75ο)

Οι συγκρίσεις των συνεχών παραμετρικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων πραγματοποιήθηκαν μέσω του μοντέλου της ανάλυσης συνδιακύμανσης (Analysis of Covariance, ANCOVA), κατά την οποία η κάθε ομάδα τοποθετούνταν ως ανεξάρτητος παράγοντας (Fixed Effect), η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στο τέλος της παρέμβασης, ως εξαρτημένη μεταβλητή (Dependent Variable) και η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στην αρχή της παρέμβασης και η % απώλεια σωματικού βάρους ως συμμεταβλητές (Covariate). Αντίστοιχα, οι συγκρίσεις των συνεχών μη παραμετρικών μεταβλητών, μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα υπολογίστηκε ο λογάριθμός τους (log). Τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται ως απολογαριθμοποιημένος αριθμός.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο ITT.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.4: ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

	Ομάδα Ελέγχου (ΟΕ) N=21		**Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) N=21**		**Ομάδα Μεσογειακού Τρόπου Ζωής (MTZ) N=21**		**P value**	**Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) ΜΔ vs ΟΕ**	**Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) MTZ vs ΟΕ**
	Αρχή παρέμβασης	**6μηνο**	**Αρχή παρέμβασης**	**6μηνο**	**Αρχή παρέμβασης**	**6μηνο**			
Σωματικό Βάρος (kg)	91 ± 16	89 ± 15	93 ± 13	87 ± 14	95 ± 14	90 ± 14	0,14	-2,7 (-6,1 , 0,68)	-1,90 (-5,3 , 1,5)
Απώλεια σωματικού βάρους (%)	-2,1 (-3,6, 0,3)		-5,4 (-8,2 , -3,3)		-6,3 (-8,2 , -1,1)		**0,01**	**-2,1 (-1,1 , -4,1)**	**-1,80 (-1,02 , -3,5)**
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m^2)	30,0 (28,2-33,1)	29,5 (27,8-32,9)	31,7 (27,4-33,6)	28,2 (25,9-31,5)	32,4 (28,4-31,5)	30,5 (26,6-33,3)	**0,008**	**-0,95 (-0,92 , -0,99)**	**-0,96 (-0,93 , 1)**
Μη φυσιολογική Περιφέρεια Μέσης (%)	90,5	76,2	76,2	47,6	71,4	61,9	0,36	0,42 (0,07 , 2,3)	0,29 (0,05 , 1,8)

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή διάμεσος (διατερταμοριακό εύρος, 25ο-75ο)

Οι συγκρίσεις των συνεχών παραμετρικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων, πραγματοποιήθηκαν μέσω του μοντέλου της ανάλυσης συνδιακύμανσης (Analysis of Covariance, ANCOVA), κατά την οποία η κάθε ομάδα τοποθετούνταν ως ανεξάρτητος παράγοντας (Fixed Effect), η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στο τέλος της παρέμβασης, ως εξαρτημένη μεταβλητή (Dependent Variable) και όπως μετρήθηκε στην αρχή της παρέμβασης ως συμμεταβλητή (Covariate). Αντίστοιχα, οι συγκρίσεις των συνεχών μη παραμετρικών μεταβλητών, μεταξύ των ομάδων πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα υπολγίστηκε ο λογάριθμός τους (log). Τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται ως απολογαριθμοποιημένος αριθμός.

Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μέθοδο ITT.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.5: ΚΛΙΝΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

	Ομάδα Ελέγχου (ΟΕ) N=21		**Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) N=21**		**Ομάδα Μεσογειακού Τρόπου Ζωής (MTZ) N=21**		**P value**	**Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) ΜΔ vs ΟΕ**	**Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) MTZ vs ΟΕ**
	Αρχή παρέμβασης	**6μηνο**	**Αρχή παρέμβασης**	**6μηνο**	**Αρχή παρέμβασης**	**6μηνο**			
ALT (IU/L)	44 (24-64)	44 (32-58)	51 (30-73)	34 (24-46)	54 (39-81)	32 (21-41)	0,09	-0,79 (-0,57 , 1,1)	-0,75 (-0,53 , 1,04)
GGT (IU/L)	64 (34-170)	73 (31-166)	65 (28-96)	40 (23-64)	71 (37-178)	51 (26-173)	0,24	-0,79 (-0,54 , 1,15)	-0,82 (-0,57 , 1,17)
AST (IU/L)	28 (20,5-36,5)	26 (22,5-35,5)	29 (23-38)	24 (20,5-30,5)	32 (27-43,5)	25 (21-34)	0,92	-0,96 (-0,74, 1,24)	-0,98 (-0,76 , 1,27)
Ηπατική Ακαμψία (kPa)	7,8 (5,5-10,9)	8,0 (6,1-11,1)	6,6 (5,5-9,8)	6,2 (5,1-9,9)	7,1 (6,3-8,8)	6,1 (5-7,6)	**0,002**	**-0,83 (-0,7, -0,98)**	**-0,78 (-0,66, -0,93)**
Ινσουλίνη (μL/ml)	11,9 (8-17)	11,0 (6,7-16,9)	16,2 (10-20,6)	11,9 (8,5-17,7)	14,0 (9-20)	12,0 (7,4-17)	0,78	-1,00 (-0,7, 1,4)	-0,90 (-0,7, 1,3)
Γλυκόζη (mg/dL)	91 ± 7,9	91 ± 8,3	92 ± 11,5	91 ± 13,6	89 ± 9,5	87 ± 9,4	0,75	0,70 (-7,2 , 5,7)	-1,90 (-8,2 , 4,3)
HOMA-IR	2,5 (1,7-4)	2,5 (1,4-3,6)	3,4 (1,9-5,1)	2,6 (1,7-4,1)	3,3 (2-5)	2,7 (1,4-3,8)	0,60	-1,10 (-0,74 , 1,5)	-0,90 (-0,6 , 1,3)

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005) Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέση τιμή ± τυπική απόκλιση (SD) ή διάμεσος (διατερταμοριακό εύρος, 25ο-75ο). Οι συγκρίσεις των συνεχών παραμετρικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων πραγματοποιήθηκαν μέσω του μοντέλου της ανάλυσης συνδιακύμανσης (Analysis of Covariance, ANCOVA), κατά την οποία η κάθε ομάδα τοποθετούνταν ως ανεξάρτητος παράγοντας (Fixed Effect), η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στο τέλος της παρέμβασης, ως εξαρτημένη μεταβλητή (Dependent Variable) και η μελετούμενη μεταβλητή, όπως μετρήθηκε στην αρχή της παρέμβασης και η % απώλεια σωματικού βάρους ως συμμεταβλητές (Covariate). Αντίστοιχα, οι συγκρίσεις των συνεχών μη παραμετρικών μεταβλητών, μεταξύ των ομάδων, πραγματοποιήθηκαν με τον ίδιο τρόπο, αφού πρώτα υπολογίστηκε ο λογάριθμός τους (log). Τα αποτελέσματά τους παρουσιάζονται ως απολογαριθμοποιημένος αριθμός. **ALT**: τρανσαμινάση της αλανίνης, **GGT**: γ-γλουταμυλ-τρανσπεπτιδάση **AST**: τρανσαμινάση του ασπαραγινικού οξέος, **HOMA-IR**: Ομοιοστατικό μοντέλο αξιολόγησης αντίστασης στην ινσουλίνη

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.6: ΔΕΙΚΤΕΣ ΟΞΕΙΔΩΤΙΚΟΥ ΣΤΡΕΣ ΤΩΝ ΕΘΕΛΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ

	Ομάδα Ελέγχου (ΟΕ) N=21		Ομάδα Μεσογειακής Δίαιτας (ΜΔ) N=21		Ομάδα Μεσογειακού Τρόπου Ζωής (MTZ) N=21		P value	Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) ΜΔ vs ΟΕ	Προσαρμοσμένη διαφορά (95% ΔΕ) MTZ vs ΟΕ
	Αρχή παρέμβασης	6μηνο	Αρχή παρέμβασης	6μηνο	Αρχή παρέμβασης	6μηνο			
TBARS (MDA nmol/ml)	3,60 (2,9, 4,6)	3,81 (3,16, 4)	2,97 (2,59, 4,0)	3,28 (2,82, 3,89)	3,46 (2,82, 4,0)	3,18 (2,75, 3,73)	0,23	-0,38 (-1,33, 0,57)	-0,66 (-1,609, 0,288)
% ΔTBARS	3,8 (-8,4, 51,7)		-9,53 (-20,2, 28,3)		-5,87 (-22,8, 22,1)		0,37		
% αλλαγή των TBARS	103,81 (91,5, 151,7)		90,40 (79,7, 128,3)		94,12 (77,15, 122,1)		0,37		

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005)

Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσος (διατερταμοριακό εύρος, 25ο-75ο).

Οι συγκρίσεις των συνεχών μη παραμετρικών μεταβλητών μεταξύ των τριών ομάδων, πραγματοποιήθηκαν μέσω του Kruskal-Wallis τεστ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.7: ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΩΝ TBARS ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΗΝ ΑΡΧΗ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.

Μεταβλητές	Spearman 's rho	p value
ALT (IU/L)	0,34	**0,008**
GGT (IU/L)	-0,67	-0,61
AST (IU/L)	0,07	0,56
Ηπατική Ακαμψία (kPa)	-0,80	0,54
8-ισοπροστάνια (ng/mmol CRE)	-0,17	0,89
Οξειδωμένα παράγωγα Γουανοσίνης (μg/mmol CRE)	-0,68	0,61

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005).

Η στατιστική συσχέτιση πραγματοποιείται μεταξύ μιας συνεχούς παραμετρικής και μιας συνεχούς μη παραμετρικής μεταβλητής. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Spearman's rho.

ΠΙΝΑΚΑΣ 4.8: ΣΥΣΧΕΤΙΣΕΙΣ ΤΩΝ TBARS ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΟΥΣ ΔΕΙΚΤΕΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.

Μεταβλητές	Spearman 's rho	p value
ALT (IU/L)	0,12	0,37
GGT (IU/L)	-0,14	0,31
AST (IU/L)	-0,005	0,97
Ηπατική Ακαμψία (kPa)	-0,18	0,17
8-ισοπροστάνια (ng/mmol CRE)	-0,01	0,92
Οξειδωμένα παράγωγα Γουανοσίνης (μg/mmol CRE)	-0,66	0,63

Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο 5% (το στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα σημειώνεται με έντονο μαύρο) (P<0.005).

Η στατιστική συσχέτιση πραγματοποιείται μεταξύ μιας συνεχούς παραμετρικής και μιας συνεχούς μη παραμετρικής μεταβλητής. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το κριτήριο Spearman's rho.

Κεφ. 5: Συζήτηση

Η NAFLD, αποτελεί μια ασθένεια η οποία εξελίσσεται ραγδαία τα τελευταία χρόνια, παράλληλα με τη παχυσαρκία. Όλο και περισσότερα περιστατικά εμφανίζονται καθημερινά και για το λόγο αυτό, έχει χτυπήσει ο κώδωνας του κινδύνου σχετικά με την εύρεση μεθόδων αντιμετώπισης της. Η προσκόλληση στη Μεσογειακή Δίαιτα, έχει εξετασθεί για την αποτελεσματικότητα της ως πρότυπο διατροφής στη βελτίωση χαρακτηριστικών της νόσου. Τα αποτελέσματα της νόσου είναι ποικίλα. Αναφορικά τα αποτελέσματα της νόσου σε βιοχημικό επίπεδο, το οξειδωτικό στρες φαίνεται να καταλαμβάνει σπουδαίο ρόλο. Μεταξύ των διαφόρων δεικτών οξειδωτικού στρες τα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης TBARS αποτελούν έναν μη ευαίσθητο δείκτη αλλά ο προσδιορισμός τους και η τροποποίηση τους είναι εξίσου σημαντικοί, με άλλους περισσότερο ευαίσθητους δείκτες οξειδωτικού στρες. Σκοπός, λοιπόν, της παρούσας τυχαιοποιημένης, μονά-τυφλής κλινικής μελέτης ήταν να διερευνήσει και να αξιολογήσει την αποτελεσματικότητα μίας εξάμηνης παρέμβασης, που είχε στόχο την τροποποίηση του τρόπου ζωής, είτε μέσω αύξησης της προσκόλλησης μόνο στη Μεσογειακή δίαιτα είτε μέσω υιοθέτησης ενός Μεσογειακού τρόπου ζωής, παράλληλα με απώλεια σωματικού βάρους, σε κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά ασθενών με NAFLD συγκριτικά με τη συνήθη κλινική αντιμετώπιση. Το βασικότερο ερώτημα της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας, ήταν κατά πόσο η τροποποίηση διαφόρων συνιστώσων του τρόπου ζωής, είναι ικανές να επηρεάσουν τους δείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα τα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης και συγκεκριμένα τα TBARS. Μετά το πέρας της παρέμβασης, φάνηκε σημαντική βελτίωση της ηπατικής ακαμψίας και βιοχημικών παραμέτρων στις ομάδες παρέμβασης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου, ανεξάρτητα από την απώλεια βάρους, ωστόσο δεν αναδείχθηκε σημαντική διαφορά στα επίπεδα TBARS μεταξύ των τριών ομάδων.

Σχετικά με τους στόχους της μελέτης, βρέθηκε ότι οι ομάδες παρέμβασεις αύξησαν σημαντικά το δείκτη MedDietScore, δηλαδή το δείκτη προσκόλλησης τους στη Μεσογειακής δίαιτας συγκριτικά με τη ομάδας ελέγχου. Το εύρημα αυτό, ίσως οφείλεται γεγονός στην αύξηση της κατανάλωσης τροφίμων, όπως τα φρούτα, τα όσπρια, οι ξήροι καρπού, τα μη επεξεργασμένα δημητριακά, καθώς και στη μείωση της κατανάλωσης τροφίμων, όπως σακχαρούχα αναψυκτικά, γλυκά, κόκκινο κρέας και επεξεργασμένα δημητριακά. Αναφορικά με τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας, μόνο στην ομάδα MTZ παρατηρήθηκε αύξηση η οποία,ωστόσο δεν φάνηκε σημαντικά διαφορετική μεταξύ των ομάδων ως προς το συνολικό επίπεδο φυσικής δραστηριότητας (PAL). Επίσης, σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων δεν παρατηρήθηκαν

ούτε ως προς τις συνήθεις ώρες ύπνου των ασθενών. Αξίζει όμως να σημειωθεί, ότι η μέση ημερήσια ανάπαυση (σιέστα) αυξήθηκε μόνο στην ομάδα MTZ συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου. Αναφορικά με την απώλεια σωματικού βάρους, και οι τρεις ομάδες φάνηκαν να επιτυγχάνουν απώλεια, ωστόσο στις ομάδες παρέμβασης ήταν σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (~6% στις ομάδες παρέμβασης έναντι ~2% στην ομάδα ελέγχου).

Σημαντικότερο εύρημα της παρούσας μελέτης αποτελεί η σημαντική βελτίωση στα ηπατικά χαρακτηριστικά των ομάδων παρέμβασης σε σχέση με την ομάδα ελέγχου και συγκεκριμένα στην ηπατική ακαμψία. Η τελευταία αξιολογήθηκε μέσω της ελαστογραφίας ήπατος και ήταν ανεξάρτητη από την απώλεια σωματικού βάρους. Παράλληλα, στο τέλος της παρέμβασης παρατηρήθηκε μία μείωση των επιπέδων ALT και GGT στις ομάδες παρέμβασης η οποία ωστόσο δεν αποδείχθηκε σταστικά σημαντική ($P>0.05$). Μάλιστα, αξιοσημείωτο είναι το γεγονός, ότι οι παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα της ALT και στα επίπεδα ηπατικής ακαμψίας παρέμειναν σημαντικές ακόμα και όταν λήφθηκε υπόψη η απώλεια βάρους ως συγχυτικός παράγοντας. Οι δύο ομάδες εντατικής παρακολούθησης δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ τους παρά μόνο τάσεις ως προς τη δραστικότητα της ALT και τα επίπεδα ηπατικής ακαμψίας. Τα ευρήματα σχετικά με τη θετική επίδραση της Μεσογειακής δίαιτας στα ηπατικά χαρακτηριστικά έχουν επιβεβαιωθεί από περιορισμένο αριθμό παλαιότερων μελετών. Πιο συγκεκριμένα, σε μια τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, η οποία πραγματοποιήθηκε στην Αυστραλία μεταξύ 12 ασθενείς με NAFLD, αποδείχθηκε πως η αύξηση της προσκόλλησης σε μία Μεσογειακού τύπου δίαιτα συγκριτικά με μία δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπίδια για διάστημα 6 εβδομάδων, οδήγησε σε σημαντική βελτίωση του βαθμού ηπατικής στεάτωσης και ίνωσης. Η μελέτη αυτή παρουσιάζει ιδιαίτερη σημασία, καθώς πραγματοποιήθηκε με απουσία απώλειας σωματικού βάρους (Ryan et al, 2013). Επιπρόσθετα, στη τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή της Katsagoni και τους συνεργάτες της το 2016, συμμετείχαν 28 ενήλικες, αυξημένου σωματικού βάρους και πάσχοντες NAFLD οι οποίοι για 6 μήνες ακολούθησαν είτε μεσογειακή διατρροφή, είτε συμβατική δίαιτα με απλές γραπτές συστάσεις. Μετά από 6 μήνες, η ομάδα παρέμβασης συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση σωματικού βάρους και σημαντική μεγαλύτερη βελτίωση των επιπέδων ALT (Katsagoni et al., 2016). Η πρόσφατη διασταυρούμενη κλινική δοκιμή, επέδειξε ότι η Μεσογειακή Δίαιτα όχι μόνο οδήγησε 20 ασθενείς NAFLD σε σημαντική μείωση ηπατικών ενζύμων, αλλά η μείωση αυτή διατηρήθηκε και 16 εβδομάδες μετά από μία

δίαιτα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος (Biolato et al., 2019). Επιπρόσθετα, στην μελέτη των Misciagna και συν. (Misciagna et al., 2016), αναδείχθηκε υπερηχογραφική βελτίωση της νόσου μετά από αύξηση της προσκόλλησης σε μία ad libidum χαμηλού γλυκαιμικού δείκτη μεσογειακή δίαιτα, σε σχέση με μία δίαιτα ελέγχου, βασισμένη στις οδηγίες του Εθνικού Ινστιτούτου Έρευνας Τροφίμων και Διατροφής της Ιταλίας. Τέλος, στη πρόσφατη κλινική δοκιμή των Trovato και συν. φάνηκε πως η αύξηση της προσκόλλησης στη Μεσογειακή Δίαιτα για χρονικό διάστημα μηνών, από 90 μη διαβητικούς ασθενείς με NAFLD, συσχετίστηκε με βελτίωση των επιπέδων ενδοηπατικού λίπους (Trovato et al, 2014).

Για την αξιολόγηση της πιθανής συσχέτισης των παρεμβάσεων σε δείκτες οξειδωτικού στρες, μετρήθηκαν τα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης TBARS. Συμπερασματικά όμως δεν βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Πιθανή εξήγηση των αποτελεσμάτων αυτών, ίσως αποτελεί το γεγονός ότι τα άτομα της μελέτης ήταν νέοι πάσχοντες και η νόσος δεν είχε προλάβει ακόμα να εξελιχθεί σε μεταγενέστερα στάδια. Παράλληλα όταν μελετήθηκαν τυχόν συσχετίσεις μεταξύ των τιμών TBARS στην αρχή της παρέμβασης (baseline) με τους διάφορους δείκτες της νόσου φάνηκε να υπάρχει μια σημαντική συσχέτιση μόνο μεταξύ TBARS και της δραστικότητας της αμινοτρανσφεράση της αλανίνης (ALT) στο χρόνο αυτό. όμως μετά από τη μελέτη συσχετίσεων μεταξύ των τιμών TBARS στο τέλος της παρέμβασης (εξάμηνο) με τους διάφορους δείκτες της νόσου δεν βρέθηκε να υπάρχει καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ TBARS και διαφόρων τιμών στο χρόνο αυτό. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των τριών ομάδων. Τα αποτελέσματα αυτά δεν μπορούν να συγκριθούν, καθώς κατά την αναζήτηση της βιβλιογραφίας δεν φάνηκε να έχει διεξαχθεί αντίστοιχη μελέτη παρέμβασης Μεσογειακής δίαιτας ή τρόπου ζωής σε δείγμα ασθενών με NAFLD που να μελετάει το συγκεκριμένο δείκτη οξειδωτικού στρες.

Παρόλα αυτά, υπάρχουν δεδομένα για θετική συσχέτιση της Μεσογειακής διατροφής και του Μεσογειακού τρόπου ζωής με βελτιώσεις σε άλλα επίπεδα οξειδωτικού στρες όπως τα επιπέδα οξειδωμένων γουανοσινών και 8-ισοπροστανίων. Οι βελτιώσεις αυτές μεταξύ των ομάδων ήταν ανεξάρτητες της απώλειας βάρους (Katsagoni et al., 2016). Αξίζει να σημειωθεί ότι οι δύο προαναφερόμενοι δείκτες είναι πιο ευαίσθητοι και ειδικοί δείκτες οξειδωτικού στρες για την in vivo αξιολόγηση της υπεροξείδωσης των λιπιδίων και της ανίχνευσης αλλαγών στα επίπεδα ROS συγκριτικά με τα προϊόντα TBARS και ίσως αυτό αποτελεί μία εξήγηση των αποτελεσμάτων. Αναφορικά με τη Μεσογειακή Δίαιτα, βρέθηκε μία πρόσφατα δημοσιευμένη μελέτη παρατήρησης 24 εβδομαδών, που πραγματοποιήθηκε σε 44 ενήλικες πάσχοντες NAFLD. Στη

μελέτη αυτή αποδείχθηκε ότι η προσκόλληση σε μια δίαιτα Μεσογειακού Τύπου, συσχετίστηκε αρνητικά με τα επιπέδα ουρικού οξέος. Ένα ακόμα εύρημα της μελέτης, ήταν μία μη σημαντική μείωση των επιπέδων οξειδωμένης LDL (Kaliora et al., 2019).

Αναφορικά με τα επίπεδα HOMA-IR, ο οποίος αποτελεί δείκτη αντίστασης στην ινσουλίνη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ομάδων. Αξίζει να αναφερθεί, ότι μετά το πέρας της παρέμβασης, παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση των επιπέδων HOMA-IR μόνο εντός των ομάδων παρέμβασης. Είναι πιθανόν, η χρήση άλλων δεικτών, περισσότερο ειδικών στις μεταβολές των επιπέδων ινσουλινοαντίστασης και ινσουλινοευαισθήσιας, όπως είναι οι μέθοδοι «*Hyperglycemic clamp* ή *Hyperinsulinemic-euglycemic clamp»,* να προσδιόριζαν καλύτερα τις παρατηρούμενες αλλαγές στα επίπεδα ινσουλινοαντίστασης στη παρούσα μελέτη (Tam et al., 2012).

Η μελέτη αυτή εμφανίζει ορισμένους περιορισμούς. Αρχικά, κατά την αξιολόγηση των ασθενών στην αρχή της παρέμβασης φάνηκε ότι η ομάδα MTZ παρουσίαζε μεγαλύτερο δέικτη προσκόλλησης στη Μεσογειακή Δίαιτα , σε σχέση με τι άλλες δύο ομάδες (MedDietScore). Το γεγονός αυτό δρα επιβαρυντικά στα αποτελέσματα της παρέμβασης σχετικά με τις αλλαγές στο δείκτη αυτό. Παράλληλα δεν μπορεί να παραβλεφθεί, ο σχετικά μεγάλος αριθμός ατόμων, ο οποίος εγκατέλειψε την ομάδα ελέγχου (n=7) πριν την ολοκλήρωση της εξάμηνης δοκιμής. Μάλιστα, οι ασθενείς παρουσίαζαν σημαντικά υψηλότερο βαθμό ηπατικής ακαμψίας και υψηλότερο ΔΜΣ συγκριτικά με τα υπολοίπα άτομα της ΟΕ. Η σοβαρότητα της κατάστασης τους, ίσως αποτέλεσε αίτιο εγκατάληψης τους, καθώς οι ασθενείς αναζητούσαν μια πιο ενταντική παρέμβαση. Ωστόσο, η ανάλυση της πλειονότητας των δεδομένων πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου «πρόθεση για θεραπεία», συμπεριλαμβάνοντας όλο το δείγμα, με σκοπό την αποφυγή απώλειας στατιστικής ισχύος κατά τη διαδικασία εξαγωγής των αποτελεσμάτων. Εντούτοις, αναφορικά με με τους δείκτες οξειδωτικού στρες, οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω της μεθόδου «βάσει πρωτοκόλλου», κατά την οποία δεν συμπεριλήφθηκαν οι εθελοντές, που εγκατέλειψαν την ομάδα ελέγχου. Το γεγονός αυτό, καθιστά τον αριθμό της ομάδας μικρό και πιθανώς να συμβάλλει στην απώλεια στατιστικής ισχύος. Περιορισμό επίσης της μελέτης αποτελεί όπως ήδη αναφέρθηκε, η απουσία ασθενών με χρόνια νόσο NAFLD, καθώς είναι πιθανόν τα λίγα έτη νοσηρότητας να επηρεάζουν τα αποτελέσματα της μελέτης. Οι δείκτες οξειδωτικού στρες αυξάνονται κυρίως σε πιο σοβαρά στάδια της νόσου, καθώς αποτελούν το δεύτερο χτύπημα της νόσου, μετά την ινσουλινοαντίσταση η οποία εμφανίζεται ως αρχικό χτύπημα. Παράλληλα είναι αλήθεια ότι τα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης TBARS είναι

λιγότερο ευαίσθητοι δείκτες, σε σχέση με άλλους πιο ουσιαστικούς δείκτες οξειδωτικού στρες, γεγονός που προσθέτει στον προσδιορισμό τους μια παραπάνω δυσκολία. Επιπρόσθετα, η χρήση του FFQ, το οποίο περιλαμβάνει το σφάλμα ανάκλησης, μπορεί να αποτελέσει επιπλέον περιορισμό. Τέλος, η χρήση της ελαστογραφίας, ως μέθοδο αξιολόγησης της βαρύτητας της νόσου, αντί της μεθόδου αναφοράς, είναι ένα ακόμα επιβαρυντικός παράγοντας της μελέτης. Ωστόσο η μέθοδο της ελαστογραφίας έχει φανεί πως μπορεί να αποτελέσει ένα αρκετά ακριβές εργαλείο (Papagianni et al., 2015). Παρόλα αυτά, η παρούσα μελέτη έχει σημαντικά πλεονεκτήματα. Ως μονά-τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, μας επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων αιτίου-αποτελέσματος. Αξίζει να σημειωθεί, πως αποτελεί την πρώτη κλινική δοκιμή, η οποία εξέτασε την αποτελεσματικότητα παρεμβάσεων, που περιλαμβάνουν τη Μεσογειακή Δίαιτα και ένα συνολικά Μεσογειακό τρόπο ζωής, παράλληλα με απώλεια βάρους, σε κλινικά χαρακτηριστικά και βιοχημικούς δείκτες, συμπεριλαμβανομένων των δεικτών οξειδωτικού στρες TBARS.

Συμπερασματικά, η εξάμηνη μονά- τυφλή τυχαιοποιημένη κλινική δοκιμή, κατέληξε στο γεγονός ότι η προσκόλληση στη Μεσογειακή δίαιτα και στον Μεσογειακό τρόπο ζωής, παράλληλα με απώλεια σωματικού βάρους, είναι ικανή να βελτιώσει σημαντικά τα επίπεδα της ηπατικής ακαμψίας ασθενών με NAFLD. Τα ηπατικά ένζυμα και συγκεκριμένα τα ένζυμα ALT και GGT παρουσίασαν πτωτικές τάσεις, συγκριτικά με τη συνήθη κλινική αντιμετώπιση. Ωστόσο, δεν αναδείχθηκαν σημαντικές διαφορές στα προϊόντα λιποειδικής οξείδωσης TBARS μεταξύ των ομάδων της μελέτης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αντωνοπούλου Σ. και Δημόπουλος ΚΑ. *Βασική Βιοχημεία*. 2η έκδοση, με βελτιώσεις και προσθήκες. Αθήνα, 2009.

Γιαννακοπούλου Ε. Οξειδωτικό Στρες - Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί Κλινική Σημασία. *Αρχεία Ελληνικής Ιατρικής.* 2009, σσ. 26(Ι):23-35.

Κατσαγώνη Χ. Η Επίδραση του Μεσογειακού Τρόπου Ζωής σε Βιοχημικά και Κλινικά Χαρακτηριστικά Ασθενών με Μη-Αλκοολική Λιπώδη Νόσο του Ήπατος. *Διδακτορική Διατριβή.* Αθήνα, 2016

Abdelmalek MF., Suzuki A., Guy C., Unalp-Arida A., Colvin R., Johnson RJ., Diehl, AM. and Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research N. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2010, 51**,** 1961-71.

Abenavoli L. and Beaugrand M. Transient elastography in non-alcoholic fatty liver disease. *Ann Hepatol.* 2012, 11**,** 172-8.

Abete I., Parra D. and Martinez JA. Energy – restricted diets based on a distinct food selection affecting the glycemic index induce different weight loss and oxidative response. *Clin Nutr.* 2008, 27(4): 545 – 51.

Adam Rinde ND. Liposomal Curcumin for Non-alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *Sound Integrative Health.* 2018.

Adriano LS., Sampaio HA., Arruda SP., Portela CL., De Melo MLP., Carioca AA. and Soares NT. Healthy dietary pattern is inversely associated with non-alcoholic fatty liver disease in elderly. *Br J Nutr.* 2016, 115**,** 2189-95.

Ahn J., Jun DW., Lee HY. and Moon JH. Critical appraisal for low-carbohydrate diet in nonalcoholic fatty liver disease: Review and meta-analyses. *Clinical Nutrition.* 2018, 09, 022 .

Alissa EM. and Ferns, GA. Dietary Fruits and Vegetables and Cardiovascular Diseases Risk. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2015, 00–00.

Allard JP., Aghdassi E., Mohammed S., Raman M., Avand G., Arendt Bm., Jalali P., Kandasamy T., Prayitno N., Sherman M., Guindi M., Ma DW. and Heathcote JE. Nutritional assessment and hepatic fatty acid composition in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a cross-sectional study. *J Hepatol.* 2008,48**,** 300-7.

Anzenbacher P., Anzenbacherova E., Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci*. 2001, 58(5 – 6): 737 – 47.

Arslanow A., Teutsch M., Walle H., Grnhage F., Lammert F. and Stokes CS. Short-Term Hypocaloric High-Fiber and High-Protein Diet Improves Hepatic Steatosis Assessed by Controlled Attenuation Parameter. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2016, 7, e176.

Assy N., Nasser G., Kamayse I., Nseir W., Beniashvili Z., Djibre A. and Grosovski M. Soft drink consumption linked with fatty liver in the absence of traditional risk factors. *Can J Gastroenterol.* 2008, 22**,** 811-6.

Attar BM. and Van Thiel DH. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. *Scientific World Journal,* 2013**,** 481893.

Bach – Faig A., Berry EM. et al., Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr.* 2011; 14(12A): 2274 – 2284.

Bach-Faig A., Berry EM., Lairon D., Reguant J., Trichopoulou A., Dernini, S .et al. Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates*.* ***Public Health Nutrition,*** **2011, 14(12A), 2274–2284.**

Baldrick FR., Elborn JS. et al. Effect of fruit and vegetable intake on oxidative stress and inflammation in COPD: a randomized controlled trial. *Eur Respir J.* 2012, 39(6): 1377 – 84.

Baskol G., Baskol M. and Kocer D. Oxidative stress and antioxidant defenses in serum of patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Clin Biochem.* 2007, 40(11): 776 – 80.

Bedossa P. Histological Assessment of NAFLD. *Dig Dis Sci.* 2016, 61**,** 1348-55.

Benedict M. and Zhang X. Non-alcoholic fatty liver disease: An expanded review. *World J Hepatol.* 2017, 9**,** 715-732.

Benzie IF. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. *Int J Food Sci Nutr.* 1996, 47(3): 233 – 61.

Bergendi L. et al. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.* 1999, σσ. 65(18-19):1865-74.

Bezerra Duarte SM., Faintuch J., Stefano JT., Sobral De Oliveira MB., De Campos Mazo DF., Rabelo F., Vanni D., Nogueira MA., Carrilho FJ. and Marques Souza De Oliveira CP. Hypocaloric high-protein diet improves clinical and biochemical markers in patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Nutr Hosp.* 2014,29**,** 94-101.

Bhat AH., Dar KB., Anees S., Zargar MA., Masood A., Sofi MA., Ganie SA. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2015. 74:101 – 110.

Biolato M., Manca F., Marrone G., Cefalo C., Racco S., Miggiano GA., Valenza V., Gasbarrini A., Miele L. and Grieco A. Intestinal permeability after Mediterranean diet and low-fat diet in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2019, 28;25(4):509-520.

Birerdinc A., Stepanova M., Pawloski L. and Younossi ZM. Caffeine is protective in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012, 35**,** 76-82.

Bjermo H., Iggman D., Kullberg J., Dahlman I., Johansson L.,Persson L., Berglund J., Pulkki K., Basu S., Uusitupa M., Rudling M., Arner P., Cederholm T., Ahlstrom H. and Riserus U. Effects of n-6 PUFAs compared with SFAs on liver fat, lipoproteins, and inflammation in abdominal obesity: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2012, 95, 1003-12.

Blachier M., Leleu H., Peck-Radosavljevic M., Valla D. and Roudot-Thoraval F. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. *J Hepatol.* 2013, 58, 593-608.

Bradford V., Dillon J. and Miller M. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepat Med.* 2014, 6**,** 1-10.

Bravo E., Palleschi S. et al. Coenzyme q metabolism is disturbed in high fat diet – induced non alcoholic fatty liver disease in rats. *Int J Mol Sci.* 2012, 13(2): 1644 – 57.

Brea A. and Puzo J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol.* 2013, 167, 1109-17.

Brons C., Jensen CB., Storgaard H., Hiscock NJ., White A., Appel JS., Jacobsen S., Nilsson E., Larsen CM., Astrup A., Quistorff B. and Vaag A. Impact of short-term high-fat feeding on glucose and insulin metabolism in young healthy men. *J Physiol.* 2009, 587**,** 2387-97.

Browning JD., Szczepaniak LS. et al. 2004. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology.* 2004, 40, 1387-95.

Buettner GR. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha – tocopherol, and ascorbate. *Arch Biochem Biophys*. 1993, 300(2): 535 – 43.

Buzzetti E., Pinzani M. and Tsochatzis EA. The multiple-hit pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Metabolism.* 2016*,* 65**,** 1038-48.

Caballeria L., Pera G., Auladell MA., Toran P., Munoz L., Miranda D., Aluma A., Casas Jd., Sanchez C. et al. Prevalence and factors associated with the presence of nonalcoholic fatty liver disease in an adult population in Spain. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2010, 22**,** 24-32.

Cadenas E. and Sies H. The lag phase. *Free Radic Res.* Jun 1998, σσ. 8(6):601-9.

Caro-Sabido EA., and Larrosa-Haro A. Efficacy of dietary intervention and physical activity in children and adolescents with nonalcoholic fatty liver disease associated with obesity: A scoping review. *Revista de Gastroenterología de México (English Edition).* 2019, 84(2), 185–194.

Catania AS., de Barros CR. and Ferreira SR. Vitamins and minerals with antioxidant properties and cardiometabolic risk: controversies and perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009, 53(5): 550 – 9.

Ceccarelli S., Panera N., Mina M., Gnani D., De Stefanis C., Crudele A., Rychlicki C., Petrini S., Bruscalupi G., Agostinelli L., Stronati L., Cucchiara S., Musso G., Furlanello C., Svegliatibaroni G., Nobili V. and Alisi A. LPS-induced TNF-alpha factor mediates pro-inflammatory and pro-fibrogenic pattern in non-alcoholic fatty liver disease. *Oncotarget.* 2015, 6**,** 41434-52.

Chae HZ., Chung SJ. and Rhee SG. Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast. *J Biol Chem.* 1994, 269:27670–27678.

Chalasani N., Deeg MA. and Crabb DW. Systemic levels of lipid peroxidation and its metabolic and dietary correlates in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol.* 2004, 99(8): 1497 – 502.

Chalasani N., Gorski JC. et al. Hepatic cytochrome P4502E1 activity in nondiabetic patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003, 37(3): 544 – 50.

Chalasani N., Younossi Z., Lavine JE., Diehl AM., Brunt EM., Cusi K., Charlton M. and Sanyal AJ. American Association For The Study Of Liver, D., American College Of, G. & American Gastroenterological, A. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. *Am J Gastroenterol.* 2012, 107**,** 811-26.

Chao L., Xiangping L., Xinhua L., Lihui S., Mei W. and Jiaojiao G. Research progresses of exercise intervention methods in non- alcoholic fatty liver disease. *The journal of the International Research Group on Biochemistry of Exercise.* 2018.

Cheung O, Sanyal AR. Abnormalities of lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis*. 2008, 28:351-359.

Colak Y., Ozturk O. et al. SIRT1 as apotential therapeutic target for treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Med Sci Monit.* 2011, 17(5): HY5 – 9.

Compare D., Coccoli P., Rocco A., Nardone OM., De Maria S., Carteni M. and Nardone G. Gut--liver axis: the impact of gut microbiota on non alcoholic fatty liver disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2010, 22**,** 471-6.

Cortez-Pinto H., Jesus L., Barros H., Lopes C., Moura MC. and Camilo ME. How different is the dietary pattern in non-alcoholic steatohepatitis patients? *Clin Nutr.* 2006, 25**,** 816-23.

Crespo J., Cayon A., Fernandez-Gil P., Hernandez-Guerra M., Mayorga M., Dominguez-Diez A., Fernandez-Escalante J. and Pons-Romero F. Gene expression of tumor necrosis factor alpha and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology.* 2001, 34**,** 1158-63.

Crujieras AB., Parra MD. et al. A role for fruit content in energy – restricted diets in improving antioxidant status in obese women during weight loss. *Nutrition.* 2006, 22: 593 – 9.

Crujeiras AB., Parra D et al. A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects. *Free Radic Res.* 2007, 41(4): 498 – 506.

Czerska M. et al. Today's Oxidative stress markers. *Med Pr.* 2015, σσ. 66(3):393-405.

Daugherity EK., Balmus G. et al. The DNA damage checkpoint protein ATM promotes hepatocellular apoptosis and fibrosis in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *Cell Cycle.* 2012,11(10): 1918 – 28.

Davis SM. and Pennypacker KR. Targeting antioxidant enzyme expression as a therapeutic strategy for ischemic stroke. *Neurochemistry International.* 2016, 1 – 10.

Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002, 16(5): 663 – 78.

Day CP. and James OFW. Steatohepatitis: A tale of two “hits? *Gastroenterology.* 1998, 114**,** 842-845.

De Alwis N and Day CP. Genetics of alcoholic liver disease and nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2007, 27:44-54.

De Assis AM., Rech A. et al. Ω3 –Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. *Mol Cell Biochem.* 2012, 361(1 – 2): 151 – 60.

De Faria Ghetti F., Oliveira DG., de Oliveira JM., de Castro Ferreira VV., Cesar DE. and Moreira APB. Effects of Dietary Intervention on Gut Microbiota and Metabolic-Nutritional Profile of Outpatients with Non-Alcoholic Steatohepatitis: a Randomized Clinical Trial. *Journal of Gastrointestinal & Liver Diseases.* 2019, Vol. 28 Issue 3, p279-287. 11p.

De Piano A., Prado WL., Caranti DA., Siqueira KO., Stella SG., Lofrano M., Tock L. Metabolic and nutritional profile of obese adolescents with nonalcoholic fatty liver disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007, 44**,** 446-52.

Demopoulos C., Karantonis H., Antonopoulou S. Platelet activating factor — a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol.* 2003, 105(11):705-16.

Devasagayam TP, et al. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospect. *J Assoc Physicians India.* Oct 2004, σσ. 52:794-804.

Dinu M., Pagliai G., Casini A. and Sofi F. Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European Journal of Clinical Nutrition.* 2017, 72(1), 30–43.

Domingo JL. Omega – 3 fatty acids and the benefits of fish consumption: is all that glitters gold? *Environ Int.* 2007, 33(7): 993 – 8.

Dongiovanni P., Petta S., Maglio C., Fracanzani AL., Pipitone R., Mozzi E., Motta BM., Kaminska D. et al. Transmembrane 6 superfamily member 2 gene variant disentangles nonalcoholic steatohepatitis from cardiovascular disease. *Hepatology.* 2015, 61**,** 506-14.

Dowman JK., Tomlinson JW. and Newsome PN. Pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. 2010, *QJM,* 103**,** 71-83.

Dowman JK. Tomlinson JW. and Newsome PN. Systematic review: the diagnosis and staging of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011, 33**,** 525-40.

EASL-EASD-EASO Clinical Practice Guidelines for the Management of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Obes Facts.* 2016, 9**,** 65-90.

Eckard C., Cole R., Lockwood J., Torres DM., Williams CD., Shaw JC. and Harrison SA. Prospective histopathologic evaluation of lifestyle modification in nonalcoholic fatty liver disease: a randomized trial. *Therap Adv Gastroenterol. 2013,*6, 249-59.

Elias MC., Parise ER., De Carvalho L., Szejnfeld D. and Netto JP. Effect of 6-month nutritional intervention on non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition.* 2010, 26**,** 1094-9.

Elisabetta C., Tommaso M. and Andrea G. Pathogenesis of alcoholic liver disease: Role of oxidative metabolism. *World J Gastroenterol.* 21 Dec 2014, σσ. 20(47): 17756-17772.

Enriquez A., Leclercq I et al. Altered expression of hepatic CYP2E1 and CYP4A in obese, diabetic, ob/ob mice and fa/fa Zucker rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999, 255(2): 300 – 6.

Fang YZ., Yang S. and Wu G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* Oct 2002, σσ. 18(10):872-9.

Fazel Y., Koenig AB., Sayiner M., Goodman ZD. and Younossi ZM. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease. *Metabolism.* 2016*,* 65**,** 1017-25.

Feldstein AE. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2010, 30**,** 391-401.

Ferre N., Martinez – Clemente M. et al. Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE – deficient mice: potential involvement of oxysterols. *Am J Physiol Liver Physiol.* 2009, 296(3): G553 – 62.

Fito M., de la Torre R et al. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounts in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita.* 2007, 43(4): 375 – 81.

Fragopoulou E., Xanthopoulou M., Kalathara K., Melachroinou S., Arampatzi-Menenakou K., Antonopoulou S. and Yannakoulia M. Wine consumption reduced postprandial platelet sensitivity against platelet activating factor in healthy men. *Eur J Nutr.* 2017, 56(4):1485-1492

Gambino R., Cassader M. et al. Polymorphism in microsomal triglyceride transfer protein: a link between liver disease and atherogenic postprandial lipid profile in NASH? *Hepatology*. 2007, 45(5): 1097 – 107.

Garcia MC., Amankwa – Sakyi M. and Flynn TJ. Cellular glutathione in fatty liver in vitro models. *Toxicol In Vitro.* 2011, 25(7): 1501 – 6.

Gavahian M. et al. Health benefits of olive oil and its components: Impact on gut microbiota, and prevention of the risk of development of noncommunicable diseases. *Trends in Food Science & Technology* . March, 2019.

Gerber L., Otgonsuren M., Mishra A., Escheik C., Birerdinc A., Stepanova M. and Younossi Z. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is associated with low level of physical activity: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012a, 36**,** 772-81.

Georgoulis M., Fragopoulou E., Kontogianni M., Margariti A., Boulamatsi O., Detopoulou P., Tiniakos D., Zafiropoulou R. and Papatheodoridis G.·Blood redox status is associated with the likelihood of nonalcoholic fatty liver disease irrespectively of diet's total antioxidant capacity. *Nutr Res.* 2015, 35(1):41-8.

Georgoulis M., Kontogianni MD, Tileli N., Margariti A., Fragopoulou E., Tiniakos D., Zafiropoulou R. and Papatheodoridis G. The impact of cereal grain consumption on the development and severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Eur J Nutr.* 2014, 53**,** 1727-35.

Georgoulis M., Kontogianni MD, Margariti A., Fragopoulou E., Tiniakos D., Zafiropoulou R. and Papatheodoridis G. Associations between dietary intake and the presence of the metabolic syndrome in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hum Nutr Diet.* 2015, 28**,** 409-15.

Ghafourifar P. and Cadenas E. Mitochondrial nitric oxide synthase. *Trends Pharmacol Sci.* Apr 2005, σσ. 26(4):190-5.

Giammarioli S., Filesi C. and Sanzini E. Oxidative stress markers: specificity and measurement techniques. *Ann Ist Super Sanita.* 1999, σσ. 35(4):563-76.

Glen J., Floros L., Day C., Pryke R. and Guideline Development G. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): summary of NICE guidance. *BMJ.* 2016, 354**,** i4428.

Halliwell B. Antioxidant defense mechanisms: From the beginning to the end. *Free Radical Research.* 1999, σσ. 31:261–272.

Halliwell B. and Gutteridge JMC. Free Radicals. *Biology and Medicine*. 2nd Edition, Clarendon Press. Oxford. 1989, 22-85.

Hardwick RN., Fischer CD. et al. Diversity in antioxidant response enzymes in progressive stages of human non-alcoholic fatty liver disease. *Drug Metab Dispos.* 2010, 38(12): 2293 – 301.

Haque M., Sanyal AJ. The metabolic abnormalities associated with nonalcoholic fatty liver disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2002, 16(5): 709 -31.

Haukeland JW., Damas JK. et al. Systematic inflammation in nonalcoholic fatty liver disease is characterized by elevated levels of CCL2. *J Hepatol.* 2006, 44(6): 1167 – 74.

Hekmatdoost A., Shamsipour A., Meibodi M., Gheibizadeh N., Eslamparast T. and Poustchi H. Adherence to the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) and risk of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 2016, 1-6.

Hernaez R., Mclean J., Lazo M., Brancati FL., Hirschhorn JN., Borecki LB., Harris TB., Genetics Of Obesity-Related Liver Disease C., Nguyen T. Association between variants in or near PNPLA3, GCKR, and PPP1R3B with ultrasound-defined steatosis based on data from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013, 11**,** 1183-1190 e2.

Hermsdorff HH., Barbosa KB. et al. Vitamin C and fibre consumption from fruits and vegetables improves Oxidative stress markers in healthy young adults. *Br J Nutr.* 2012, 107(8): 1119 – 27.

Hsieh SD., Muto T., Murase T., Tsuji H. and Arase Y. Association of short sleep duration with obesity, diabetes, fatty liver and behavioral factors in Japanese men. *Intern Med.* 2011, 50**,** 2499-502.

Ho E., Galougani KK., Liu CC., Bhindi R. and Figtree GA. Biological markers of Oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology.* 2013, 1:483 – 491.

Hossain N., Kanwar P. and Mohanty SR. A Comprehensive Updated Review of Pharmaceutical and Nonpharmaceutical Treatment for NAFLD. *Gastroenterol Res Pract.* 2016**,** 7109270.

Huber Y., Pfirrmann D., Gebhardt I., Labenz C., Gehrke N., Straub BK. and Schattenberg, JM. Improvement of non-invasive markers of NAFLD from an individualised, web-based exercise program. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 2019.

Ikizler M., Ovali C. et al. Protective effect of resveratrol in ischemia – reperfusion injury of skeletal muscle: A clinically relevant animal model for lower extremity ischemia. *Clin J Physiol.* 2006, 49(4): 204 – 9.

Imaizumi H., Takahashi A., Tanji N., Abe K., Sato Y., Anzai Y., Watanabe H. and Ohira H. The Association between Sleep Duration and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease among Japanese Men and Women. *Obes Facts.* 2015, 8**,** 234-42.

Jia Q., Xia Y., Zhang Q., Wu H., Du H., Liu L., Wang C., Shi H., Guo X., Liu X., Li C., Sun S., Wang X., Zhao H., Song K., Huang G., Wu Y., Cui N. and Niu K. Dietary patterns are associated with prevalence of fatty liver disease in adults. *Eur J Clin Nutr.* 2015, 69**,** 914-21.

Kaliora AC., Gioxari A., Kalafati IP., Diolintzi A., Kokkinos A. and Dedoussis GV. The Effectiveness of Mediterranean Diet in Nonalcoholic Fatty Liver Disease Clinical Course: An Intervention Study. *Journal of Medicinal Food.* 2019, 22(7), 729–740.

Kang H., Greenson JK., Omo JT., Chao C., Peterman D., Anderson L., Foess-Wood L., Sherbondy MA. and Conjeevaram HS. Metabolic syndrome is associated with greater histologic severity, higher carbohydrate, and lower fat diet in patients with NAFLD. *Am J Gastroenterol.* 2006,101**,** 2247-53.

Kadiiska MB., Gladen BC. et al. Biomarkers of Oxidative stress study II: are oxidation products of lipids, proteins, and DNA markers of CCI4 poisoning? *Free Radic Biol Med.* 2005, 38(6): 698 – 710.

Kalia HS. and Gaglio PJ. The Prevalence and Pathobiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients of Different Races or Ethnicities. *Clin Liver Dis,* 2016, 20, 215-24.

Karantonis H., Antonopoulou S. and Demopoulos C. Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others. *J Agric Food Chem.* 2002, 27;50(5):1150-60.

Katsagoni CN., Egkomiti A., Papageorgiou M., Ioannidou P., Fragopoulou E., Papatheodoridis G. and Kontogianni M. Improvement in liver function after an intervention based on the Mediterranean diet in patients with non alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Clin Nutr ESPEN.* 2016, 13**,** e57.

Katsagoni CN., Papatheodoridis G., Papageorgiou M., Ioannidou P., Deutsch M., Alexopoulou A., Papadopoulos N., Fragopoulou E., Georgoulis M. and Kontogianni M. Associations Between Lifestyle Characteristics and the Presence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Case-Control Study. *Metab Syndr Relat Disord.* 2017a, 15**,** 72-79.

Katsagoni CN., Papatheodoridis G., Papageorgiou M., Georgoulis M., Panagiotakos D., Fragopoulou E. and Kontogianni M. Effects of lifestyle interventions on clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. *Metabolism.* 2017b, 68, 119-132.

Katsagoni CN., Papatheodoridis G., Papageorgiou M., Ioannidou P., Deutsch M., Alexopoulou A., Papadopoulos N., Fragopoulou E. And Kontogianni M. A "healthy diet-optimal sleep" lifestyle pattern is inversely associated with liver stiffness and insulin resistance in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Appl Physiol Nutr Metab.* 2017c, 42**,** 250-256.

Katsagoni CN., Papatheodoridis G., Papageorgiou M., Ioannidou P., Deutsch M., Alexopoulou A., Papadopoulos N., Fragopoulou E. and Kontogianni M. Improvements in clinical characteristics of patients with non-alcoholic fatty liver disease, after an intervention based on the Mediterranean lifestyle: a randomised controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition.* 2018, 120, 164–175.

Keating SE., Hackett DA., George J. and Johnson NA. Exercise and non-alcoholic fatty liver disease: a systematic review and meta-analysis. *J Hepatol.* 2012, 57, 157-66.

Kennenth M., Simona DM. and Zhao ZC. Oxidative stress Biology and Cell Injury During Type 1and Type 2 Diabetes Mellitus. *Curr Neurivasc Res*. 2007, February ; 4(1): 63-71.

Keys A., Menotti A. et al. The diet and 15 –year death rate in the seven countries study. *Am J Epidemiol.* 1986, 124(6): 903 – 15.

Kiecolt – Glaser JK., Epel ES. et al. Omega – 3 fatty acids, Oxidative stress, and leukocyte telomere length: A randomized controlled trial. *Brain Behav Immun*. 2012, epub ahead of print.

Kim Y., Keogh JB. and Clifton PM. Effects of Two Different Dietary Patterns on Inflammatory Markers, Advanced Glycation End Products and Lipids in Subjects without Type 2 Diabetes: A Randomised Crossover Study. *Nutrients*. 2017, 9.

Kirk E., Reeds DN., Finck BN., Mayurranjan SM., Patterson BW. and Klein S. Dietary fat and carbohydrates differentially alter insulin sensitivity during caloric restriction. *Gastroenterology.* 2009, 136, 1552-60**.**

Kneeman JM., Misdraji J. and Corey KE. Secondary causes of nonalcoholic fatty liver disease. *Therap Adv Gastroenterol.* 2012, 5**,** 199-207.

Kojima H., Sakurai S. et al. Mitochondrial abnormality and Oxidative stress in nonalcoholic steatohepatitis. *Alcohol Clin Exp Res.* 2007, 31(1 Suppl): S61 – 6.

Koplay M., Sivri M., Erdogan H. and Nayman A. Importance of imaging and recent developments in diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol.* 2015, 7**,** 769-76.

Kotronen A., Seppälä-Lindroos A., Vehkavaara S., Bergholm R., Frayn KN., Fielding BA., and Yki-Järvinen H. Liver fat and lipid oxidation in humans. *Liver International.* 2009, 29(9), 1439–1446.

Kotronen A., Westerbacka J., Bergholm R., Pietilainen Kh. and Yki-Jarvinen H. Liver fat in the metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007, 92**,** 3490-7.

Koutoukidis DA., Astbury NM., Tudor KE., Morris E., Henry JA., Noreik M. and Aveyard, P. Association of Weight Loss Interventions With Changes in Biomarkers of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*. JAMA Internal Medicine.* 2019.

Kozlitina J., Smagris E., Stender S., Nordestgaard BG. et al. Exome-wide association study identifies a TM6SF2 variant that confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet,* 2014 46**,** 352-6.

Krasnoff JB., Painter PL., Wallace JP., Bass NM. and Merriman RB. Health-related fitness and physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2008, 47, 1158-66.

Kumar R., Rastogi A. et al. Unconjugated hyperbilirubinemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease: a favorable endogenous response. *Clin Biochem.* 2012, 45(3): 272 – 4.

Larter CZ., Chitturi S., Heydet D. and Farrell GC. A fresh look at NASH pathogenesis. Part 1: the metabolic movers. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010, 25**,** 672- 90.

Lee CH., Olson P. and Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator – activated receptors. *Endocrinology.* 2003, 144(6): 2201 – 7.

Lee YJ., Lee HR. et al. Association between serum uric acid and nonalcoholic fatty liver disease in Korean adults. *Clin Chem Lab Med.* 2010, 48(2): 175 – 80.

Lepetsos P. and Papavassiliou AG., ROS/Oxidative stress signaling in osteoarthritis, *Biochimical et Biophysica Acta*. 2016, 1862:576 – 591.

Levene AP. and Goldin RD. The epidemiology, pathogenesis and histopathology of fatty liver disease. *Histopathology.* 2012, 61**,** 141-52.

Li J., Cordero P., Nguyen V. and Oben JA. The Role of Vitamins in the Pathogenesis of Non-alcoholic Fatty Liver Disease. *Integrative Medicine Insights.* 2016,11**,**19-25.

Lin WY., Wu CH., Chu NF. and Chang CJ. Efficacy and safety of very-low calorie diet in Taiwanese: A multicenter randomized, controlled trial. *Nutrition.* 2009, 25,1129-1136.

Liochev SI. and Fridovich I. Copper, zinc superoxide dismutase and H2O2. Effects of bicarbonate on inactivation and oxidations of NADPH and urate, and on consumption of H2O2. *J Biol Chem.* Sep 20 2002, σσ 277(38):34674-8.

Litescu SC., Eremia S. and Radu GL. Methods for determination of antioxidant capacity in food and raw materials, Bio – Farms for Nutraceuticals Advances in Experimental *Medicine and Biology.* 2010, 698(18),US: Springer: 241 – 9.

Liu M., Chen F., Liu T., Chen F., Liu S. and Yang J. The role of Oxidative stress in influenza virus infection. *Microbes and Infection*. 2017, 19(12), 580–586.

Liu S., Shi W. et al., Plasma reactive carbonyl species levels and risk of nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2011, 26(6): 1010 – 5.

Lobo V., Patil A., Phata, A. and Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods *Impact on human health. Pharmacognosy Reviews.* 2010, 4(8), 118.

Loffredo L., Perri L., Nocella C. and Violi F. Antioxidant and antiplatelet activity by polyphenol-rich nutrients: focus on extra virgin olive oil and cocoa*. British Journal of Clinical Pharmacology.* 2016,83(1), 96–102.

Lonardo A., Ballestri S., Marchesini G., Angulo P. and Loria P. Nonalcoholic fatty liver disease: a precursor of the metabolic syndrome. *Dig Liver Dis.* 2015, 47, 181-90.

Lopez-Velazquez JA., Silva-Vidal KV., Ponciano-Rodriguez G., Chavez-Tapia NC., Arrese M., Uribe M. and Mendez-Sanchez N. The prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in the Americas. *Ann Hepatol.* 2014, 13, 166-78.

Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, Oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact*. 2014, 224C:164–75.

Machado M., Marques – Vidal P. and Cortez – Pinto H. Hepatic histology in obese patients undergoing bariatric surgery. *J Hepatol*. 2006, 45: 600 – 6.

Malaguarnera M., Di Rosa M. et al. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl).* 2009, 87(7): 679 – 95.

Marchesini G., Brizi M., Bianchi G., Tomassetti S., Bugianesi E., Lenzi M., Mccullough A. J., Natale S., Forlani G. and Melchionda, N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes.* 2001, 50**,** 1844-50.

Marchesini G., Bugianesi E., Forlani G., Cerrelli F., Lenzi M., Manini R., Natale S., Vanni E., Villanova N., Melchionda N. and Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology.* 2003, 37**,** 917-23.

Markova M., Pivovarova O., Hornemann S., Sucher S., Frahnow T., Wegne, K., Machann J., Petzke K. J., Hierholzer J., Lichtinghagen R., Herder C., Carstensen-Kirberg M., Roden M., Rudovich N., Klaus S., Thomann R., Schneeweiss R., Rohn S. and Pfeiffer Afh. Isocaloric Diets High in Animal or Plant Protein Reduce Liver fat and Inflammation in Individuals with Type 2 Diabetes. *Gastroenterology*. 2016.

Martinez – Tomas R., Larque E. et al. Effect of the consumption of a fruit and vegetable soup with high in vitro carotenoid bio accessibility on serum carotenoid concentrations and markers of Oxidative stress in young men. *Eur J Nutr.* 2012, 51(2): 231 – 9.

Matsunami T., Sato Y et al. Regulation of Oxidative stress and inflammation by hepatic adiponectin receptor 2 in an animal model of non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Clin Exp Pathol.* 2010, 3(5): 472 – 81.

Malaguarnera M., Di Rosa M et al. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med (Berl).* 2009, 87(7): 679 – 95.

Mcpherson S., Hardy T., Henderson E., Burt AD., Day CP and Anstee, QM. Evidence of NAFLD progression from steatosis to fibrosing-steatohepatitis using paired biopsies: implications for prognosis and clinical management. *J Hepatol.* 2015*,* 62**,** 1148-55.

Micallef M., Lexis L. and Lewandowski P. Red wine consumption increases antioxidant status and decreases Oxidative stress in the circulation of both young and old humans. *Nutr J.* 2007, 6: 27.

Misciagna G., Del Pilar Díaz M., Caramia D., Bonfiglio C., Franco I., Noviello M., Chiloiro M., Abbrescia Di., Mirizzi A., Tanzi M., Caruso MG., Correale M., Reddavide R., Inguaggiato R., Cisternino A. and Osella A. Effect of a Low Glycemic Index. Mediterranean Diet on non-alcoholic fatty liver disease. A randomized controlled clinical trial. *The journal of nutrition, health & aging***.** 2016, 1-9.

Miele L. Valenza V., LA Torre G., Montalto M., Cammarota G., Ricci R., Masciana R., and Grieco A. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009, 49, 1877-87.

Milic S., Lulic D. and Stimac D. Non-alcoholic fatty liver disease and obesity: biochemical, metabolic and clinical presentations. *World J Gastroenterol.* 2014, 20**,** 9330-7.

Montezano AC., Dulak – Lis M., Tsiropoulou S., Harvey A., Briones AM. and Touyz RM. Oxidative stress and Human Hypertension: Vascular Mechanisms, Biomarkers, and Novel Therapies. *Canadian Journal of Cardiology.* 2015, 31:631 – 641.

Musso G., Gambino R. and Cassader M. Non-alcoholic fatty liver disease from pathogenesis to management: an update. *Obes Rev.* 2010, 11**,** 430-45.

Musso G., Gambino R. and Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Prog Lipid Res.* 2012.

Musso G., Gambino R., De Michieli F., Cassader M., Rizzetto M., Durazzo M., Faga E., Silli B. and Pagano G. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003, 37**,** 909-16.

Musso G., Gambino R., De Michieli F., Cassader M., Rizzetto M., Durazzo M., Faga E., Silli B. and Pagano G. Nitrosative stress predicts the presence and severity of nonalcoholic fatty liver at different stages of the development of insulin resistance and metabolic syndrome: possible role of vitamin A intake. *Am J Clin Nutr.* 2007, 86**,** 661-71.

Nakbi A., Issaoui M., Dabbou S., Koubaa N., Echbili A., Hammami M. and Attia N. Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis 23*. 2010, 711–715.

Newton J., Jones D., Henderson E., Kane L., Wilton K., Burt A. and Day C. Fatigue in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is significant and associates with inactivity and excessive daytime sleepiness but not with liver disease severity or insulin resistance. *Gut.* 2008, 57**,** 807-13.

Ninio E. Phospholipid mediators in the vessel wall: involvement in atherosclerosis. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2005, 8(2), 123–131.

Nobili V. and Manco M. Measurement of advanced glycation end products may change NASH management*. J Gastroenterol Hepatol*. 2007, 22(9): 1354 – 5.

Nomoto K., Tsuneyama K. et al. Cytoplasmic fine granular expression of 8 – hydroxydeoxyguanosine reflects early mitochondrial oxidative DNA damage in non-alcoholic fatty liver disease. *Appl Immunohistochem Mol Morph.* 2008, 16(1): 71 – 5.

Orci LA., Gariani K., Oldani G., Delaune V., Morel P. and Toso C. Exercise-based Interventions for Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Meta-analysis and Meta-regression. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016.

Okabe H., Irita K. et al. Endotoxin causes early changes in glutathione concentrations in rabbit plasma and liver. *J Surg Res.* 1994, 57(3): 416 – 9.

Oliveira C., De Lima Sanches P., De Abreu-Silva .E and Marcadenti A. Nutrition and Physical Activity in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Diabetes Res.* 2016**,** 4597246.

Paschos P. and Paletas K. Non alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome. *Hippokratia.* 2009, 13**,** 9-19.

Papagianni M., Sofogianni A. and Tziomalos K. Non-invasive methods for the diagnosis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Hepatol*. 2015, 7, 638-48.

Paston N. et al. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* Nov 2000, σσ. 17;304(1):55-68.

Pataky Z., Genton L., Spahr L. et al. Impact of Hypocaloric Hyperproteic Diet on Gut Microbiota in Overweight or Obese Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Pilot Study. *Digestive Diseases and Sciences.* 2016, 61**,** 2721-2731.

Pedret A., Valls RM. et al. Polyphenol – rich foods exhibit DNA antioxidative properties and protect the glutathione system in healthy subjects. *Mol Nutr Food Res.* 2012, 56(7): 1025 – 33.

Perlemuter G., Davit – Spraul A. et al., Increase in liver antioxidant enzyme activities in nonalcoholic fatty liver disease. *Liver Int.* 2005, 25(5): 946 – 53.

Perseghin G., Lattuada G., De Cobelli F., Ragogna F., Ntali, G., Esposito A., Belloni E., Canu T., Terruzzi I., Scifo P., Del Maschio A. and Luzi L. Habitual physical activity is associated with intrahepatic fat content in humans. *Diabetes Care.* 2007, 30**,** 683-8.

Pessayre D. Role of mitochondria in non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007, Suppl 1 : S20 – 7.

Pessayre D., Mansouri A. and Fromenty B. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. V. Mitochondrial dysfunctionj in steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2001, 282(2): G193 – 9.

Pickering AM., Vojtovich L., Tower J., and Davies KJA. Oxidative stress adaptation with acute, chronic, and repetead stress. *Free Radic. Biol.* 2013, Med. 55:109–18.

Pisoschi AM., Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review, *European Journal of Medical Chemistry*. 2015, 97:55 – 74.

Polyzos S., Kountouras J., Zavos C. and Tsiaousi E. The role of adiponectin in the pathogenesis and treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Diabetes Obes Metab.* 2010b, 12**,** 365-83.

Rafiq N. and Younossi ZM. Effects of weight loss on nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2008, 28**,** 427-33.

Ratziu V., Bellentani S., Cortez-Pinto H., Day C. and Marchesini G. A position statement on NAFLD/NASH based on the EASL 2009 special conference. *J Hepatol.* 2010, 53**,** 372-84.

Razavi Zade M., Telkabadi MH., Bahmani F., Salehi B., Farshbaf S. and Asemi Z. The effects of DASH diet on weight loss and metabolic status in 216 adults with non-alcoholic fatty liver disease: a randomized clinical trial. *Liver International.* 2016, 36, 563-571.

Reddy JK. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta – oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001, 281(6): g1333 – 9.

Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2001; 121(3): 710 – 23.

Rice EC., Halliwell B. and Lunt GG. Free radicals and Oxidative stress s: environment, drugs and food additives. *Biochemical Society,* London Portland Press, 1995.

Rinella M. and Charlton M. The globalization of nonalcoholic fatty liver disease: Prevalence and impact on world health. *Hepatology.* 2016, 64, 19-22.

Romeo S., Kozlitina J., Xing C., Pertsemlidis A. et al. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Genet.* 2008, 40**,** 1461-5.

Rolo AP., Teodoro JS. and Palmeira CM. Role of Oxidative stress in the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med.* 2012, 52(1): 59 – 69.

Ruszkiewicz J. and Albrecht J. Changes in the mitochondrial antioxidant systems in neurodegenerative diseases and acute brain disorders, *Neurochemistry International.* 2015, 88:66 – 72.

Ryan MC., Itsiopoulos C., Thodis T., Ward G., Trost N., Hofferberth S., O'dea K., Desmond PV., Johnson NA. and Wilson AM. The Mediterranean diet improves hepatic steatosis and insulin sensitivity in individuals with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2013, 59, 138-43.

Rytter E., Vessby B. et al. Supplementation with a combination of antioxidants does not affect glycaemic control, Oxidative stress or inflammation in type 2 diabetes subjects. *Free Radic Res.* 2010, 44(12): 1445 – 53.

Ryu S., Chang Y., Jung H., Yun KE., Kwon M., Choi Y., Kim CW., Cho J., Suh BS., Cho YK., Chung EC., Shin H. And Kim YS. Relationship of sitting time and physical activity with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2015, 63**,** 1229-37.

Sadruddin S. and Arora R. Resveratrol: biologic and therapeutic implications. *J Cardiometab Syndr.* 2009, 4(2): 102 – 6.

Saeidnia S. and Abdollahi M. Toxicological and pharmacological concerns on Oxidative stress and related diseases. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2013, 273:442 – 455.

Samy W., Hassanian M. et al. Paraoxonase – 1 activity, malondialdehyde and glutathione peroxidase in nonalcoholic fatty liver disease and the effect of atorvastatin. *Arab J Gastroenterol.* 2011, 12(2): 80 – 85.

Sanchez – Moreno C., Cano MP. et al. Consumption of high – pressurized vegetable soup increases plasma vitamin C and decreases Oxidative stress and inflammatory biomarkers in healthy humans*. J Nutr.* 2004, 134(11): 3021 – 5.

Sanchez – Muniz FJ. Dietary fibre and cardiovascular health. *Nutr Hosp.* 2012, 27(1): 31 – 45.

Sánchez-Valle V., Chávez-Tapia NC., Uribe M. and Méndez-Sánchez N. Role of Oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem.* 2012, 19(28):4850-60.

Sandhya N., Gokulakrishnan K. et al. Association of hypoadiponectinemia with hypoglutathionemia in subjects with and without type 2 diabetes. *Dis Markers.* 2010, 29(5): 213 – 21.

Sargeant JA., Gray LJ., Bodicoat DH., Willis SA., Stensel DJ., Nimmo MA. and King JA. The effect of exercise training on intrahepatic triglyceride and hepatic insulin sensitivity: a systematic review and meta-analysis. *Obesity Reviews.* 2018.

Satapathy SK. and Sanyal AJ. Epidemiology and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Semin Liver Dis.* 2015, 35, 221-35.

Sattar N., Forrest E. and Preiss D. Non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ.* 2014, 349**,** g4596.

Sayiner M., Koenig A., Henry L. and Younossi ZM. Epidemiology of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis in the United States and the Rest of the World. *Clin Liver Dis.* 2016, 20**,** 205-14.

Sayiner M., Stepanova M., Pham H., Noor B., Walters M. and Younossi ZM. Assessment of health utilities and quality of life in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BMJ Open Gastroenterology.* 2011, 0**,** e000106.

Schwingshackl L. and Hoffmann G. Mediterranean dietary pattern, inflammation and endothelial function: A systematic review and meta-analysis of intervention trials*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases.* 2014, 24(9), 929–939*.*

Serviddio G et al. Uncoupling protein – 2 (UCP2) induces mitochondrial proton leak and increases susceptibility of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) liver to ischaemia – reperfusion injury. *Gut*. 2008, 57(7): 957 – 65.

Seki S., Kitada T. et al. In situ detection of lipid peroxidation and oxidative DNA damage in nonalcoholic fatty liver diseases. J Hepatol. 2002, 37(1): 56 – 62.

Shen N., Wang P. and Yan W. Sleep Duration and the Risk of Fatty Liver Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Sci Rep.* 2016, 6**,** 31956.

Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine*. Redox Biology*. 2015, 4:180 – 183.

Sies H., Berndt C. and Jones, DP. Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry*, 2017. 86(1), 715–748.

Sies H., Cadenas E., Symons MCR. and Scott G. Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs [and Discussion]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 1958, 311(1152).

Sies H., Jones DP. Oxidative stress. *Encyclopedia of stress*, 2007. Vol. 3, ed. G Fink, σσ. 45–48. Amsterdam: Elsevier. 2nd ed.

Simoncini C. et al. Alzheimer's Pathogenesis and Its Link to the Mitochondrion. *Oxid Med Cell Longev.* 2015, σσ.: 803942.

Singh, S., Allen AM., Wang Z., Prokop LJ., Murad MH. and Loomba, R. Fibrosis progression in nonalcoholic fatty liver vs nonalcoholic steatohepatitis: a systematic review and meta-analysis of paired-biopsy studies. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2015, 13**,** 643-54 e1-9; quiz e39-40.

Siti HN., Kamisah Y. and Kamisiah J. The role of Oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review), *Vascular Pharmacology.* 2015, 71:40 – 56.

Sookoian S., Castano GO., Scian R., Mallardi P., Fernandez Gianotti T. and Pirola CJ. Genetic variation in transmembrane 6 superfamily member 2 and the risk of nonalcoholic fatty liver disease and histological disease severity. *Hepatology.* 2015, 61**,** 515-25.

Sreekumar R., Rosado B. et al., Hepatic gene expression in histologically progressive nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2003, 38(1): 244 – 51.

Srivastava KK. and Kumar R. Stress, oxidative injury and disease. *Indian J Clin Biochem.* Jan 2015, σσ. 30(1): 3–10.

St George A., Bauman A., Johnston A., Farrell G., Chey T. and George J. Independent effects of physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology.* 2009, 50**,** 68-76.

Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science.* 28 Aug 1992. σσ. 257(5074):1220-4.

Strauss RS. Comparison of serum concentrations of alpha – tocopherol and beta – carotene in a cross – sectional sample of obese and nonobese children (NHANES III). National Health and Nutrition Examination Survey. *J Pediatr.* 1999, 134(2): 160 – 5.

Sun DQ., Liu WY., Wu SJ., Zhu GQ., Braddock M., Zhang DC., Shi KQ., Song D. and Zheng MH. Increased levels of low-density lipoprotein cholesterol within the normal range as a risk factor for nonalcoholic fatty liver disease. *Oncotarget.* 2016, 7**,** 5728-37.

Sunny NE., Parks EJ. et al. Excessive hepatic mitochondrial TCA cycle and gluconeogenesis in humans with nonalcoholic fatty liver disease. *Cell Metab.* 2011, 14(6): 804 – 10.

Sung KC., Wild SH. and Byrne CD. Development of new fatty liver, or resolution of existing fatty liver, over five years of follow-up, and risk of incident hypertension. *J Hepatol.* 2014, 60**,** 1040-5.

Tahan G., Akin H. et al. Melatonin ameliorates liver fibrosis induced by bile – duct ligation in rats. *Can J Surg.* 2010, 53(5): 313 – 8.

Tahan V., Atug O. et al. Melatonin ameliorates methionine – and choline – deficient diet – induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Pineal Res*. 2009, 46(4): 401 – 7.

Tahan V., Ozaras R. et al. Melatonin reduces dimethylnitrosamine – induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res*. 2004, 37(2): 78 – 84.

Takami Y., Uto H. et al. Identification of a novel biomarker for Oxidative stress induced by hydrogen peroxide in primary human hepatocytes using the 2 – nitrobenzenesulfenyl chloride isotope labelling method. *Hepatol Res.* 2010, 40(4): 438 – 45.

Takino J., Kobayashi Y. and Takeuchi M. The formation of intracellular glyceraldehyde – derived advanced glycation end – products and cytotoxicity*. J Gastroenterol.* 2010, 45(6): 646 – 55.

Tam CS., Xie W., Johnson WD., Cefalu WT., Redman LM. and Ravussin E. Defining insulin resistance from hyperinsulinemic-euglycemic clamps. *Diabetes Care.* 2012, 35, 1605-10.

Thoma C., Day CP. and Trenell MI. Lifestyle interventions for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease in adults: a systematic review. *J Hepatol,* 2012, 56, 255-66.

Thuy S., Ladurner R., Volynets V., Wagner S., Strahl S., Konigsrainer A., Maier KP., Bischoff SC. and Bergheim I. Nonalcoholic fatty liver 86 disease in humans is associated with increased

plasma endotoxin and plasminogen activator inhibitor 1 concentrations and with fructose intake. *J Nutr.* 2008, 138**,** 1452-5.

Tilg H. and Diehl AM. Cytokines in alcoholic and nonalcoholic steatohepatitis. *N Eng J Med.* 2000, 343(20): 1467 – 76.

Tilg H. and Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology.* 2010, 52**,** 1836-46.

Trichopoulou A. and Benetou. Nutrition and Cancer Prevention. From Molecular Mechanisms to Dietary Recommendations. *Royal Society of Chemistry*. England, 2019.

Trichopoulou A., Costacou T. et al. Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *N Engl J Med.* 2003, 348(26): 2599 – 608.

Trovato FM., Catalano D., Martines GF., Pace P. and Trovato GM. Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: the need of extended and comprehensive interventions. *Clin Nutr.* 2015, 34, 86-8.

Tomita K., Tamiya G., Ando S. et al. Tumour necrosis factor alpha signalling through activation of Kupffer cells plays an essential role in liver fibrosis of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Gut.* 2006, 55**,** 415-24.

Torres DM., Williams CD. and Harrison SA. Features, diagnosis, and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012, 10**,** 837-58.

Tuyama A. and Chang C. Non-alcoholic fatty liver disease. *J Diabetes.* 2012, 4**,** 266-80.

Urquiqga I., Strobel P. et al. Mediterranean diet and red wine protect against oxidative damage in young volunteers*. Atherosclerosis.* 2010, 211(2): 694 – 9.

Ursini F., Maiorino M. and Forman HJ. Redox homeostasis: the golden mean of healthy living. *Redox Biol*. 2016, 8:205–15.

Utz-Melere M., Ferreira CT., Lessa-Horta B., Epifanio M., Mouzaki M., Angelo A. and Mattos. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children and Adolescents: Lifestyle Change - a Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Hepatology.* 2018, 17 (3): 345-354.

Valko M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in Oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions 160.* 2006, σσ. 1–40.

Valko M., Izakovic M. et al., Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004, 266(1 – 2): 37 – 56.

Van Acker FA., Schouten O. et al. Flavonoids can replace alpha – tocopherol as an antioxidant. *FEBS Lett.* 2000, 473(2): 145 – 8.

Vernaglione L. The Mediterranean diet: a matter of history, tradition, culture and health. *J Nephrol.* 2009, 22 (Suppl.14): 149 – 58.

Vernon G., Baranova A. and Younossi ZM. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment Pharmacol Ther,* 2011, 34**,** 274-85.

Vilar-Gomez E., Martinez-Perez Y., Calzadilla-Bertot L., Torres-Gonzalez A., Gra-Oramas B., Gonzalez-Fabian L., Friedman S., Diago M. and Romero-Gomez M. Weight Loss Through Lifestyle Modification Significantly Reduces Features of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology.* 2015, 149, 367-78 e5; quiz e14-5.

Vivancos M., Moreno JJ. Effect of resveratrol, tyrosol and beta- sitosterol on oxidised low – density lipoprotein – stimulated Oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *Br J Nutr.* 2008, 99(6): 1199 – 207.

Wang J., Schipper HM., Velly AM., Mohit S. and Gornitsky M. Salivary biomarkers of Oxidative stress: A critical review, *Free radical Biology and Medicine*. 2015, 85:95 – 104.

Williams CD., Stengel J., Asike MI., Torres DM., Shaw J., Contreras M., Landt CL. and Harrison SA. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely 222 middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology.* 2011, 140, 124-31.

Williams PT. Attenuating effect of vigorous physical activity on the risk for inherited obesity: a study of 47,691 runners. *PLoS One.* 2012, 7, e31436.

Woodside JV. and Kromhout D. Fatty acids and CHD. *Proc Nutr Soc.* 2005, 64(4): 554 – 64.

Wu D. and Cederbaum AI. Alcohol, Oxidative stress and free radical damage. *Alcohol Res Health.* 2003, σσ. 27(4):277-84.

Xiang C., Xu Z., Liu J., Li T., Yang Z. and Ding, C. Quality, composition, and antioxidant activity of virgin olive oil from introduced varieties at Liangshan. *LWT - Food Science and Technology.* 2017, 78, 226–234.

Xu W., Shao L. et al. Upregulation of Nrf2 expression in non-alcoholic fatty liver and steatohepatitis. *Hepatogastroenterology.* 2011, 58(112): 2077 – 80.

Yamamoto M., Iwasa M., Iwata K., Kaito M. et al. Restriction of dietary calories, fat and iron improves non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007, 22**,** 498-503.

Yan LJ. Positive Oxidative stress in aging and aging-related disease tolerance. *Redox Biol.* 2014, 2C:165–69.

Yasui K., Hashimoto E., Komorizono Y., Koike K., Arii S., Imai Y., Shima T., Kanbara Y. et al. Characteristics of patients with nonalcoholic steatohepatitis who develop hepatocellular carcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2011, 9**,** 428-33; quiz e50.

Young AJ. and Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 2001, 385(1): 20 – 7

Younossi ZM., Koenig AB., Abdelatif D., Fazel Y., Henry L. and Wymer M. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease-Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes. *Hepatology.* 2016, 64:73-84.

Younossi ZM., Stepanova M., Negro F., Hallaji S., Younossi Y., Lam B. and Srishord M. Nonalcoholic fatty liver disease in lean individuals in the United States. *Medicine (Baltimore).* 2012, 91, 319-27.

Zhu MJ., Sun LJ. et al. Blood F2 – isoprostanes are significally associated with abnormalities of lipid status in rats with steatosis. *World J Gastroenterol.* 2008, 14(29): 4677 – 83.

Zelber-Sagi S., Nitzan-Kaluski D., Goldsmith R., Webb M., Blendis L., Halpern Z. and Oren R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a population based study. *J Hepatol.* 2007, 47**,** 711-7.

Zou TT., Zhang C., Zhou YF. and Han YJ. Lifestyle interventions for patients with nonalcoholic fatty liver disease: A network meta-analysis. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology.* 2018, 30(7):1