



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

**Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη σύσταση σε λιπαρά οξέα μεμβρανών
ερυθρών κυττάρων σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό μετά από διατροφική
παρέμβαση με ψάρια ιχθυοτροφείου**

Μεταπτυχιακή εργασία

Παπακωνσταντίνου Μαρία Αναστασία

Αθήνα, 2022



HAROKOPIO UNIVERSITY

SCHOOL Health Science & Education

DEPARTMENT Nutrition & Dietetics

POSTGRADUATE PROGRAMME MASTER IN APPLIED NUTRITION AND
DIETETICS

COURSE SPORTS NUTRITION

**Correlation of oxidative stress markers with the fatty acid composition of red cell
membranes in a seemingly healthy population after dietary intervention with
farmed fish**

Master Thesis

Papakonstantinou Maria Anastasia

Athens, 2022



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ

ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (επιβλέπουσα καθηγήτρια)

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,

Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Νομικός Τζώρτζης

Αναπληρωτής Καθηγητής , Διευθυντής Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών

"Εφαρμοσμένη Διαιτολογία-Διατροφή" , Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-

Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Φραγγοπούλου Ελισάβετ

Επίκουρη καθηγήτρια, Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο

Πανεπιστήμιο.

Η Μαρία Αναστασία Παπακωνσταντίνου

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1)** Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2)** Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.
- 3)** Όπου υφίστανται δικαιώματα άλλων δημιουργών έχουν διασφαλιστεί όλες οι αναγκαίες άδειες χρήσης ενώ το αντίστοιχο υλικό είναι ευδιάκριτο στην υποβληθείσα εργασία.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ABSTRACT.....	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	13
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Οξειδωτικό στρες.....	15
1.1 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες	17
1.2 Οξείδωση των λιπιδίων	18
1.3 Προϊόντα Οξείδωσης Πρωτεϊνών	21
1.4 Νιτροτυροσίνη	23
1.5 S-γλουταθειονυλίωση	24
1.6 Μυελοπεροξειδάση (MPO)	25
1.7 Οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (oxLDL)	26
1.8 Οξειδωτική βλάβη DNA / RNA.....	27
Κεφάλαιο 2 Κατανάλωση ψαριών και καρδιαγγειακή υγεία.	29
2.1 Λιπαρά οξέα και δείκτες καρδιαγγειακής υγείας	33
2.1.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα	35
2.1.2 Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs)	35
2.1.3 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)	36
2.1.4 Ωμέγα 6 λιπαρά οξέα.....	37
2.1.5 Ωμέγα 3 λιπαρά οξέα.....	39
2.2 Μοριακοί μηχανισμοί	41
2.3 Τελευταίες κλινικές δοκιμές.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων	51

3.1 Δομή, λειτουργία, σηματοδότηση και μεταβολισμός PAF	52
3.2 Σηματοδότηση PAF στην Παθοφυσιολογία	55
3.3 Η πιθανή χρήση αναστολέων του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων ως θεραπευτικών και προληπτικών ασθενειών	57
Κεφάλαιο 4 Πειραματικό μέρος	62
4.1 Πρωτόκολλο παρέμβασης.....	62
4.2 Συμμετέχοντες	62
4.3 Παρέμβαση.....	63
4.4 Κύριοι δείκτες	63
4.5 Συμμόρφωση	65
Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα-Συζήτηση	77
5.1 Βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών	77
5.2 Συμμόρφωση με το πρωτόκολλο μελέτης	80
5.3 Επίδραση του τύπου ψαριού που καταναλώνεται	86
5.4 Δείκτες οξειδωτικού στρες	87
5.5 Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες και λιπαρών οξέων.....	90
Συμπεράσματα.....	92
Βιβλιογραφία	94

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη σύσταση σε λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρια ιχθυοτροφείου. Η μελέτη διατροφικής παρέμβασης ήταν τυφλή (double blinded), διασταυρούμενη (crossover), και τυχαιοποιημένη (randomized controlled trial) ως προς τη σειρά με την οποία κατανάλωναν οι εθελοντές τα δύο ψάρια (απλή ή εμπλουτισμένη τσιπούρα). Οι εθελοντές κατανάλωναν 2 μερίδες ψαριού την εβδομάδα.

Τα άτομα της μελέτης ήταν ηλικίας 30-65 ετών, με δείκτη μάζας σώματος $24,0-31,0 \text{ kg/m}^2$, που κατανάλωναν λιγότερα από 150 g μαγειρεμένα ψάρια την εβδομάδα. Οι συμμετέχοντες τυχαιοποιήθηκαν ($n=38$, 1: 1) σε μία από τις δύο ακολουθίες: κατανάλωση ψαριών που τρέφονται με δίαιτα ιχθυελαίου (συμβατικά ψάρια, CF)/ψάρια που τρέφονται με δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα (εμπλουτισμένο ψάρι, EF) [EF/CF]. Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές για τους ανθρωπομετρικούς δείκτες, τους τυπικούς βιοχημικούς δείκτες, μεταξύ των ομάδων CF/EF και EF/CF στην αρχή της μελέτης. Ο καρδιακός ρυθμός (παλμοί/λεπτό), η συγκέντρωση ινσουλίνης στον ορό νηστείας (pmol/L) και το HOMA-IR ήταν υψηλότερα στην ομάδα CF/EF σε σύγκριση με την ομάδα EF/CF. Επιπλέον, οι δύο ομάδες δεν διέφεραν όσον αφορά τη σωματική δραστηριότητα και τα χαρακτηριστικά διατροφής στην αρχή της μελέτης. Η συμμόρφωση των συμμετεχόντων στο πρωτόκολλο της μελέτης ήταν υψηλή (100%) και αυτό επιβεβαιώθηκε από την περιεκτικότητα λιπαρών οξέων στη μεμβράνη ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης, στην πρώτη και στη δεύτερη περίοδο θεραπείας για τη θεραπεία με συμβατικά και εμπλουτισμένα ψάρια, αντίστοιχα. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη TBARS και του 20:4n-6 αλλά και του GPx στον ορό με το 16:0. Θετική ήταν η συσχέτιση του δείκτη TBARS και του 16:0. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τους κύριους δείκτες οξειδωτικού στρες (TBARS, ox-LDL, Lag time, GPx ορού και λευκοκυττάρων). Σχετικά με την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα της μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) (%) των συμμετεχόντων που κατανάλωσαν συμβατικά (CF) και εμπλουτισμένα (EF) ψάρια βρέθηκε ότι το ερουκικό οξύ (C22:1n-9) ήταν σε υψηλότερη συγκέντρωση στο τέλος της 2^{ης} περιόδου θεραπείας σε σύγκριση με το περιεχόμενο στο τέλος της 1^{ης} περιόδου στη θεραπεία με συμβατικά ψάρια (CF) και το παλμιτικό οξύ (C16:0) αλλά και το βαχενικό οξύ (C18:1 n7) ήταν σε υψηλότερα επίπεδα στο τέλος της 2^{ης} περιόδου θεραπείας σε σύγκριση με το περιεχόμενό τους στο τέλος της 1^{ης} περιόδου

στη θεραπεία με εμπλουτισμένα ψάρια. Γενικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο για την κατανάλωση των CF, όσο και για την κατανάλωση των EF κατά τις δύο περιόδους θεραπείας ήταν σχεδόν παρόμοια ανεξάρτητα από την περίοδο θεραπείας.

Λέξεις κλειδιά: Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, ω -3 λιπαρά οξέα, ψάρια, οξειδωτικό στρες, βιοδείκτες, Ενεργές μορφές οξυγόνου.

ABSTRACT

In the present study, the correlation of oxidative stress markers with the fatty acid composition of red cell membranes in a seemingly healthy population after dietary intervention with farmed fish was studied. The dietary intervention study was double blinded, crossover, and randomized controlled trial in the order in which the volunteers ate the two fish (plain or fortified sea bream). The volunteers ate 2 servings of fish a week.

The subjects in the study were aged 30-65 years, with a body mass index of 24.0-31.0 kg / m², consuming less than 150 g of cooked fish per week. Participants were randomized (n = 38, 1: 1) in one of two sequences: consumption of fish fed diet with fish oil diet (conventional fish, CF) / fish fed diet enriched with kernels (fortified fish, EF) [EF / CF]. No significant differences were found for anthropometric indices, typical biochemical indices, between the CF / EF and EF / CF groups at the beginning of the study. Heart rate (pulse / minute), fasting serum insulin concentration (pmol / L) and HOMA-IR were higher in the CF / EF group compared to the EF / CF group. In addition, the two groups did not differ in physical activity and diet characteristics at the beginning of the study. The study participants' compliance with the study protocol was high (100%) and this was confirmed by the red blood cell membrane (RBC) fatty acid content of the participants at the beginning of the study, in the first and second period for treatment with conventional and enriched fish, respectively. A negative correlation was observed between the TBARS index and the 20: 4n-6 and the serum GPx with 16: 0. The correlation of the TBARS index and 16: 0 was positive. The remaining fatty acids examined did not show a significant correlation with the main indicators of oxidative stress (TBARS, ox-LDL, Lag time, serum and leukocyte GPx). Regarding the fatty acid content of the red blood cell membrane (RBC) (%) of participants who ate conventional (CF) and fortified (EF) fish, it was found that erucic acid (C22: 1n-9) was at a higher concentration at the end of 2nd period of treatment compared to the content at the end of the 1st period in the treatment with conventional fish (CF) and palmitic acid (C16: 0) but also bachenic acid (C18: 1 n7) were at higher levels at the end of the 2nd period compared to their content at the end of the 1st period in the treatment of fortified fish. In general, the results obtained for both CF and EF consumption during the two treatment periods were almost similar regardless of the treatment period.

Keywords: PAF, n-3 fatty acids, fish consumption, oxidative stress, biomarker, ROS.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1 Οδοί σχηματισμού επιλεγμένων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. Οι βιοδείκτες που έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προγνωστική σημασία σε καρδιαγγειακές παθήσεις σημειώνονται με *. GSH = γλουταθειόνη (μειωμένη), PUFA = πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βλ. Κείμενο για άλλες συντομογραφίες (Ho & Galougahi, 2013)	17
Σχήμα 2 Σχηματικό χρονοδιάγραμμα των απαιτούμενων βημάτων στην ανάπτυξη βιοδεικτών, από την ανακάλυψη στο εργαστήριο έως την κλινική εφαρμογή μετά από επικύρωση σε κλινικές δοκιμές μεγάλης κλίμακας. Αν και πολλοί βιοδείκτες ROS έχουν φτάσει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, μόνο λίγοι εφαρμόζονται τακτικά σε ασθενείς στην κλινική πράξη (Ho & Galougahi, 2013).	18
Σχήμα 3 Μη αναστρέψιμες οξειδωτικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών. AGEs: προηγμένα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης. ALEs: προηγμένα τελικά προϊόντα υπεροξειδωσης. AOPP: προϊόντα πρωτεΐνης προηγμένης οξείδωσης. HClO: υποχλωριώδες οξύ. RNS: ενεργές μορφές αζώτου. ROS ενεργές μορφές οξυγόνου (Marrocco et al., 2017).	22
Σχήμα 4 Η δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF): (Α) Δεδομένα μοντέλου πλήρωσης χώρου PAF και (Β) δομικό μοντέλο PAF.	52
Σχήμα 5 Η δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Kostadinova et al., 2015)	53
Σχήμα 6 Η πορεία αναδιαμόρφωσης PAF και η πορεία αποικοδόμησής του. Το PAF-AH μετατρέπει το ενεργό PAF σε ανενεργό Lyso-PAF με την απώλεια μιας οξικής ομάδας στη θέση sn-2. Το Lyso-PAF AT μετατρέπει το Lyso-PAF στο ενεργό PAF με την επανενσωμάτωση ενός οξικού στη θέση sn-2. Ακετυλο-CoA, ακετυλο συνένζυμο Α; AT, ακετυλοτρανσφεράση; Lyso-PAF, λυσο μορφή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. PAF, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. PAF-AH, ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Lordan, Tsoupras, & Zabetakis, 2019).	55
Σχήμα 7 Απλοποιημένη απεικόνιση για τις κύριες προ-φλεγμονώδεις οδούς σηματοδότησης που προκαλεί ο PAF μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του υπό ορισμένες πιέσεις ή ερεθίσματα σε διάφορες οδούς και φλεγμονώδεις καταρράκτες σε χρόνιες διαταραχές που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Lordan, Tsoupras, Zabetakis, et al., 2019)	57

Σχήμα 8 Αντιπροσωπευτικές οπτικές μικρογραφίες $\times 100$ τμημάτων αορτικού τοιχώματος χρωματισμένες με αιματοξυλίνη και ηωσίνη που ελήφθησαν από τις δύο πειραματικές ομάδες κουνελιού. Οι αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις εμφανίζονται ως αφρώδη κύτταρα μεταξύ των βελών. Κάθε δείγμα ιστού είχε πάχος περίπου 5 μm . (α) Ομάδα Α (αθηρογόνο δίαιτα) και (β) ομάδα Β (αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη με πολικά λιπίδια τσιπούρας). (C. Nasoroulou et al., 2010)

..... 60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1 Μελέτες παρέμβασης σχετικά με την κατανάλωση ψαριών και συμπληρωμάτων ψαριών και τη συσχέτισή τους με διάφορους δείκτες οξειδωτικού στρες	43
Πίνακας 2 Δημογραφικά, ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης κατά σειρά.	77
Πίνακας 3 Φυσική δραστηριότητα και διατροφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης κατά σειρά.	79
Πίνακας 4 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης κατά σειρά.....	81
Πίνακας 5 Περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα της μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) (%) των συμμετεχόντων στα συμβατικά ψάρια (CF)	82
Πίνακας 6 Περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα της μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) (%) των συμμετεχόντων στα εμπλουτισμένα ψάρια (EF).....	84
Πίνακας 7 Εκτίμηση της επίδρασης του εμπλουτισμένου ψαριού έναντι του συμβατικού ψαριού στα διατροφικά χαρακτηριστικά και τους τυπικούς βιοχημικούς δείκτες.	86
Πίνακας 8 Δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης.....	88
Πίνακας 9 Δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στα συμβατικά ψάρια (CF)	89
Πίνακας 10 Δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στα εμπλουτισμένα ψάρια (EF) ...	89
Πίνακας 11 Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες και λιπαρών οξέων	90

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AA	Αραχιδονικό οξύ
AC	Ααδένυλο κυκλάση
AKT	Πρωτεϊνική κινάση B
ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
Ca	Ασβέστιο
cAMP	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
cPLA2	Κυτοσολική φωσφολιπάση A2
DAG	Διακυλογλυκερόλη
ERK	Εξωκυτταρικές κινάσες ρυθμιζόμενες με σήμα
IL	Ιντερλευκίνη
LPCAT	Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη ακυλοτρανσφεράση
Lyso-PC	Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας kappa-
MAPK	Ενεργοποιημένη με μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAFLL	Λιπίδια τύπου PAF
PAF-R	PAF-υποδοχέας
PI3K	Φωσφατιδυλνισιτόλη 3-κινάση
PIP2	4,5-διφωσφορική φωσφατιδυλνισιτόλη PKA, πρωτεϊνική κινάση A
PKC	Πρωτεϊνική κινάση C
PLCβ	Φωσφολιπάση C-β
mTOR	Μηχανιστικός στόχος της ραπαμυκίνης
RNS	Ενεργές μορφές αζώτου
ROS	Ενεργές μορφές οξυγόνου
TNF-α	Παράγοντας νέκρωσης όγκου-α

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Οξειδωτικό στρες

Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως η ανισορροπία στα οξειδοαναγωγικά χαρακτηριστικά κάποιου κυτταρικού περιβάλλοντος που μπορεί να είναι το αποτέλεσμα είτε βιοχημικών διεργασιών που οδηγούν στην παραγωγή ενεργής μορφής, έκθεσης σε επιβλαβείς παράγοντες (δηλ. περιβαλλοντικούς ρύπους και ακτινοβολίες) ή περιορισμένες δυνατότητες ενδογενών αντιοξειδωτικά συστήματα. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου και αζώτου (ROS/RNS) που παράγονται υπό οξειδωτικό στρες είναι γνωστό ότι βλάπτουν όλα τα κυτταρικά βιομόρια (λιπίδια, σάκχαρα, πρωτεΐνες και πολυνουκλεοτίδια). Έτσι, πολλά αμυντικά συστήματα έχουν εμπλακεί στα κύτταρα για να αποτρέψουν την ανεξέλεγκτη αύξηση του ROS. Αυτά τα συστήματα περιλαμβάνουν μη ενζυματικά μόρια (γλουταθειόνη, βιταμίνες A, C και E, και πολλά αντιοξειδωτικά που υπάρχουν σε τρόφιμα) καθώς και ενζυματικούς εκκαθαριστές του ROS, με δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD), καταλάση (CAT) και υπεροξειδάση γλουταθειόνης (GPX) τα πιο γνωστά αμυντικά συστήματα (Marrocco et al., 2017).

Τα μιτοχόνδρια είναι η κυρίαρχη πηγή ROS σε όλους τους τύπους κυττάρων. Το υπεροξείδιο (O_2^-) παράγεται κυρίως στο επίπεδο της μιτοχονδριακής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων και μπορεί να μετατραπεί σε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) με SOD ή να υποστεί αυθόρμητη αυτοοξειδοαναγωγή. Παρουσία ιόντων μεταβατικών μετάλλων, για παράδειγμα, ιόντων σιδήρου και χαλκού, το H_2O_2 μπορεί να δημιουργήσει μέσω της αντίδρασης Fenton την εξαιρετικά δραστική ρίζα υδροξυλίου ($HO\bullet$). Οι ενεργές μορφές μπορούν επίσης να παραχθούν ενζυματικά από οξειδάση ξανθίνης (XO), με συζευγμένες συνθάσες νιτρικού οξειδίου (NOS) και οξειδάση NADPH (NOX). Η παραγωγή ROS σχετίζεται όχι μόνο με τη βλάβη των κυττάρων ή τον θάνατο, αλλά έχουν επίσης εξακριβωθεί οι φυσιολογικοί και σηματοδοτικοί ρόλοι για το ROS. Τα δραστικά είδη είναι η κύρια πηγή αμυντικών προ-οξειδωτικών που δημιουργούνται στην αναπνευστική έκρηξη ουδετερόφιλων. Κατά την ενεργοποίηση, τα ουδετερόφιλα παράγουν διάφορα ROS μέσω μυελοπεροξειδάσης (MPO) και RNS μέσω επαγωγίμης συνθάσης νιτρικού οξειδίου (iNOS). Το MPO καταλύει τον εξαρτώμενο από H_2O_2 σχηματισμό υποχλωριούχου οξέος (HClO) ενώ το iNOS παράγει νιτρικό οξείδιο ($NO\bullet$), το οποίο στη συνέχεια αντιδρά με $O_2\bullet^-$ σχηματίζοντας υπεροξυνιτρίτη ($ONOO^-$). Το NOX που σχετίζεται με την κυτταρική μεμβράνη καταλύει τη δημιουργία ριζών υπεροξειδίου που παίζουν φυσιολογικό ρόλο στην εισβολή του καρκίνου, την υποξία και τη σηματοδότηση ιντεγκρίνης. Επιπλέον, το ROS μπορεί να διαμορφώσει την έκφραση πολλών

γονιδίων μέσω της οξειδοαναγωγικής ρύθμισης του παράγοντα 2 που σχετίζεται με τον πυρηνικό παράγοντα-ερυθροειδή 2 (Nfr2) και τον πυρηνικό παράγοντα καπα-ενισχυτή της ελαφριάς αλυσίδας των ενεργοποιημένων B κυττάρων (NF-kB). Έχει προταθεί συντονισμένη διαμόρφωση αυτών των οδών στη φλεγμονή και την καρκινογένεση (Marrocco et al., 2017).

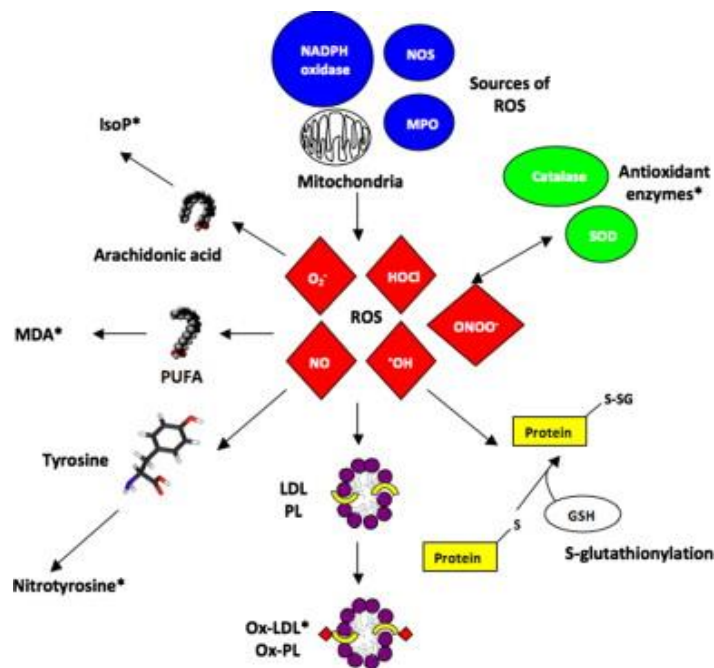
Κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας, η έρευνα αποκάλυψε μια ευρεία συμμετοχή του οξειδωτικού στρες σε μια σειρά από ασθένειες, όπως καρκίνο, καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD), αθηροσκλήρωση, διαβήτη, αρθρίτιδα, νευροεκφυλιστικές διαταραχές και πνευμονικές, νεφρικές και ηπατικές ασθένειες. Αυτές οι παθολογικές καταστάσεις έχουν αυξημένη συχνότητα με την ηλικία και το οξειδωτικό στρες πιστεύεται ότι είναι ένας σημαντικός παράγοντας στη γήρανση και τις ασθένειες που σχετίζονται με τη γήρανση.

Ο ρόλος του οξειδωτικού στρες στην παθοφυσιολογία της CVD είναι καθιερωμένος. Οι ενεργές μορφές οξυγόνου (ROS) μπορεί να προέρχονται από πολλές πηγές και μπορεί να προκαλούν επίσης συγκεκριμένες μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που μεταβάλλουν τη λειτουργία σημαντικών κυτταρικών πρωτεϊνών και οδών σηματοδότησης στην καρδιά. Ο σημαντικός ρόλος του οξειδωτικού στρες στην καρδιαγγειακή παθοφυσιολογία έχει ενθαρρύνει την ποσοτικοποίηση των ROS με βιοδείκτες που αντικατοπτρίζουν τη διαδικασία της νόσου. Ωστόσο, αυτό έχει αποδειχθεί μια πολύπλοκη πρόκληση, δεδομένης της φύσης των ROS. Ο σύντομος χρόνος ημιζωής αυτών των ειδών τα καθιστά εξαιρετικά μόρια σηματοδότησης αλλά συγχέει τη μέτρησή τους στην κυκλοφορία σύνθετων βιολογικών συστημάτων με τυπικές προσεγγίσεις όπως η παγίδευση σπιν. Αντίθετα, η εστίαση ήταν στη μέτρηση σταθερών δεικτών στην κυκλοφορία που μπορεί να αντανakλούν το συστηματικό οξειδωτικό στρες (Ho & Galougahi, 2013).

Έτσι, οι δείκτες οξειδωτικού στρες είναι σημαντικά εργαλεία για την εκτίμηση της βιολογικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης, της κατάστασης και της εξέλιξης της νόσου, καθώς και των επιδράσεων που βελτιώνουν την υγεία των αντιοξειδωτικών στον άνθρωπο. Ο εντοπισμός δεικτών οξειδωτικού στρες υπήρξε το επίκεντρο πολλών μελετών και αρκετές δείκτες από διάφορες πηγές βιομορίων έχουν προταθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Ωστόσο, για ορισμένα από αυτά, υπάρχει έλλειψη συναίνεσης σχετικά με την επικύρωση, την τυποποίηση και την αναπαραγωγιμότητα. Στόχος μας είναι να συζητήσουμε τη σημαντική προκατάληψη αυτών των μεθόδων.

1.1 Βιοδείκτες οξειδωτικού στρες

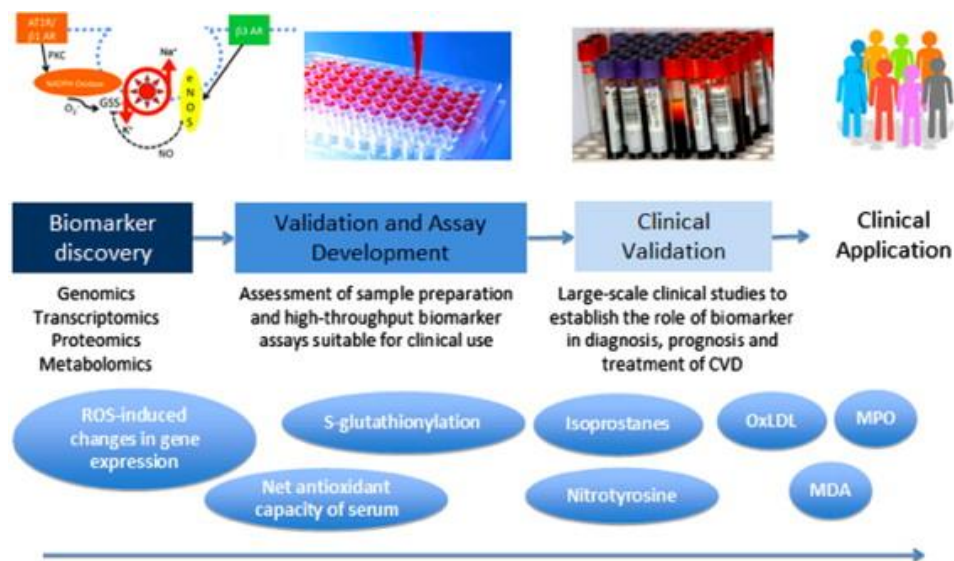
Οι βιοδείκτες του οξειδωτικού στρες μπορούν να ταξινομηθούν ως μόρια που τροποποιούνται από αλληλεπιδράσεις με ROS στο μικροπεριβάλλον και μόρια του αντιοξειδωτικού συστήματος που αλλάζουν σε απόκριση του αυξημένου οξειδοαναγωγικού στρες. Το DNA, τα λιπίδια (συμπεριλαμβανομένων των φωσfolιπιδίων), οι πρωτεΐνες και οι υδατάνθρακες είναι παραδείγματα μορίων που μπορούν να τροποποιηθούν με την παρουσία ROS in vivo. Αυτό φαίνεται σχηματικά στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1 Οδοί σχηματισμού επιλεγμένων βιοδεικτών οξειδωτικού στρες. Οι βιοδείκτες που έχουν αποδειχθεί ότι έχουν προγνωστική σημασία σε καρδιαγγειακές παθήσεις σημειώνονται με *. GSH = γλουταθειόνη (μειωμένη), PUFA = πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, βλ. Κείμενο για άλλες συντομογραφίες (Ho & Galougahi, 2013)

Από αυτές τις τροποποιήσεις, ορισμένες είναι γνωστό ότι έχουν άμεσες επιδράσεις στη λειτουργία του μορίου (π.χ. αναστέλλουν τη λειτουργία του ενζύμου), αλλά άλλοι απλώς αντανakλούν το βαθμό οξειδωτικού στρες στο τοπικό περιβάλλον. Η λειτουργική σημασία ή ο αιτιώδης ρόλος της οξειδωτικής τροποποίησης σε λειτουργία κυττάρου, οργάνου και συστήματος αναγνωρίζεται ως

καθοριστικός παράγοντας της εγκυρότητας του δείκτη. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την κλινική εφαρμογή ενός βιοδείκτη ROS περιλαμβάνουν την ευκολία λήψης κατάλληλου βιολογικού δείγματος, τη σταθερότητα του βιοδείκτη σε διάφορες συνθήκες αποθήκευσης και στάδια προετοιμασίας του δείγματος, και την εξειδίκευση, την ευαισθησία και την αναπαραγωγιμότητα του προσδιορισμού που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της τροποποίησης (Dalle-donne et al., 2005). Το Σχήμα 2 δείχνει το χρονοδιάγραμμα και τα απαιτούμενα βήματα για την ανάπτυξη βιοδεικτών για κλινική εφαρμογή.



Σχήμα 2 Σχηματικό χρονοδιάγραμμα των απαιτούμενων βημάτων στην ανάπτυξη βιοδεικτών, από την ανακάλυψη στο εργαστήριο έως την κλινική εφαρμογή μετά από επικύρωση σε κλινικές δοκιμές μεγάλης κλίμακας. Αν και πολλοί βιοδείκτες ROS έχουν φτάσει σε επίπεδο κλινικών δοκιμών, μόνο λίγοι εφαρμόζονται τακτικά σε ασθενείς στην κλινική πράξη (Ho & Galougahi, 2013).

1.2 Οξείδωση των λιπιδίων

Η υπεροξείδωση των λιπιδίων χρησιμοποιείται συνήθως ως δείκτης βλάβης των κυτταρικών μεμβρανών που προκαλούνται από ROS. Η μηλονυλοδιαλδεύδη (MDA) είναι ένα από τα καλύτερα μελετημένα τελικά προϊόντα υπεροξείδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε κλινικά δείγματα και χρησιμοποιείται συχνά για τον υπολογισμό των καταστάσεων οξειδωτικού στρες. Τα επίπεδα

του MDA μπορούν να μετρηθούν χρησιμοποιώντας ενεργές μορφές θειοβαρβιτουρικού οξέος (TBARS). Σε όλες αυτές τις μεθόδους, το MDA αντιδρά με TBARS σε όξινο μέσο στους 100 °C για να δημιουργήσει ένα προϊόν ροζ / κόκκινου χρώματος που μπορεί να εκχυλιστεί με βουτανόλη και να μετρηθεί χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο σε απορρόφηση 520-535 nm ή με φθοροσίμετρο σε απορρόφηση 515 ή 555 nm. Η μέθοδος TBARS είναι γρήγορη και εύκολη. Ωστόσο, άλλες αλδεϋδες εκτός από το MDA μπορεί επίσης να αντιδράσουν με το TBARS, παράγοντας παράγωγα που απορροφούν φως στο ίδιο εύρος μήκους κύματος. Εναλλακτικά, το MDA πλάσματος μπορεί να μετρηθεί χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιώντας στήλη αντίστροφης φάσης C18 όπως περιγράφεται από τους Victorino et al. (2013) ή με αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) σε τριχοειδή στήλη μετά από μεταμεθυλίωση με μεθοξείδιο του νατρίου (Picardo et al., 1996). Ενώ αυτή η μέθοδος καθορίζει τα επίπεδα MDA πιο αναπαραγωγίμα και αξιόπιστα, η μεμονωμένη επεξεργασία δείγματος το καθιστά χρονοβόρο, εντατικό στην εργασία και ανέφικτο.

Άλλοι δείκτες υπεροξειδωσής λιπιδίων περιλαμβάνουν τα F2-ισοπροστάνια (F2-IsoPs). Πρόκειται για χημικώς σταθερά ισομερή μόρια τύπου προσταγλανδίνης που δημιουργούνται από την αντίδραση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε φωσφολιπίδια μεμβράνης και ελεύθερες ρίζες ή ROS και αντιπροσωπεύουν έναν άλλο αξιόπιστο δείκτη που αξιολογεί την κατάσταση του οξειδωτικού στρες *in vivo* (Proudfoot et al., 1999). Στην πραγματικότητα, σχηματίζονται αρχικά σε λιπιδικές μεμβράνες ως συνέπεια οξειδωτικού στρες και στη συνέχεια απελευθερώνονται σε ελεύθερη μορφή με δράση φωσφολιπάσης. Τα F2-IsoPs δεν επηρεάζονται από την περιεκτικότητα των λιπιδίων στη διατροφή και, συνεπώς, η μέτρησή τους σε βιολογικά υγρά καθώς και το συμπύκνωμα εκπνοής αναπνοής μπορεί να παρέχει μια εκτίμηση της συνολικής παραγωγής του σώματος, ενώ η μέτρηση των F2-IsoP που εστεροποιούνται σε ιστούς ενδιαφέροντος μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τον εντοπισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό του οξειδωτικού στρες. Παρά τις παρατηρήσεις αυτές, η χρησιμότητα των F2-IsoP ως βιοδείκτες οξειδωτικού στρες είναι πολύ περιορισμένη, καθώς η αξιόπιστη ποσοτικοποίησή τους απαιτεί δαπανηρή χρωματογραφία αερίου/υγρού σε συνδυασμό με τεχνικές φασματοσκοπίας μάζας (HPLC/GC-MS). Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι επίσης ο προσδιορισμός τόσο του MDA όσο και των 15 (S) -8-iso-PGF (2α) από GC-MS/MS σε δείγματα πλάσματος ενδέχεται να διακυβευτούν σημαντικά με αιμόλυση. Οι τεχνικές ανοσοδοκιμασίας, που βασίζονται σε συγκεκριμένα αντισώματα, βρίσκονται υπό ανάπτυξη, αλλά

η εφαρμογή τους είναι περιορισμένη, καθώς τα ληφθέντα αποτελέσματα δεν συσχετίζονται καλά με τον προσδιορισμό της φασματομετρίας μάζας. Εκτός από τις μεθοδολογικές εκτιμήσεις, πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι σε ορισμένες φλεγμονώδεις καταστάσεις, το ενζυματικό προϊόν της αραχιδονικού οξέος προσταγλανδίνης F2a (PGF2a) πρέπει να αξιολογηθεί με μη ενζυματικά προϊόντα οξείδωσης (F2-IsoPs) σε διαφορετικούς ιστούς. Στην πραγματικότητα, έχει αναφερθεί πρόσφατα ότι τα επίπεδα PGF2a, αλλά όχι τα F2-IsoPs, ήταν υψηλότερα στο εγκεφαλονωτιαίο υγρό ασθενών με σκλήρυνση κατά πλάκας (σε σύγκριση με τους μάρτυρες). Ωστόσο, στο πλάσμα, τόσο τα F2-IsoPs όσο και ο PGF2a ήταν χαμηλότερα σε ασθενείς με προοδευτική νόσο και μειώθηκαν με την αύξηση της βαθμολογίας αναπηρίας. Μια καλή προσέγγιση θα μπορούσε να είναι η μελέτη του προφίλ του εικοσανοειδούς μεταβολώματος, όπως προτάθηκε πρόσφατα σε ζωικά μοντέλα ρευματοειδούς αρθρίτιδας (Wang et al., 2016).

Η ακόρεστη υδροξυαλκενική 4-HNE μπορεί επίσης να διερευνηθεί σε ιστούς, κατά προτίμηση χρησιμοποιώντας ανοσοϊστοχημεία (IHC) ή HPLC (Jo et al., 2011). Τα συζευγμένα διένια (CD) παράγονται ως συνέπεια της οξείδωσης των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων που προκαλούνται από ελεύθερες ρίζες (PUFAs) και μπορούν επίσης να ανιχνευθούν σύμφωνα με τους Suryanarayana Rao και Recknagel, οι οποίοι ακολουθούν τη μέγιστη απορρόφηση του υπεριώδους φωτός στα 233 nm από αυτές τις ενώσεις. Τέλος, τα υδροϋπεροξειδία λιπιδίων (LOOH)CD, τα οποία είναι τα κύρια προϊόντα οξείδωσης των PUFAs, μπορούν να προσδιοριστούν με τη δοκιμασία οξυγόνωσης σιδήρου σιδήρου ξυλενόλης (FOX), με βάση την ικανότητα του LOOH να οξειδώνει σιδηρούχο σίδηρο παρουσία πορτοκαλιού ξυλενόλης, οδηγώντας στο σχηματισμό ενός χρωματισμένου σύμπλοκο σιδήρου-σιδήρου-ξυλενόλης, με απορρόφηση στα 560 nm (Nouroozzadeh et al., 1994).

Οξειδωμένα επίπεδα λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) μετρώνται επίσης μερικές φορές σε ανθρώπινο ορό ή πλάσμα ως καθιερωμένοι βιοαισθητήρες οξειδωτικού στρες, χρησιμοποιώντας ELISA με βάση το ιδιόκτητο μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού 4E6, το οποίο στρέφεται εναντίον ενός διαμορφωτικού επιτόπου στο οξειδωμένο ApoB- 100. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος μπορεί να υπολείπεται της εξειδίκευσης αντισωμάτων για το oxLDL, καθώς μπορεί επίσης να ανιχνευθεί φυσικό LDL.

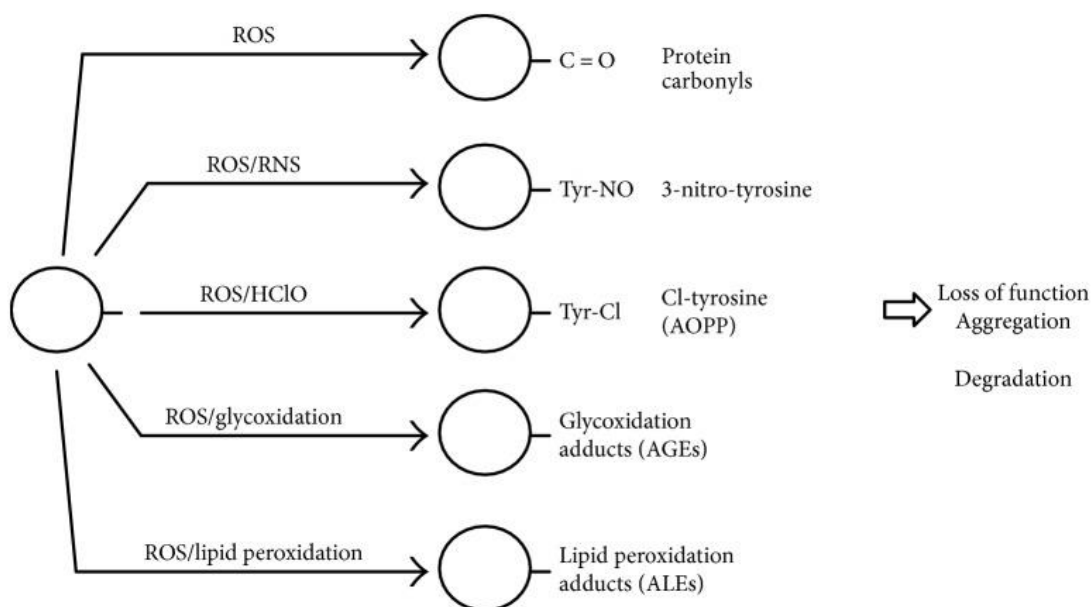
1.3 Προϊόντα Οξειδωσης Πρωτεϊνών

Οι πρωτεΐνες αντιπροσωπεύουν έναν ευρύ στόχο για ROS και RNS που παράγονται υπό κανονικές ή οξειδωτικές καταστάσεις στρες και μπορούν να θεωρηθούν ως γενικοί καθαριστές αυτών των ειδών. Αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα μπορούν να υποστούν οξειδωτικές τροποποιήσεις, όπως οξείδωση υπολειμμάτων που περιέχουν θείο, υδροξυλίωση αρωματικών και αλειφατικών ομάδων, νίτρωση υπολειμμάτων τυροσίνης, νιτροσυλίωση και γλουταθειονυλίωση υπολειμμάτων κυστεΐνης, χλωρίωση αρωματικών ομάδων και πρωτογενών αμινοξέων και μετατροπή ορισμένων αμινοξέων υπολείμματα σε καρβονυλο παράγωγα (Davies, 2016) (Σχήμα 2).

Η οξείδωση μπορεί επίσης να οδηγήσει στη διάσπαση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και στον σχηματισμό σταυρωτά συνδεδεμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Σχήμα 2).

Η οξείδωση των κέντρων σιδήρου-θείου από το $O_2\bullet$ -είναι μη αναστρέψιμη και οδηγεί σε αδρανοποίηση ενζύμων. Επιπλέον, τα μέταλλα που συνδέονται με την πρωτεΐνη μπορούν να δημιουργήσουν, μέσω της αντίδρασης Fenton, HO ρίζες που οξειδώνουν γρήγορα τα γειτονικά αμινοξικά κατάλοιπα της πρωτεΐνης.

Εάν οι οξειδωτικές τροποποιήσεις των υπολειμμάτων πρωτεΐνης δεν επιδιορθωθούν ή αφαιρεθούν σωστά, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την τρισδιάστατη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες της πρωτεΐνης που μπορεί επίσης να γίνουν τοξικές.



Σχήμα 3 Μη αναστρέψιμες οξειδωτικές τροποποιήσεις πρωτεϊνών. AGEs: προηγμένα τελικά προϊόντα γλυκοζυλίωσης. ALEs: προηγμένα τελικά προϊόντα υπεροξειδωσης. AOPP: προϊόντα πρωτεΐνης προηγμένης οξείδωσης. HClO: υποχλωριώδες οξύ. RNS: ενεργές μορφές αζώτου. ROS ενεργές μορφές οξυγόνου (Marrocco et al., 2017).

Οι μη αναστρέψιμες τροποποιήσεις των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν την καρβονυλίωση, τη νιτροποίηση, το σπάσιμο των δακτυλίων ιστιδίνης και τρυπτοφάνης και την υδρόλυση του πεπτιδικού δεσμού παρουσία προλίνης. Το τελευταίο εμφανίζεται κυρίως στο κολλαγόνο, πλούσιο σε προλίνη και υδροξυπρολίνη, το οποίο είναι ιδιαίτερα κατεστραμμένο κάτω από συνθήκες οξειδωτικού στρες (Monboisse & Borel, 1992).

Ο προσδιορισμός της οξείδωσης της πρωτεΐνης έχει βιολογική σημασία και καλή κλινική συνάφεια. Ένα ειδικό προφίλ οξειδωμένων πρωτεϊνών μπορεί να σχηματιστεί ως συνέπεια διαφορετικού οξειδωτικού στρες ή ασθενειών που σχετίζονται με την ηλικία. Η βιολογική σημασία της οξείδωσης της πρωτεΐνης μπορεί επίσης να προκύψει από τη χημική της σταθερότητα και τον σχηματισμό υψηλής απόδοσης. Η διαθεσιμότητα των δειγμάτων είναι ένας σημαντικός παράγοντας που περιορίζει την αξιοπιστία ενός βιοδείκτη. Η οξείδωση της πρωτεΐνης μπορεί να προσδιοριστεί σε δείγματα αίματος και ούρων, αν και ο προσδιορισμός σε συγκεκριμένα δείγματα ιστών ή κυττάρων μπορεί να δώσει ακριβέστερες πληροφορίες. Πρέπει να σημειωθεί ότι η οξείδωση των πρωτεϊνών

μπορεί να συμβεί κατά τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας δημιουργώντας έτσι κάποια αντικείμενα. Οι ρυθμοί αντιδράσεων οξείδωσης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τη θερμοκρασία του δείγματος, τη φυσική του μορφή και την παρουσία οξυγόνου και καταλυτών (μεταλλικά ιόντα και φως) (Breusing & Grune, 2010). Για αυτούς τους λόγους, η μέτρηση της οξείδωσης πρωτεΐνης μπορεί να είναι χρήσιμος δείκτης, εφόσον χαρακτηρίζεται από υψηλή αναπαραγωγικότητα, ευαισθησία και ειδικότητα.

Έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι για την ανίχνευση των διαφόρων ειδών τροποποιήσεων πρωτεΐνης. Ωστόσο, η βιολογική και κλινική συνάφεια της πρωτεΐνης οξείδωσης ως βιοδείκτη εξακολουθεί να περιορίζεται από τη διαθεσιμότητα μεθοδολογιών ικανών να αναγνωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν συγκεκριμένες πρωτεϊνικές οξειδωτικές τροποποιήσεις.

1.4 Νιτροτυροσίνη

Η νίτρωση πρωτεϊνικής τυροσίνης μεσολαβείται από ενεργές μορφές αζώτου όπως το υπεροξυνιτρίτη (ONOO-) και το διοξείδιο του αζώτου (NO₂) και έχει ως αποτέλεσμα προσθήκη ομάδας νίτρο σε ευαίσθητα υπολείμματα τυροσίνης. Η μυελοπεροξειδάση (MPO), με το κέντρο μετάλλων μετάπτωσης, μπορεί να αντιδράσει με το ONOO- για να δώσει σύμπλοκα οξο-μετάλλων και NO₂ διευκολύνοντας έτσι την αντίδραση νίτρωσης. Αν και τα ακριβή ενδιάμεσα και ο μηχανισμός νίτρωσης ίη νίνο υπήρξαν θέμα διαμάχης, μέτρα που αντικατοπτρίζουν την νίτρωση τυροσίνης έχουν χρησιμοποιηθεί ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η ελεύθερη νιτροτυροσίνη (3-NO₂-Tyr) αντιπροσωπεύει τον κύκλο εργασιών των νιτρωμένων πρωτεϊνών και μπορεί να μετρηθεί με διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS / MS) σε συνδυασμό με GC ή HPLC ως την τρέχουσα τυπική τεχνική χρυσού. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για τον καθορισμό ενός φυσιολογικού βασικού εύρους κυκλοφορίας ελεύθερου 3-NO₂-Tyr σε υγιή άτομα (προτείνεται από τους Pelluffo και Radi να είναι 1 nM) (Duncan, 2003).

Ο σχηματισμός νιτροτυροσίνης έχει παρατηρηθεί σε αγγειακούς και μυοκαρδιακούς ιστούς τόσο σε υγιή άτομα όσο και σε άτομα με CVD. Σε μια μελέτη ελέγχου περιπτώσεων 100 ασθενών με καθιερωμένη στεφανιαία νόσο (CAD), τα επίπεδα νιτροτυροσίνης που δεσμεύονται με πρωτεΐνες στο πλάσμα βρέθηκαν να είναι σημαντικά υψηλότερα μεταξύ των ασθενών με CAD ακόμη και μετά από προσαρμογή για παραδοσιακούς παράγοντες κινδύνου για CVD και CRP. Ο σχηματισμός

νιτροτυροσίνης στο SERCA2a είναι σημαντικά υψηλότερος στον καρδιακό ιστό των ανθρώπων με διατακτική μυοκαρδιοπάθεια σε σύγκριση με τους υγιείς μάρτυρες.

Παρά τον παθοφυσιολογικό ρόλο της νίτρωσης, υπάρχουν αρκετές προκλήσεις στην εφαρμογή της νιτροτυροσίνης ως βιοδείκτη CVD. Στην περίπτωση της αθηροσκλήρωσης, οι νιτρώδεις πρωτεΐνες που κυκλοφορούν και οι λιποπρωτεΐνες ενδέχεται να μην αντικατοπτρίζουν με ακρίβεια τον βαθμό νίτρωσης των βασικών πρωτεϊνών στο τοίχωμα του αγγείου ή τον ιστό που μας ενδιαφέρει (Papers et al., 2004). Επιπλέον, οι τρέχουσες μέθοδοι ανίχνευσης της νιτροτυροσίνης είναι σχετικά δαπανηρές και ανέφικτες για κλιμάκωση για έλεγχο και ανάλυση υψηλής απόδοσης. Απαιτούνται περαιτέρω μελέτες για την αντιμετώπιση αυτών των ζητημάτων προτού η νιτροτυροσίνη μπορεί να υιοθετηθεί ως βιοδείκτης οξειδωτικού στρες έτοιμο για την κλινική.

1.5 S-γλουταθειονυλίωση

Η αναστρέψιμη S-γλουταθειονυλίωση μπορεί να συμβεί είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες είτε ως αποτέλεσμα της αντιοξειδωτικής δράσης της GSH μέσω της μείωσης των οξειδωμένων υπολειμμάτων κυστεΐνης και του σχηματισμού μικτής δισουλφιδικής πρωτεΐνης-γλουταθειόνης (PSSG). Η γλουταθειονυλίωση της κυστεΐνης (SOH-) μπορεί να δράσει ως προστατευτικός μηχανισμός αποτρέποντας περαιτέρω μη αναστρέψιμη οξείδωση σε σουλφινικά ή σουλφονικά οξέα. Η μείωση του PSSG μπορεί να λάβει χώρα αυθόρμητα, όταν η αναλογία GSH/GSSG είναι υψηλή ή μπορεί να καταλυθεί από οξειδοοξειδοκτάσες πρωτεΐνης θειόλης-δισουλφιδίου, όπως γλουταρεδοξίνες, ισομεράσες πρωτεΐνης δισουλφιδίου, θειοοξειδοκτάση, υπεροξειδοοξειδοκτάση και σουλπιρεδοξίνες (Shelton et al., 2005). Οι πρόσφατες εξελίξεις στις τεχνικές της οξειδοαναγωγικής τεχνικής οδήγησαν στον εντοπισμό πολλών S-γλουταθειονυλιωμένων πρωτεϊνών και στην εμπλοκή τους σε οδούς που ρυθμίζονται από την οξειδοαναγωγή. Η αναστρέψιμη πρωτεΐνη-S-γλουταθειονυλίωση σε μονοκύτταρα και μακροφάγα έχει αναδειχθεί ως ένα νέο και σημαντικό παράδειγμα σηματοδότησης, το οποίο παρέχει μια μοριακή βάση για την καθιερωμένη σχέση μεταξύ μεταβολικών διαταραχών, οξειδωτικού στρες και καρδιαγγειακών παθήσεων.

Η μέτρηση της S-γλουταθειονυλίωσης των λειτουργικών σημαντικών πρωτεϊνών είναι ένας πολλά υποσχόμενος βιοδείκτης. Ωστόσο, αυτό παρεμποδίζεται από την πολυπλοκότητα των μεθοδολογιών (πρόσβαση σε δείγματα ιστών και τεχνικά τεχνουργήματα) που απαιτεί ιδιαίτερη

προσοχή στο χειρισμό και την προετοιμασία του δείγματος. Μια απλούστερη προσέγγιση είναι η ανάλυση της S-γλουταθειονυλίωσης των πρωτεϊνών σε κυκλοφορούντα κύτταρα. Η γλουταθειονυλίωση της αιμοσφαιρίνης έχει προταθεί ως δείκτης οξειδωτικού στρες και έχει αναφερθεί αύξηση της τροποποίησης της πρωτεΐνης σε ασθενείς με διαβήτη, υπερλιπιδαιμία και νεφρική ανεπάρκεια (Niwa et al., 2000).

Παρόλο που η S-γλουταθειονυλίωση μπορεί εύκολα να μετρηθεί με στύπωμα Western υπό μη αναγωγικές συνθήκες, απαιτείται η χρήση πιο αποτελεσματικών προσεγγίσεων για ακριβή ποσοτικοποίηση. Οι τεχνικές MS είναι έγκυρες αλλά απαιτούν εξειδικευμένα όργανα. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί δοκιμές ELISA χρησιμοποιώντας μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της γλουταθειόνης.

1.6 Μυελοπεροξειδάση (MPO)

Το MPO είναι ένα ένζυμο αίμης που είναι άφθονο σε κάψουλες ανθρώπινων φλεγμονωδών κυττάρων όπως ενεργοποιημένα ουδετερόφιλα, μακροφάγα και μονοκύτταρα. Το MPO δρα ως κύριο ένζυμο στην παραγωγή μιας σειράς ROS καταλύοντας τη μετατροπή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (H_2O_2) σε είδη που περιλαμβάνουν ριζική $\cdot OH$, $ONOO^-$, υποχλωρικό οξύ ($HOCl$) και NO_2 . Το ROS που προέρχεται από MPO μπορεί στη συνέχεια να τροποποιήσει τα λιπίδια, τις λιποπρωτεΐνες και τις πρωτεΐνες.

Η λειτουργία MPO μπορεί να μετρηθεί με δοκιμασίες δραστηριότητας υπεροξειδάσης όπως ο σχηματισμός προϊόντων οξείδωσης γουαϊακόλης που μπορούν εύκολα να μετρηθούν φασματοφωτομετρικά. Η μάζα/συγκέντρωση MPO μπορεί να ποσοτικοποιηθεί σε βιολογικά δείγματα χρησιμοποιώντας μια σειρά από εμπορικά διαθέσιμες πλάκες ELISA. Η συλλογή, ο χειρισμός και η επεξεργασία δειγμάτων επηρεάζει τον ποσοτικό προσδιορισμό του MPO. Για παράδειγμα, η ηπαρίνη στον ασθενή ή ο σωλήνας συλλογής θα μπορούσε να αλλάξει τις μετρήσεις (Mueller et al., 2008).

Το MPO παίζει ουσιαστικό ρόλο στην άμυνα του ξενιστή λόγω της μοναδικής ικανότητάς του να παράγει $HOCl$, το οποίο έχει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Από την ανακάλυψή του το 1994, πολλές μελέτες έχουν εμπλέξει επίσης το MPO στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, δείχνοντας

ότι είναι εμπλουτισμένο μέσα σε αθηρωματικές πλάκες. Τα φλεγμονώδη κύτταρα που έχουν προσληφθεί στο αγγειακό τοίχωμα απελευθερώνουν MPO που προέρχεται από MPO που μπορούν με τη σειρά τους να προωθήσουν τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου μειώνοντας τη βιοδιαθεσιμότητα του οξειδίου του αζώτου, παράγουν αθηρογόνο OxLDL και τροποποιούν τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), επηρεάζοντας τη λειτουργία του εκροή χοληστερόλης. Τα αυξημένα επίπεδα κυκλοφορίας MPO βρέθηκε ότι σχετίζονται με την παρουσία CAD.

1.7 Οξείδωση λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (oxLDL)

Οι λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας μπορούν να υποστούν οξειδωτική τροποποίηση και αυτό συσχετίστηκε με την αθηροσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Η πιο συνηθισμένη δοκιμή κάνει χρήση ειδικών αντισωμάτων που αναγνωρίζουν επιλεγμένες τροποποιήσεις αμινοξέων LDL (δηλ. υπολείμματα λυσίνης τροποποιημένων με αλδεύδη ή οξειδωμένα υπολείμματα τροποποιημένα με φωσφολιπίδια). Ωστόσο, η χρήση του oxLDL ως βιοδείκτη του οξειδωτικού στρες έχει επικριθεί λόγω της ετερογένειας των προϊόντων οξείδωσης, της χαμηλής ειδικότητας των αντισωμάτων και των διαφορετικών αποτελεσμάτων που λαμβάνονται ανάλογα με τον προσδιορισμό που χρησιμοποιείται (Frijhoff et al., 2015).

Επιπλέον, πρέπει να ληφθεί υπόψη η κάθαρση του oxLDL και ο σχηματισμός ανοσοσυμπλεγμάτων. Οι ασθενείς με ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο με ενδοκρανιακή αθηροσκλήρωση είχαν υψηλότερα αρχικά επίπεδα oxLDL και μεγαλύτερη μείωση μετά από ένα τυποποιημένο λιπαρό γεύμα σε σύγκριση με εκείνους που παρουσίασαν εξωκρανιακή αθηροσκλήρωση, υποδηλώνοντας αύξηση της κάθαρσης του oxLDL μετά το γεύμα. Έχει παρατηρηθεί αύξηση της πρόσληψης oxLDL επίσης σε μακροφάγους από ασθενείς με διαβήτη τύπου 2 (T2D), προκαλώντας δυνητικά σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και αθηροσκλήρωση. Το oxLDL μπορεί επίσης να προκαλέσει ωρίμανση δενδριτικών κυττάρων και να ρυθμίσει τη μετάβαση από την κλασική (M1) στην εναλλακτική (M2) ενεργοποίηση των μακροφάγων και από την απόκριση T helper 1 (Th1) σε T helper 2 (Th2), υποδηλώνοντας ότι αυτά θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως γέφυρα μεταξύ έμφυτης και προσαρμοστικής ανοσίας, που εμπλέκεται στην ανάπτυξη της πλάκας. Η επαγόμενη από Th2 ανταπόκριση θα μπορούσε να εξηγήσει την παρουσία αντισωμάτων κατά της οξείδωσης σε άτομα με T2D και μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, καθώς και στα αντι-MDA-LDL IgG που βρέθηκαν στον ορό

ασθενών που υποβλήθηκαν σε αντλία εκτός μόσχευμα bypass στεφανιαίας αρτηρίας αντλίας. Επομένως, το oxLDL δεν είναι μόνο ένας δείκτης οξειδωτικού στρες αλλά και ένας παθογόνος παράγοντας οι τιμές του οποίου θα πρέπει να αξιολογηθούν στο πλαίσιο μιας παγκόσμιας κλινικής εξέτασης.

1.8 Οξειδωτική βλάβη DNA / RNA

Η οξείδωση των νουκλεοτιδίων είναι μια άφθονη τροποποίηση DNA και αντιπροσωπεύει μια προ-μεταλλαξιγόνο βλάβη που προκαλεί μεταλλάξεις CG: TA, οι οποίες μπορούν επίσης να συμβάλουν στον καρκίνο. Η χαρακτηριστική ομάδα γουανίνης είναι ιδιαίτερα επιρρεπής σε οξείδωση υπό σχηματισμό 8-υδροξυ-2-δεοξυγουανουσίνης (8-OHdG) ή 8-OHG (8-oxoGuo) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης οξείδωσης DNA και RNA από υδροξυλ που προέρχεται από ρίζες Fenton ή υπεροξυνιτρώδες. Τα επίπεδα του ελεύθερου 8-OH (d) G μπορούν να μετρηθούν κατά την πέψη DNA / RNA και υδρόλυση από ιστούς ή απευθείας στα ούρα και στον ορό / πλάσμα. Ενώ η μέθοδος ELISA είναι διαθέσιμη, το πρότυπο μέτρησης βασίζεται σε μεθόδους φασματομετρίας μάζας.

Μια μετα-ανάλυση σχετικά με τη συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων 8-OHdG και της CVD (CAD, εγκεφαλικό επεισόδιο, περιφερική αρτηριακή νόσος και αθηροσκλήρωση καρωτίδων) που περιλάμβανε πέντε μελέτες ελέγχου περιπτώσεων και εννέα προοπτικές μελέτες (810 ασθενείς με CVD και 1106 άτομα ελέγχου) έδειξαν υψηλότερα επίπεδα -OHdG σε ασθενείς με CVD σε σύγκριση με τους μάρτυρες (SMD 1,04, 95% CI 0,61-1,47) (Minno et al., 2016). Σε καλή συμφωνία, μια περαιτέρω μετα-ανάλυση έξι μελετών (446 ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια και 140 μάρτυρες) από την ίδια ομάδα συγγραφέων έδειξε υψηλότερα επίπεδα 8-OHdG σε ασθενείς με καρδιακή ανεπάρκεια από ό, τι στους μάρτυρες (SMD 0,89, 95% CI 0,68-1,10) με προοδευτική αύξηση για υψηλότερη κατηγορία NYHA. Πρόσφατη μελέτη των Wang et al. (2020) στόχευε στη διερεύνηση του κατά πόσον το 8-OHdG μπορεί να συμβάλει στην επίπτωση του CAD σε 1920 ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Μετά από πολυμεταβλητή προσαρμογή, οι συγγραφείς ανέφεραν ότι τα αυξημένα επίπεδα 8-OHdG σχετίζονται εγκάρσια με αυξημένες πιθανότητες αποφρακτικού CAD (OR 1,38, 95% CI 1,24-1,52), υψηλότερο αριθμό ασθενών αγγείων με στένωση $\geq 50\%$ (OR 1,29, 95% CI 1,19-1,41), τροποποιημένη βαθμολογία Gensini (OR 1,28, 95% CI 1,18-1,39) και υψηλότερα επίπεδα C-αντιδραστικής πρωτεΐνης (β 0,18, 95% CI 0,06-0,31). Τα επίπεδα του 8-HOG ήταν

υψηλότερα μεταξύ των ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με αγγειακές επιπλοκές, ακολουθούμενες από ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 χωρίς αγγειακές επιπλοκές και υγιείς ασθενείς.

Κεφάλαιο 2 Κατανάλωση ψαριών και καρδιαγγειακή υγεία.

Η καρδιαγγειακή νόσος (CVD) ήταν η κορυφαία αιτία πρόωρων θανάτων παγκοσμίως το 2017, συμβάλλοντας σε ~ 17,8 εκατομμύρια θανάτους, συμπεριλαμβανομένων 8,9 εκατομμυρίων από στεφανιαία νόσο (CHD) (Pan et al., 2017). Υπήρξε μακροχρόνιο επιστημονικό ενδιαφέρον για τις καρδιοπροστατευτικές επιπτώσεις της κατανάλωσης ψαριών. Ένα σημαντικό μέρος της έρευνας σχετικά με τα καρδιαγγειακά οφέλη των ψαριών έχει επικεντρωθεί σε μακράς αλυσίδας ωμέγα-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs, συμπεριλαμβανομένων εικοσαπενταενοϊκού οξέος (EPA; 20: 5n-3), δοκοσαπενταενοϊκού οξέος docosapentaenoic acid (DPA; 22: 5n-3) και δοκοσαεξαενοϊκού οξέος docosahexaenoic acid (DHA; 22: 6n-3)) που εντοπίζονται στα ψάρια, αλλά και άλλα θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες και βιταμίνη D που μπορεί επίσης να διαδραματίσουν κάποιο ρόλο. Αντίθετα, τα ψάρια είναι επίσης η κορυφαία διατροφική πηγή υδράργυρου. Ο υδράργυρος σε ποτάμια, λίμνες και ωκεανούς εξομοιώνεται με τα ψάρια με τη διαδικασία βιοσυσσώρευσης και η οργανική του μορφή (μεθυλϋδράργυρος), βρίσκεται σε υψηλότερα επίπεδα στα μακροχρόνια αρπακτικά ψάρια. Σε πειραματικές και *in vitro* μελέτες σε ζώα, ο υδράργυρος καταδεικνύει επιβλαβείς φυσιολογικές επιδράσεις όπως δυσλιπιδαιμία, θρόμβωση και καρδιαγγειακή τοξικότητα, αυξάνοντας τις ανησυχίες ότι η έκθεση ενδέχεται να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης CVD. Επομένως, η κατανόηση των ανεξάρτητων καρδιαγγειακών επιδράσεων των πιθανών ευεργετικών και επιβλαβών θρεπτικών συστατικών στα ψάρια, όπως τα ωμέγα-3 PUFA και ο υδράργυρος, καθώς και οι πιθανές αλληλεπιδράσεις τους, είναι ζωτικής σημασίας για τη δημόσια υγεία και την κλινική σημασία (Mozaffarian, 2009).

Τα επίπεδα των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων είναι επικυρωμένοι βιοδείκτες που αντικατοπτρίζουν τη μακροπρόθεσμη διατροφική κατανάλωση των ψαριών. Στην μελέτη των (Pan et al., 2017) που διεξήχθη σε 2199 άνδρες ηλικίας 42-60 ετών που συμμετείχαν στο Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor Study (KIHD) στην ανατολική Φινλανδία αναφέρθηκε ότι τα συνολικά ωμέγα-3 PUFA μακράς αλυσίδας συσχετίζονταν σημαντικά αντίστροφα με τον κίνδυνο της ισχαιμίας που ασκείται από την άσκηση. Αντίθετα, τα υψηλότερα επίπεδα μεθυλϋδράργυρου συσχετίστηκαν με σημαντικά υψηλότερο κίνδυνο ισχαιμίας που προκαλείται από άσκηση. Οι επιδράσεις των ωμέγα-3 PUFAs και του μεθυλϋδράργυρου φαίνονται να είναι ανεξάρτητα το ένα από το άλλο, και υπήρχαν ελάχιστες

ενδείξεις ότι άλλαξαν τη σχέση του άλλου με το αποτέλεσμα. Δηλαδή τα μεγέθη των προστατευτικών συσχετίσεων για τα ωμέγα-3 PUFAs για ισχαιμία που προκαλείται από άσκηση ήταν παρόμοια είτε οι συμμετέχοντες είχαν υψηλά επίπεδα είτε χαμηλά επίπεδα μεθυλμυδράργυρου και αντίστροφα.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η κατανάλωση ψαριού είναι αντιστρόφως ανάλογη με θανατηφόρα ισχαιμική καρδιακή νόσο (IHD), καθώς έχει διαπιστωθεί η πρόληψη θανατηφόρων αρρυθμιών από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα n-3 μακράς αλυσίδας (PUFAs) στα ψάρια (Mozaffarian et al., 2003). Ωστόσο, εάν οι καρδιακές επιδράσεις της κατανάλωσης ψαριών σχετίζονται κυρίως με τις επιδράσεις των n-3 PUFAs, τότε οι συσχετίσεις μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με τον τύπο του ιχθυάλευρου που καταναλώνεται, καθώς η περιεκτικότητα σε n-3 PUFA μπορεί να διαφέρει κατά σειρά μεγέθους συγκρίνοντας τα λιπαρά ψάρια (π.χ. σολομός) με τα άπαχα ψάρια π.χ. (γατόψαρο). Επιπλέον, η μέθοδος παρασκευής (π.χ. τηγάνισμα) μπορεί να αλλάξει σημαντικά την περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα ενός ψαριού. Ωστόσο, λίγα είναι γνωστά για τις σχέσεις διαφόρων τύπων ιχθυαλεύρων με τον κίνδυνο IHD.

Ο (Mozaffarian, 2009) διερεύνησε τις σχέσεις διαφόρων τύπων ιχθυαλεύρων με κίνδυνο IHD, εξέτασαν τους συσχετισμούς κατανάλωσης τόνου / άλλου ψαριού και τα τηγανητά ψάρια με θάνατο από IHD, με αρρυθμικό θάνατο IHD και περιστατικά μη θανατηφόρου εμφράγματος του μυοκαρδίου (MI). Λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τις σχέσεις της κατανάλωσης ψαριών με τον κίνδυνο IHD συγκεκριμένα μεταξύ των ηλικιωμένων ενηλίκων με ιδιαίτερο κίνδυνο για IHD. Επειδή οι καρδιακές επιδράσεις της κατανάλωσης ψαριών μπορεί να οφείλονται κυρίως σε αντιαρρυθμικές επιδράσεις των n-3 PUFAs παρά στις επιδράσεις στην αθηρογένεση ή στη σταθερότητα της πλάκας, η κύρια υπόθεσή ήταν ότι η κατανάλωση ιχθυαλεύρων με υψηλότερη σε περιεκτικότητα σε n-3 PUFA συσχετίζεται αντιστρόφως με τον θάνατο IHD αλλά όχι μη θανατηφόρο MI, ενώ η κατανάλωση ιχθυαλεύρων με χαμηλότερη σε περιεκτικότητα σε n-3 PUFA δε συσχετίζεται με θάνατο IHD ή μη θανατηφόρο MI (Siscovick et al., 2001).

Ο (Nordøy, 2001) εντόπισε σημαντικά ευρήματα σχετικά με την κατανάλωση ψαριών και τα αποτελέσματα των καρδιαγγειακών παθήσεων. Πρώτον, κάποια στοιχεία δείχνουν ότι η κατανάλωση τηγανητών ψαριών σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο συνολικών καρδιαγγειακών παθήσεων, αν και άλλες μελέτες που αφορούσαν μη τηγανητά ψάρια δεν παρατήρησαν αυτή τη

σχέση. Δεύτερον, η κατανάλωση τηγανητών ψαριών συσχετίστηκε με αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος του μυοκαρδίου, ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει μείωση του εμφράγματος του μυοκαρδίου με την κατανάλωση μη τηγανητών ψαριών. Ωστόσο, άλλες μελέτες δεν έδειξαν σημαντική σχέση μεταξύ της κατανάλωσης ψαριών και του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Τέλος, μέχρι σήμερα καμία μελέτη δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση της κατανάλωσης ψαριών στα αποτελέσματα του εγκεφαλικού επεισοδίου.

Η κατανάλωση ψαριών είναι ένα δημοφιλές διαιτητικό συστατικό και προτείνεται τόσο στη δίαιτα Διατροφικών Προσεγγίσεων για Διακοπή Υπερτάσεων (DASH) όσο και στη μεσογειακή διατροφή. Η κατευθυντήρια γραμμή του American College of Cardiology / American Heart Association για την πρωτογενή πρόληψη της καρδιαγγειακής νόσου συνιστά φυτικές και μεσογειακές δίαιτες που περιλαμβάνουν «ζωικές πρωτεΐνες (κατά προτίμηση ψάρια)». Αυτή η κατανάλωση ζωικής πρωτεΐνης συνιστάται στο πλαίσιο μιας δίαιτας με άφθονες ίνες από φρούτα, λαχανικά, ξηρούς καρπούς και όσπρια. Οι συγγραφείς προτείνουν επίσης να αποφεύγονται τηγανητά τρόφιμα, μεταξύ άλλων τροφίμων που έχουν δείξει πιθανότητα βλάβης όσον αφορά τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Επιπλέον, τόσο η μεσογειακή όσο και η δίαιτα DASH αποθαρρύνουν την κατανάλωση τηγανητών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των τηγανητών ψαριών. Πράγματι, στη συστηματική ανασκόπηση των (Nordøy, 2001), διαπιστώθηκε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στα αποτελέσματα των καρδιαγγειακών παθήσεων όταν εξετάστηκε εάν τα ψάρια που καταναλώθηκαν ήταν τηγανητά ή όχι. Όσον αφορά τα μη τηγανητά ψάρια, αρκετές μελέτες είναι συνεπείς με τη δοκιμασία Diet And Reinfarction (DART), η οποία κατέδειξε ότι η κατανάλωση ψαριών ήταν ευεργετική για τη δευτερογενή πρόληψη του εμφράγματος του μυοκαρδίου. Παρόλο που ο μηχανισμός δεν είναι απολύτως σαφής, η κατανάλωση ψαριών θα μπορούσε να αποτρέψει συμβάντα καρδιαγγειακών παθήσεων μέσω ενός συνδυασμού αντι- αρρυθμικών (Newman et al., 1995) και αντιφλεγμονωδών ιδιοτήτων, καθώς και ευεργετικών επιδράσεων στη λειτουργία του καναλιού των καρδιακών ιόντων από πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας ωμέγα-3.

Μία εξήγηση της πιθανής μείωσης των καρδιαγγειακών παθήσεων που παρατηρείται με την κατανάλωση ψαριών σχετίζεται με σχετικά υψηλότερα επίπεδα ωμέγα-3 λιπαρών οξέων. Επιπλέον, μπορεί να υπάρχει μια πιθανή διαφορική επίδραση των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων από τα ψάρια έναντι των συμπληρωμάτων ωμέγα-3, τα οποία μπορεί να προκαλέσουν σύγχυση λόγω διαφορών

στη βιοδιαθεσιμότητα και οδηγεί σε υψηλότερες συγκεντρώσεις στο πλάσμα των ωμέγα-3 λιπαρών οξέων λόγω αποτελεσματικότερης ενσωμάτωσης στα λιπίδια του πλάσματος.

Οι συγγραφείς απέδειξαν ότι η περιεκτικότητα σε εικοσαπενταενοϊκό οξύ στα ερυθροκύτταρα βρέθηκε να αυξάνεται ταχύτερα στην ομάδα καταναλωτών που τρέφονται με ψάρια (Simonsen et al., 1987). Επιπλέον, το ψάρι έχει πολλά βιοδραστικά θρεπτικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένης μιας εξαιρετικής πηγής βασικών αμινοξέων, λιποδιαλυτών βιταμινών, ανόργανων συστατικών και άλλων τύπων λιπαρών οξέων που μπορεί να παρέχουν οφέλη για την υγεία. οξειδωτικό στρες και φλεγμονή σε ασθενείς με στεφανιαία νόσο, ενώ η βιταμίνη D θα μπορούσε ενδεχομένως να ρυθμίσει την αρτηριακή πίεση, να αναστέλλει τη φλεγμονή και να αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών λείων μυών και την αγγειακή αβεστοποίηση.

Παρόλο που τα ψάρια μπορεί να προσφέρουν οφέλη για την υγεία σε μέτρια κατανάλωση, ο τύπος και η προετοιμασία του ιχθυάλευρου έχουν επίσης βρεθεί ότι επηρεάζουν τα πιθανά οφέλη στα συμβάντα καρδιαγγειακής νόσου. Αρκετές μελέτες που εξετάστηκαν έδειξαν ότι η κατανάλωση τηγανητών ψαριών περισσότερες από μία φορές την εβδομάδα σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και εμφράγματος του μυοκαρδίου. Αν και οι λεπτομερείς μηχανισμοί τηγανητών τροφίμων που αυξάνουν τους κινδύνους καρδιαγγειακών παθήσεων δεν είναι καλά κατανοητοί, η διαδικασία τηγανίσματος θα μπορούσε να περιλαμβάνει τα ακόλουθα: 1) επαγωγή οξειδωτικού στρες και φλεγμονής από αλλοιωμένη οξείδωση, πολυμερισμό και υδρογόνωση λιπαρών οξέων στα ψάρια, 2) τα ψάρια μπορεί να χάσουν νερό, να απορροφήσουν λίπος, να χάσουν φυσικά n-3 λιπαρά οξέα και τα λάδια τηγανίσματος να αλλοιώσουν άλλα θρεπτικά συστατικά σε αυτά (Ivanhoe et al., 1997) 3) το τηγάνισμα επιδεινώνει τα έλαια μέσω της διαδικασίας οξείδωσης και υδρογόνωσης, οδηγώντας σε απώλεια ακόρεστων λιπαρών οξέων όπως το λινελαϊκό οξύ και αύξηση στα αντίστοιχα trans λιπαρά οξέα όπως το trans λινελαϊκό οξύ. Η λήψη τηγανητών ψαριών μπορεί επίσης να αντιπροσωπεύει έναν υποκατάστατο δείκτη λιγότερο υγιεινών διατροφικών προτύπων, κάτι που μπορεί συμβάλλουν στην καρδιαγγειακή νόσο.

Έχει εκτιμηθεί ότι τουλάχιστον οι μισοί από τους θανάτους που προκαλούνται από CHD οφείλονται σε ηλεκτρική αστάθεια της καρδιάς που καταλήγει σε κοιλιακή μαρμαρυγή. Μελέτες καρδιακών μυοκυττάρων και σε ζώα με πειραματική απόφραξη στεφανιαίων αρτηριών έδειξαν ότι τα κορεσμένα λιπαρά οξέα μπορεί να προάγουν την κοιλιακή αρρυθμία, ενώ τα ωμέγα-3 και τα ωμέγα-

6 PUFA είχαν αντιαρρυθμιογόνα αποτελέσματα, με τα ωμέγα-3 PUFA να φαίνονται πιο ισχυρά. Μια μελέτη ελέγχου περίπτωσης βάσει πληθυσμού που περιελάμβανε 334 ασθενείς με πρωτοπαθή καρδιακή ανακοπή και 493 άτομα ελέγχου φαίνεται να επιβεβαιώνει τις πειραματικές μελέτες (Nordøy, 2001). Σε σύγκριση με τη μη πρόσληψη ωμέγα-3 PUFAs, η πρόσληψη 0,45 g ωμέγα-3 FA ανά ημέρα ή ένα λιπαρό ψάρι την εβδομάδα συσχετίστηκε με σχετικό κίνδυνο πρωτοπαθούς καρδιακής ανακοπής. Σε σύγκριση με ένα επίπεδο μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων n-3 PUFA 3,3% των συνολικών λιπαρών οξέων, ένα επίπεδο 5,0% συσχετίστηκε με 70% μείωση του κινδύνου πρωτοπαθούς καρδιακής ανακοπής. Η παρατήρηση της μελέτης στην οποία συμμετείχαν 20 551 άνδρες γιατροί των ΗΠΑ ηλικίας 40-85 ετών και απαλλαγμένοι από έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλική αγγειακή νόσο κατά την έναρξη, και οι οποίοι είχαν συμπληρώσει ένα ημι-ποσοτικό ερωτηματολόγιο συχνότητας τροφίμων σχετικά με την κατανάλωση ψαριών και στη συνέχεια παρακολουθήθηκαν μέχρι και 11 χρόνια, επιβεβαίωσε αυτές τις παρατηρήσεις. Υπήρξαν 133 θάνατοι κατά τη διάρκεια της μελέτης και αυτά τα πιθανά δεδομένα πρότειναν, μετά από προσαρμογή για παράγοντες στεφανιαίας επικινδυνότητας και προηγούμενη καρδιαγγειακή νόσο, ότι η κατανάλωση ψαριών τουλάχιστον μία φορά την εβδομάδα συσχετίστηκε με 52% χαμηλότερο κίνδυνο ξαφνικού θανάτου στους άνδρες.

Πρόσφατες μελέτες που αξιολογούν τη σχέση μεταξύ της κατανάλωσης ωμέγα-3 λιπαρών οξέων και της μεταβλητότητας του παλμού έχουν προσθέσει μια νέα διάσταση στις πιθανές καρδιοπροστατευτικές επιδράσεις των λιπαρών οξέων ωμέγα-3. Η κατανάλωση ενός γεύματος ιχθύος την εβδομάδα σε σύγκριση με καθόλου ψάρι δεν έχει συσχετιστεί με αύξηση της μεταβλητότητας του καρδιακού ρυθμού, η οποία έχει συσχετιστεί με χαμηλότερο κίνδυνο αρρυθμικού θανάτου μετά από έμφραγμα του μυοκαρδίου (Ivanhoe et al., 1997).

2.1 Λιπαρά οξέα και δείκτες καρδιαγγειακής υγείας

Μεταξύ των τριών μακροθρεπτικών συστατικών, δηλαδή υδατανθράκων, πρωτεϊνών και λιπών, τα τελευταία, αποτελούμενα κυρίως από λιπαρά οξέα ως μέρος των τριακυλογλυκερολών και, σε μικρότερο βαθμό, στα φωσfolιπίδια, είναι σημαντικοί καθοριστικοί παράγοντες της κατάστασης της υγείας. Οι άνθρωποι λαμβάνουν επίσης γλυκολιπίδια, άλλα σύνθετα λιπίδια και χοληστερόλη. Σε πολλές αναπτυσσόμενες χώρες, η πρόσληψη λίπους αυξάνεται, ενώ στις ανεπτυγμένες χώρες, η πρόσληψη λίπους τείνει να μειωθεί τα τελευταία 30 χρόνια περίπου. Τα λίπη έχουν ποσοτική

σημασία στη διατροφή για δύο τουλάχιστον λόγους: (1) εύκολη διαθεσιμότητα λόγω μαζικής καλλιέργειας φυτών για παραγωγή λαδιού και (2) τρέχον χαμηλό κόστος πλούσιων σε ενέργεια λιπαρών τροφών. Πρέπει επίσης να τρώμε λίπος για (α) παροχή ενέργειας. β) βασική πρόσληψη λιπαρών οξέων γ) πρόσληψη λιποδιαλυτών βιταμινών (δ) αύξηση της γευστικότητας των τροφίμων (οι περισσότερες γεύσεις είναι λιποδιαλυτές). Εκτός από τη συνολική ποσότητα λίπους, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ο τύπος λίπους έχει επίσης αλλάξει με την πάροδο του χρόνου. το αποτέλεσμα είναι ότι η σύνθεση λιπαρών οξέων της ανθρώπινης διατροφής έχει αλλάξει. Τα διαθέσιμα στοιχεία από το Ηνωμένο Βασίλειο δείχνουν ότι η αναλογία πολυακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών οξέων στη διατροφή αυξήθηκε από 0,17 το 1959 σε 0,22 το 1979 και σε 0,40 το 1990 (Tiukinhoy & Rochester, 2006). Μεγάλο μέρος αυτής της αλλαγής οφείλεται σε μια αλλαγή στις καταναλωτικές συνήθειες, που διευκολύνεται από φορείς δημόσιας υγείας και επιστημονικές κοινωνίες. Οι καταναλωτές μετακινήθηκαν από βούτυρο και ζωικά λίπη στα φυτικά έλαια. Στην Ευρώπη, η συνολική πρόσληψη λίπους κυμαίνεται από 28,5 έως 46,2% της συνολικής ενέργειας, εκ των οποίων τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αντιπροσωπεύουν 2,8 έως 11,3%.

Εκτός από την παροχή της πιο ποσοτικής ενέργειας, τα λιπαρά οξέα διαδραματίζουν πολύ σχετικούς φυσιολογικούς ρόλους. Συγκεκριμένα, επιλεγμένοι τύποι λιπαρών οξέων, όπως τα μακράς αλύσου, πολύ ακόρεστα λιπαρά οξέα της σειράς ωμέγα 6 και ωμέγα 3, είναι σημαντικοί ρυθμιστές της κυτταρικής λειτουργίας και πρόδρομοι των μεσολαβητών λιπιδίων. Με άλλα λόγια, το διαιτητικό λίπος είναι απαραίτητο για την ενέργεια, την παροχή διαλυτών σε λιπίδια βιταμινών και τη φυσιολογία. Παρόλο που οι άνθρωποι συχνά πιστεύουν ότι οι δίαιτες πρέπει να έχουν όσο το δυνατόν χαμηλότερα λιπαρά, τα αποτελέσματα της μεγαλύτερης τυχαιοποιημένης δοκιμής παρέμβασης που έγινε ποτέ, δηλαδή, της Πρωτοβουλίας για την Υγεία των Γυναικών (WHI) (Tiukinhoy & Rochester, 2006), έδειξαν ότι ο περιορισμός της πρόσληψης ολικού λίπους δεν βελτιώνει σημαντικά το προφίλ καρδιαγγειακού κινδύνου, τη συχνότητα εμφάνισης διαβήτη τύπου 2 και, πιθανώς, δεν προκαλεί αξιοσημείωτη απώλεια βάρους. Πράγματι, δεν παρατηρήθηκε σημαντική προστατευτική επίδραση της δίαιτας χαμηλών λιπαρών στα καρδιαγγειακά τελικά σημεία, η οποία περιελάμβανε γυναίκες που μείωσαν τη συνολική πρόσληψη λίπους από 35/37% σε 25/27% για μέσο όρο 7 ετών, σε σύγκριση σε γυναίκες που δεν άλλαξαν τη διατροφή τους. Συνοπτικά, στις δυτικές χώρες, πρέπει να δοθεί μεγαλύτερη έμφαση στο σχετικό ποσοστό των μεμονωμένων λιπαρών οξέων παρά στη συνολική μείωση της πρόσληψης λίπους.

2.1.1 Κορεσμένα λιπαρά οξέα

Η διατροφική πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών οξέων είναι ένας σημαντικός καθοριστικός παράγοντας των επιπέδων χοληστερόλης LDL στο πλάσμα. Ως εκ τούτου, αυτή η κατηγορία λιπαρών οξέων έχει από καιρό θεωρηθεί ότι σχετίζεται θετικά με καρδιαγγειακό κίνδυνο (η παρόμοια επίδραση στα επίπεδα χοληστερόλης HDL στο πλάσμα συνήθως παραβλέπεται). Τουλάχιστον δύο μετα-αναλύσεις, δεν ανέφεραν συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης κορεσμένου λίπους και της συνολικής θνησιμότητας. Το κρίσιμο ζήτημα είναι ότι η απεριόριστη μείωση των κορεσμένων λιπών οδηγεί στην απαγόρευση των κατά τα άλλα υγιεινών τροφίμων, όπως τα γαλακτοκομικά τρόφιμα.

2.1.2 Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFAs)

Οι διεθνείς οδηγίες προωθούν τώρα την υποκατάσταση των MUFA ή πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) έναντι των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA). Όσον αφορά τα MUFAs, ορισμένα αποδεικτικά στοιχεία που υποστηρίζουν αυτήν την έννοια μπορούν πραγματικά να βρεθούν στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία. Τα δεδομένα από την Κρήτη (μια περιοχή όπου η μακροζωία είναι από τις υψηλότερες στον κόσμο) δείχνουν ότι η πρόσληψη θερμίδων από λίπος προσεγγίζει το 40% των συνολικών θερμίδων, περίπου οι μισές από τις οποίες προέρχονται από ελαιόλαδο, δηλαδή, υψηλή πρόσληψη ελαϊκού οξέος MUFA (18 : 1ω9) (Moschandreas & Kafatos, 1999). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί στη δοκιμή PREDIMED.

Κυρίως βάσει της αδιαμφισβήτητης συσχέτισης μεταξύ της χρήσης ελαιολάδου και της χαμηλότερης συχνότητας εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων (καθώς και της νευροεκφυλισμού και του καρκίνου), πολλοί ερευνητές και φορείς δημόσιας υγείας αποδίδουν τις MUFAs άμεσες υγιείς ιδιότητες. Ωστόσο, μια προσεκτική ματιά στη δημοσιευμένη βιβλιογραφία δημιουργεί κάποια αμφιβολία σε αυτήν την υπόθεση, και οι επιπτώσεις του έξτρα παρθένου ελαιολάδου σε σχέση με τον στεφανιαίο κίνδυνο οφείλονται στις (πολυ) φαινόλες του και όχι στα λιπιδικά συστατικά του όπως το ελαϊκό οξύ. Κατ' αρχάς, αρκετές μελέτες, που συνοψίστηκαν σε εξίσου με μεγάλη αναφορά, υπολόγισαν ότι οι επιδράσεις των MUFA στη χοληστερόλη - όταν αντικαθιστούν ισοποριακά τους υδατάνθρακες - είναι μάλλον μικρές ή αμελητέες. Επιπλέον, μια πρόσφατη κριτική

από τους Tomé-Carneiro et al. [51] υπογράμμισε τις δυνητικά επιβλαβείς επιπτώσεις του ελαιολάδου και του ελαϊκού οξέος όταν χρησιμοποιούνται σε περίσσεια.

Παραδείγματα επιβλαβών επιπτώσεων της υπερβολικής χρήσης MUFA περιλαμβάνουν μελέτες παρατήρησης. Σε μια μελέτη διατομής, εξετάστηκαν οι σχέσεις μεταξύ της πρόσληψης λιπαρών οξέων και του μεταβολικού συνδρόμου (MetS) μεταξύ υπέρβαρων και παχύσαρκων γυναικών. Οι υπέρβαρες γυναίκες με MetS κατανάλωναν υψηλότερες ποσότητες μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, πολυακόρεστων λιπαρών οξέων και λινελαϊκού οξέος σε σύγκριση με τις υπέρβαρες γυναίκες χωρίς MetS (Maximino et al., 2015). Επιπλέον, σε ένα μεγάλο δείγμα Σουηδών μεσήλικων ανδρών (σύνολο 2322), μια παρακολούθηση 32 ετών έδειξε ότι οι αυξημένες ποσότητες παλμιτικού, παλμιτολεϊκού και ελαϊκού οξέος σχετίζονται με υψηλότερο κίνδυνο εγκεφαλικού επεισοδίου / παροδικής ισχαιμικής προσβολής, ενώ ένα υψηλότερο ποσοστό λινελαϊκού οξέος ήταν προστατευτικό.

Αρκετές μελέτες ελέγχου περιπτώσεων που ανέλυσαν τα προφίλ λιπαρών οξέων στην κυκλοφορία στην πραγματικότητα ανέφεραν υψηλότερο παρά χαμηλότερο κίνδυνο CHD καθώς σχετίζονται με υψηλότερες αναλογίες MUFAs. Στα παραδείγματα περιλαμβάνονται οι (Marangoni et al., 2014) οι οποίοι συνέκριναν 119 ασθενείς με πρόσφατη διάγνωση εμφράγματος του μυοκαρδίου με 103 μάρτυρες. Οι συγκεντρώσεις ελαϊκού οξέος στο αίμα ήταν υψηλότερες στο πρώτο δείγμα απ' ό,τι στο δεύτερο. Τέλος, οι (Würtl et al., 2015) ταξινόμησαν τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα ως προγνωστικά καρδιαγγειακού κινδύνου σε 14.629 συμμετέχοντες σε τρεις μελέτες με βάση τον πληθυσμό που πραγματοποιήθηκαν στη Φινλανδία και το Ηνωμένο Βασίλειο. Αξίζει να σημειωθεί, πρόσφατη έρευνα δείχνει ότι τα αποτελέσματα των μονοακόρεστων που προέρχονται από φυτά είναι διαφορετικά από αυτά που βρίσκονται στο κρέας (Guasch-ferré et al., 2018).

2.1.3 Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA)

Το κύριο PUFA στη διατροφή είναι το λινελαϊκό οξύ (18: 2ω6, LA), ακολουθούμενο από το άλφα-λινολενικό οξύ (18: 3ω3, ALA). Η πρόσληψη μεταξύ ενηλίκων στον δυτικό κόσμο είναι περίπου 13,5 g και 1,7 g την ημέρα, αντίστοιχα. Τα PUFA μεγαλύτερης αλυσίδας καταναλώνονται σε χαμηλότερες ποσότητες από τα LA και ALA. Η πρόσληψη αραχιδονικού οξέος (20: 4ω6, ARA) στους δυτικούς πληθυσμούς κυμαίνεται μεταξύ 50 και 300 mg / ημέρα. Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι, αν

και πολλά λιπαρά οξέα μπορούν να συντεθούν στο ανθρώπινο σώμα, τα θηλαστικά μπορούν να εισάγουν διπλούς δεσμούς στη θέση 9 λιπαρών οξέων, αλλά δεν μπορούν να το κάνουν στις θέσεις 3 και 6, κάτι που είναι απαραίτητο για τη σύνθεση PUFAs [43]. Κατά συνέπεια, τα λινελαϊκά και άλφα-λινολενικά οξέα πρέπει να καταναλώνονται με τη διατροφή και, επομένως, ονομάζονται «απαραίτητα». Από την άλλη πλευρά, η αναγκαιότητα λιπαρών οξέων μπορεί επίσης να αναφέρεται στους διάφορους απαραίτητους ρόλους που διαδραματίζουν στην κυτταρική φυσιολογία.

Είναι κοινή σοφία ότι η δυτική δίαιτα, αν συχνά είναι πολύ πλούσια σε λιπαρά, κυρίως ως κορεσμένα, μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα της σειράς ωμέγα 6 (όπως το LA), υπάρχουν σε υψηλές συγκεντρώσεις στα περισσότερα έλαια σπόρων. Τουλάχιστον στην Ευρώπη, η κατανάλωση PUFA με ωμέγα 6 είναι στην πραγματικότητα χαμηλότερη από τα επίπεδα που προτείνουν διάφοροι επιστημονικοί φορείς, όπως η American Heart Association.

2.1.4 Ωμέγα 6 λιπαρά οξέα

Όπως αναφέρθηκε, το πιο πλούσιο ωμέγα 6 PUFA στη διατροφή είναι το LA (18: 2ω6), του οποίου οι προσλήψεις είναι κατά μέσο όρο 50 φορές υψηλότερες από αυτές του ARA. Η έρευνα για το LA κέρδισε έλξη πριν από περίπου 50 χρόνια [68] όταν αυτό το λιπαρό οξύ αποδείχθηκε ότι μειώνει τις συγκεντρώσεις χοληστερόλης στο αίμα. Κατά συνέπεια, οι διατροφικές συμβουλές για την αύξηση της κατανάλωσής τους εκδόθηκαν από τις αρχές δημόσιας υγείας. Πράγματι, το πολυακόρεστο λίπος (και πάλι, κυρίως LA) στις ΗΠΑ αυξήθηκε από περίπου 3% της ενέργειας τη δεκαετία του 1950 σε περίπου 6-7% της ενέργειας (Willett, 2007). Η αύξηση της κατανάλωσης LA συσχετίστηκε με μια σημαντική (50%) μείωση των καρδιαγγειακών παθήσεων στις ΗΠΑ. Αυτή η διατροφική αλλαγή επιβεβαιώθηκε από μεγάλες αυξήσεις της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέων των δειγμάτων λιπών. Οι επιδράσεις των ωμέγα 6 PUFA (και άλλων λιπαρών οξέων) στα λιπίδια του αίματος έχουν υπολογιστεί με εξισώσεις που απέδωσαν σχεδόν πανομοιότυπα αποτελέσματα: η κατανάλωση κορεσμένου λίπους σχετίζεται θετικά και το πολυακόρεστο λίπος σχετίζεται αντιστρόφως με τις συγκεντρώσεις χοληστερόλης στον ορό. Αυτά τα ευρήματα επιβεβαιώθηκαν από τους Mensink et al. [50], ο οποίος αντιμετώπισε επίσης τις επιπτώσεις των διαιτητικών λιπών όχι μόνο στη συνολική χοληστερόλη στο αίμα, αλλά και στα επίπεδα LDL και HDL χοληστερόλης και τριγλυκεριδίων [50]. Συνοπτικά, σε σύγκριση με τους υδατάνθρακες, το πολυακόρεστο λίπος (η

συντριπτική πλειονότητα του οποίου είναι, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ωμέγα 6 PUFA) μειώνει την LDL χοληστερόλη, με μικρή επίδραση στην HDL χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια. Ως εκ τούτου, η διατροφική πρόσληψη ωμέγα-6 λιπαρών οξέων, π.χ., η αντικατάσταση του 5% των θερμίδων από κορεσμένα με λινελαϊκό οξύ, συσχετίστηκε με σημαντική μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου (-9%) σε μια μετα-ανάλυση των ΗΠΑ. Η συσχέτιση μεταξύ της αύξησης της πρόσληψης LA και της μείωσης των συμβάντων CHD διατηρεί, σε αυτήν τη μετα-ανάλυση, έως και τουλάχιστον το 8% των συνολικών θερμίδων από το LA. Δύο πρόσφατες μετα-αναλύσεις έδειξαν αρνητική συσχέτιση των επιπέδων LA στο πλάσμα ή των ιστών (που αντικατοπτρίζουν την πρόσληψη αυτού του βασικού λιπαρού οξέος) με τη συχνότητα εμφάνισης CHD και CVD και τη θνησιμότητα και τη συχνότητα εμφάνισης διαβήτη τύπου 2.

Έχει προταθεί ότι το LA μπορεί να αναστέλλει εν μέρει το ένζυμο PCSK9, το οποίο ρυθμίζει την αποδόμηση του ηπατικού LDL υποδοχέα, με τρόπο παρόμοιο με (αν και πολύ λιγότερο αποτελεσματικό από αυτό) των διαθέσιμων φαρμάκων, δηλαδή του alirocumab και του evolocumab. Αυτή η υπόθεση, ωστόσο, απαιτεί περαιτέρω επιβεβαίωση. Περαιτέρω, τα επίπεδα του λινελαϊκού οξέος στο πλάσμα συσχετίζονται θετικά με την ευαισθησία στην ινσουλίνη. Το καθαρό αποτέλεσμα της χρήσης συνιστώμενων ποσοτήτων ωμέγα 6 λιπαρών οξέων είναι αυτό της μείωσης του καρδιαγγειακού κινδύνου. Εκτός από τις επιδημιολογικές μελέτες, ένα σκέλος της κλινικής δοκιμής PREDIMED, δηλαδή, εκείνο όπου οι ασθενείς έλαβαν ξηρούς καρπούς πλούσιους σε λινελαϊκό οξύ, επιβεβαίωσαν καρδιαγγειακή προστασία (Estruch et al., 2018).

Θεωρητικά, τα ωμέγα 6 λιπαρά οξέα, δηλαδή το αραχιδονικό οξύ, θα μπορούσαν να είναι προφλεγμονώδη, ως πρόδρομοι των εικοσανοειδών. Από διατροφική άποψη, ορισμένες θεωρίες θέτουν την ανταγωνιστική σχέση με τα ωμέγα 3 λιπαρά οξέα, με τα οποία τα ωμέγα 6 πρέπει να ανταγωνίζονται για κάποιες ενζυματικές δραστηριότητες, δηλαδή επιμήκυνση και αποκορεσμό. Ωστόσο, η πλειονότητα των μελετών σε ανθρώπους δεν επιβεβαιώνει αυτή τη βιοχημική υπόθεση, και μια συστηματική ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν κατέληξε ουσιαστικά σε οποιαδήποτε αύξηση των φλεγμονωδών δεικτών που σχετίζονται με την κατανάλωση ωμέγα 6 στους ανθρώπους (Johnson & Fritsche, 2012). Σημειωτέον, μια μελέτη περίπτωσης για ιταλικά άτομα με έμφραγμα ανέφερε ότι τα υψηλά επίπεδα πλάσματος τόσο των ωμέγα 3 όσο και των ωμέγα 6 συσχετίστηκαν με μια σαφή μείωση κινδύνου, ενώ η τώρα απορριφθείσα αναλογία ωμέγα 6 / ωμέγα 3 δεν συσχετίστηκε σημαντικά με τον ίδιο τον κίνδυνο. Επιπλέον, η αναλογία ωμέγα 6 / ωμέγα 3

συσχετίστηκε αρνητικά με το συνολικό ποσοστό θανάτου, δηλαδή, η αύξηση των λόγων συσχετίστηκε με τη μείωση του κινδύνου θανάτου για οποιαδήποτε αιτία σε μια πρόσφατη και πολύ μεγάλη προοπτική ομάδα.

2.1.5 Ωμέγα 3 λιπαρά οξέα

Σε φυσιολογικούς όρους, τα ωμέγα 3 PUFA, ειδικά εκείνα που έχουν μεγαλύτερη σημασία σε βιολογικούς όρους, δηλαδή τα μακράς αλυσίδας PUFA εικοσαπενταενοϊκά (EPA) και δοκοσαεξαενοϊκά docosahexaenoic (DHA), έχουν γίνει ανάλογα με τα μικροθρεπτικά συστατικά (προσλήψεις mg / ημέρα στα περισσότερα πληθυσμοί από περίπου 100 g / ημέρα ολικού λίπους). Αναμφισβήτητα στοιχεία δείχνουν ότι η επαρκής πρόσληψη ωμέγα-3 από φυτικές τροφές (λιναρόσπορος, canola και σογιέλαια), δηλαδή άλφα-λινολενικό οξύ (ALA, 18: 3ω3), και από ψάρια (EPA και DHA, αντίστοιχα) είναι σχετίζεται με σημαντική μείωση του στεφανιαίου κινδύνου και του ξαφνικού θανάτου, ειδικά στους ηλικιωμένους (Francesco Visioli & Hagen, 2007). Δεδομένα από 17 προοπτικές μελέτες που εξετάζουν τη συσχέτιση των διατροφικών EPA και DHA με τον κίνδυνο διαφόρων στεφανιαίων αποτελεσμάτων δείχνουν μείωση κινδύνου κατά 18% για οποιοδήποτε συμβάντος CVD για εκείνους με υψηλότερη διατροφική πρόσληψη EPA + DHA σε σύγκριση με εκείνες με χαμηλότερη πρόσληψη. Υπολογίστηκαν επίσης σημαντικές μειώσεις κατά 23%, 19% και 47% στον κίνδυνο θανατηφόρων στεφανιαίων επεισοδίων, στεφανιαίου θανάτου και ξαφνικού καρδιακού θανάτου αντίστοιχα [85]. Αυτές οι προστατευτικές δράσεις, οι οποίες προέρχονται από μελέτες παρατήρησης και σχετίζονται κυρίως με την κατανάλωση ψαριών παρά τη χρήση συμπληρωμάτων, εξηγούνται μηχανικά από τις ευνοϊκές επιδράσεις των EPA και DHA στην τριγλυκεριδαιμία, στη λειτουργία των αιμοπεταλίων, στην αρτηριακή πίεση και στη χαμηλότερη παραγωγή πρόσφυσης και προφλεγμονώδεις πρωτεΐνες από το αρτηριακό τοίχωμα [82], εκτός από τις άμεσες αντιαρρυθμικές και αντιοξειδωτικές επιδράσεις. Το πρώτο RCT που διερεύνησε τη φαρμακολογική χρήση των ωμέγα 3 ήταν το GISSI-Prevenzione, όπου οι κάψουλες συμπυκνωμένων αιθυλεστέρων ωμέγα 3 (σε δόση 850 mg / ημέρα) έναντι του εικονικού φαρμάκου χορηγήθηκαν σε άτομα με κλινικό ιστορικό στεφανιαίας. Αυτή η δοκιμή επιβεβαίωσε κλινικά τα καρδιοπροστατευτικά αποτελέσματα των EPA και DHA. Το επόμενο JELIS RCT μελέτησε τη χρήση του EPA (1,8 g / d ως αιθυλεστέρα) μόνο σε Ιάπωνες ασθενείς που έλαβαν στατίνες και ανέφερε

19% χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης επανεμφάρματος σε σύγκριση με την ομάδα μόνο στατίνης. Μετά από αυτές τις μελέτες, ωστόσο, δεν προέκυψαν περαιτέρω σημαντικά στοιχεία, από ελεγχόμενες δοκιμές, υπέρ της θεραπείας με ωμέγα 3 στη δευτερογενή πρόληψη, με εξαίρεση τη δοκιμή REDUCE-IT, όπου 4 g /d icosapent αιθυλίου μείωσαν σημαντικά τα καρδιαγγειακά συμβάματα σε υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς με θεραπεία με στατίνη. Όσον αφορά το προφίλ των λιπιδίων, υπήρξε σημαντική μείωση των τριγλυκεριδίων (μείωση 0,5 mmol / L, $p < 0,001$) και LDL-χοληστερόλη (μείωση 0,13 mmol / L, $p < 0,001$).

Άλλες δοκιμές έχουν πραγματοποιηθεί με υψηλές (υψηλότερες από τις προηγούμενες) δόσεις καθαρού EPA. Πολύ πρόσφατα, οι (Rueda et al., 2020) διερεύνησαν εάν τα επίπεδα EPA ορού-PC κατά τη στιγμή του εμφράγματος του μυοκαρδίου (STEMI) συσχετίστηκαν με χαμηλότερη επίπτωση σημαντικών ανεπιθύμητων καρδιαγγειακών συμβάντων, θνησιμότητας όλων των αιτιών για παρακολούθηση 3 ετών. Τα αυξημένα επίπεδα EPA και ALA στον ορό-PC κατά τη στιγμή του STEMI συσχετίστηκαν με χαμηλότερο κίνδυνο κλινικών ανεπιθύμητων ενεργειών, τα οποία οι συγγραφείς αποδίδουν σε δίαιτες πλούσιες σε αυτά τα δύο λιπαρά οξέα. Μια πρόσφατη ανάλυση της μελέτης ANCHOR [93] ανέφερε ότι το icosapent ethyl 4 g / ημέρα μείωσε σημαντικά και με ασφάλεια τις τριακυκλογλυκερόλες (TG) και άλλες αθηρογόνες και φλεγμονώδεις παραμέτρους χωρίς αύξηση του LDL-C σε ασθενείς που έλαβαν στατίνη με hsCRP $\geq 2,0$ mg / ημέρα L και TG 200 έως 499 mg / dL κατά την έναρξη, έναντι του εικονικού φαρμάκου (Miller et al., 2019).

Το σκεπτικό για τη χρήση καθαρής EPA αντί για το πιο συνηθισμένο μείγμα ιχθυελαίου EPA και DHA είναι ότι το τελευταίο αυξάνει τις συγκεντρώσεις LDL-χοληστερόλης περισσότερο από τα προηγούμενα, τουλάχιστον σε υπερτριγλυκεριδαιμικούς ασθενείς. Αυτό το αποτέλεσμα είναι πιο έντονο στους φορείς ApoE4 και μπορεί, εν μέρει, να αναιρέσει την καρδιοπροστατευτική δράση του DHA σε αυτήν την υποομάδα πληθυσμού.

Είναι σημαντικό να υπογραμμιστεί ότι τα σε μεγάλο βαθμό αρνητικά αποτελέσματα των πιο πρόσφατων μελετών δεν πρέπει να υπονομεύουν τη σύσταση για τακτική κατανάλωση ψαριών ή φυτικών πηγών ALA. Όπως αναφέρθηκε πρόσφατα από τους (Goeller & Achenbach, 2020), ένας χαμηλός δείκτης ωμέγα 3 σχετίζεται με την αρχική έναρξη της στεφανιαίας αθηροσκλήρωσης. Δέκα μελέτες εντόπισαν μείωση κατά 15% του κινδύνου θανατηφόρου CHD για κάθε μία από τις τυπικές αυξήσεις απόκλισης στον δείκτη ωμέγα 3. Σε πολλές δοκιμές, τα καψάκια ωμέγα 3 μπορεί να είχαν

δοθεί σε άτομα που δεν τα χρειάζονταν απαραίτητα και πολύ χαμηλή δόση θα μπορούσε να είχε χορηγηθεί σε άτομα με πολύ χαμηλό δείκτη ωμέγα 3. Αυτό μοιάζει με δοκιμές υπέρτασης χωρίς μέτρηση της αρτηριακής πίεσης ή δοκιμές υπερλιπιδαιμίας χωρίς μέτρηση της LDL. Όπως αναθεωρήθηκε από τους (Philipp & Hahn, 2013), η βιοδιαθεσιμότητα εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ταυτόχρονη πρόσληψη λίπους ή / και επαρκούς όγκου τροφίμων, έχει υψηλή μεταβλητότητα μεταξύ ατόμων και ούτω καθεξής. Παραδείγματα καλής βιοδιαθεσιμότητας περιλαμβάνουν ωμέγα-3 λιπαρά οξέα διαμορφωμένα σε γαλακτοκομικά προϊόντα, σε ψάρια ή όταν χορηγούνται ως έλαια. Ένα άλλο συχνά αμφιλεγόμενο ζήτημα είναι ότι το ιχθυέλαιο είναι, από τη φύση του επιρρεπές στην οξείδωση. Οι γιατροί θα πρέπει να συμβουλεύουν τους ασθενείς να αποθηκεύουν τα φάρμακα / συμπληρώματά τους στο σκοτάδι και ακόμη και να παγώνουν τις κάψουλες ιχθυελαίου για να αποφύγουν το σχηματισμό επιβλαβών υπεροξειδίων.

Συνοπτικά, η εβδομαδιαία κατανάλωση ψαριών (ειδικά λιπαρών ψαριών) παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της καρδιαγγειακής πρόληψης και θα πρέπει να παρέχει κατά μέσο όρο 500 mg / ημέρα EPA και DHA (F Visioli & Poli, 2020). Η χρήση EPA και DHA στη δευτερογενή πρόληψη δεν στηρίζεται επί του παρόντος σε στερεό έδαφος για τους προαναφερθέντες λόγους. Ωστόσο, δεδομένης της λιγοστής ανεπιθύμητης ενέργειας, ορισμένοι ασθενείς θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την επιπλέον πρόσληψη ιχθυελαίου και οι γιατροί θα πρέπει να συζητήσουν τη χρήση του μαζί τους.

2.2 Μοριακοί μηχανισμοί

Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τα οφέλη CVD της πρόσληψης Ω-3 δεν έχουν καθιερωθεί με σαφήνεια, αν και πρόσφατη έρευνα παρέχει νέες πληροφορίες. Ορισμένα οφέλη CVD από τη θεραπεία Ω-3 μπορεί να αποδοθούν σε μεταβολίτες που είναι ισχυροί αντιφλεγμονώδεις μεσολαβητές. Για παράδειγμα, η σειρά μεταβολιτών της ρεσβίνης E συντίθεται από την EPA και μειώνει ενεργά την παρακολούθηση των λευκοκυττάρων στη θέση της φλεγμονής, προωθεί την κάθαρση των φλεγμονωδών κυττάρων και καταστέλλει την παραγωγή κυτοκινών. Πολλαπλές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει τα οφέλη αυτών των αντιφλεγμονωδών μεσολαβητών μετά το MI. Η χορήγηση της ρεσβίνης E1 ελαττώνει το μέγεθος του εμφράγματος σε αρουραίους που υπόκεινται σε τραυματισμό ισχαιμίας / επανέγχυσης και η ρεσβίνη D1 προκαλεί μετάβαση σε

αντιφλεγμονώδη μακροφάγα M2 στην αριστερή κοιλία για την πρόληψη της ίνωσης του μυοκαρδίου (Kain et al., 2015).

Εκτός από τις αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις, το Ω-3 μπορεί να μειώσει τις αρρυθμίες μέσω της άμεσης αναστολής των καναλιών ιόντων σαρκολημίας που μπορεί να σταθεροποιήσουν την ηλεκτρική δραστηριότητα και να παρατείνουν τη σχετική ανθεκτική περίοδο των καρδιομυοκυττάρων. Αντι-αρρυθμικές επιδράσεις έχουν αποδειχθεί σε μελέτες τόσο σε ζώα όσο και σε ανθρώπους. Παρατηρήθηκε παρατεταμένη κολπική ανθεκτικότητα σε ανθρώπους με συμπλήρωση Ω-3 (6 g / ημέρα EPA + DHA για τουλάχιστον 1 μήνα) με μειωμένη ευπάθεια να προκαλέσει κολπική μαρμαρυγή, αν και δοκιμές όπως το STRENGTH και το REDUCE-IT έδειξαν αυξημένα ποσοστά κολπικής μαρμαρυγής. Είναι πιθανό να απαιτούνται υψηλότερες δόσεις, όπως 6 g / ημέρα, για ορισμένα αντι-αρρυθμικά αποτελέσματα. Το Ω-3 βελτιώνει επίσης την ενδοθηλιακή λειτουργία αυξάνοντας την παραγωγή νιτρικού οξειδίου διεγείροντας άμεσα το γονίδιο και την πρωτεϊνική έκφραση συνθάσης νιτρικού οξειδίου του αζώτου. Απαιτείται συνεχής έρευνα σχετικά με αυτά τα μοριακά μονοπάτια για να κατανοήσουμε καλύτερα τα οφέλη CVD του Ω-3.

2.3 Τελευταίες κλινικές δοκιμές

Δύο δοκιμές Ω-3 κυκλοφόρησαν στα τέλη του 2020, οι οποίες δεν βρήκαν οφέλη από τη θεραπεία Ω-3 σε ασθενείς υψηλού κινδύνου. Το OMEMI χρησιμοποίησε παρέμβαση χαμηλότερης δόσης (1,8 g / ημέρα EPA + DHA εκτός από την τυπική ιατρική περίθαλψη) σε ηλικιωμένους ασθενείς (ηλικίας 70-82) μετά από οξεία MI (2-8 εβδομάδες) (Elagizi et al., 2021). Δεν υπήρχε στατιστικά σημαντική διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ ομάδων θεραπείας και εικονικού φαρμάκου, κάτι που μπορεί να εξηγηθεί από την ανεπαρκή δοσολογία Ω-3.

Τα αποτελέσματα της δοκιμής STRENGTH προσθέτουν σημαντικά μεγαλύτερη σύγχυση. Οι συμμετέχοντες σε αυτήν τη διεθνή μελέτη είχαν δυσλιπιδαιμία, υψηλό TG και χαμηλά επίπεδα λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας χοληστερόλης και έλαβαν 4 g / ημέρα ενός σκευάσματος καρβοξυλικού οξέος EPA + DHA ή εικονικού φαρμάκου αραβοσιτέλαιο εκτός από την τυπική ιατρική θεραπεία (Nicholls et al., 2020). Η μελέτη ολοκληρώθηκε πρόωρα μετά από 1384 ασθενείς που εμφάνισαν ένα πρωτογενές τελικό σημείο (σύνθετο θάνατο CV, μη θανατηφόρο MI, μη θανατηφόρο εγκεφαλικό επεισόδιο, στεφανιαία επαναγγείωση ή ασταθή στηθάγχη) λόγω της

χαμηλής πιθανότητας κλινικού οφέλους με τη χρήση αυτού του σκευάσματος Ω-3 καρβοξυλικού οξέος, σύμφωνα με μια ενδιάμεση ανάλυση. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην εμφάνιση του πρωτεύοντος τελικού σημείου μεταξύ των ομάδων.

Η έντονη διαφορά στα ευρήματα μεταξύ STRENGTH (κανένα όφελος από σκεύασμα καρβοξυλικού οξέος 4 g / ημέρα EPA + DHA) και REDUCE-IT (ισχυρό όφελος βιογραφικού με χρήση υψηλής καθαρότητας EPA 4 g / ημέρα) αυξάνει τη σύγχυση γύρω από το θέμα του Ω-3 και υγεία CV. Υποστηρίχθηκε ότι η ομάδα εικονικού φαρμάκου που έλαβε ορυκτέλαιο στη δοκιμή REDUCE-IT μπορεί να είχε αυξημένη βλάβη που προκλήθηκε από το ορυκτέλαιο, το οποίο συσχετίστηκε με αύξηση > 30% στα επίπεδα της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Ωστόσο, ο FDA ακολούθησε στη συνέχεια μια αξίωση ετικέτας για μείωση του συμβάντος CVD για το icosapent ethyl με βάση αναλύσεις που κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα αποτελέσματα του ορυκτέλαιου δεν μπορούσαν να εξηγήσουν πλήρως τις παρατηρούμενες διαφορές στα αποτελέσματα. Είναι επίσης πιθανό ότι το συστατικό DHA της επέμβασης STRENGTH μπορεί να έχει προκαλέσει βλάβη στην ομάδα θεραπείας. Ωστόσο, αυτό είναι απίθανο καθώς το DHA δεν έχει δείξει ανεπιθύμητα συμβάματα CVD και οι συγκεντρώσεις DHA ήταν μέτριες και δεν συσχετίστηκαν με τα ποσοστά συμβάντων. Το STRENGTH και το REDUCE-IT ανέφεραν αυξημένα συμβάντα κολπικής μαρμαρυγής. Η πρόσφατη μετα-ανάλυση μας ενημερώνεται για να συμπεριλάβει αυτές τις μελέτες και παρόλο που τα συνολικά αποτελέσματα είναι ελαφρώς εξασθενημένα, τα συνολικά ευρήματα παραμένουν έντονα υπέρ της Ω-3 που βελτιώνει τα αποτελέσματα της CVD (Bernasconi et al., 2020).

Ο Πίνακας 1 παρουσιάζει μελέτες παρέμβασης σχετικά με την κατανάλωση ψαριών και συμπληρωμάτων ψαριών και τη συσχέτισή τους με διάφορους δείκτες οξειδωτικού στρες.

Πίνακας 1 Μελέτες παρέμβασης σχετικά με την κατανάλωση ψαριών και συμπληρωμάτων ψαριών και τη συσχέτισή τους με διάφορους δείκτες οξειδωτικού στρες

Σχεδιασμός μελέτης	Ευρήματα	Αναφορά
Τυφλή δοκιμή τριών περιόδων, διασταύρωση τριών περιόδων (3 × 5 εβδομάδες, 7 εβδομάδες έκπλυσης) N = 16, μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες με θεραπεία αντικατάστασης ορμονών Συμπληρώματα 15 g ημερησίως ηλιέλαιο με υψηλή περιεκτικότητα σε ελαϊκό λάδι, κουνουπέλαιο ή ιχθυέλαιο Το συμπλήρωμα ιχθυελαίου αντιστοιχούσε σε ημερήσια δόση EPA και DHA 3,4 g	Και οι δύο συγκεντρώσεις πλάσματος ελεύθερων F2 - ισοπροστανών και MDA μειώθηκαν μετά τη συμπλήρωση ιχθυελαίου σε σύγκριση με ηλιέλαιο	(Higdon et al., 2000)
Παράλληλη σχεδίαση (6 μήνες) N = 20, ασθενείς με σύνδρομο Rett στο στάδιο I (μέση ηλικία 21 μηνών) Ψάρι πλούσιο σε n-3 PUFA (ημερήσια δόση 246 mg/kg σωματικού βάρους) ή καμία θεραπεία	Το LC n-3 PUFA συσχετίστηκε με μειωμένο πλάσμα F4-νευροπροστάνια, F3- και F2-διωμο-ισοπροστάνια αλλά όχι με επίπεδα F2-ισοπροστενίου	(Felice et al., 2012)
Διπλή τυφλή, δοκιμή crossover τεσσάρων περιόδων (4 × 5 εβδομάδες) N = 46, γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση	Το ιχθυέλαιο χωρίς α-τοκοφερόλη αύξησε το TBARS στο πλάσμα αλλά όχι το DNPH Δεν υπήρξαν επιδράσεις στην υπεροξείδωση των λιπιδίων ή στην οξείδωση της πρωτεΐνης μετά από	(Wander & Du, 2018)

Συμπληρώματα: 15 g ιχθυελαίου και 0, 100, 200 ή 400 mg RRR-α-τοκοφερόλη ανά ημέρα Το συμπλήρωμα ιχθυελαίου αντιστοιχούσε σε ημερήσια δόση EPA και DHA των 4,3 g	συμπλήρωση ιχθυελαίου με α-τοκοφερόλη	
Μελέτη cross-double crossover (2× 3 βδομάδες) N = 30 ασθενείς με στεφανιαία νόσο (άνδρες/γυναίκες), ηλικία 66,7±7,5 έτη, το 45% είχε μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη, το 100% έλαβε ασπιρίνη και το 90% έλαβαν στατίνες Τέσσερις κάψουλες εικονικού φαρμάκου ή 1880 mg EPA/1484 mg DHA από συμπλήρωμα ψαριού ανά ημέρα	Η παρέμβαση επηρέασε τα επίπεδα του F2-ισοπροστανίων στο πλάσμα μετά το γεύμα ή του MDA	(Schirmer et al., 2012)
Παράλληλος σχεδιασμός (προ-χειρουργική επέμβαση 1 εβδομάδας) N = 95 (68 άνδρες και 27 γυναίκες), μέση ηλικία 59 έτη Ιχθυέλαιο (EPA + DHA 2 g/ημέρα) ή κάψουλες εικονικού φαρμάκου από 7 ημέρες πριν από τη χειρουργική επέμβαση. 2 ημέρες πριν από τη χειρουργική επέμβαση οι κάψουλες	Οι ασθενείς με συμπληρώματα ιχθυελαίου είχαν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε MDA και πρωτεΐνη καρβονυλίου και υψηλότερη περιεκτικότητα σε GSH/ GSSG στον κοιλικό ιστό σε σύγκριση με τους ασθενείς με εικονικό φάρμακο Η δοκιμασία μετατόπισης ηλεκτροκινητικότητας έδειξε ότι η σύνδεση του NF-κΒ DNA μειώθηκε σε εκχυλίσματα πυρηνικής	(Castillo et al., 2010)

ιχθυελαίου εμπλουτίστηκαν με βιταμίνες C και E Οι βιοψίες της καρδιάς λήφθηκαν πριν από την έναρξη του χειρουργείου	πρωτεΐνης κοιλιακού ιστού που ελήφθησαν από τους συμπληρωμένους ασθενείς σε σύγκριση με εκείνη του εικονικού φαρμάκου.	
Παράλληλος σχεδιασμός (6 εβδομάδες) N = 59, διαβητικοί τύπου 2 άνδρες και γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση που έλαβαν θεραπεία για υπέρταση 4 g EPA, DHA από συμπλήρωμα ψαριού ή ελαιόλαδο ελήφθησαν καθημερινά ως κάψουλες. Τα ούρα (24 ώρες) συλλέχθηκαν στην αρχή και στο τέλος της μελέτης	Μετά από 6 εβδομάδες παρέμβασης με EPA ή DHA, τα επίπεδα F2-ισοπροστανίων στα ούρα 24 ωρών μειώθηκαν κατά 19-20% σε σύγκριση με τη θεραπεία με ελαιόλαδο. Οι αλλαγές στις ισοπροστανές F2 των ούρων συνδέθηκαν θετικά με αλλαγές στην HbA1c πλάσματος, ανεξάρτητα από την ομάδα θεραπείας	(Mori et al., 2003)
Διατροφική παρέμβαση, crossover (2 × 8 εβδομάδες) N = 0,25, γυναίκες με ανεπάρκεια σιδήρου, διαφορετικά υγιείς, ηλικίας 18-30 ετών Οι δίαιτες διέφεραν μόνο σε περιεκτικότητα σε λιπαρά ψάρια έναντι κόκκινου κρέατος, πέντε μερίδες την εβδομάδα	Καμία επίδραση στα επίπεδα των ολικών λιποϋπεροξειδίων στο αίμα (MDA και υδροξυαλκένια)	(Navas-Carretero et al., 2009)
Διαιτητική παρέμβαση, παράλληλος σχεδιασμός (8 εβδομάδες)	Η ολική αντιοξειδωτική κατάσταση στο πλάσμα αυξήθηκε και η MDA στο πλάσμα μειώθηκε μόνο στην	(Parra et al., 2007)

N = 118, άνδρες. N = 158, γυναίκες; υπέρβαροι κατά τα άλλα υγιή, ηλικίας 20-40 ετών Τέσσερις ομάδες δίαιτας: έλεγχος (περιορισμένη σε ψάρια, LC n-3 PUFA 5,6 mg / ημέρα), συμπλήρωμα LC n-3 PUFA (LC n-3 PUFA 3 g / ημέρα), μπακαλιάρος (LC n-3 PUFA 227 mg / ημέρα ημέρα) και σολομός (LC n-3 PUFA 1,418 g / ημέρα). Οι δίαιτες παρείχαν το 70% της ενεργειακής ζήτησης κάθε ατόμου	ομάδα δίαιτας με βάση τον μπακαλιάρο	
Διαιτητική παρέμβαση, διασταύρωση (2 x 6 εβδομάδες) N = 35, υπέρβαροι υγιείς άνδρες, ηλικίας 35-60 ετών Διατροφή (150 γραμμάρια φιλέτα ρέγγας στο φούρνο, 5 ημέρες την εβδομάδα) συγκρίθηκε με μια αντίστοιχη δίαιτα αναφοράς (150 γραμμάρια ψημένα άπαχα χοιρινά/ φιλέτα κοτόπουλου, 5 ημέρες την εβδομάδα)	Καμία επίδραση στην oxLDL του πλάσματος ή στην αντιοξειδωτική ικανότητα (ORAC). Τα τριγλυκερίδια πλάσματος μειώθηκαν και από τις δύο δίαιτες Τα πλάσματα HDL και HDL2 αυξήθηκαν με δίαιτα ρέγγας	(Lindqvist et al., 2009)
Διαιτητική παρέμβαση, αμφίδρομος παραγοντικός παράλληλος σχεδιασμός (8 εβδομάδες)	Οι ισοπροστάνες F2 στα ούρα μειώθηκαν κατά 20% μετά τη δίαιτα με συμπληρώματα ψαριών σε σύγκριση με τη δίαιτα χαμηλών	(Mori et al., 1999)

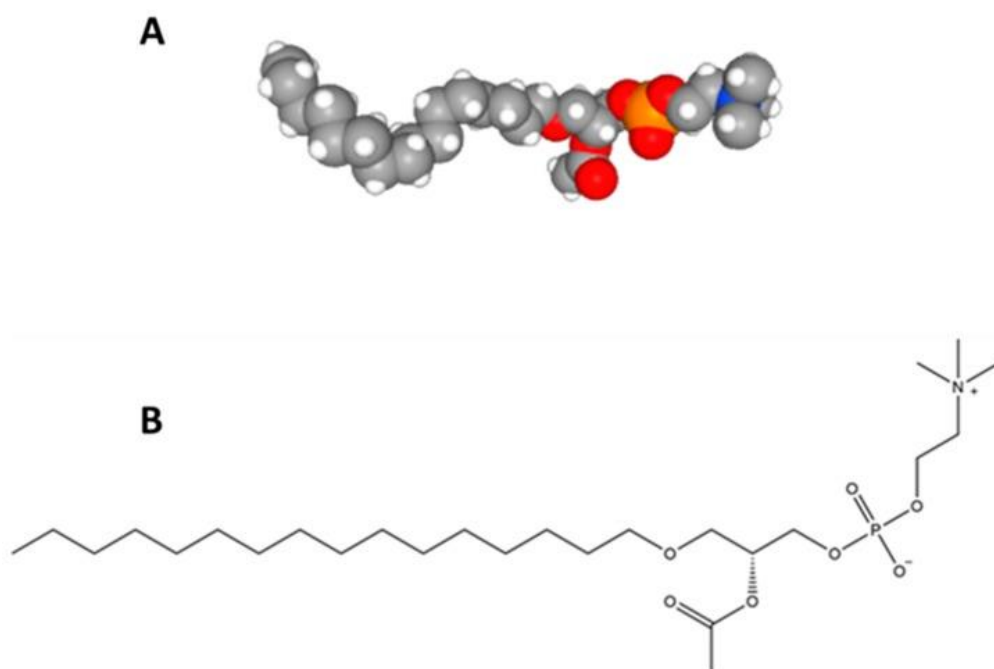
N = 49, υπερλιπιδαιμικοί τύποι 2 διαβητικοί άνδρες/γυναίκες ασθενείς, ηλικίας 30-65 ετών Δίαιτα χαμηλών λιπαρών (λίπος λιγότερο από το 30% της συνολικής ενέργειας) με ή χωρίς ένα καθημερινό γεύμα ψαριού (που αντιστοιχεί σε 3,6 g LC n-3 PUFA ανά ημέρα) Ελαφριά ή μέτρια άσκηση	λιπαρών μόνο. Δεν υπήρξε ανεξάρτητη επίδραση της άσκησης στα F2-ισοπροστάνια στα ούρα	
Παρατηρητική μελέτη Πόλη Kurishio, νομός Kochi, Ιαπωνία N = 28 άνδρες. N = 72 γυναίκες. ηλικιωμένα άτομα με ελεύθερη ζωή (65+ ετών) Το 95% των συμμετεχόντων ανέφεραν τακτική κατανάλωση Pacific bonito, ένα τοπικό ψάρι που ανήκει στην οικογένεια του τόνου	Η υψηλή πρόσληψη ψαριών συσχετίστηκε με χαμηλότερα επίπεδα 8 -OHdG στα ούρα. Τα επίπεδα F2 - ισοπροστανίου στα ούρα σχετίζονται αρνητικά με τη θεραπεία με στατίνες και το σελήνιο.	(Muzembo et al., 2011)
Παρατηρητική μελέτη Βασκική περιοχή της Ισπανίας N = 46 άνδρες. N = 55 γυναίκες. υγιή άτομα, ηλικίας 35–65 ετών Η κατανάλωση ψαριών κυμαινόταν μεταξύ 0 και 251 g ημερησίως	Καμία διαφορά στην αντιοξειδωτική ικανότητα του από άτομα με χαμηλή (217 g ψάρια την εβδομάδα) έως υψηλή κατανάλωση ψαριού (πάνω από 805 g την εβδομάδα)	(Carlos et al., 2002)
Επιδημιολογική έρευνα	Η πρόσληψη ψαριού είχε θετική σχέση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια	(Y. Wang et al., 2003)

65 αγροτικές κομητείες στην Κίνα N = 6500; 100 άτομα επιλεγμένα από κάθε νομό	LC n-3 PUFA, EPA και DHA. Τα ψάρια και το κρέας, αλλά όχι η συνολική πρόσληψη λιπιδίων, σχετίζονται θετικά με τα επίπεδα σεληνίου στο πλάσμα. Τα επίπεδα Gpx στο πλάσμα σχετίζονται θετικά με την κατανάλωση ψαριών και κρέατος και με τη συνολική πρόσληψη λιπιδίων	
Παρατηρητική μελέτη Καναδών N = 31; υγιείς αθλητικοί ψαράδες Οι παράμετροι του πλάσματος μετρήθηκαν πριν και μετά την περίοδο αλιείας	Η αντιοξειδωτική κατάσταση αίματος/πλάσματος (Gpx, GR, GSH + GSSG) αυξήθηκε και τα επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα βελτιώθηκαν (αυξημένη HDL χοληστερόλη, μειωμένα VLDL-TG, VLDL-χοληστερόλη και oxLDL) στο τέλος της αλιευτικής περιόδου σε σύγκριση με τη βάση.	(Bélanger et al., 2008)
Παρατηρητική μελέτη Ποταμός Tapajós στον Βραζιλιάνο Αμαζόνιο N = 108; διάμεση ηλικία 40 ετών Η μελέτη αποσκοπούσε στη διερεύνηση της σχέσης μεταξύ της έκθεσης στον υδράργυρο και των δεικτών του οξειδωτικού στρες Η κατανάλωση ψαριών κυμαινόταν από 0 έως 15 γεύματα την εβδομάδα	Η έκθεση στον υδράργυρο σχετίζεται αντιστρόφως με τις δραστηριότητες των αντιοξειδωτικών ενζύμων άμυνας (Gpx, Cat, ALA-D) και τα επίπεδα GSH στο πλάσμα Η κατανάλωση ψαριών συσχετίστηκε επίσης θετικά με το Gpx και το ALA-D, ανεξάρτητα από το εάν ο υδράργυρος συμπεριλήφθηκε στο μοντέλο παλινδρόμησης ή όχι	(Monteiro et al., 2011)

Παρατηρητική μελέτη Οξφόρδη, Ηνωμένο Βασίλειο N = 670 άνδρες και N = 1023 γυναίκες Η μελέτη αποσκοπούσε στη διερεύνηση της συγκέντρωσης ουρικού οξέος στον ορό σε συνηθισμένους τρώγοντες κρέατος, τρώγοντες ψαριών, χορτοφάγους. Στην ανάλυση συμπεριλήφθηκαν 424 κρεατοφάγοι, 425 ψαροφάγοι και 422 χορτοφάγοι	Τα επίπεδα ουρικού οξέος στον ορό ήταν υψηλότερα στους χορτοφάγους και τους καταναλωτές ψαριών	(Schmidt et al., 2013)
--	---	-------------------------------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων

Από την ανακάλυψή του, η δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) ή AGEPC (1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) έχει αναγνωριστεί ως ένας φωσφογλυκεριναιθερικός μεσολαβητής που εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές και παθοφυσιολογικές διαδικασίες. Φαίνεται προφανές ότι ο PAF έχει διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους σε ζώα, φυτά και μονοκυτταρικούς οργανισμούς. Θεωρείται ο πιο ισχυρός λιποειδικής φύσης μεσολαβητής που είναι γνωστός μέχρι σήμερα (Lordan, Tsoupras, Zabetakis, et al., 2019). Ο PAF θεωρήθηκε αρχικά ένα μόριο, το οποίο συνήθως αναφέρεται ως το κλασικό PAF. Τώρα είναι κατανοητό ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός δομικά σχετιζόμενων φωσφολιπιδίων ή αναλόγων PAF που είναι ανόμοια στη δομή με το PAF που αλληλεπιδρούν με τον υποδοχέα PAF (PAF-R) και ανήκουν στην «οικογένεια PAF». Ωστόσο, για τους σκοπούς αυτής της επισκόπησης, ο PAF αναφέρεται στην κλασική δομή που δημοσιεύθηκε το 1979, η οποία είναι υπεύθυνη για τις περισσότερες από τις γνωστές βιολογικές επιδράσεις και θεωρείται ότι είναι το πιο ισχυρό μόριο PAF. Ο PAF μεσολαβεί σε μια μεγάλη ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών και αλληλεπιδράσεων μεταξύ κυττάρων. Ως εκ τούτου, ο PAF εμπλέκεται σε διάφορες φυσιολογικές διεργασίες όπως απόπτωση, φυσιολογική φλεγμονή, επούλωση τραυμάτων, αναπαραγωγή, αγγειογένεση και μακροχρόνια ενίσχυση. Ωστόσο, ο PAF είναι επίσης ένας ισχυρός προφλεγμονώδης μεσολαβητής που εμπλέκεται σε ποικίλες καταστάσεις και χρόνιες ασθένειες όπως καρκίνος, νεφρικές παθήσεις, εγκεφαλοαγγειακές και διαταραχές του κεντρικού νευρικού συστήματος, αλλεργίες, άσθμα, λοιμώξεις και καρδιαγγειακές παθήσεις (CVD) (Tsoupras et al., 2018).

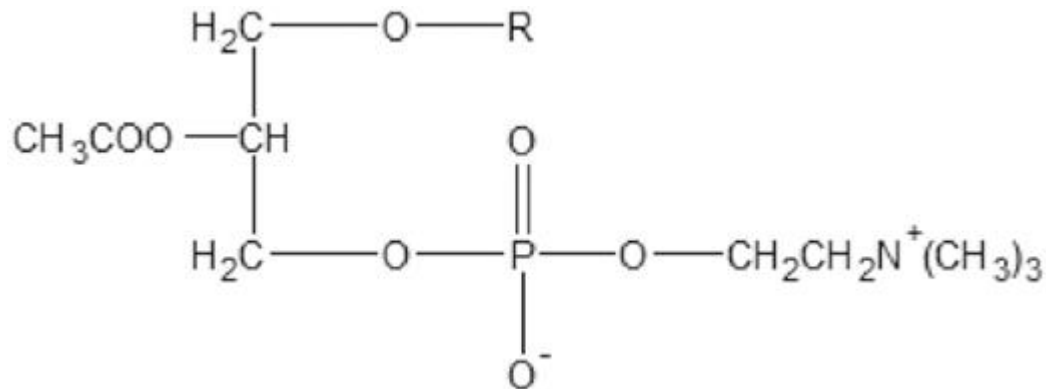


Σχήμα 4 Η δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF): (Α) Δεδομένα μοντέλου πλήρωσης χώρου PAF και (Β) δομικό μοντέλο PAF.

3.1 Δομή, λειτουργία, σηματοδότηση και μεταβολισμός PAF

Οι μεσολαβητές φωσfolιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των προσταγλανδινών και του PAF, υπάρχουν σε διάφορες βιολογικές οδούς φλεγμονωδών νόσων, συμπεριλαμβανομένων των καρδιαγγειακών παθήσεων και του καρκίνου. Η κλασική δομή PAF (1-O-αλκυλ-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (Σχήμα 2) είναι ένα μέλος μιας οικογένειας μορίων γνωστών ως PAF-τύπου λιπίδια, τα οποία έχουν ή μη παρόμοιες δομές με παρόμοιες βιολογικές δραστηριότητες (Lordan, Tsoupras, & Zabetakis, 2019). Το PAF συντίθεται από διάφορα κύτταρα συμπεριλαμβανομένων ουδετερόφιλων, ενδοθηλιακών κυττάρων, αιμοπεταλίων, μακροφάγων και μονοκυττάρων. Το PAF είναι ένας ισχυρός προφλεγμονώδης μεσολαβητής που επηρεάζει διάφορα κύτταρα και παθολογικές διεργασίες και εμπλέκεται στην αγγειογένεση, τη θρόμβωση, την καρκινογένεση και τη μετάσταση (Lordan, Tsoupras, & Zabetakis, 2019). Το PAF και τα ομόλογα μόρια λιπιδίων του είναι συγκεκριμένα, δομικά καθορισμένα υποστρώματα που δεσμεύονται αποκλειστικά και προκαλούν τις βιολογικές τους δραστηριότητες μέσω ενός μοναδικού 7-

διαμεμβρανικού συζευγμένου με G-πρωτεΐνη υποδοχέα γνωστού ως PAF-υποδοχέα (PAF-R) με εξαιρετικά υψηλή συγγένεια.



Σχήμα 5 Η δομή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Kostadinova et al., 2015)

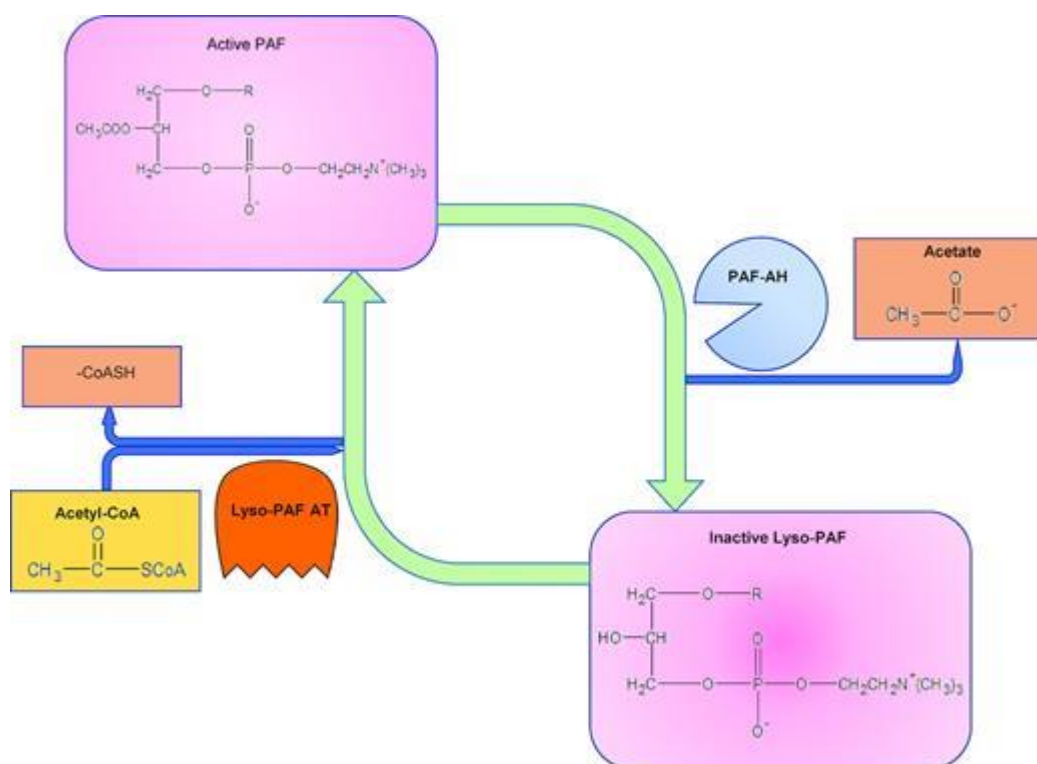
Η δέσμευση του PAF-R από PAF ή παρόμοια με PAF λιπίδια προκαλεί μια σειρά από ενδοκυτταρικούς καταρράκτες σηματοδότησης. Αυτό ξεκινά βιοχημικούς μηχανισμούς και λειτουργικές αποκρίσεις κυττάρων που φέρουν PAF-R, οι οποίοι στη συνέχεια ξεκινούν ή ενισχύουν φλεγμονώδεις διεργασίες. Το PAF-R εκφράζεται στην επιφάνεια διαφόρων κυττάρων θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων των λευκοκυττάρων, των αιμοπεταλίων, των μακροφάγων και των ενδοθηλιακών κυττάρων (Damiani & Ullrich, 2016).

Το PAF μπορεί να ενεργοποιήσει τα κύτταρα σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, επομένως οι φυσιολογικές συγκεντρώσεις του PAF ρυθμίζονται στενά από τα μεταβολικά ένζυμα του PAF. Η απορύθμιση του μεταβολισμού PAF οδηγεί σε αύξηση του PAF που επιδεινώνει τη φλεγμονώδη απόκριση. Το PAF απενεργοποιείται και καταβολίζεται με απομάκρυνση της ακετυλομάδας στη θέση sn-2 των μορίων φωσφολιπιδίου με ειδική PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH, EC 3.1.1.47) για σχηματισμό λυσο-PAF.

Η βιοσύνθεση του PAF επιτυγχάνεται με 2 διακριτικές ενζυματικές διεργασίες: τις οδούς de novo και της αναδιαμόρφωσης. Το πρώτο βιοσυνθετικό μονοπάτι είναι το μονοπάτι αναδιαμόρφωσης, με το οποίο η φωσφολιπάση A2 μετατρέπει τα αιθερικά ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης σε lyso-PAF, το οποίο στη συνέχεια ακετυλιώνεται σε PAF με lyso-PAF ακετυλοτρανσφεράσες (Lyso-PAF

ATs, EC 2.3.17), (LPCAT) 1 και LPCAT2. Τα στοιχεία δείχνουν ότι η παραγωγή PAF από το LPCAT2 ενεργοποιείται υπό φλεγμονώδεις συνθήκες, ενώ ο ρόλος του LPCAT1 είναι ακόμη υπό διερεύνηση, καθώς είναι ανεξάρτητος από ασβέστιο και δεν φαίνεται να εμπλέκεται σε φλεγμονώδεις διεργασίες (Harayama & Shindou, 2008).

Το δεύτερο βιοσυνθετικό μονοπάτι PAF είναι το *de novo* μονοπάτι, το οποίο ξεκινά με ακυλίωση 1-O-αλκυλ-sn-γλυκερο-3 φωσφορικού με 1-O-αλκυλ-sn-γλυκερο-3 φωσφορικό ακετυλο-CoA ακυλοτρανσφεράση, ακολουθούμενο από τις δράσεις μιας φωσφοϋδρολάσης και της ειδικής δραστηριότητας της μη ευαίσθητης σε διθειοθρεϊτόλη CDP-χολίνης: 1-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT, EC 2.7.8.2), η οποία ενσωματώνει CDP-χολίνη σε 1-O-αλκύλιο -2-ακετυλ-γλυκερόλη για να σχηματίσει PAF (44). Το PAF-CPT και η λυσο-PAF-ακετυλοτρανσφεράση καταλύουν και τα δύο τα τελικά στάδια σε κάθε βιοσυνθετική οδό και εμφανίζουν βασικό ρυθμιστικό ρόλο στην παραγωγή PAF. Υποτίθεται ότι το *de novo* μονοπάτι είναι υπεύθυνο για την ενδογενή παραγωγή PAF για τη διατήρηση φυσιολογικών συγκεντρώσεων, ενώ η διαδρομή αναδιαμόρφωσης οδηγεί στην παραγωγή PAF σε απόκριση σε φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι η κύρια οδός που εμπλέκεται σε φλεγμονώδεις καταρράκτες απλοποιημένο σχηματικό μονοπάτι της αναδιαμόρφωσης παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.



Σχήμα 6 Η πορεία αναδιαμόρφωσης PAF και η πορεία αποικοδόμησής του. Το PAF-AH μετατρέπει το ενεργό PAF σε ανενεργό Lyso-PAF με την απώλεια μιας οξικής ομάδας στη θέση sn-2. Το Lyso-PAF AT μετατρέπει το Lyso-PAF στο ενεργό PAF με την επανενσωμάτωση ενός οξικού στη θέση sn-2. Ακετυλο-CoA, ακετυλο συνένζυμο A; AT, ακετυλοτρανσφεράση; Lyso-PAF, λυσο μορφή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. PAF, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων. PAF-AH, ακετυλοϋδρολάση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Lordan, Tsoupras, & Zabetakis, 2019)

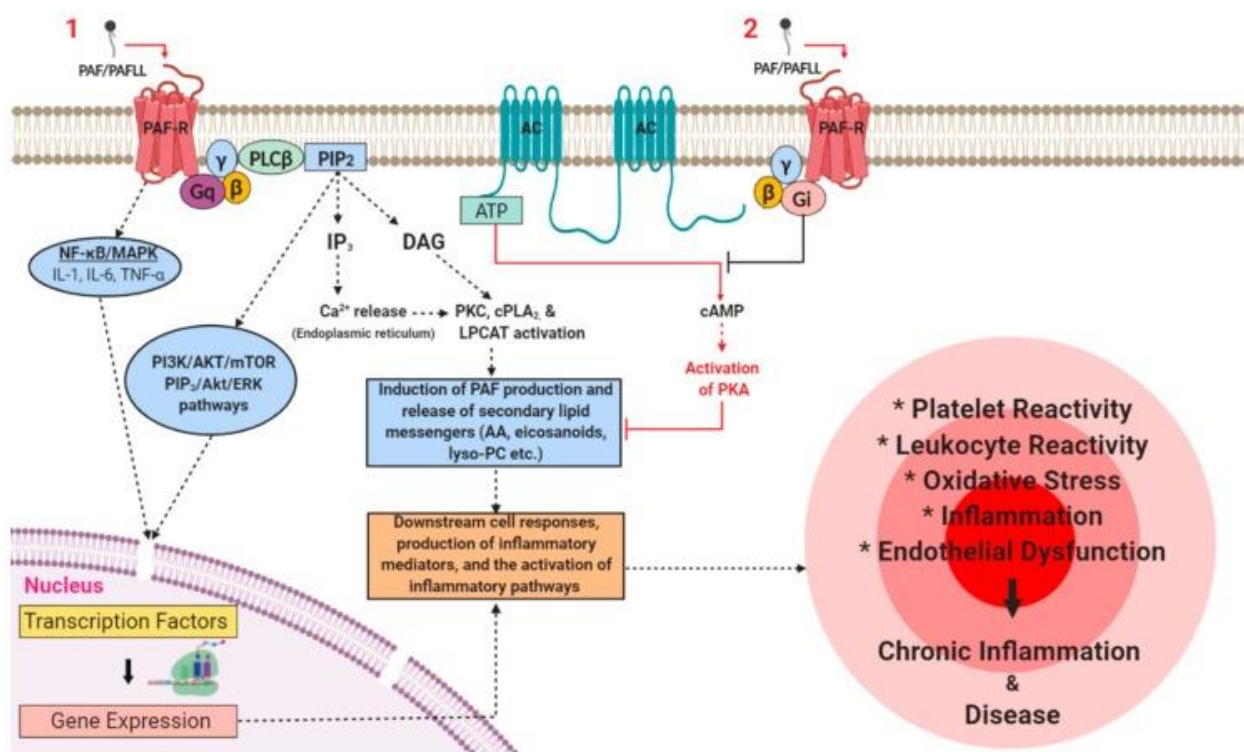
3.2 Σηματοδότηση PAF στην Παθοφυσιολογία

Είναι γνωστό ότι ο PAF εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα καταστάσεων και ασθενειών που σχετίζονται με τη φλεγμονή. Δεδομένου ότι η CVD εξακολουθεί να είναι η κύρια αιτία της παγκόσμιας θνησιμότητας, ο καθορισμός των αιτιών και του τρόπου πρόληψης της CVD είναι επιτακτικός και βασικός στόχος της σύγχρονης ιατρικής. Η συστηματική φλεγμονή μεσολαβεί σε όλα τα στάδια της αθηροσκλήρωσης όπου ο PAF είναι ένας βασικός φλεγμονώδης μεσολαβητής. Αρκετοί

φλεγμονώδεις μεσολαβητές διευκολύνουν την αλληλεπίδραση και τη διασταύρωση μεταξύ διαφόρων κυττάρων και ενδοθηλιακών κυττάρων, τα οποία ξεκινούν φλεγμονώδεις καταρράκτες που τελικά οδηγούν σε ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και έναρξη προθερτογόνων συμβάντων. Ο PAF είναι μια από τις κρίσιμες συνδέσεις μεταξύ πολλών φλεγμονωδών οδών (κυτοκίνες, οξειδωτικό στρες, εικοσανοειδή κ.λπ.) που διαμόρφωσαν την αλληλεπίδραση μεταξύ διαφόρων κυττάρων που συμμετέχουν στην αθηροσκλήρωση. Ο PAF συντίθεται από πολλά από τα βασικά κύτταρα (όταν ενεργοποιούνται) που εμπλέκονται στην αθηροσκληρωτική διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων των ενδοθηλιακών κυττάρων, των μακροφάγων, των μονοκυττάρων, των αιμοπεταλίων και ακόμη και των αφρωδών κυττάρων. Κατά συνέπεια, ο PAF εμπλέκεται στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης και συνεχίζει να εμπλέκεται μέσω σχηματισμού πλάκας, ανάπτυξης, διάβρωσης και ρήξης (Ed Rainger et al., 2015). Το 2003, οι (Demopoulos et al., 2003) πρότειναν ότι ο PAF είναι ο συνδετικός κρίκος μεταξύ αρκετών θεωριών ανάπτυξης αθηροσκλήρωσης λόγω του γεγονότος ότι πολλές από τις αθηρογόνες ιδιότητες των οξειδωμένων λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL) μπορούν να αποδοθούν στη δραστηριότητα των PAF και PAFLL.

Τα PAF και PAFLL μπορούν να προκαλέσουν την απελευθέρωση δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) που μπορεί να οδηγήσει σε οξείδωση LDL. Ομοίως, η οξείδωση LDL ευθύνεται για την αύξηση των επιπέδων PAF και η οξειδωμένη LDL περιέχει PAFLL. Αυτό είναι σημαντικό καθώς οι χαμηλές συγκεντρώσεις οξειδωμένης LDL έχουν την ικανότητα να ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια μέσω ενός μηχανισμού που μεσολαβείται από το PAFLL και το PAF-R (Chen et al., 2009). Αντίθετα, φαίνεται ότι η PAF-AH σε λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL) προστατεύει, μειώνοντας έτσι τις αθηρογόνες αλλαγές στο LDL και τις σχετικές φλεγμονώδεις διεργασίες. Ωστόσο, αποδείχθηκε επίσης ότι κατά την LDL οξείδωση, η PAF-AH απενεργοποιείται σταδιακά δυνητικά από ρίζες οξυγόνου, εμποδίζοντας έτσι την ικανότητά του να καταστέλλει τις προφλεγμονώδεις δραστηριότητες των PAF και PAFLL.

Ένα απλοποιημένο παράδειγμα σηματοδότησης προφλεγμονωδών κυττάρων που προκαλείται από PAF περιγράφεται στο Σχήμα 7.



Σχήμα 7 Απλοποιημένη απεικόνιση για τις κύριες προ-φλεγμονώδεις οδούς σηματοδότησης που προκαλεί ο PAF μέσω σύνδεσης με τον υποδοχέα του υπό ορισμένες πιέσεις ή ερεθίσματα σε διάφορες οδούς και φλεγμονώδεις καταρράκτες σε χρόνιες διαταραχές που σχετίζονται με τη φλεγμονή (Lordan, Tsoupras, Zabetakis, et al., 2019)

3.3 Η πιθανή χρήση αναστολέων του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων ως θεραπευτικών και προληπτικών ασθενειών

Η έρευνα σχετικά με πιθανούς φυσιολογικούς και θεραπευτικούς τρόπους καταστολής της δραστηριότητας του PAF έδειξε ότι οι ενδογενείς ή προσλαμβανόμενοι αναστολείς PAF θα μπορούσαν να αναστέλλουν τις δράσεις του PAF. Ενδογενείς αναστολείς του PAF έχουν ταυτοποιηθεί ως καρδιολιπίνες.

Έχουν περιγραφεί αρκετά μόρια, τόσο της συνθετικής όσο και της φυσικής προέλευσης, τα οποία επιδεικνύουν ανασταλτικές επιδράσεις κατά των βιολογικών δραστηριοτήτων που προκαλούνται από PAF. Αυτά τα μόρια δρουν άμεσα μέσω ανταγωνιστικής μετατόπισης του PAF στο PAF-R ή μέσω

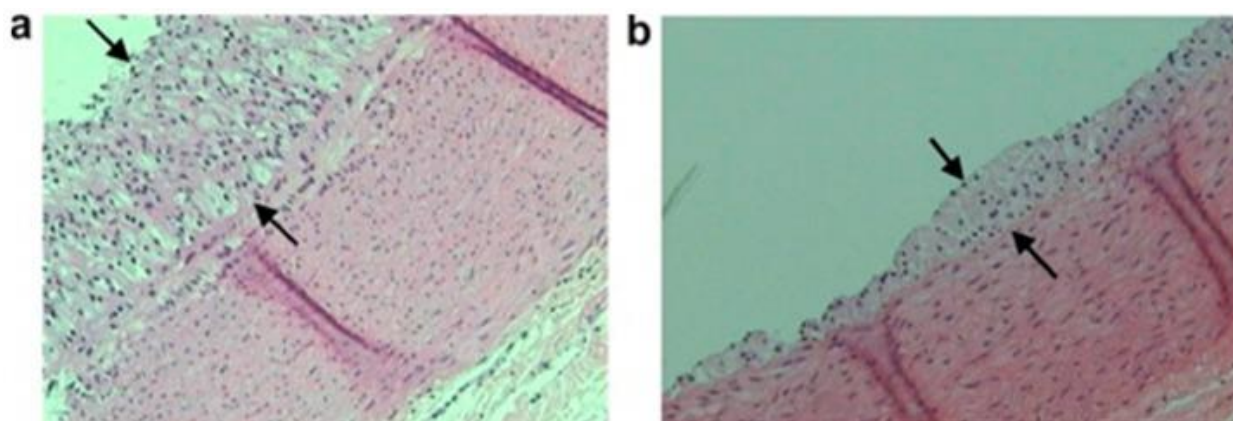
άλλων έμμεσων μηχανισμών. Αυτοί οι έμμεσοι μηχανισμοί δεν έχουν ακόμη διευκρινιστεί πλήρως. Ωστόσο, προτείνεται να είναι υπεύθυνες οι αλλαγές στις λιπιδικές σχεδίες και το μικροπεριβάλλον της μεμβράνης του PAF-R ή / και της αντιοξειδωτικής ικανότητας αυτών των μορίων. Επιπλέον, ορισμένοι αναστολείς PAF όπως τα διατροφικά πολικά λιπίδια επιδεικνύουν ευεργετικά αποτελέσματα στον μεταβολισμό PAF μειώνοντας τη σύνθεση PAF και αυξάνοντας τον καταβολισμό PAF (Reznichenko & Korstanje, 2015). Όσον αφορά τις δομές τους, οι αναστολείς PAF μπορεί να είναι ανάλογα PAF όπως πολικά λιπίδια, ή μόρια που είναι διυδροπυριδίνες, ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου, φαινολικά και άλλες διάφορες φυσικές φαρμακευτικές ενώσεις (Sioriki et al., 2018). Μαζί με την ταξινόμηση σε ενώσεις φυσικής ή συνθετικής προέλευσης, οι αναστολείς PAF μπορούν να χαρακτηριστούν σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με την ειδικότητά τους: μη ειδικούς και ειδικούς αναστολείς. Οι μη ειδικοί αναστολείς PAF είναι ενώσεις που αναστέλλουν ορισμένες διεργασίες στις οδούς μεταγωγής σήματος που προκαλούνται από PAF όπως αναστολείς διαύλων ασβεστίου, αναστολείς της G-πρωτεΐνης, ενδοκυτταρικοί χηλικοί παράγοντες ασβεστίου κ.λπ.. Ωστόσο, η φαρμακολογική τους αξία είναι περιορισμένη λόγω της χαμηλής ειδικότητάς τους. Αντιθέτως, συγκεκριμένοι αναστολείς PAF δεσμεύονται ανταγωνιστικά ή μη ανταγωνιστικά με το PAF-R. Αυτοί οι τύποι αναστολέων μπορεί να έχουν πιθανή θεραπευτική αξία.

Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε συνθετικούς αναστολείς PAF που ρυθμίζουν το μεταβολισμό PAF, όπως η ρουπαταδίνη, η οποία χρησιμοποιείται για τη θεραπεία φλεγμονωδών καταστάσεων όπως αλλεργίες ή σισπλατίνη για θεραπεία καρκίνου. Επιπλέον, έχουν περιγραφεί φυσικοί ανταγωνιστές PAF-R. το πιο γνωστό είναι ginkgolides A και B. Τα Ginkgolides είναι μια οικογένεια μορίων που προέρχονται από το δέντρο *Ginkgo biloba*, τα οποία μπορούν να ρυθμίσουν το μεταβολισμό PAF σε χρόνιες ασθένειες (Zeng et al., 1997). Επίσης βρέθηκε ότι εκχυλίσματα λιπιδίων θα μπορούσαν ενδεχομένως να αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από PAF. Αυτό οδήγησε σε μια σειρά μελετών που διερεύνησαν εκχυλίσματα λιπιδίων τροφίμων από το 1993, οι οποίες αρχικά οδήγησαν στην ανακάλυψη ανταγωνιστών PAF στα κλάσματα πολικών λιπιδίων του ελαιολάδου, του μελιού, του γάλακτος και του γιαουρτιού, του σκουμπριού (*Scomber scombrus*), και του κρασιού. Αυτές οι μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι κυρίως τα πολικά λιπίδια όπως τα γλυκεροφωσfolιπίδια και τα γλυκολιπίδια παρουσίασαν

ισχυρή αναστολή έναντι της επαγόμενης από PAF συσσωμάτωσης αιμοπεταλίων μέσω ανταγωνιστικής δέσμευσης στο PAF-R. Καθώς αναπτύχθηκε αυτός ο ερευνητικός τομέας, σημειώθηκε ότι πολλές από τις ενώσεις που ανακάλυψαν ότι παρουσίασαν δράση κατά του PAF ήταν επίσης συστατικά των τροφίμων της μεσογειακής διατροφής (Zeng et al., 1997). Επομένως, αυτά τα συστατικά μπορεί να είναι υπεύθυνα για τα παρατηρούμενα ευεργετικά αποτελέσματα της κατανάλωσης της μεσογειακής διατροφής. Πράγματι, μετέπειτα έρευνα έδειξε ότι τα εκχυλίσματα πολικών λιπιδίων από ελαιόλαδο, πυρηνέλαιο και ψάρια θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν πολλά από τα μεταβολικά ένζυμα PAF τόσο in vitro όσο και in vivo (Constantina Nasopoulou et al., 2011). Αυτά τα εκχυλίσματα μπόρεσαν να βοηθήσουν στην επανεξισορρόπηση των επιπέδων PAF με ευεργετικά αποτελέσματα έναντι μοντέλων χρόνιας φλεγμονής.

Η έρευνα σχετικά με την επίδραση των λιπιδίων στη δραστηριότητα του PAF και στον μεταβολισμό του PAF εξακολουθεί να διερευνάται σήμερα με σκοπό την εξεύρεση φυσικών τρόπων για την πρόληψη της προφλεγμονώδους σηματοδότησης του PAF. Είναι πλέον γνωστό ότι πολλά τρόφιμα, ποτά και άλλες φυσικές πηγές, συμπεριλαμβανομένων των υποπροϊόντων της βιομηχανίας τροφίμων, είναι πλούσια σε ανταγωνιστές PAF. Ωστόσο, υπήρξαν αρκετές κρίσιμες ανακαλύψεις in vivo που υποδηλώνουν ότι οι αναστολείς PAF φυσικής προέλευσης μπορούν να βοηθήσουν στην πρόληψη ασθενειών όπως η CVD. Σε μελέτες in vivo, εκχυλίσματα πολικών λιπιδίων και ουδέτερων λιπιδίων από ελαιόλαδο χορηγήθηκαν σε κουνέλια που κατανάλωναν αθηρογόνο δίαιτα. Αποδείχθηκε ότι τα κουνέλια που καταναλώνουν αυτά τα εκχυλίσματα είχαν πιο ευεργετικές φυσιολογικές και βιοχημικές αλλαγές ως αποτέλεσμα αυξημένων επιπέδων PAF-AH στο πλάσμα, λιγότερης οξειδωσης στο πλάσμα, μείωσης του πάχους της αθηροσκληρωτικής βλάβης και συγκράτησης της ελαστικότητας των τοιχωμάτων των αγγείων, εμποδίζοντας έτσι την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν σε μια μεταγενέστερη μελέτη που διαπίστωσε ότι τα εκχυλίσματα πολικών λιπιδίων ελαιολάδου και πυρηνέλαιου μπορούν να εμποδίσουν την πρόωρη ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης μέσω της μείωσης της ευαισθησίας των αιμοπεταλίων στο PAF και της μείωσης του πάχους της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Μια μεταγενέστερη μελέτη παρακολούθησης σε κουνέλια κατέδειξε ότι τα εκχυλίσματα πολικών λιπιδίων από ελαιοπυρήνα ήταν ισοδύναμα με τη σιμβαστατίνη στην πρόληψη της εξέλιξης της αθηρογένεσης (Tsantila et al., 2007).

Δύο μελέτες παρόμοιου σχεδιασμού έδειξαν αντι-αθηρογόνα αποτελέσματα όταν τα κουνέλια κατανάλωναν πολικά λιπίδια που εξήχθησαν από ψάρια (τσιπούρα, *Sparus aurata*) σε ένα μοντέλο υπερχοληστερολαιμίας. Αυτές οι μελέτες έδειξαν ότι τα πολικά λιπίδια των ψαριών θα μπορούσαν επίσης να μειώσουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων, να μειώσουν το μέγεθος της αθηροσκληρωτικής βλάβης και να αυξήσουν τα επίπεδα HDL σε κουνέλια μαζί με τη ρύθμιση του μεταβολισμού PAF που οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα PAF και δραστηριότητα στο αίμα κουνελιού. Αντιπροσωπευτικές οπτικές μικρογραφίες ($\times 100$) του αορτικού τοιχώματος αυτών των κουνελιών παρουσιάζονται στο Σχήμα 4. Αυτές οι εικόνες δείχνουν ότι τα κουνέλια που καταναλώνουν αθηρογόνο δίαιτα συμπληρωμένη με πολικά λιπίδια ψαριών οδηγούν σε μείωση του πλάτους της αθηροσκληρωτικής βλάβης (β) έναντι μιας ομάδας ελέγχου που κατανάλωσε μόνο μια αθηρογόνο δίαιτα (α) (C. Nasoroulou et al., 2010).



Σχήμα 8 Αντιπροσωπευτικές οπτικές μικρογραφίες $\times 100$ τμημάτων αορτικού τοιχώματος χρωματισμένες με αιματοξυλίνη και ηωσίνη που ελήφθησαν από τις δύο πειραματικές ομάδες κουνελιού. Οι αθηροσκληρωτικές αλλοιώσεις εμφανίζονται ως αφρώδη κύτταρα μεταξύ των βελών. Κάθε δείγμα ιστού είχε πάχος περίπου 5 μm . (α) Ομάδα Α (αθηρογόνο δίαιτα) και (β) ομάδα Β (αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη με πολικά λιπίδια τσιπούρας). (C. Nasoroulou et al., 2010)

Λαμβάνοντας υπόψη, την πιθανή χρήση διαιτητικών πολικών λιπιδίων για την πρόληψη της CVD, αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν ανακαλύψει ανταγωνιστές PAF σε διάφορα είδη ψαριών και υποπροϊόντα της αλιευτικής βιομηχανίας, όπως φιλέτο σολομού και ρέγγας και άλλα τρόφιμα,

όπως αιγοπρόβριο κρέας, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα που έχουν υποστεί ζύμωση, καθώς και υποπροϊόντα μύρας και ζυθοποιίας . Μελλοντική έρευνα σε αυτόν τον τομέα στοχεύει στην ανάπτυξη νέων λειτουργικών τροφών και θρεπτικών ουσιών που ενσωματώνουν αυτά τα βιοδραστικά εκχυλίσματα πολικών λιπιδίων για την πρόληψη της CVD και άλλων ασθενειών που σχετίζονται με τη φλεγμονή.

Κεφάλαιο 4 Πειραματικό μέρος

4.1 Πρωτόκολλο παρέμβασης

Η δοκιμή ήταν μια τυφλή (double blinded), διασταυρούμενη (crossover), και τυχαιοποιημένη (randomized controlled trial) μελέτη παρέμβασης με αναλογία κατανομής 1:1. Αυτή η μελέτη συνέκρινε δύο θεραπείες, δηλαδή, εκτρεφόμενα ψάρια που τροφοδοτούνται με δίαιτα εμπλουτισμένη με πυρηνέλαιο (εμπλουτισμένο ψάρι; EF) έναντι εκτρεφόμενων ψαριών που τρέφονται με δίαιτα εμπλουτισμένη με ιχθυέλαιο (συμβατικά ψάρια; CF), χρησιμοποιώντας σχεδιασμό διασταύρωσης. Η μελέτη διήρκεσε 22 εβδομάδες: περίοδος μίας θεραπείας (8 εβδομάδες, μέσα Ιανουαρίου-τέλη Μαρτίου), περίοδος έκπλυσης (6 εβδομάδες) και περίοδος δεύτερης θεραπείας (8 εβδομάδες, μέσα Μαΐου-τέλος Ιουλίου). Οι συμμετέχοντες κατανέμονταν εξίσου στις δύο θεραπείες κατά τη διάρκεια των περιόδων θεραπείας.

4.2 Συμμετέχοντες

Επιλέξιμα άτομα ήταν όλοι οι ενήλικες ηλικίας μεταξύ 30 και 65 ετών με δείκτη μάζας σώματος (ΔΜΣ) μεταξύ 24,0 και 31,0 kg/m² που πληρούσαν τα κριτήρια καταλληλότητας για τη συνήθη κατανάλωση ψαριών (<150 g μαγειρεμένου ψαριού την εβδομάδα). Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν η εγκυμοσύνη, η τρέχουσα ή η πρόσφατη προσπάθεια απώλειας βάρους, η χρήση συμπληρωμάτων διατροφής και η θεραπεία για οποιαδήποτε ιατρική διαταραχή. Τα άτομα είχαν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν ιατρική θεραπεία για διαταραχές του θυρεοειδούς αδένα, συμπληρώματα σιδήρου ή φυλλικού οξέος, αντισυλληπτικά ή θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης (HRT) για γυναίκες, υπό την προϋπόθεση ότι θα συνέχιζαν να λαμβάνουν τα φάρμακά τους καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Τα επιλέξιμα άτομα ζούσαν όλοι στην περιοχή της Αττικής, Ελλάδα. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Διατροφής και Διαιτολογίας σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιολογίας, Βιοχημείας, Φυσιολογίας και Μικροβιολογίας του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, Αθήνα, Ελλάδα (Ntzounani et al., 2021).

4.3 Παρέμβαση

Οι συμμετέχοντες ανατέθηκαν τυχαία σε μία από τις δύο ακολουθίες επεξεργασίας ψαριών (CF/EF ή EF/CF). Οι συμμετέχοντες σε κάθε αλληλουχία έλαβαν κάθε θεραπεία για 8 εβδομάδες με περίοδο washout 6 εβδομάδων μεταξύ των περιόδων θεραπείας. Το είδος ψαριών που μελετήθηκε στην παρούσα δοκιμή ήταν τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) και τα δύο είδη ψαριών που συγκρίθηκαν ήταν ψάρια εκτροφής που τρέφονταν με δίαιτα ιχθυελαίου (CF) και ψάρια εκτροφής που τρέφονταν με δίαιτα εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα (EF). Η εταιρεία NIREUS Aquaculture S.A. παρείχε και τα δύο είδη ψαριών. Λεπτομέρειες της εκατοστιαίας σύστασης λιπαρών οξέων των φιλέτων ήταν οι εξής: 18: 1ω-9 (24-25%), 20: 5ω-3 (4-5%), 22: 5ω-3 (2-2,6%), 22: 6ω-3 (13-14%) για το CF, και 18: 1ω-9 (23-23,8%), 20: 5ω-3 (2,2-2,6%), 22: 5ω-3 (1,7-1,9%) και 22: 6ω-3 (7-7,8%) για το EF. Κάθε εβδομάδα κατά τη διάρκεια κάθε περιόδου θεραπείας, δόθηκαν στους συμμετέχοντες δύο μερίδες ψαριού. Κάθε μερίδα ζύγιζε κατά μέσο όρο 380 g (ποσότητα φιλέτου περίπου 170 g). Οι συμμετέχοντες έλαβαν οδηγίες να καταναλώνουν ψάρι δύο φορές την εβδομάδα (μία μερίδα τη φορά) τις ημέρες της επιλογής τους. Στην αρχή κάθε περιόδου θεραπείας, δόθηκαν στους συμμετέχοντες προφορικές και γραπτές οδηγίες σχετικά με την προετοιμασία των ψαριών. Συγκεκριμένα, ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να ψήσουν τα ψάρια και τους επιτράπηκε να προσθέσουν καρυκεύματα και μπαχαρικά της επιλογής τους κατά την προετοιμασία και την κατανάλωση των ψαριών. Οι συμμετέχοντες κλήθηκαν επίσης να διατηρήσουν τις διατροφικές και φυσικές τους συνήθειες καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και να απέχουν από οποιαδήποτε προσπάθεια απώλειας βάρους κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Κατά τη διάρκεια της περιόδου washout των 6 εβδομάδων, δεν δόθηκε στους συμμετέχοντες καμία μερίδα ψαριού και τους ζητήθηκε να συνεχίσουν τις μακροχρόνιες διατροφικές τους συνήθειες.

4.4 Κύριοι δείκτες

Όλες οι αξιολογήσεις πραγματοποιήθηκαν στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου θεραπείας.

Ανθρωπομετρική εκτίμηση: Το σωματικό βάρος των συμμετεχόντων μετρήθηκε με ψηφιακή κλίμακα (Seca robusta 813, Αμβούργο, Γερμανία) με προσέγγιση 100 g, και το ύψος του σώματος μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0,5 cm. Ο ΔΜΣ υπολογίστηκε ως βάρος (kg) διαιρούμενο με τετράγωνο

ύψους (m²). Οι δείκτες SBP και το DBP των ατόμων μετρήθηκαν δύο φορές, με απόσταση 2 λεπτών, σε καθιστή θέση, χρησιμοποιώντας ένα αυτοματοποιημένο πιεσόμετρο Omron M4 και υπολογίστηκε και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

Διαιτητική εκτίμηση: Η συνήθης διαιτητική πρόσληψη των συμμετεχόντων τον τελευταίο μήνα αξιολογήθηκε με ένα ημι-ποσοτικό FFQ 76 στοιχείων, το οποίο αναπτύχθηκε και δοκιμάστηκε για την επαναληψιμότητα και τη σχετική εγκυρότητά του στον ελληνικό πληθυσμό. Η ημερήσια πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών υπολογίστηκε με βάση τα δεδομένα του FFQ. Η διαιτητική πρόσληψη εκφράστηκε επίσης με βάση την ημερήσια ομάδα τροφίμων (π.χ. γαλακτοκομικά προϊόντα, φρούτα, λαχανικά) και την κατανάλωση ατομικών τροφίμων και ποτών (π.χ. πατάτες, ελαιόλαδο, καφέ) όπως περιγράφεται στις διαιτητικές οδηγίες για τους ενήλικες. Το Mediterranean Diet Score (MedDietScore) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση του επιπέδου συμμόρφωσης στο μεσογειακό διαιτητικό πρότυπο.

Αξιολόγηση σωματικής δραστηριότητας: Η φυσική δραστηριότητα αξιολογήθηκε με το ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας της Αθήνας (APAQ) επικυρωμένο για τον ελληνικό πληθυσμό. Αυτό το ερωτηματολόγιο χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της συνολικής ημερήσιας ενεργειακής δαπάνης (kcal/ημέρα) και την εκτίμηση του επιπέδου φυσικής δραστηριότητας (PAL).

Αξιολόγηση καπνίσματος: Τα άτομα αξιολογήθηκαν σε σχέση με την κατάσταση του καπνίσματος (μη καπνιστής, πρώην καπνιστής και ενεργός καπνιστής), τη διάρκεια του καπνίσματος (σε χρόνια) και το μέσο αριθμό τσιγάρων που καπνίζονταν την ημέρα (για τους ενεργούς καπνιστές). Τα πακέτα καπνίσματος υπολογίστηκαν με βάση τον ακόλουθο τύπο:

Αριθμός συσκευασίας – έτη = (μέσος αριθμός καπνισμένων τσιγάρων ανά ημέρα/20) × αριθμός ετών καπνίσματος

Δειγματοληψία αίματος: Τα άτομα κλήθηκαν να μην χρησιμοποιήσουν μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αντιβιοτικά ή αναλγητικά δύο εβδομάδες πριν από την προγραμματισμένη ώρα συλλογής αίματος. Τα άτομα έλαβαν επίσης οδηγίες να αποφεύγουν την έντονη σωματική δραστηριότητα την ημέρα πριν από τη δειγματοληψία αίματος και να απέχουν από το κάπνισμα το πρωί πριν από τη συλλογή αίματος. Δείγματα αίματος ελήφθησαν μετά από ολονύκτια νηστεία 10 ωρών μεταξύ 08:00 π.μ. και 10:00 π.μ. Ο ορός ελήφθη από σωλήνες

επικαλυμμένους με σιλικόνη (BD Vacutainer® Plus Plastic Serum Tubes). Το αίμα αφέθηκε να πήξει σε θερμοκρασία δωματίου για 60 λεπτά μέχρι φυγοκέντρωσης ($1500 \times g$, 10 λεπτά, $20^\circ C$). Το πλάσμα ελήφθη από σωλήνες EDTA. Η μέτρηση ολικού αίματος πραγματοποιήθηκε σε έναν αιματολογικό αναλυτή BC-3000 Plus (Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics C., Ltd., Shenzhen 518057, Κίνα) σε θερμοκρασία δωματίου αμέσως πριν από τη συλλογή πλάσματος. Όλα τα δείγματα ορού και πλάσματος αποθηκεύτηκαν στους $-80^\circ C$ μέχρι τη βιοχημική ανάλυσή τους.

Αναλύσεις αίματος: Εμπορικά διαθέσιμα κιτ (BIOSIS, Αθήνα, Ελλάδα) βασισμένα σε ενζυματικές μεθόδους χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της γλυκόζης (mmol/L) (οξειδάση γλυκόζης, ευαισθησία 0,04 mmol/L, συντελεστής διακύμανσης εντός ανάλυσης (CV) 2,4%), τριακυλογλυκερόλες (TAG) (mmol/L) (οξειδάση φωσφογλυκερίνης, ευαισθησία 0,03 mmol/L, CV 1,3%), ολική χοληστερόλη (mmol/L) (χοληστερόλη εστεράση/οξειδάση χοληστερόλης, ευαισθησία 0,10 mmol/L, CV 1,6%). Η λιποπρωτεΐνη-χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας (mmol/L) προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο με αυτήν που χρησιμοποιήθηκε για την ολική χοληστερόλη, αφού υπολογίστηκε η καθίζηση των λιποπρωτεϊνών εκτός HDL με φωσφοτονγκυστικό οξύ και LDL-χοληστερόλη (mmol/L) χρησιμοποιώντας τον τύπο Friedewald. Η ινσουλίνη (pmol/L) μετρήθηκε με μια ενζυμικά συνδεδεμένη ανοσοπροσροφητική δοκιμασία (Invitrogen™, ανθρώπινη ινσουλίνη ELISA, CV%: 5,4% και CV μεταξύ δοκιμασιών: 8,5; Life Technologies Corporation, 7335 Executive Way, Frederick, MD USA 21704). Η μέθοδος αξιολόγησης του μοντέλου ομοιόστασης (HOMA) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της αντίστασης στην ινσουλίνη (IR) από τις βασικές συγκεντρώσεις γλυκόζης (νηστείας) και ινσουλίνης. Το HOMA-IR υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο: $(FPI \times FPG) / 22.5$, όπου το FPI είναι η συγκέντρωση ινσουλίνης νηστείας στο πλάσμα (mU/L) και το FPG είναι η γλυκόζη πλάσματος νηστείας (mmol/L).

4.5 Συμμόρφωση

Κατά τη διάρκεια της κατανάλωσης ψαριών και των περιόδων washout, οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να καταγράψουν τις ημέρες που κατανάλωναν ψάρια, και τη χρήση οποιουδήποτε φαρμάκου, καθώς και να αναφέρουν τυχόν βραχυπρόθεσμο κρυολόγημα. Όλα τα αρχεία συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των ραντεβού που είχαν οι συμμετέχοντες με τον ερευνητή διαιτολόγο. Επιπλέον, στη μέση κάθε περιόδου παρέμβασης, ένας από τους ερευνητές κάλεσε τους συμμετέχοντες να

διερευνήσουν τη συμμόρφωση με την παρέμβαση και να καταγράψουν τυχόν απροσδόκητες συνθήκες (π.χ. ασθένειες, προβλήματα με την παράδοση ψαριών, απώλεια μερίδων ψαριών λόγω ατυχημάτων κατά το μαγείρεμα). Επιπλέον, η συμμόρφωση των συμμετεχόντων στο πρωτόκολλο της μελέτης αξιολογήθηκε με ανάλυση λιπαρών οξέων (FA) των μεμβρανών των ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) που συλλέχθηκαν στην αρχή και στο τέλος κάθε περιόδου θεραπείας ψαριών.

Απομόνωση ερυθρών αιμοσφαιρίων και ανάλυση FA: Εν συντομία, τα ερυθρά αιμοσφαίρια παρασκευάστηκαν από σωλήνες EDTA (BD Vacutainer® επικαλυμμένοι με ψεκασμό σωλήνες K2EDTA) μετά τη συλλογή πλάσματος. Μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων (FAME) παρήχθησαν κατά τη διάρκεια μεθανόλυσης των εκχυλισμάτων RBC και εκχυλίστηκαν με εξάνιο που περιείχε εσωτερικό πρότυπο, δηλ. BHT. Οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιώντας έναν αέριο χρωματογραφία Agilent HP-6890 (Avondale, PA, USA) εξοπλισμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας και έναν αυτόματο δειγματολήπτη HP 6890. Ένα τυπικό μείγμα FAME χρησιμοποιήθηκε για την αναγνώριση των κορυφών (Sigma L9405, St. Louis, MO, USA). Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης, μόνο εκείνες οι FA που περιείχαν > 0,01% των συνολικών FA των μεμβρανών RBC εξετάστηκαν για ανάλυση δεδομένων, δηλαδή 34 FA από ένα σύνολο 46 FA που εντοπίστηκαν. Τα τρανς ισομερή δεν συμπεριλήφθηκαν.

Προσδιορισμός συστατικών που αντιδρούν με θειοβαρβιτουρικό οξύ (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS)

Η μέτρηση του οξειδωτικού στρες στα μόρια των λιποειδών έγινε με τη μέθοδο TBARS. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αντίδραση (σχήμα) ανάμεσα στη μηλονική διαλδεΐδη (MDA) ένα από τα κύρια προϊόντα της λιποξειδικής υπεροξειδωσης - και το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBA), κατά την οποία παράγεται το έγχρωμο μόριο TBA- MDA, που προσδιορίζεται φωτομετρικά.

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Φυγόκεντρος (Eppendorf Centrifuge 5810R, Netheler Hinz GmbH)
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Φασματοφωτόμετρο μικροπλακιδίων

- Μικροπλακίδια 96 θέσεων
- Φωσφορικό οξύ
- Βουτανόλη
- HCl 0.01 M: 250μL HCl σε 250ml απιονισμένο νερό
- NaOH 0.1 N
- BHT (5μM): 0,0055g σε 5 mL μεθανόλη
- Φωσφορικό οξύ 0,2 M
- TBA 0,11M: 0.0793 g σε 5 mL NaOH 0,1N
- Πρότυπο διάλυμα MDA 200μM: Υδρολύονται 0,672 mL TMP σε 20 mL 0.01M για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Το διάλυμα MDA που προκύπτει έχει συγκέντρωση 200μM.

Αρχή μεθόδου

Η MDA είναι μία αλδεΐδη με τρεις ανθρακικές αλυσίδες που παράγεται κατά τη διάρκεια αποσύνθεσης του υδροπεροξειδίου των λιπιδίων. Η ανίχνευση των TBARS είναι μια δοκιμή που χρησιμοποιείται για την μέτρηση των προϊόντων αλδεΐδης (κυρίως MDA) που σχηματίζονται μέσω της διάσπασης των υδροπεροξειδίων των λιπιδίων

Αναλυτική πορεία

Σε erpendorfs σωλήνες προστίθενται: 100μL ορού ή 200μL πρότυπο διάλυμα TMP ή αποσταγμένο νερό (τυφλό). Στην περίπτωση του ορού, ο όγκος συμπληρώνεται μέχρι τα 200μL με νερό, 25μL BHT (5μM), 200μL φωσφορικό οξύ 0,2M και 25μL TBA 0,11M. Μετά από έντονη ανάδευση το μίγμα της αντίδρασης παραμένει στους 90 °C για 60 min. Μετά το τέλος της επώασης, οι σωλήνες ψύχονται για 5 min στο ψυγείο και προστίθεται σε αυτούς 500 μL βουτανόλης. Μετά από έντονη ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 10000xg για 10 min, ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, παραλαμβάνεται η πάνω βουτανολική φάση, μεταφέρεται σε erpendorfs και επαναφυγοκεντρείται στα 10000xg για 10 min. Η βουτανολική φάση μεταφέρεται σε μικροπλακίδια 96 θέσεων και φωτομετρείται στα 535 nm. Από την καμπύλη αναφοράς που κατασκευάζεται με πρότυπα διαλύματα που έχουν συνολική

ποσότητα MDA στο διάλυμα φωτομέτρησης 0,02, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6 nmol MDA προσδιορίζεται η συγκέντρωση MDA των αγνώστων διαλυμάτων. Τόσο τα πρότυπα διαλύματα, όσο και τα άγνωστα αναλύονται εις διπλούν.

Μέτρηση της δραστικότητας της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης Gpx1 σεερυθροκύτταρα

Αντιδραστήρια-Όργανα-Σκεύη

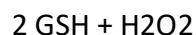
- ❖ Διάλυμα Drabkin D5941. Ανασύσταση ενός vial of the Drabkin's Reagent σε 1000 mL καλή και φιλτράρισμα εάν έχει αδιάλυτα κομμάτια.
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM με EDTA 0,4 mM, Sodium Azide 1 mM pH 7 (PBS/ EDTA/Sodium azide): 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ και 0,08325 g EDTA, 0,032 g NaN_3 σε 500 mL απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση pH με NaOH 1 M
- ❖ Αναγωγή της γλουταθειόνης: 219 U/mg πρωτεΐνης, 3,1 mg πρωτεΐνης/mL (τελική συγκέντρωση στο μίγμα της αντίδρασης 1,17 U/mL) Παρασκευάζονται αμέσως πριν την πειραματική διαδικασία.
- ❖ Διάλυμα γλουταθειόνης 200 mM: 0,0615 g σε 1 mL απεσταγμένο νερό
- ❖ Διάλυμα H_2O_2 0,0084%: 1,12 μL διαλύματος H_2O_2 από το stock διάλυμα (30%) και 3999 μL απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζονται αμέσως πριν την πειραματική διαδικασία.
- ❖ Μίγμα αντίδρασης PBS/ Sodium azide 8340 μL , 5 μL αναγωγή της γλουταθειόνης, γλουταθειονη 50 μL , NADPH 100 μL
- ❖ β -NADPH
- ❖ Φωτόμετρο ELISA (Biotek, PowerWaveXS2)
- ❖ Φυγόκεντρος Eppendorf 5810R
- ❖ Tips (άσπρα, κίτρινα, μπλε)
- ❖ Αυτόματες πιπέτες

❖ Πλακίδια 96 θέσεων

❖ Vortex

Αρχή μεθόδου

Η μέτρηση της δραστικότητας της GPx έγινε έμμεσα μέσω της αντίδρασης της αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Η GPx καταλύει την αντίδραση της γλουταθειόνης (GSH) με το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Κατά την αντίδραση αυτή παράγεται οξειδωμένη γλουταθειόνη, η οποία ανάγεται και πάλι σε GSH με τη δράση της αναγωγάσης της γλουταθειόνης παρουσία NADPH. Η οξείδωση του NADPH σε NADP⁺ συνοδεύεται από μείωση της απορρόφησης στα 340 nm. Ο ρυθμός μείωσης της απορρόφησης στα 340 nm είναι ευθέως ανάλογος της δραστικότητας της GPx.



υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GSSG + 2 H₂O

GSSG + β-NADPH αναγωγάση της γλουταθειόνης NADP⁺ + 2GSH

Αναλυτική πορεία

Σε erpendorfs τοποθετήθηκαν 400 μL νερό, 100 μL RBC (αραίωση ερυθροκυττάρων 1:5) και ακολουθήσε ανάδευση με vortex. Φυγοκέντρηση για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4°C με 10000 rpm. Μετά το πέρας της φυγοκέντρησης, λήφθηκε 400 μL του υπερκειμένου και τοποθετήθηκε σε ένα καινούριο erpendorf. Πραγματοποιήθηκε καλή ανάδευση και τοποθέτηση 100 μL/ erpendorf. Σε ένα erpendorf που περιείχε ακριβώς 100 μL προστέθηκε 400 μL διάλυμα Drabkin όπου και χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της Gpx1. Τα υπόλοιπα erpendorf των 100 μL αποθηκεύτηκαν στους -80° C. Στο τυφλό τοποθετήθηκαν 100μL νερό και 400μL διάλυμα Drabkin. Στα πηγάδια της μικροπλάκας προστέθηκαν 30 μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS/EDTA/Sodium azide στη συνέχεια 20 μL από το δείγμα ή 20 μL από το τυφλό. Ακολούθως 180 μL από το μίγμα αντίδρασης. Παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό. Προστέθηκε 25 μL διάλυμα H₂O₂. Μέτρηση απορρόφησης στα 340 nm για 6 min. Ο υπολογισμός της δραστικότητας έγινε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Units/ mL παρασκευάσματος} = \frac{(\Delta A / \text{min}_{\text{Δείγμα}} - \Delta A / \text{min}_{\text{Τυφλό}}) \times 2 \times 0,255 \times df}{4,60 \times 0,02}$$

Όπου:

2: Τα 2 μmoles της GSH που παράγονται για κάθε μmole NADPH που οξειδώνεται.

0,255: Ο τελικός όγκος του assay σε mL.

df: Ο συντελεστής αραίωσης αν το δείγμα της GPx1 είχε αραιωθεί.

4,60: ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,74 cm).

0,05: Ο όγκος του διαλύματος της GPx1 που χρησιμοποιείται στο assay.

Τα δείγματα με το περιεχόμενο διάλυμα Drabkin που χρησιμοποιήθηκαν στη φωτομέτρηση για τον προσδιορισμό του ενζύμου, αποθηκεύονται στους -20° C για να χρησιμοποιηθούν μετά στον προσδιορισμό της αιμοσφαιρίνης με τη μέθοδο Drabkin.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως U/g αιμοσφαιρίνης.

Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης

Όργανα

- ELISA reader

Αναλώσιμα

- Tips (άσπρα, κίτρινα, μπλε)
- Αυτόματες πιπέτες
- Πλακίδια 96 θέσεων (απλά)

Στερεά αντιδραστήρια/Διαλύτες

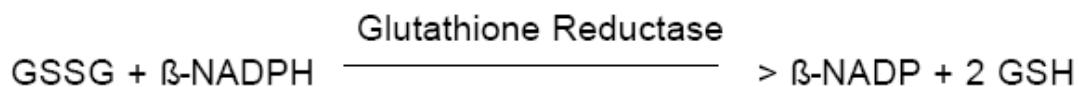
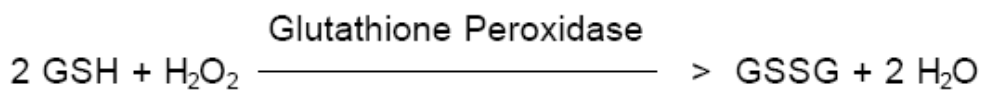
- Sodium phosphate monobasic, Na₂PO₄.H₂O

- EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid, Tetrasodium Salt) (Sigma, E6511)
- Sodium Azide (Sigma, S-2002)
- β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Form (β -NADPH), Tetrasodium Salt (N1630, MW 833,35), 25 mg
- Glutathione Reductase (Sigma, G-3664)
- GSH (Sigma, G-4251)
- Dithiothreitol (Sigma, D-0632)
- H_2O_2 30% (Sigma, H-1009)
- Πρότυπο διάλυμα GPx

Διαλύματα

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM με EDTA 0.4 mM, Sodium Azide 1 mM pH 7.0 (**PBS/EDTA/Sodium azide**): 3,45 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (S5) και 0,08325 g EDTA (E1), 0,032 g NaN_3 σε 500 mL απεσταγμένο νερό. Ρύθμιση pH με NaOH 1M
- Διάλυμα αναγωγάσης της γλουταθειόνης 100 U/mL (**GR**): Αραίωση stock διαλύματος αναγωγάσης με παγωμένο απεσταγμένο νερό. Απευθείας αραίωση κατά την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης (πίνακας).
- Διάλυμα ανηγμένης γλουταθειόνης 200 mM (**GSH**): 0,0615 g σε 1 mL απεσταγμένο νερό
- Διάλυμα H_2O_2 0.0084% (**H_2O_2**): 1,12 μL διαλύματος H_2O_2 από το stock διάλυμα (30%) και 3999 μL απεσταγμένο νερό. Παρασκευάζεται αμέσως πριν το assay.

Αντίδραση



Αναλυτική πορεία

- Παρασκευή διαλυμάτων GR και H_2O_2 λίγο πριν το assay
- Παρασκευή μίγματος αντίδρασης σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

PBS/Sodium azide	8340 μL
GR	15 μL
GSH	50 μL
NADPH	100 μL

Αναδιάλυση NADPH με ήπια ανακίνηση. Το διάλυμα διατηρείται στους 25 °C.

- Προσθήκη των παρακάτω διαλυμάτων στα πηγαδάκια των plates και διεξαγωγή του assay σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

	Blank	Sample
Μίγμα αντίδρασης	180 μL	180 μL
Tris pH 7,4 (Διαλύτης διαλύματος GPx)	50 μL	-
Διάλυμα GPx (LRP)	-	50 μL
	Ανάμιξη με το tip και παραμονή 1 λεπτό σε Θδωμ.	
Διάλυμα H_2O_2	25 μL	25 μL

	Μέτρηση A στα 340 nm για 5 min ανά 1 min (μέθοδος GPX LF στο Elisa reader)
--	---

Υπολογισμός δραστηριότητας

$$\text{Units/mL παρασκευάσματος} = \frac{(\Delta A/\text{min, sample} - \Delta A/\text{min, blank}) \times 2 \times 0,255 \times df}{5,60 \times 0,05}$$

όπου:

2: Τα 2 μmoles της GSH που παράγονται για κάθε μmole NADPH που οξειδώνεται

0,255: Ο τελικός όγκος του assay σε mL

df: Ο συντελεστής αραιώσης αν το δείγμα της GPX αραιωθεί

5,60 : ο συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας του NADPH στα 340 nm και για όγκο 0,255 mL (μήκος οπτικής διαδρομής: 0,9 cm)

0,05 : Ο όγκος του διαλύματος της GPX που χρησιμοποιείται στο assay

G3664-500UN.. 71.40 = 71.40

G4251-1G 22.70 = 22.7

N1630-25MG 93.00= 93.0

Πρωτόκολλο οξείδωσης ορού

Αντιδραστήρια

- * Stock Διάλυμα CuSO_4 20mM: Ζυγίζονται 0,0125 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MW=249,68) και διαλύονται σε 2,5ml H_2O . Το διάλυμα φυλάσσεται σε σκουρόχρωμη φιάλη σε θερμοκρασία δωματίου.
- * Διάλυμα PBS buffer: Αναδιαλύονται σε 1000 mL απεσταγμένου νερού 9 g NaCl, 0.9076 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2408 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ και ρυθμίζεται το pH στο 7,4.

Αρχή Μεθόδου

Η μέτρηση της in vitro οξειδωσης του πλάσματος η προκαλούμενη από ιόντα Cu^{2+} , βασίζεται στη συνεχή καταγραφή της απορρόφησης στα 245nm. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος οφείλεται κυρίως στα συζυγή διένια των υδροϋπεροξειδίων και κατά μικρότερο βαθμό σε άλλες ενώσεις όπως συζυγή διένια υδροξειδίων, που παράγονται κατά την οξείδωση των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFAs) που απαντούν στις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, όταν προστίθενται ιόντα Cu^{2+} .

Καταγράφοντας την απορρόφηση στα 245nm παρέχεται η δυνατότητα να παρακολουθείται η κινητική της οξειδωσης που λαμβάνει χώρα στο πλάσμα. Η κινητική αυτή είναι περίπλοκη καθώς οι λιποπρωτεΐνες του πλάσματος περιέχουν πληθώρα αντιοξειδωτικών τα οποία οξειδώνονται πρώτα εκδηλώνοντας την αντιοξειδωτική τους δράση. Στο διάστημα της οξείδωσης των αντιοξειδωτικών η απορρόφηση στα 245nm αυξάνεται ελάχιστα. Ο χρόνος που απαιτείται για να οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά καλείται χρόνος λανθάνουσας φάσης και αποτελεί μέτρο της αντίστασης του πλάσματος στην οξείδωση.

Μόνο όταν οξειδωθούν τα αντιοξειδωτικά αρχίζουν να παράγονται τα συζυγή διένια και να αυξάνεται η απορρόφηση στα 245nm. Η καταγραφή της απορρόφησης παρέχει μια σιγμοειδή καμπύλη, η οποία έχει τα εξής χαρακτηριστικά: 1) χρόνος της λανθάνουσας φάσης (lag time), 2) η μέγιστη ταχύτητα ($V_{\max}$) της συσσώρευσης των προϊόντων που απορροφούν στα 245nm που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης ανά min, 3) ο χρόνος ($t_{\max}$) κατά τον οποίο παρατηρείται η $V_{\max}$ και 4) η μέγιστη συσσώρευση προϊόντων που απορροφούν που εκφράζεται σε μονάδες απορρόφησης.

Πειραματική Πορεία

96-well UV plate flat bottom:

- Διάλυμα ορού αραιώση 1: 12 του δείγματος με PBS buffer
- Working CuSO_4 . Πραγματοποιείται αραιώση 1/1095 με PBS (21μL stock σε 22.98mL PBS)
- Σε κάθε well τοποθετούνται 20μl αραιωμένου ορού
- Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 230 μL μίγματος που περιέχουν PBS και CuSO_4 . (τελική συγκέντρωση 16μM στα 250 μL)

- Γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 245 nm για 6,5 h ανά 2 min

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας Stata Statistical Software, Release 12 (StataCorp LP: College Station, TX, USA). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 0,05 για όλες τις δοκιμές.

Οι δύο ομάδες αλληλουχιών (CF/EF έναντι EF/CF) συγκρίθηκαν για δημογραφικά, ανθρωπομετρικά, βιοχημικά, σωματική δραστηριότητα και διατροφικά χαρακτηριστικά που αξιολογήθηκαν στην αρχή της μελέτης. Το Fisher test χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμηθεί εάν το φύλο και το κάπνισμα εκπροσωπούσαν ομοιόμορφα μεταξύ των δύο ομάδων. Για τις συνεχείς μεταβλητές, χρησιμοποιήθηκε το t-test δύο ανεξάρτητων δειγμάτων ή το μη παραμετρικό τεστ Mann-Whitney για μεταβλητές που ακολουθούν κανονική ή μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα. Οι κατηγορικές μεταβλητές (φύλο, κατάσταση καπνίσματος) παρουσιάζονται ως συχνότητες, n (%), η σχετική συχνότητα (%) εκφράζεται ως ποσοστό όλων των συμμετεχόντων. Οι συνεχείς μεταβλητές με κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (SD), ενώ οι συνεχείς μεταβλητές με μη κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόρια).

Χρησιμοποιήθηκαν δοκιμές t tests ζευγών δειγμάτων για να αξιολογηθεί εάν το περιεχόμενο της μεμβράνης RBC σε λιπαρά οξέα ήταν υψηλότερο μετά την κατανάλωση ψαριών σε σύγκριση με το περιεχόμενο πριν από την κατανάλωση ψαριών. Πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις ανά περίοδο και θεραπεία. Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσος όρος πριν από τη θεραπεία $\pm$ SD, διάστημα εμπιστοσύνης 95% (CI) της μεταβολής και τιμή p για τα δείγματα t tests.

Τα δεδομένα εκφράστηκαν ως σχετική μεταβολή (%) που υπολογίστηκε ως η μεταβολή μεταξύ των τιμών στο τέλος και των τιμών στην αρχή κάθε περιόδου θεραπείας. Για δεδομένα με μη κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκε ο φυσικός λογάριθμος ($\ln$) της αναλογίας (%) αντί της σχετικής μεταβολής (%). Για κάθε ένα από τα αποτελέσματα εφαρμόστηκαν μοντέλα γραμμικής παλινδρόμησης. Η θεραπεία χρησιμοποιήθηκε ως η κύρια έκθεση και το CF χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς. Έγιναν προσαρμογές για την περίοδο της θεραπείας, δηλαδή, 1^η περίοδος (χειμώνας) έναντι 2^{ης} περιόδου (καλοκαίρι). Πρόσθετες προσαρμογές για την ινσουλίνη ή το HOMA-IR και τα πακέτα καπνίσματος δεν άλλαξαν τα αποτελέσματα και επομένως δεν παρουσιάζονται. Η

επίδραση της θεραπείας παρουσιάζεται ως ο εκθετικός συντελεστής (τυπικό σφάλμα, SE) και 95% CI.

Για κάθε κύριο αποτέλεσμα/δείκτη, οι τιμές στην αρχή της θεραπείας 8 εβδομάδων συγκρίθηκαν με τις τιμές στο τέλος της θεραπείας, ξεχωριστά για κάθε επεξεργασία ψαριών. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν επίσης ανά περίοδο, καθώς υπήρχαν ενδείξεις για την επίδραση της περιόδου. Για αυτήν την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν δοκιμές t tests δύο ζευγών ή δοκιμές Wilcoxon.

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα-Συζήτηση

5.1 Βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών

Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές για τους ανθρωπομετρικούς δείκτες ή τους τυπικούς βιοχημικούς δείκτες μεταξύ των ομάδων CF/EF και EF/CF στην αρχή της μελέτης. Ο καρδιακός ρυθμός (παλμοί/λεπτό), η συγκέντρωση ινσουλίνης στον ορό νηστείας (pmol/L) και το HOMA-IR ήταν υψηλότερα στην ομάδα CF/EF σε σύγκριση με την ομάδα EF/CF (Πίνακας 2). Επιπλέον, οι δύο ομάδες δεν διέφεραν όσον αφορά τη σωματική δραστηριότητα και τα χαρακτηριστικά διατροφής στην αρχή της μελέτης (Πίνακας 3).

Πίνακας 2 Δημογραφικά, ανθρωπομετρικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης κατά σειρά.

	CF/EF	EF/CF	p
Συμμετέχοντες, n (%)	15 (50)	15 (50)	
Φύλο			0.272
Άνδρες, n (%)	10 (33.3)	6 (20.0)	
Ηλικία (έτη)	42 ± 6	45 ± 8	0.360
Κατάσταση καπνίσματος			0.890
Μη καπνιστές, n (%)	7 (23.3)	5 (16.7)	
Πρώην Καπνιστές, n (%)	3 (10.0)	3 (10.0)	
Ενεργοί καπνιστές, n (%)	5 (16.7)	7 (23.3)	
Έτη καπνίσματος	5.0 (1.3, 11.3)	20.0 (1.8, 46.5)	0.570
Ανθρωπομετρικοί δείκτες			
BMI (kg/m ²)	30.4 ± 3.9	28.7 ± 3.1	0.209

Μη φυσιολογική περιφέρεια μέσης, n (%)	10 (33.3)	9 (30.0)	>0.99
Συστολική πίεση (mmHg)	129 (123, 138)	131 (116, 133)	0.787
Διαστολική πίεση (mmHg)	81 ± 8	80 ± 9	0.645
Καρδιακός ρυθμός (pulses/min)	77 ± 10	68 ± 7	0.009
Τυπικοί βιοχημικοί δείκτες			
Ολική χοληστερόλη (mmol/L)	4.93 ± 1.02	5.23 ± 0.98	0.434
HDL-χοληστερόλη (mmol/L)	1.22 ± 0.26	1.23 ± 0.24	0.979
LDL-χοληστερόλη (mmol/L)	3.27 ± 0.98	3.49 ± 0.83	0.516
Τριγλυκερίδια (mmol/L)	0.96 ± 0.44	1.11 ± 0.40	0.328
Γλυκόζη (mmol/L)	4.97 ± 0.63	4.72 ± 0.43	0.215
Ινσουλίνη (pmol/L)	95.8 ± 45.1	61.1 ± 36.1	0.028
HOMA-IR	2.7 (1.7, 4.6)	1.4 (1.0, 2.6)	0.018

Οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται ως συχνότητες, n (%). Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται ως μέση ± τυπική απόκλιση εάν κατανέμονται κανονικά ή ως διάμεσος (25ο, 75ο τεταρτημόρια) εάν δεν κατανέμονται κανονικά. Τα Fisher's test χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση ομάδων για κατηγορικές μεταβλητές. Δύο ανεξάρτητες t test ή test Mann – Whitney χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση ομάδων για συνεχείς μεταβλητές με κανονική και μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα. ADP: διφωσφορική αδενοσίνη. ΔΜΣ: δείκτης μάζας σώματος. CF: συμβατικά ψάρια. EF; εμπλουτισμένα ψάρια. HDL: λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας. HOMA-IR: εκτίμηση μοντέλου ομοιόστασης της αντίστασης στην ινσουλίνη. LDL: λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας.

Πίνακας 3 Φυσική δραστηριότητα και διατροφικά χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης κατά σειρά.

	CF/EF (n= 15)	EF/CF (n= 15)	p
Φυσική δραστηριότητα			
Ενέργεια (kcal/ημέρα)	3016.9 ± 526.4	2832.6 ± 742.7	0.440
Επίπεδο φυσικής δραστηριότητας (PAL)	1.4 (1.2, 1.6)	1.4 (1.3, 1.6)	0.418
Διατροφικά χαρακτηριστικά			
Ενεργειακή πρόσληψη (kcal/ημέρα)	2334.1 ± 755.8	2221.5 ± 613.4	0.658
Υδατάνθρακες (%)	37.3 ± 4.5	39.2 ± 7.4	0.393
Πρωτεΐνες (%)	15.7 (14.7, 17.4)	15.5 (14.2, 17.3)	0.576
Λίπη (%)	44.0 ± 5.6	41.8 ± 6.5	0.334
Αλκοόλ (%)	1.9 (0.7, 2.7)	2.4 (0, 4.0)	0.692
Ομαδική κατανάλωση τροφίμων (μερίδες/ημέρα):			
Ψάρια και αλιεύματα	0.4 (0.2, 0.4)	0.2 (0.2, 0.4)	0.803
Κόκκινο κρέας	1.2 (1.1, 1.7)	1.6 (0.9, 1.8)	0.852
Πουλερικά	0.5 (0.2, 0.5)	0.5 (0.2, 0.5)	0.717
Αυγά	0.1 (0.1, 0.2)	0.1 (0.1, 0.2)	0.912
Γαλακτοκομικά προϊόντα	2.3 ± 1.0	1.9 ± 1.0	0.257
Γαλακτοκομικά προϊόντα με πλήρη λιπαρά	1.1 (0.6, 2.3)	1.4 (0.9, 2.0)	0.868
Γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλών λιπαρών	0.6 (0, 1.3)	0.1 (0, 1.0)	0.191
Σιτηρά	5.5 ± 2.8	5.8 ± 2.2	0.784
Εκλεπτυσμένα δημητριακά	3.9 ± 2.3	5.2 ± 2.4	0.155
Μη επεξεργασμένα δημητριακά	0.7 (0.1, 4.0)	0.2 (0.0, 1.0)	0.220
Πατάτες	0.4 (0.3, 0.6)	0.3 (0.2, 0.7)	0.256
Φρούτα	1.5 ± 0.9	1.5 ± 1.0	0.845
Ολόκληρο φρούτο	0.8 (0.4, 1.1)	0.9 (0.1, 1.9)	0.693
Χυμός φρούτων	0.4 (0, 1.3)	0.4 (0, 1.3)	0.814

Λαχανικά	1.8 ± 1.0	1.9 ± 0.6	0.729
Οσπρια	0.5 (0.2, 0.5)	0.2 (0.2, 0.5)	0.231
ΞΗΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ	0.2 (0.1, 0.6)	0.1 (0, 0.2)	0.187
Ελιές	0.1 (0, 0.1)	0.1 (0, 0.2)	0.548
Ελαιόλαδο	1.0 ± 0.5	1.1 ± 0.6	0.540
Ελαιόλαδο (ml ανά ημέρα)	29 ± 15	33 ± 19	0.540
Βαθμολογία μεσογειακής διατροφής	31.7 ± 4.6	29.7 ± 4.6	0.243

Οι συνεχείς μεταβλητές με κανονική κατανομή παρουσιάζονται ως μέση ± τυπική απόκλιση. Οι συνεχείς μεταβλητές με μη φυσιολογική κατανομή παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25, 75 τεταρτημόρια).

Δύο ανεξάρτητα t test ή Wilcoxon rank-sum (Mann-Whitney) χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση ομάδων για συνεχείς μεταβλητές με κανονική ή μη κανονική κατανομή, αντίστοιχα.

Οι τιμές P παρουσιάζονται για δοκιμές δύο ανεξάρτητων δειγμάτων.

CF: συμβατικά ψάρια. EF; εμπλουτισμένα ψάρια.

5.2 Συμμόρφωση με το πρωτόκολλο μελέτης

Η συμμόρφωση των συμμετεχόντων στο πρωτόκολλο της μελέτης ήταν υψηλή (100%), βάσει αυτοαναφοράς, και αυτό επιβεβαιώθηκε από την περιεκτικότητα λιπαρών οξέων στη μεμβράνη ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης, στην πρώτη και στη δεύτερη περίοδο θεραπείας για τη θεραπεία με συμβατικά και εμπλουτισμένα ψάρια, αντίστοιχα (Πίνακες 4-6). Το ερουκικό οξύ (C22:1n-9) βρέθηκε υψηλότερο στο τέλος της 2^{ης} περιόδου θεραπείας σε σύγκριση με το περιεχόμενο στο τέλος της 1^{ης} περιόδου στη θεραπεία με συμβατικά ψάρια (CF). Το παλμιτικό οξύ (C16:0) και το βαχενικό οξύ (C18:1 n7) βρέθηκαν υψηλότερα στο τέλος της 2^{ης} περιόδου θεραπείας σε σύγκριση με το περιεχόμενό τους στο τέλος της 1^{ης} περιόδου στη θεραπεία με εμπλουτισμένα ψάρια (EF). Γενικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο για την κατανάλωση των CF, όσο και για την κατανάλωση των EF κατά τις δύο περιόδους θεραπείας ήταν σχεδόν παρόμοια ανεξάρτητα από την περίοδο θεραπείας.

Πίνακας 4 Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων σε μεμβράνες ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης κατά σειρά.

	CF/EF	EF/CF	p
14:0 (%)	0.30 (0.23, 0.47) n=9	0.35 (0.24, 0.42) n=9	0.860
16:0 (%)	22.20 (20.92, 22.99) n=12	23.99 (20.73, 24.61) n=11	0.157
17:0 (%)	0.48 (0.43, 0.53) n=13	0.47 (0.37, 0.53) n=13	0.626
18:0 (%)	16.50 (16.30, 17.16) n=13	16.77 (16.30, 17.45) n=14	0.752
20:0 (%)	0.48 (0.39, 0.52) n=9	0.45 (0.35, 0.51) n=14	0.659
21:0 (%)	1.69 (1.51, 2.07) n=10	1.65 (1.45, 1.90) n=10	0.650
22:0 (%)	1.07 (0.95, 1.10) n=13	0.90 (0.76, 1.01) n=14	0.005
24:0 (%)	2.71 (2.19, 3.02) n=13	2.19 (1.58, 2.83) n=14	0.190
18:1n-9c (%)	12.49 (12.01, 13.17) n=13	12.39 (11.68, 13.61) n=14	0.942
18:1n-7 (%)	0.69 (0.67, 0.83) n=13	0.83 (0.70, 0.87) n=14	0.264
20:1n-9 (%)	0.42 (0.38, 0.44) n=9	0.42 (0.36, 0.48) n=12	0.914
18:2cc (%)	8.83 (8.26, 9.51) n=13	8.63 (7.89, 9.09) n=14	0.332
20:4n-6 (%)	12.47 (11.36, 13.81) n=13	12.17 (11.41, 13.73) n=14	0.903
20:5n-3 (%)	0.43 (0.39, 0.52) n=11	0.50 (0.43, 0.55) n=13	0.092
22:1n-9 (%)	0.49 (0.22, 0.55) n=10	0.60 (0.30, 0.94) n=12	0.291
24:1 (%)	2.45 (2.05, 2.62) n=13	2.13 (1.81, 2.71) n=14	0.627

22:5n-3 (%)	1.68 (1.49, 1.85) n=13	1.63 (1.52, 1.81) n=14	0.771
22:6n-3 (%)	2.78 (2.56, 3.48) n=13	3.65 (3.31, 3.80) n=14	0.009
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόριο). Τα Mann–Whitney test χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση ομάδων. Το επίπεδο σημαντικότητας του p ορίστηκε στο 0,05.			

Πίνακας 5 Περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα της μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) (%) των συμμετεχόντων στα συμβατικά ψάρια (CF)

	Τέλος 1^{ης} περιόδου	% μεταβολή	Τέλος 2^{ης} περιόδου	% μεταβολή	p
14:0 (%)	0.33 (0.21, 0.50) n=8	-16.67 (-45.45, 30.0) n=6	0.32 (0.26, 0.36) n=9	-29.17 (-46.15, 2.86) n=9	0.736
16:0 (%)	22.0 (21.05, 23.2) n=13	-0.71 (-2.75, 1.91) n=12	23.0 (21.89, 23.51) n=11	-2.97 (-12.26, 1.46) n=11	0.213
17:0 (%)	0.38 (0.36, 0.46) n=12	-13.13 (-26.66, 1.72) n=12	0.42 (0.36, 0.46) n=13	-2.66 (-20.71, 25.83) n=12	0.683
18:0 (%)	16.65 (16.18, 17.53) n=13	-0.67 (-3.52, 1.27) n=13	16.27 (15.43, 17.15) n=14	-3.47 (-7.17, 3.15) n=12	0.437
20:0 (%)	0.63 (0.44, 0.75) n=11	9.82 (-4.90, 49.04) n=8	0.45 (0.37, 0.86) n=14	22.66 (-7.14, 76.28) n=12	0.763
21:0 (%)	1.45 (1.14, 1.74) n=11	-11.59 (-24.68, - 4.20) n=10	1.44 (1.16, 1.60) n=12	-2.42 (-13.77, 4.67) n=10	0.829
22:0 (%)	1.05 (0.93, n=11)	-3.67 (-30.43, n=10)	0.89 (0.78, n=12)	3.06 (-26.50, n=10)	0.132

	1.15) n=13	9.09) n=13	1.01) n=14	15.79) n=13	
24:0 (%)	2.7 (2.31, 3.0) n=13	-1.49 (-9.35, 11.87) n=13	2.26 (1.87, 2.5) n=14	-2.02 (-13.27, 10.31) n=13	0.115
18:1n-9c (%)	12.01 (11.27, 12.97) n=13	-0.52 (-5.11, 1.13) n=13	12.05 (11.05, 13.58) n=14	-3.66 (-6.94, - 1.15) n=13	0.884
18:1n-7 (%)	0.76 (0.68, 0.82) n=13	9.68 (-4.35, 21.18) n=13	0.86 (0.73, 0.91) n=14	4.62 (-10.53, 17.74) n=13	0.089
20:1n-9 (%)	0.49 (0.37, 0.56) n=13	11.36 (2.78, 22.64) n=9	0.46 (0.32, 0.62) n=10	56.03 (-24.14, 95.83) n=6	0.877
18:2cc (%)	8.66 (8.3, 9.2) n=13	-1.77 (-4.84, 3.11) n=13	8.54 (8.17, 8.93) n=14	-2.44 (-10.15, - 0.11) n=13	0.332
20:4n-6 (%)	12.38 (11.22, 13.08) n=13	-1.63 (-8.36, 1.53) n=13	12.13 (11.4, 12.64) n=14	-1.96 (-10.02, 3.79) n=13	0.662
20:5n-3 (%)	0.58 (0.43, 0.73) n=13	34.69 (-7.41, 86.54) n=11	0.71 (0.58, 0.92) n=14	37.25 (14.81, 86.36) n=13	0.145
22:1n-9 (%)	0.51 (0.32, 0.74) n=8	64.44 (-14.12, 150.0) n=7	0.29 (0.18, 0.44) n=12	-42.34 (-64.0, 15.38) n=7	0.031
24:1 (%)	2.31 (2.28, 2.94) n=13	-1.18 (-9.73, 11.71) n=13	2.48 (1.97, 2.7) n=14	6.49 (-13.41, 13.62) n=13	0.734
22:5n-3 (%)	1.71 (1.46, 1.8)	4.27 (-8.33,	1.82 (1.54,	17.31 (-3.51,	0.174

	n=13	11.11) n=13	1.93) n=14	32.59) n=12	
22:6n-3 (%)	3.71 (2.73, 4.2) n=13	17.32 (-0.54, 26.40) n=13	3.98 (3.46, 4.3) n=14	20.94 (0.95, 30.0) n=13	0.286
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόριο). Οι δοκιμές Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της περιόδου 1 με την περίοδο 2. Οι τιμές p παρουσιάζονται με το επίπεδο σημαντικότητας να είναι ορισμένο στο 0,05. Τα δεδομένα εισόδου εκφράστηκαν επίσης ως σχετική μεταβολή (%), υπολογιζόμενη ως η μεταβολή μεταξύ των τιμών στο τέλος και των τιμών στην αρχή κάθε περιόδου θεραπείας.					

Πίνακας 6 Περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα της μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) (%) των συμμετεχόντων στα εμπλουτισμένα ψάρια (EF)

	Τέλος 1 ^{ης} περιόδου	% μεταβολή	Τέλος 2 ^{ης} περιόδου	% μεταβολή	p
14:0 (%)	0.38 (0.29, 0.45) n=8	-12.25 (-22.86, 20.83) n=6	0.27 (0.22, 0.42) n=9	4.66 (-26.09, 83.33) n=6	0.194
16:0 (%)	23.28 (21.96, 24.85) n=10	0.68 (-4.55, 7.07) n=10	22.0 (20.65, 22.55) n=11	2.39 (-2.40, 4.56) n=11	0.035
17:0 (%)	0.46 (0.37, 0.49) n=9	-2.70 (-16.98, 6.98) n=9	0.42 (0.32, 0.49) n=11	-21.43 (-40.96, -4.26) n=11	0.286
18:0 (%)	16.47 (16.12, 16.93) n=12	-1.72 (-3.77, 0.14) n=12	15.98 (15.71, 16.64) n=11	-0.76 (-2.39, 0.89) n=11	0.295
20:0 (%)	0.56 (0.33, 0.64)	-2.5 (-30.43,	0.43 (0.36, 0.59)	-7.69 (-41.10,	1.000

	n=11	19.15) n=11	n=9	13.46) n=9	
21:0 (%)	1.44 (1.24, 1.86) n=10	-7.21 (-12.41, 0.0) n=9	1.60 (1.29, 1.99) n=10	-0.18 (-8.35, 3.68) n=8	0.450
22:0 (%)	0.90 (0.77, 1.11) n=12	6.27 (-7.81, 20.10) n=12	1.01 (0.83, 1.11) n=10	1.37 (-1.92, 26.25) n=9	0.553
24:0 (%)	2.44 (1.84, 2.94) n=12	6.78 (2.76, 18.31) n=12	2.82 (2.43, 3.14) n=11	2.01 (-5.35, 10.59) n=11	0.090
18:1n-9c (%)	11.90 (11.57, 12.91) n=12	-2.41 (-5.76, -0.48) n=12	11.98 (10.67, 12.8) n=11	-2.56 (-5.61, -1.08) n=11	0.854
18:1n-7 (%)	0.87 (0.78, 0.94) n=11	11.43 (1.16, 23.21) n=11	0.74 (0.68, 0.85) n=11	-10.0 (-20.0, 2.41) n=11	0.015
20:1n-9 (%)	0.43 (0.34, 0.63) n=5	-6.85 (-16.28, 32.89) n=4	0.49 (0.30, 0.59) n=7	0.94 (-36.17, 37.84) n=6	0.935
18:2cc (%)	8.46 (8.02, 9.51) n=12	0.0 (-4.37, 5.20) n=12	8.77 (7.91, 10.05) n=11	1.93 (-9.25, 4.04) n=11	0.758
20:4n-6 (%)	11.30 (10.84, 12.47) n=12	-3.79 (-8.91, -0.71) n=12	11.19 (11.03, 12.12) n=10	-1.61 (-10.82, -1.04) n=10	0.668
20:5n-3 (%)	0.67 (0.59, 0.79) n=12	39.53 (9.43, 68.0) n=11	0.76 (0.53, 0.98) n=9	50.85 (29.27, 91.89) n=9	0.414
22:1n-9 (%)	0.44 (0.32, 0.53)	11.11 (-50.0,	0.45 (0.30, 0.79)	20.0 (-29.6,	0.885

	n=9	57.58) n=7	n=8	120.0) n=5	
24:1 (%)	2.47 (2.14, 2.73) n=12	14.14 (-1.62, 20.70) n=12	2.5 (2.41, 2.69) n=11	3.56 (-5.42, 14.56) n=11	0.559
22:5n-3 (%)	1.78 (1.61, 1.91) n=12	8.37 (-2.75, 17.74) n=12	1.79 (1.60, 1.97) n=11	6.21 (-17.13, 9.59) n=11	0.975
22:6n-3 (%)	4.23 (3.81, 4.65) n=12	18.32 (13.18, 25.22) n=12	4.02 (3.10, 4.77) n=11	9.22 (0.91, 14.20) n=9	0.268
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόριο). Οι δοκιμές Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της περιόδου 1 με την περίοδο 2. Οι τιμές p παρουσιάζονται με το επίπεδο σημαντικότητας να είναι ορισμένο στο 0,05. Τα δεδομένα εισόδου εκφράστηκαν επίσης ως σχετική μεταβολή (%), υπολογιζόμενη ως η μεταβολή μεταξύ των τιμών στο τέλος και των τιμών στην αρχή κάθε περιόδου θεραπείας.					

5.3 Επίδραση του τύπου ψαριού που καταναλώνεται

Παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της περιόδου θεραπείας σε ορισμένους από τους κύριους δείκτες. Συγκεκριμένα, η περίοδος θεραπείας επηρέασε τον ΔΜΣ ($p = 0,003$), την ενεργειακή πρόσληψη ($p < 0,001$), την ολική και την LDL-χοληστερόλη ($p = 0,014$ και $p = 0,007$, αντίστοιχα). Συγκεκριμένα, η LDL-χοληστερόλη αυξήθηκε την πρώτη περίοδο, ενώ η ενεργειακή πρόσληψη μειώθηκε τη δεύτερη περίοδο, ανεξάρτητα από τη θεραπεία.

Η επίδραση της θεραπείας εκτιμήθηκε με προσαρμογές που έγιναν για την περίοδο της θεραπείας. Το προφίλ λιπιδίων και οι δείκτες ομοιόστασης της γλυκόζης δεν διέφεραν μεταξύ των δύο θεραπειών ψαριών (Πίνακας 7).

Πίνακας 7 Εκτίμηση της επίδρασης του εμπλουτισμένου ψαριού έναντι του συμβατικού ψαριού στα διατροφικά χαρακτηριστικά και τους τυπικούς βιοχημικούς δείκτες.

	ΕF έναντι CF		
	Επίδραση (SE)	95% CI	p
Διατροφικά χαρακτηριστικά			
Ενεργειακή πρόσληψη	0.99 (0.05)	0.89, 1.09	0.778
Πρόσληψη υδατανθράκων (% E)	-1.38 (3.86)	-9.11, 6.36	0.723
Πρόσληψη πρωτεΐνης (% E)	2.77 (3.16)	-3.55, 9.10	0.384
Πρόσληψη λίπους (% E)	1.87 (3.04)	-4.22, 7.97	0.540
Τυπικοί βιοχημικοί δείκτες			
Ολική χοληστερόλη	1.02 (0.04)	0.95, 1.09	0.567
HDL-χοληστερόλη	-3.81 (3.82)	-11.46, 3.84	0.323
LDL-χοληστερόλη	1.04 (0.05)	0.94, 1.15	0.420
Τριγλυκερίδια	1.09 (0.13)	0.86, 1.39	0.471
Γλυκόζη	1.04 (0.03)	0.99, 1.11	0.140
Ινσουλίνη	1.11 (0.12)	0.88, 1.39	0.367
HOMA-IR	1.16 (0.14)	0.90, 1.48	0.248
Τα δεδομένα ήταν οι σχετικές μεταβολές (%). η σχετική μεταβολή υπολογίστηκε ως η μεταβολή μεταξύ των τιμών μετά τη θεραπεία και των τιμών πριν από τη θεραπεία, με τις τιμές αναφοράς που αφορούν την περίοδο να χρησιμοποιούνται ως τιμές αναφοράς. Στα δεδομένα με μη κανονική κατανομή (ενεργειακή πρόσληψη, ολική, LDL-χοληστερόλη, τριγλυκερίδια, γλυκόζη, ινσουλίνη, HOMA-IR): χρησιμοποιήθηκε ο φυσικός λογάριθμος (ln) της αναλογίας (%) αντί της σχετικής μεταβολής. Η Επίδραση παρουσιάζεται ως ο εκθετικός συντελεστής. Το CF χρησιμοποιήθηκε ως ομάδα αναφοράς. Έγιναν προσαρμογές για την περίοδο της θεραπείας. CF: συμβατικά ψάρια. CI: διάστημα εμπιστοσύνης. % EF; εμπλουτισμένο ψάρι. HDL: λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας. HOMA-IR: εκτίμηση μοντέλου ομοιόστασης της αντίστασης στην ινσουλίνη. LDL: λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας. SE: τυπικό σφάλμα.			

5.4 Δείκτες οξειδωτικού στρες

Οι δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης, στην πρώτη και στη δεύτερη περίοδο θεραπείας για τη θεραπεία με συμβατικά και εμπλουτισμένα ψάρια

παρουσιάζεται στους Πίνακες 8-10, αντίστοιχα. Γενικά τα αποτελέσματα που ελήφθησαν τόσο για την κατανάλωση των CF, όσο και για την κατανάλωση των EF κατά τις δύο περιόδους θεραπείας ήταν σχεδόν παρόμοια ανεξάρτητα από την περίοδο θεραπείας και δεν έδειξαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ των δεικτών οξειδωτικού στρες.

Πίνακας 8 Δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης

	CF/EF	EF/CF	p
Δείκτες οξειδωτικού στρες			
TBARS (nM)	1.60 (1.29, 2.04) n=15	1.70 (1.33, 5.39) n=15	0.575
ox-LDL (μg/mL)	0.88 (0.47, 3.17) n=15	1.43 (0.57, 2.86) n=15	0.507
αντίσταση οξείδωσης του ορού (λεπτά)	58.4 (54.0, 71.0) n=15	55.2 (49.0, 93.3) n=15	0.820
GPx στον ορό (U/mL)	0.064 (0.059, 0.077) n=15	0.060 (0.052, 0.071) n=15	0.213
GPx σε λευκοκύτταρα (U/min/mg)	0.050 (0.033, 0.073), n=15	0.044 (0.036, 0.058), n=15	0.756
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόριο). Τα test Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση ομάδων. Οι τιμές p παρουσιάζονται με επίπεδο σημαντικότητας ορισμένο στο 0,05.			

Πίνακας 9 Δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στα συμβατικά ψάρια (CF)

	Τέλος 1ης περιόδου	% μεταβολή	Τέλος 2ης περιόδου	% μεταβολή	p
Δείκτες οξειδωτικού στρες:					
TBARS (nM)	1.73 (1.37, 2.02) n=15	-0.98 (-9.74, 7.69) n=15	1.92 (1.6, 6.07) n=15	11.93 (2.56, 22.58) n=15	0.158
ox-LDL (μg/mL)	0.81 (0.49, 2.69) n=15	-7.02 (-31.97, 1.59) n=15	1.61 (0.59, 2.67) n=15	-8.77 (-15.79, -3.40) n=15	0.575
αντίσταση οξείδωσης του ορού (λεπτά)	60.6 (46.3, 69.6) n=15	-3.42 (-15.15, 11.28) n=15	56.9 (46.4, 62.3) n=15	-10.25 (-19.39, 3.04) n=15	0.494
GPx στον ορό (U/mL)	0.073 (0.067, 0.078) n=15	10.50 (-5.10, 24.20) n=15	0.065 (0.057, 0.075) n=15	-0.95 (-12.56, 12.29) n=15	0.074
GPx σε λευκοκύτταρα (U/min/mg)	0.048 (0.033, 0.062) n=15	-5.47 (-14.72, 30.08) n=15	0.057 (0.040, 0.069) n=15	12.93 (-19.01, 49.95) n=15	0.604
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόριο). Οι δοκιμές Mann–Whitney χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της 1 ^{ης} περιόδου με την 2 ^η περίοδο. Οι τιμές p παρουσιάζονται με επίπεδο σημαντικότητας ορισμένες στο 0,05. Τα δεδομένα εκφράστηκαν επίσης ως σχετική μεταβολή (%), υπολογιζόμενη ως η μεταβολή μεταξύ των τιμών στο τέλος και των τιμών στην αρχή κάθε περιόδου θεραπείας.					

Πίνακας 10 Δείκτες οξειδωτικού στρες των συμμετεχόντων στα εμπλουτισμένα ψάρια (EF)

	Τέλος 1ης περιόδου	% μεταβολή	Τέλος 2ης περιόδου	% μεταβολή	p
Δείκτες οξειδωτικού στρες:					
TBARS (nM)	1.85 (1.27, 2.36) n=15	-2.23 (-15.27, 6.72) n=15	1.69 (1.35, 2.33) n=15	1.81 (-7.48, 10.39) n=15	0.852
ox-LDL (μg/mL)	1.78 (0.55, 2.7) n=15	-6.67 (-12.18, 17.05) n=15	0.62 (0.45, 1.88) n=15	-4.94 (-14.16, 5.56) n=15	0.245

αντίσταση οξειδωσης του ορού (λεπτά)	61.3 (49.3, 81.4) n=15	-1.56 (-12.39, 9.17) n=15	58.7 (51.5, 72.4) n=15	-2.28 (-6.57, 6.73) n=15	0.740
GPx στον ορό (U/mL)	0.066 (0.061, 0.070) n=15	7.0 (0.26, 13.54) n=15	0.071 (0.067, 0.078) n=15	2.92 (-6.57, 12.86) n=15	0.062
GPx σε λευκοκύτταρ α (U/min/mg)	0.047 (0.039, 0.052) n=15	6.10 (-10.02, 30.29) n=15	0.057 (0.044, 0.062) n=15	21.74 (-9.66, 35.91) n=15	0.085
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως διάμεσοι (25ο, 75ο τεταρτημόριο). Οι δοκιμές Mann-Whitney χρησιμοποιήθηκαν για τη σύγκριση της 1 ^{ης} περιόδου με την 2 ^η περίοδο. Οι τιμές p παρουσιάζονται με επίπεδο σημαντικότητας ορισμένες στο 0,05. Τα δεδομένα εκφράστηκαν επίσης ως σχετική μεταβολή (%), υπολογιζόμενη ως η μεταβολή μεταξύ των τιμών στο τέλος και των τιμών στην αρχή κάθε περιόδου θεραπείας.					

5.5 Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες και λιπαρών οξέων

Έχουν επιλεγεί συγκεκριμένα λιπαρά οξέα τα οποία παρουσίασαν διαφοροποίηση κατά τις παρεμβάσεις. Στον Πίνακα 11 παρουσιάζεται η συσχέτιση των σημαντικών λιπαρών οξέων με τους δείκτες οξειδωτικού στρες. Παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του δείκτη TBARS και του 20:4n-6 αλλά και του GPx στον ορό με το 16:0. Θετική ήταν η συσχέτιση του δείκτη TBARS και του 16:0. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν δεν εμφάνισαν σημαντική συσχέτιση με τους κύριους δείκτες οξειδωτικού στρες (TBARS, ox-LDL, Lag time, GPx ορού και λευκοκυττάρων).

Πίνακας 11 Συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες και λιπαρών οξέων

Δείκτες οξειδωτικού στρες:	Λιπαρά οξέα	
	20:4n-6	16:0
TBARS (Nm)	-0.348 (0.045)	0.352 (0.044)
GPx στον ορό (U/MI)	-	-0.345 (0.049)
Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως ο αριθμός συσχέτισης μεταξύ των κύριων δεικτών		

οξειδωτικού στρες και των λιπαρών οξέων που εμφάνισαν σημαντικότητα. Οι τιμές p παρουσιάζονται εντός της παρένθεσης και ορίστηκαν με επίπεδο σημαντικότητας το 0,05.

Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η συσχέτιση δεικτών οξειδωτικού στρες με τη σύσταση σε λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρια ιχθυοτροφείου. Η μελέτη διατροφικής παρέμβασης ήταν τυφλή (double blinded), διασταυρούμενη (crossover), και τυχαιοποιημένη (randomized controlled trial) ως αυτής τη σειρά με την οποία κατανάλωναν οι εθελοντές τα δύο ψάρια. Η διάρκεια αυτής παρέμβασης ήταν 2 περίοδοι των 8 εβδομάδων για κάθε τύπο ψαριού (απλή ή εμπλουτισμένη τσιπούρα) (1^η και 2^η περίοδος θεραπείας) και μεσολάβησε ανάμεσα στις δύο παρεμβάσεις και μία περίοδος 6 εβδομάδων (washed out period). Οι εθελοντές κατανάλωναν 2 μερίδες ψαριού την εβδομάδα. Δεν παρατηρήθηκε καμία μεταβολή των βασικών παραμέτρων των εθελοντών όπως το βάρος, ο δείκτης μάζας σώματος, η συστολική και η διαστολική πίεση κατά τη διάρκεια και την ολοκλήρωση της παρέμβασης. Η συμμόρφωση των συμμετεχόντων στο πρωτόκολλο της μελέτης ήταν υψηλή (100%), βάσει αυτοαναφοράς, και αυτό επιβεβαιώθηκε από την περιεκτικότητα λιπαρών οξέων στη μεμβράνη ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) των συμμετεχόντων στην αρχή της μελέτης, στην πρώτη και στη δεύτερη περίοδο θεραπείας για τη θεραπεία με συμβατικά και εμπλουτισμένα ψάρια, αντίστοιχα. Το προφίλ λιπιδίων και οι δείκτες ομοιόστασης της γλυκόζης δεν διέφεραν μεταξύ των δύο θεραπειών ψαριών. Πρέπει να επισημανθεί ότι η παρέμβαση πραγματοποιήθηκε σε ελληνικό πληθυσμό όπου υπάρχει ευρεία κατανάλωση ελαιολάδου και για το λόγο αυτό το συμπέρασμα δεν μπορεί να γενικευτεί σε διαφορετικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας είναι σύμφωνα με αυτά άλλων μελετών, όπου καταναλώθηκαν μερίδες ιχθυηρών και βρέθηκε να επηρέασαν θετικά τους δείκτες οξειδωτικούς στρες και το προφίλ λιπαρών οξέων της μεμβράνης ερυθρών αιμοσφαιρίων (RBC) (%) των συμμετεχόντων στις μελέτες. Συγκεκριμένα, οι Wang et al., (2003) απέδειξαν ότι η πρόσληψη ψαριού είχε θετική επίδραση με τα ερυθρά αιμοσφαίρια LC n-3 PUFA, EPA και DHA, τα επίπεδα Gpx στο πλάσμα και τη συνολική πρόσληψη λιπιδίων. Οι Bélanger et al., (2008) έδειξαν ότι η κατανάλωση ιχθυηρών επηρέασαν θετικά τους δείκτες Gpx, GR, GSH + GSSG καθώς και τα επίπεδα λιπιδίων στο πλάσμα. Οι Monteiro et al., (2011) συμπέραναν ότι η κατανάλωση ψαριών συσχετίστηκε επίσης θετικά με το Gpx και το ALA-D. Κλινικές δοκιμές με μεγαλύτερο αριθμό συμμετεχόντων και με μακροπρόθεσμη παρέμβαση που αξιολογεί διάφορους δείκτες καρδιαγγειακής νόσου θα μπορούσαν να διακρίνουν μεταξύ των επιπτώσεων στην υγεία μιας συμβατικής τσιπούρας και μιας τσιπούρας με διαφορετική τροφοδοσία. Η μελλοντική έρευνα

θα μπορούσε επίσης να επικεντρωθεί στον εμπλουτισμό της τροφής των ψαριών με το απομονωμένο πολικό λιπιδικό κλάσμα του ελαιοπυρήνα, που περιέχει τους βιοδραστικούς ειδικούς ανταγωνιστές των υποδοχέων PAF, και οι επόμενες διαιτητικές μελέτες παρέμβασης θα πρέπει να αξιολογήσουν την επίδραση του εμπλουτισμένου ψαριού στους δείκτες πήξης των ανθρώπων.

Βιβλιογραφία

1. Bélanger, M., Mirault, M., Dewailly, E., & Plante, M. (2008). *Seasonal mercury exposure and oxidant-antioxidant status of James Bay sport fishermen*. 57, 630–636.
<https://doi.org/10.1016/j.metabol.2007.12.006>
2. Bernasconi, A. A., Wiest, M. M., Lavie, C. J., Milani, R. V., & Laukkanen, J. A. (2020). *Mayo Clinic Proceedings. Elsevier; Amsterdam, The Netherlands: 2020. Effect of Omega-3 Dosage on Cardiovascular Outcomes: An Updated Meta-Analysis and Meta-Regression of Interventional Trials*.
3. Breusing, N., & Grune, T. (2010). Biomarkers of protein oxidation from a chemical , biological and medical point of view. *EXG*, 45(10), 733–737.
<https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.04.004>
4. Carlos, J., Gordo, R. De, Renobales, M. De, Fernández, E., Labastida, D., Amiano, P., & Dorronsoro, M. (2002). *Habitual Fish Intake Is Associated with Decreased LDL Susceptibility to ex vivo Oxidation*. 37(4).
5. Castillo, R., Rodrigo, R., Perez, F., Cereceda, M., Asenjo, R., Zamorano, J., Navarrete, R., Villalabeitia, E., Sanz, J., Baeza, C., & Aguayo, R. (2010). *Antioxidant Therapy Reduces Oxidative and Inflammatory Tissue Damage in Patients Subjected to Cardiac Surgery with Extracorporeal Circulation*. 256–262. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2010.00651.x>
6. Chen, R., Chen, X., Salomon, R. G., & McIntyre, T. M. (2009). Platelet activation by low concentrations of intact oxidized LDL particles involves the PAF receptor. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(3), 363–371.
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.108.178731>
7. Dalle-donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., & Milzani, A. (2005). *PROTEINS AS BIOMARKERS OF OXIDATIVE / NITROSATIVE STRESS IN DISEASES : THE CONTRIBUTION OF REDOX PROTEOMICS*. 55–99.
<https://doi.org/10.1002/mas.20006>
8. Damiani, E., & Ullrich, S. E. (2016). Progress in Lipid Research Understanding the connection between platelet-activating factor , a UV-induced lipid mediator of inflammation , immune suppression and skin cancer. *JPLR*, 63, 14–27. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2016.03.004>

9. Davies, M. (2016). Protein oxidation and peroxidation. *The Biochemical Journal*, 7, 805–825.
10. Demopoulos, C. A., Karantonis, H. C., & Antonopoulou, S. (2003). Platelet activating factor - A molecular link between atherosclerosis theories. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(11), 705–716. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300845>
11. Duncan, M. W. (2003). A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine Review Article. 351–361. <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0022-z>
12. Ed Rainger, G., Chimen, M., Harrison, M. J., Yates, C. M., Harrison, P., Watson, S. P., Lordkipanidzé, M., & Nash, G. B. (2015). The role of platelets in the recruitment of leukocytes during vascular disease. *Platelets*, 26(6), 507–520. <https://doi.org/10.3109/09537104.2015.1064881>
13. Elagizi, A., Lavie, C. J., Keefe, E. O., Marshall, K., Keefe, J. H. O., & Milani, R. V. (2021). *Cardiovascular Health*. 1–12.
14. Estruch, R., Ros, E., Salvadó, J. S., Covas, M., Corella, D., Arós, F., Gracia, E. G., Gutiérrez, V. R., Fiol, M., Lapetra, J., Raventos, R. M. L., Majem, L. S., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorlí, J. V, Martínez, J. A., & Fitó, M. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. 34(1), 1–14. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800389>
15. Felice, C. De, Signorini, C., Durand, T., Ciccoli, L., Pecorelli, J. G. A., Vale, A. G., Felice, L. De, Valacchi, G., & Hayek, J. (2012). Partial rescue of Rett syndrome by α -3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) oil. 447–458. <https://doi.org/10.1007/s12263-012-0285-7>
16. Frijhoff, J., Winyard, P., & Zarkovic, N. et al. (2015). “Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress,” *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 23, no. 14, pp. 1144–1170.
17. Goeller, D. O. B. M., & Achenbach, Y. Z. S. (2020). Early-onset coronary atherosclerosis in patients with low levels of omega-3 fatty acids. *European Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1038/s41430-019-0551-5>
18. Guasch-ferré, M., Zong, G., Willett, W. C., Zock, P. L., Wanders, A. J., & Frank, B. (2018). Associations of Monounsaturated Fatty Acids from Plant and Animal Sources with Total and Cause-Specific Mortality in Two US Prospective Cohort Studies. December, 1–19. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313996>
19. Harayama, T., & Shindou, H. (2008). Identification of a Novel Noninflammatory Biosynthetic

- Pathway of Platelet-activating Factor* * □. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708909200>
20. Higdon, J. V, Liu, J., Du, S., Morrow, J. D., Ames, B. N., & Wander, R. C. (2000). *Supplementation of postmenopausal women with fish oil rich in eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid is not associated with greater in vivo lipid peroxidation compared with oils rich in oleate and linoleate as assessed by plasma malondialdehyde and*. 714–722.
 21. Ho, E., & Galougahi, K. K. (2013). Biological markers of Oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biology*, 1, 483–491.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.07.006>
 22. Ivanhoe, R., Knopf, W., Taylor, G., Keefe, O. J., Weintraub, R., Bg, S., Lg, B., Je, T., Lh, W., & Schmidt, E. B. (1997). *Fish Consumption, n-3 Fatty Acids in Cell Membranes, and Heart Rate Variability in Survivors of Myocardial Infarction With Left Ventricular Dysfunction*. 12, 1670–1673.
 23. Jo, M., Nishikawa, T., Nakajima, T., & Okada, Y. (2011). *Oxidative stress is closely associated with tumor angiogenesis of hepatocellular carcinoma*. 809–821.
<https://doi.org/10.1007/s00535-011-0392-z>
 24. Johnson, G. H., & Fritsche, K. (2012). Effect of Dietary Linoleic Acid on Markers of Inflammation in Healthy Persons: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *JAND*, 112(7), 1029-1041.e15. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2012.03.029>
 25. Kain, V., Ingle, K. A., Colas, R. A., Dalli, J., Prabhu, S. D., Serhan, C. N., Joshi, M. D., & Halade, G. V. (2015). *Resolvin D1 activates the inflammation resolving response at splenic and ventricular site following myocardial infarction leading to improved ventricular function*. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 84:24–35.
 26. Kostadinova, A., Topouzova-Hristova, T., Momchilova, A., Tzoneva, R., & Berger, M. R. (2015). Antitumor lipids—Structure, functions, and medical applications. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 101, 27–66.
 27. Lindqvist, H. M., Langkilde, A. M., Undeland, I., & Sandberg, A. (2009). *Herring (Clupea harengus) intake influences lipoproteins but not inflammatory and oxidation markers in overweight men*. 383–390. <https://doi.org/10.1017/S0007114508003073>
 28. Lordan, R., Tsoupras, A., & Zabetakis, I. (2019). The Potential Role of Dietary Platelet-Activating Factor Inhibitors in Cancer Prevention and Treatment. *American Society for*

Nutrition., 5, 148–164.

29. Lordan, R., Tsoupras, A., Zabetakis, I., & Demopoulos, C. A. (2019). Forty years since the structural elucidation of platelet-activating factor (PAF): Historical, current, and future research perspectives. *Molecules*, 24(23). <https://doi.org/10.3390/molecules24234414>
30. Marangoni, F., Novo, G., Perna, G., Perrone, P., Pirelli, S., Ceroti, M., Querci, A., & Poli, A. (2014). Omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acid levels are reduced in whole blood of Italian patients with a recent myocardial infarction : the AGE-IM study. *Atherosclerosis*, 232(2), 334–338. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.11.048>
31. Marrocco, I., Altieri, F., & Peluso, I. (2017). Review Article Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 6501046, 1–32. <https://doi.org/10.1155/2017/6501046>
32. Maximino, P., Horta, P., Santos, L., Oliveira, C., & Fisberg, M. (2015). Fatty acid intake and metabolic syndrome among overweight and obese women. *REV BRAS EPIDEMIOL*, 18(4), 930–942. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201500040020>
33. Miller, M., Ballantyne, C. M., Bays, H. E., Granowitz, C., Doyle, R. T., Juliano, R. A., & Philip, S. (2019). Effects of Icosapent Ethyl (Eicosapentaenoic Acid Ethyl Ester) on Atherogenic Lipid / Lipoprotein , Apolipoprotein , and Inflammatory Parameters in Patients With Elevated High-Sensitivity C-Reactive Protein (from the ANCHOR Study). *The American Journal of Cardiology*, 124(5), 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2019.05.057>
34. Minno, A. Di, Turnu, L., Porro, B., Squellerio, I., Cavalca, V., Tremoli, E., Nicola, M., & Di, D. (2016). 8-hydroxy-2-deoxyguanosine levels and cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis of the literature. *Antioxidants Redox Signal*, 24, 548–555.
35. Monboisse, J., & Borel, J. (1992). “Oxidative damage to collagen,” *EXS*, vol. 62, pp. 323–327.
36. Monteiro, P., Grotto, D., Valentini, J., Mara, J., Antunes, G., Francisco, E., Santos, R., Oliveira, D., Garcia, S. C., & Jr, F. B. (2011). *Evaluation of toxic effects of a diet containing fish contaminated with methylmercury in rats mimicking the exposure in the Amazon riverside population*. 111, 1074–1082. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.09.013>
37. Mori, T. A., Dunstan, D. W., Burke, V., Croft, K. D., Rivera, J. H., Berlin, L. J., & Puddey, B. (1999). *Effect of Dietary Fish and Exercise Training on Urinary F2-Isoprostane Excretion in Non-Insulin-Dependent Diabetic Patients*. 55(11), 1402–1408.

38. Moschandreas, J., & Kafatos, A. (1999). *Food and nutrient intakes of Greek (Cretan) adults . Recent data for food-based dietary guidelines in Greece. 1997.*
39. Mozaffarian, D. (2009). *Fish , Mercury , Selenium and Cardiovascular Risk : Current Evidence and Unanswered Questions.* 1894–1916. <https://doi.org/10.3390/ijerph6061894>
40. Mozaffarian, D., Lemaitre, R. N., Kuller, L. H., Burke, G. L., Tracy, R. P., & Siscovick, D. S. (2003). *Cardiac Benefits of Fish Consumption May Depend on the Type of Fish Meal Consumed The Cardiovascular Health Study.* 1372–1377.
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000055315.79177.16>
41. Mueller, C., Danne, O., & Mo, M. (2008). Effect of Collection Tube Type and Preanalytical Handling on Myeloperoxidase Concentrations Jessie. *Clinical Chemistry*, 54(6), 1076–1079.
42. Muzembo, B. A., Narongpon, D., & Ngatu, N. R. (2011). *Assessment of lifestyle effect on oxidative stress biomarkers in free-living elderly in rural Japan.* 1–8.
<https://doi.org/10.1111/j.1447-0594.2011.00793.x>
43. Nasopoulou, C., Karantonis, H. C., Perrea, D. N., Theocharis, S. E., & Iliopoulos, D.G., Demopoulos, C.A., Zabetakis, I. (2010). In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (*Aparus aurata*) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits. *Food Chem.*, 120, 831–836.
44. Nasopoulou, Constantina, Tsoupras, A. B., Karantonis, H. C., Demopoulos, C. A., & Zabetakis, I. (2011). Fish polar lipids retard atherosclerosis in rabbits by down-regulating PAF biosynthesis and up-regulating PAF catabolism. *Lipids in Health and Disease*, 10, 1–7.
<https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-213>
45. Navas-Carretero, S., Pérez-Granados, A. M., Schoppen, S., & Vaquero, M. P. (2009). *An oily fish diet increases insulin sensitivity compared to a red meat diet in young irondeficient women. British Journal of Nutrition* 102: 546–553.
46. Newman, W., Middaugh, J., Pedersen, H., Mulvad, G., & Jul, E. (1995). *Atherosclerosis in Arctic populations: autopsy studies. In: Kristensen SD, Schmidt EB, De Caterina R, Endres S, eds. N-3 fatty acids — Prevention and treatment in vascular disease. London: Springer, 19.*
47. Nicholls, S. J., Lincoff, M., Garcia, M., Bash, D., Ballantyne, C. M., Barter, P. J., Davidson, M. H., Kastelein, J. J., Koenig, W., McGuire, D. K., & Al., E. (2020). *Effect of High-Dose Omega-3 Fatty Acids vs Corn Oil on Major Adverse Cardiovascular Events in Patients at High*

- Cardiovascular Risk The STRENGTH Randomized Clinical Trial. JAMA J. Am. Med. Assoc.* 324:2268–3380.
48. Niwa, T., Naito, C., Hassan, A., Mawjood, M., & Imai, K. (2000). *Increased Glutathionyl Hemoglobin in Diabetes Mellitus and Hyperlipidemia Demonstrated by Liquid Chromatography / Electrospray Ionization- Mass Spectrometry.* 88, 82–88.
 49. Nordøy, A. (2001). *Fish consumption and cardiovascular diseases.* 3, 4–7.
 50. Nouroozadeh, J., Tajaddinisarmadi, J., & Wolff, S. (1994). *Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylene orange assay in conjunction with triphenylphosphine, Analytical Biochemistry, vol. 220, no. 2, pp. 403–409.*
 51. Ntzouvani, A., Antonopoulou, S., Fragopoulou, E., Kontogianni, M. D., Nomikos, T., Mikellidi, A., & Panagiotakos, D. (2021). Effect of Differently Fed Farmed Gilthead Sea Bream Consumption on Platelet Aggregation and Circulating Haemostatic Markers among Apparently Healthy Adults: A Double-Blind Randomized Crossover Trial. *Nutrients*, 13(2), 286.
 52. Pan, X., Marklund, M., & Wu, J. H. Y. (2017). *Fish consumption for cardiovascular health : benefits from long-chain omega-3 fatty acids versus potential harms due to mercury.* 1–2. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0206-1>.
 53. Papers, J. B. C., Doi, M., Pennathur, S., Bergt, C., Shao, B., Byun, J., Kassim, S. Y., Singh, P., Green, P. S., McDonald, T. O., Brunzell, J., Chait, A., Oram, J. F., Brien, K. O., Geary, R. L., & Heinecke, J. W. (2004). *Human Atherosclerotic Intima and Blood of Patients with Established Coronary Artery Disease Contain High Density Lipoprotein Damaged by Reactive Nitrogen Species **. 279(41), 42977–42983. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406762200>
 54. Parra, D., Bandarra, N. M., & Thorsdottir, I. (2007). *Impact of fish intake on oxidative stress when included into a moderate energy-restricted program to treat obesity.* 460–467. <https://doi.org/10.1007/s00394-007-0686-3>
 55. Philipp, J., & Hahn, A. (2013). Prostaglandins , Leukotrienes and Essential Fatty Acids Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids \$. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 89(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2013.03.010>
 56. Picardo, M., Grammatico, P., & Roccella, F. et al. (1996). *“Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma,” The Journal of*

Investigative Dermatology, vol. 107, no. 3, pp. 322–326.

57. Proudfoot, J., Barden, A., Mori, T. A., Burke, V., Croft, K. D., Beilin, L. J., & Puddey, I. B. (1999). *Measurement of Urinary F 2 -Isoprostanes as Markers of in Vivo Lipid Peroxidation — A Comparison of Enzyme Immunoassay with Gas Chromatography / Mass Spectrometry*. 215, 209–215.
58. Reznichenko, A., & Korstanje, R. (2015). The role of platelet-activating factor in mesangial pathophysiology. *American Journal of Pathology*, 185(4), 888–896.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.11.025>
59. Rueda, F., Ortega, E., & Sala-vila, A. (2020). *Circulating Omega-3 Fatty Acids and Incident Adverse Events in Patients With Acute Myocardial Infarction*. 76(18).
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.08.073>
60. Schirmer, S. H., Werner, C. M., Binder, S. B. G., Faas, M. E., Custodis, F., Böhm, M., & Laufs, U. (2012). Effects of omega-3 fatty acids on postprandial triglycerides and monocyte activation. *Atherosclerosis*, 225(1), 166–172.
<https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2012.09.002>
61. Schmidt, J. A., Crowe, F. L., Appleby, P. N., Key, T. J., & Travis, R. C. (2013). *Serum uric acid concentrations in meat eaters, fish eaters, vegetarians and vegans: A crosssectional analysis in the EPIC-Oxford cohort*. *PLoS ONE* 8: e56339.
62. Shelton, M., Chock, B., & Mieyal, J. (2005). Glutaredoxin: Role in Reversible Protein S-Glutathionylation and Regulation of Redox Signal Transduction and Protein Translocation. *ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING*, 7(3 &4), 348–368.
63. Simonsen, T., Vartun, A. S. E., Lyngmo, V., & Nordy, A. (1987). *Coronary Heart Disease, Serum Lipids, Platelets and Dietary Fish in Two Communities in Northern Norway*. 237–245.
64. Sioriki, E., Lordan, R., Nahra, F., van Hecke, K., Zabetakis, I., & Nolan, S. P. (2018). In vitro Anti-atherogenic Properties of N-Heterocyclic Carbene Aurate(II) Compounds. *ChemMedChem*, 13(23), 2484–2487. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201800601>
65. Siscovick, D. S., Raghunathan, T. E., Lemaitre, R., King, I., & Cobb, L. A. (2001). *Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and out-of-hospital primary cardiac arrest : clinical and public health implications of observational studies and clinical trials*. 3, 70–74.
66. Tiukinhoy, S., & Rochester, C. (2006). *Selected Abstracts From Recent Cardiopulmonary*

Prevention , and Rehabilitation.

67. Tsantila, N., Karantonis, H. C., Perrea, D. N., Theocharis, S. E., Iliopoulos, D. G., Antonopoulou, S., & Demopoulos, C. A. (2007). Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators of Inflammation*, 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/36204>
68. Tsoupras, A., Lordan, R., & Zabetakis, I. (2018). Inflammation, not cholesterol, is a cause of chronic disease. *Nutrients*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/nu10050604>
69. Victorino, V. J., Panis, C., Campos, F. C., Cayres, R. C., Oliveira, S. R., Herrera, A. C. S. A., Cecchini, A. L., & Cecchini, R. (2013). *Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women*. 1411–1421. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9431-9>
70. Visioli, F. & Poli, A. (2020). Fatty Acids and Cardiovascular Risk. Evidence, Lack of Evidence, and Diligence. *Nutrients*, 12, 1–19.
71. Visioli, Francesco, & Hagen, T. M. (2007). *Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging : Focus on micronutrients*. 55, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.01.008>
72. Wander, R. C., & Du, S. (2018). *Oxidation of plasma proteins is not increased after supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids 1 – 3. March*.
73. Wang, N., Zhao, X., Wang, W., Bi, K., & Dai, R. (2016). Author ' s Accepted Manuscript Targeted profiling of arachidonic acid and rheumatoid arthritis Reference : To appear in : Talanta. *Talanta*. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.065>
74. Wang, X., Cui, N., Liu, X., & Liu, X. (2020). and coronary artery disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Cardiovascular Diabetology*, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12933-020-00998-6>
75. Wang, Y., Crawford, M. A., Chen, J., Li, J., Ghebremeskel, K., Campbell, T. C., Fan, W., Parker, R., & Leyton, J. (2003). *Fish consumption , blood docosahexaenoic acid and chronic diseases in Chinese rural populations* . 136(03), 127–140. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00016-3](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00016-3)
76. Willett, W. C. (2007). The role of dietary n-6 fatty acids in the prevention of cardiovascular disease. *Italian Federation of Cardiology*, 6–9.
77. Würtz, P., Havulinna, A. S., Soininen, P., Tynkkynen, T., Prieto-merino, D., Tillin, T.,

- Ghorbani, A., Artati, A., Wang, Q., Tiainen, M., Kangas, A. J., Kettunen, J., & Kaikkonen, J. (2015). *Metabolite Profiling and Cardiovascular Event Risk : A Prospective Study of Three Population-Based Cohorts Abstract Background — High-throughput profiling of circulating metabolites may improve cardiovascular risk prediction over established risk factors* .
<https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013116>
78. Zeng, H., Cai, D., Long, K., & Chen, Z. (1997). *Piperbetol, Methylpiperbetol, Piperol A and Piperol B: A New Series of Highly Specific PAF Receptor Antagonists from Piper betle*. 296–298.
79. Mori, T. R. A. M., Woodman, R. I. J. W., Burke, V. A. B., Puddey, I. A. N. B. P., & Croft, K. E. D. C. (2003). Effect of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on oxidative stress and inflammatory markers in treated-. *Free Radical Biology & Medicine*, 35(7), 772–781.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00407-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00407-6)