



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ: «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Επίδραση διατροφικής παρέμβασης με ψάρια
ιχθυοτροφείου στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF
(Platelet-Activating Factor, παράγοντας ενεργοποίησης
αιμοπεταλίων) σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό»**

ΠΕΤΣΙΝΗ ΦΙΛΙΩ

Τριμελής Επιτροπή:

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (επιβλέπουσα καθηγήτρια), Καθηγήτρια Βιοχημείας,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νομικός Τζώρτζης, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών
Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΑΘΗΝΑ 2015



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ: «ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**«Επίδραση διατροφικής παρέμβασης με ψάρια
ιχθυοτροφείου στα ένζυμα μεταβολισμού του PAF
(Platelet-Activating Factor, παράγοντας ενεργοποίησης
αιμοπεταλίων) σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό»**

ΠΕΤΣΙΝΗ ΦΙΛΙΩ

Τριμελής Επιτροπή:

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (επιβλέπουσα καθηγήτρια), Καθηγήτρια Βιοχημείας,
Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Νομικός Τζώρτζης, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Τμήμα Επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

Φραγκοπούλου Ελισάβετ, Επίκουρη Καθηγήτρια Βιολογικής Χημείας Φυσικών
Προϊόντων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

ΑΘΗΝΑ 2015

Πίνακας περιεχομένων

Περίληψη	7
Abstract	9
Κεφάλαιο 1: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)	10
1.1. Δομή του PAF και των αναλόγων του.....	10
1.2. Τρόπος δράσης του PAF.....	11
1.3. Παθοφυσιολογία του PAF.....	12
1.4. Μεταβολισμός του PAF	12
1.4.1. Βιοσύνθεση.....	12
1.5. Καταβολισμός.....	14
1.6. Τα κυριότερα ένζυμα του μεταβολισμού του PAF.....	15
1.6.1. Φωσφολιπάσες A2 (PLA2).....	15
1.6.2. CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση (CoA-IT).....	16
1.6.3. Ακετυλο-CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο-PAF AT)	16
1.6.4. Μη ευαίσθητη σε DTT CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT)	17
1.6.5. PAF ακετυλυδρολάση (PAF-AH).....	18
1.7. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί του μεταβολισμού του PAF	18
1.8. Υποδοχέας του PAF.....	20
1.8.1. Έκφραση, δομή και λειτουργία του υποδοχέα	20
1.9. Αναστολείς του PAF	21
1.9.1. Φυσικοί ανταγωνιστές του PAF.....	22
1.9.2. Συνθετικοί ανταγωνιστές του PAF.....	22
1.9.3. Επίδραση της διατροφής	23
Κεφάλαιο 2: PAF και Αθηροσκλήρωση.....	24
2.1. Ορισμός της Αθηροσκλήρωσης.....	24
2.2. Παθογένεση της Αθηροσκλήρωσης.....	25
2.3. PAF και Δημιουργία Αθηρογένεσης.....	26
Κεφάλαιο 3: Κατανάλωση ψαριού και καρδιαγγειακά νοσήματα.....	29

3.1. Το ψάρι στη διατροφή.....	29
3.2. Επιδημιολογικές Μελέτες.....	30
3.2.1. Συγχρονικές Μελέτες.....	30
3.2.2. Προοπτικές Μελέτες.....	30
3.3. Κλινικές Μελέτες.....	32
3.3.1. Μελέτες συστάσεων.....	32
3.3.2. Μελέτες παρέμβασης.....	33
Σκοπός.....	47
Κεφάλαιο 4: Μεθοδολογία.....	48
4.1. Πρώτοκολλο Κλινικής Μελέτης Παρέμβασης.....	48
4.1.1. Αξιολόγηση ανθρωπομετρικών μετρήσεων.....	50
4.1.2. Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης και φυσικής δραστηριότητας.....	50
4.1.3. Εργαστηριακές Μετρήσεις.....	51
4.2. Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με τη Μέθοδο Bradford.....	52
4.3. Προσδιορισμός της Δραστικότητας της Lp-PLA ₂ και της PAF-AH των Λευκοκυττάρων.....	53
4.4. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών.....	55
4.5. Προσδιορισμός της Δραστικότητας της DTT-Ανεξάρτητης CDP- Χολίνη: Αλκυλοακετυλογλυκεροφωσφοχολινοτρανσφεράσης (PAF-CPT).....	56
4.6. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC).....	58
4.7. Βιολογική δοκιμασία in vitro σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.....	60
4.7.1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού.....	63
4.7.2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.....	64
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα Πειραμάτων.....	65
5.1. Προσκόλληση Εθελοντών.....	65
5.2. Βασικά Χαρακτηριστικά Εθελοντών.....	65
5.3. Δραστικότητα Μεταβολικών Ενζύμων PAF.....	69
5.3.1. Συσχέτιση των ενζύμων.....	72
5.3.2. Επίδραση της κάθε παρέμβασης.....	72

5.3.3. Σύγκριση μεταξύ των δύο παρεμβάσεων	75
Κεφάλαιο 6: Συζήτηση	77
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	82
ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	82
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	84

Περίληψη

Η έως τώρα βιβλιογραφία έχει αναδείξει την επίδραση της διατροφής στην καρδιαγγειακή υγεία καθώς και την εμπλοκή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF) στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Όσον αφορά τον PAF, υπάρχουν ισχυρά *in vitro* αποτελέσματα για την επίδραση των συστατικών της διατροφής στα μεταβολικά του ένζυμα. Επιπλέον, πλήθος κλινικών μελετών που αφορούν τη διατροφική παρέμβαση με ψάρι υποστηρίζει τη βελτίωση διαφόρων δεικτών που σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση κυρίως σε επίπεδο λιπιδαιμικού προφίλ και αιμοπεταλιακής συσσώρευσης.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να συσχετίσει τη βελτίωση αυτή με την επίδραση της κατανάλωσης ψαριού στη δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων του PAF. Για το λόγο αυτό, 30 υγιείς εθελοντές μεταξύ 30 και 65 ετών, εκ των οποίων οι 16 ήταν άνδρες, συμμετείχαν και ολοκλήρωσαν μια τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή διασταυρούμενη μελέτη, όπου για 8 εβδομάδες κατανάλωναν εβδομαδιαίως 2 γεύματα τσιπούρα ιχθυοτροφείου είτε φυσιολογική είτε εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης. Ακολούθησαν 6 εβδομάδες κάθαρσης (washout) μετά το πέρας των οποίων το πρωτόκολλο επαναλήφθηκε ώστε όσοι έλαβαν τα εμπλουτισμένα γεύματα να λάβουν τα φυσιολογικά και ανάποδα. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία μετά από νηστεία πριν και μετά από κάθε παρέμβαση.

Τα ένζυμα του PAF που μελετήθηκαν για τη δραστικότητα τους ήταν η ακετυλοϋδρολάση του PAF (PAF-AH) και η μη ευαίσθητη σε DTT CDP-χολίνη:αλκυλακετυλογλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT) στα λευκά αιμοσφαίρια των εθελοντών καθώς και η συνδεδεμένη σε λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A_2 (LpPLA₂) στον ορό του αίματος των εθελοντών. Για τον προσδιορισμό δραστικότητας των PAF-AH και LpPLA₂, πραγματοποιήθηκε μέτρηση της ραδιενέργειας του επισημασμένου προϊόντος της ενζυμικής δοκιμασίας. Για τον προσδιορισμό δραστικότητας της PAF-CPT πραγματοποιήθηκε απομόνωση του προϊόντος της ενζυμικής δοκιμασίας με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και υπολογισμός της ποσότητας του μέσω της πρόκλησης συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα IBM SPSS Statistics 21.

Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο παρεμβάσεων. Το εμπλουτισμένο με φυσικής προέλευσης αναστολείς PAF ψάρι δεν

έδειξε ούτε να υπερτερεί αλλά ούτε και να υστερεί της φυσιολογικής τσιπούρας όσον αφορά την επίδραση στη δραστικότητα των ενζύμων. Συνολικά, μετά το πέρας της παρέμβασης εμφανίζεται μείωση της δραστικότητας της PAF-CPT ($p=0,011$, απλή τσιπούρα), μη στατιστικά σημαντική μείωση της $IpPLA_2$ ($p=0,51$, εμπλουτισμένη τσιπούρα) ενώ η PAF-AH δεν εμφανίζει καμία μεταβολή. Παρατηρείται επίσης ισχυρή θετική συσχέτιση των επιπέδων της PAF-CPT και της PAF-AH ($p<0,01$). Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν την ανάγκη περαιτέρω μελέτης της επίδρασης των συστατικών του ψαριού στη δραστικότητα των μεταβολικών ενζύμων του PAF σε εθελοντές ενδεχομένως με αύξηση των γευμάτων παρέμβασης ή του αριθμού των εθελοντών.

Abstract

Existing literature highlights the influence of diet on cardiovascular health as well as the involvement of platelet activating factor (PAF) in the development of atherosclerosis. There are, also, potent in vitro results regarding the effect of the components of the diet on PAF levels and its metabolic enzymes' activity. In addition, numerous clinical trials on intervention with fish support the improvement of various factors associated with atherosclerosis particularly in terms of lipid profile and platelet aggregation. The purpose of this study is to examine the effect of fish consumption on the activity of metabolic enzymes of PAF. Therefore, 30 healthy volunteers between 30 and 65, of which 16 were male, participated and completed a randomized double-blind crossover trial, in which they were advised to consume twice a week and for 8 weeks either normal fish or enriched fish. They had delivered two portions of raw, gutted, scaled and gilled sea bream each week and the enriched one contained PAF inhibitors of natural origin. Following a six weeks washout period, the protocol was repeated with the two intervention groups swapping normal and enriched fish. Blood samples were drawn after a 10-hour fast, before and after each intervention.

PAF enzymes studied for their activity were PAF acetylhydrolase (PAF-AH) and insensitive to DTT-insensitive CDP-choline: 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerol choline-phosphotransferase (PAF-CPT) in white blood cells and associated to lipoproteins phospholipase A2 (LpPLA₂) in the blood serum. Determination of PAF-AH and LpPLA₂ activity was held by measuring the radioactivity of the labeled product of the enzymatic assay. To determine the activity of PAF-CPT, the product of the enzymatic assay was isolated with thin layer chromatography (TLC) and its levels were estimated by inducing platelet aggregation. The statistical analysis of the results was performed with the statistical IBM SPSS Statistics 21 program.

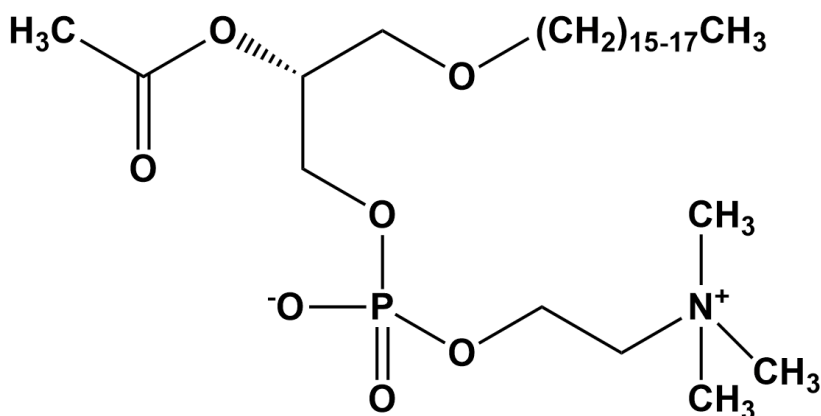
The results showed no statistically significant difference between the two interventions. The enriched, with PAF inhibitors of natural origin, fish was neither superior nor inferior to the normal fish regarding the effect on the activity of enzymes. Overall, the intervention lead to a significant reduction of the PAF-CPT activity ($p = 0.011$, normal fish) and to a non-significant reduction of the LpPLA₂ activity ($p = 0.51$, enriched fish) while PAF-AH activity did not show any change. A strong positive correlation between levels of PAF-CPT and PAF-AH was observed ($p < 0.01$). The results indicate the need for further study on the influence of fish components on the activity of PAF metabolic enzymes by either increasing the intervention's meals or the number of volunteers.

Κεφάλαιο 1: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) είναι ένα βιοδραστικό φωσφολιποειδές με συστηματική ονομασία 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη. Αν και αρχικά ανακαλύφθηκε ως μόριο που ευθύνεται για τη διέγερση των αιμοπεταλίων, η μετέπειτα έρευνα υποδεικνύει έναν ισχυρό πλειοτροπικό διαμεσολαβητή που εκκρίνεται από πληθώρα κυττάρων και συμμετέχει τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις.

1.1. Δομή του PAF και των αναλόγων του

Παρότι ο PAF ήταν γνωστός για τις ιδιότητες του από το διάστημα 1966-1972, η δομή του καθώς και ημισυνθετική παρασκευή του έγινε το 1979 από τους Demopoulos, Hanahan και Pinckard [1] και λίγο αργότερα την ίδια χρονιά από δύο άλλες ερευνητικές ομάδες [2,3]. Το μόριο χαρακτηρίζεται ως γλυκερινικό φωσφολιποειδές το οποίο διαθέτει στην πρώτη θέση λιπαρή αλυσίδα η οποία συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με τον γλυκερινικό σκελετό (Εικόνα 1.1). Η λιπαρή αυτή αλυσίδα αποτελείται συνήθως από 16 ή 18 άτομα άνθρακα και ενδέχεται να είναι είτε κορεσμένη είτε ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς. Στη θέση 2 του γλυκερινικού σκελετού είναι συνδεδεμένο εστερικά ένα οξικό οξύ ενώ στην τρίτη θέση βρίσκεται μια ομάδα φωσφοχολίνης.



Εικόνα 1.1: Το μόριο της 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης.

Η ευρεία δράση των βιοσυνθετικών και αποικοδομητικών ενζύμων του PAF οδηγεί στην πραγματικότητα σε ένα πλήθος μοριακών ειδών και αναλόγων του παράγοντα, με παρόμοια ή μικρότερη βιολογική δραστηριότητα. Η δημιουργία των μορίων αυτών εξαρτάται από τη σύσταση και την κατανομή της κυτταρικής μεμβράνης σε

φωσφολιποειδή, αραχιδονικό οξύ σε αυτά και την ταχύτητα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησής τους.

Τα μοριακά ανάλογα του PAF μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση:

- i) Το είδος του δεσμού σύνδεσης της λιπαρής αλυσίδας στην sn-1 θέση. Η δραστηριότητα του μορίου επηρεάζεται άμεσα από το δεσμό αυτό με πιο δραστικές τις ενώσεις με αιθερικό δεσμό και ακολουθούν με σειρά δραστηριότητας ο βινυλαιθερικός και ο εστερικός δεσμός.
- ii) Το είδος της λιπαρής αλυσίδας. Τα ανάλογα που περιέχουν κορεσμένο ή ακόρεστο λιπαρό οξύ με 16 ή 18 άτομα άνθρακα εμφανίζουν τη μέγιστη δραστηριότητα.
- iii) Το είδος του λιπαρού οξέος που βρίσκεται εστεροποιημένο στην sn-2 θέση. Αντικατάσταση του οξικού οξέος με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας μειώνει τη βιολογική δραστηριότητα του αναλόγου.
- iv) Το είδος της βάσης στην sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η δραστηριότητα των αναλόγων μειώνεται με την εξής σειρά: χολίνη > διμεθυλοαιθανολαμίνη > μονομεθυλοαιθανολαμίνη > αιθανολαμίνη.

Η ακετυλομάδα της θέσης sn-2 φαίνεται να είναι το σημαντικότερο δομικό χαρακτηριστικό του PAF και των αναλόγων του καθώς απομάκρυνσής της από το μόριο οδηγεί στο σχεδόν ανενεργό λυσο-PAF.

1.2. Τρόπος δράσης του PAF

Μετά την παραγωγή του από τα κύτταρα, ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων μπορεί να ακολουθήσει τις εξής πορείες:

- i) Να δράσει αυτοκρινώς ή παρακρινώς.
- ii) Να ενσωματωθεί στην πλασματική μεμβράνη και να εκτεθεί στην εξωτερικής της επιφάνεια προκειμένου να δράσει ως διακυτταρικός μεσολαβητής και να ενεργοποιήσει τα γειτονικά κύτταρα. Η πορεία αυτή είναι καταλυτική για την ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις φλεγμονής.
- iii) Να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής.

1.3. Παθοφυσιολογία του PAF

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων συμμετέχει σε μια πληθώρα παθοφυσιολογικών καταστάσεων ασκώντας διάφορες δράσεις στα κύτταρα και τους ιστούς. Η πολυμορφία των δράσεων του PAF οφείλεται στο γεγονός πως ένας μεγάλος αριθμός ερεθισμάτων, κυρίως θρομβογόνων και φλεγμονωδών, προκαλεί την ενεργοποίηση της βιοσυνθετικής πορείας του παράγοντα. Με αυτόν τον τρόπο ο PAF λειτουργεί ως ένας μεσολαβητής ο οποίος ενοποιεί πολλά διαφορετικά μηνυματοφόρα μόρια (upstream). Επιπλέον, η διαδεδομένη έκφραση του υποδοχέα του παράγοντα καθώς και η πολλαπλότητα των σηματοδοτικών μονοπατιών που επάγονται από τον PAF ευνοούν την πληθώρα δράσεών του.

Φυσιολογικά ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων συμμετέχει ως διαμεσολαβητής στην φλεγμονή, στην αναπαραγωγή, στην διαμόρφωση της μνήμης, στον αγγειακό τόνο, στην απόπτωση και την αγγειογένεση. Οι δράσεις του ρυθμίζονται μέσω της PAF-ακετυλοϋδρολάσης που τον απενεργοποιεί και των διαφόρων αναστολέων του. Αν οι διαδικασίες αυτές υπολειτουργούν τότε πραγματοποιείται υπερβολική σηματοδότηση από τον παράγοντα η οποία σχετίζεται με πολλές ασθένειες με κύριο χαρακτηριστικό την φλεγμονή. Μερικές από αυτές είναι οι αλλεργίες, το άσθμα, ο διαβήτης τύπου 1, οι νεφρικές νόσοι, ο καρκίνος, το AIDS, η περιοδοντίτιδα και η αθηροσκλήρωση η οποία και θα αναλυθεί σε επόμενο κεφάλαιο.

1.4. Μεταβολισμός του PAF

1.4.1. Βιοσύνθεση

Ο PAF παράγεται είτε ιδιοσυστατικώς (constitutively) είτε μετά από κατάλληλη διέγερση από διάφορα κύτταρα όπως τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο PAF βιοσυντίθεται από δύο εντελώς διαφορετικές ενζυμικές πορείες, την εξ' υπαρχής (de novo) βιοσύνθεση και την πορεία ανασχηματισμού (remodeling) [4].

Η πορεία ανασχηματισμού αφορά συγκεκριμένα φωσφολιποειδή των κυτταρικών μεμβρανών. Τα μόρια αυτά διαθέτουν αιθερικό δεσμό και ομάδα χολίνης και υφίστανται δομικές αλλαγές προκειμένου να μετατραπούν στον παράγοντα. Μετά την διέγερση των κυττάρων ενεργοποιείται η φωσφολιπάση A_2 του κυτοπλάσματος (cPLA₂) η οποία αποκόπτει από την sn-2 θέση του φωσφολιποειδούς την εστεροποιημένη λιπαρή

ακυλική αλυσίδα και δημιουργεί το αντίστοιχο 2-λυσσο-φωσφολιποειδές. Σε αυτή τη λυσο-μορφή έρχεται να ενεργήσει η λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF AT), ένα ένζυμο το οποίο, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το ακετυλο-CoA, μεταφέρει την ακετυλομάδα στην sn-2 θέση και δημιουργεί ένα μόριο PAF [5].

Ανάλογα με το χημικό δεσμό της λιπαρής αλυσίδας στον sn-1 άνθρακα, τα δύο ένζυμα της πορείας ανασχηματισμού (cPLA2 και lyso-PAF AT) αναγνωρίζουν τρεις υποκατηγορίες ενώσεων φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Αυτές οι ομάδες υποστρωμάτων, ακυλο-PC (εστερικός δεσμός), αλκυλο-PC (αιθερικός δεσμός) και αλκενυλο-PC (βινυλαιθερικός δεσμός), αποτελούνται από πολλά μέλη καθώς τα μόρια διαφοροποιούνται και ως προς το μήκος και την ακορεστότητα της λιπαρής αλυσίδας. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί πως οι μακριές λιπαρές αλυσίδες της sn-2 θέσης των αρχικών μορίων είναι κατά κύριο λόγο πολυακόρεστες και συνήθως είναι αλυσίδες αραχιδονικού οξέος (AA). Επομένως, κατά τη διαδικασία του ανασχηματισμού του PAF μπορεί να απελευθερωθούν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) τα οποία εν συνεχεία να μετατραπούν σε βιοδραστικά εικοσανοειδή.

Πέραν της παραπάνω διαδικασίας, υπάρχει κι άλλο ένα μονοπάτι αντιδράσεων, ανεξάρτητο του συνενζύμου A (CoA), από το οποίο μπορεί να προκύψει lyso-PAF μέσω τρانشακυλίωσης μεταξύ μιας αλκυλοακυλογλυκεροφωσφοχολίνη και ενός λυσο-φωσφολιποειδούς [6,7]. Με αυτή τη διαδικασία παράγονται ταυτόχρονα PAF και αραχιδονικό οξύ .

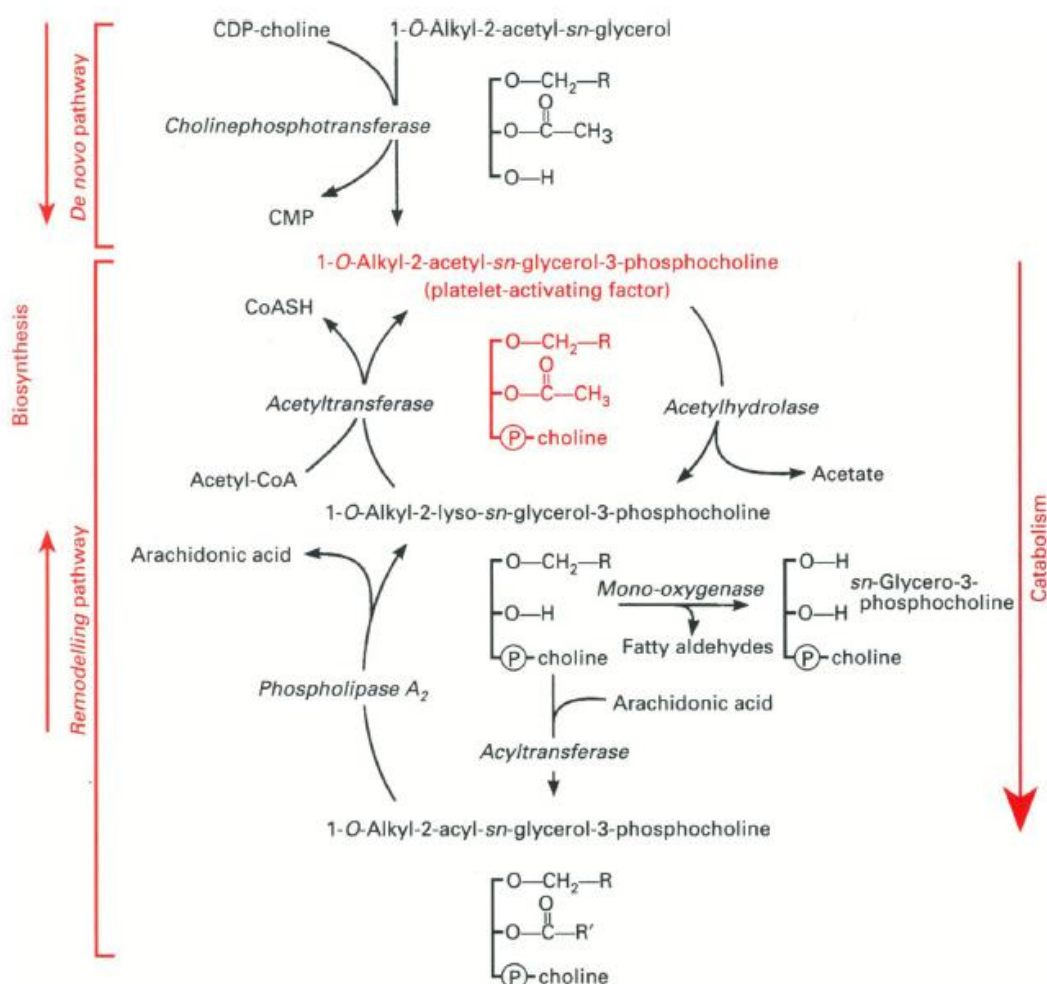
Στην περίπτωση της παραγωγής του PAF μέσω της πορείας εξ 'υπαρχής (de novo) ακολουθείται μια πορεία καθορισμένων βημάτων που ξεκινούν με την ακετυλίωση και αποφωσφορυλίωση ενός μορίου 1-O-αλκυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται από μια CoA εξαρτώμενη ακετυλοτρανσφεράση (ALPA AT) και μια φωσφοϋδρολάση αντίστοιχα. Από τα παραπάνω βήματα παράγεται ένα μόριο 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλης το οποίο μετατρέπεται σε PAF με τη βοήθεια μιας DTT-ανεξάρτητης φωσφοχολινοτρανσφεράσης (PAF-CPT). Η φωσφοχολίνη, που μεταφέρεται την sn-3 θέση της γλυκερόλης, με τη βοήθεια του ενζύμου βρίσκεται σε ενεργοποιημένη μορφή ως κυτιδυλο-διφωσφορικής χολίνης (CDP-χολίνης) [5].

Η επιστημονική κοινότητα θεωρεί πως η πορεία ανασχηματισμού συναντάται και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στις περιπτώσεις φλεγμονής και υπερευαισθησίας ενώ μέσω της de novo πορείας διατηρούνται τα φυσιολογικά επίπεδα PAF στο αίμα και τους ιστούς.

1.5. Καταβολισμός

Η αποικοδόμηση των μορίων PAF μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων με κυριότερη την απόσπαση της ακυλικής αλυσίδας της sn-2 θέσης από την, ειδική για τον PAF, ακετυλοϋδρολάση (PAF AH) με αποτέλεσμα την παραγωγή του ανενεργού λυσο-PAF. Υδρόλυση του PAF φαίνεται να καταλύεται και από μια εκκρινόμενη PLA2 *in vitro* [8] ενώ μια τρανσακετυλάση (TA) μπορεί να μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-πλάσμαλογόνα ή άλλα λυσο-φωσφολιποειδή [9].

Επιπλέον, η LCAT (λεκιθίνη: χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση), ένα ένζυμο που συσχετίζεται με τη λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL), έχει συσχετιστεί με υδρολυτική δράση για τον PAF [10]. Αν και έχουν μικρή σημασία στο μεταβολισμό του PAF, η φωσφολιπάση C και οι λυσοφωσφολιπάσες I και II εμφανίζουν επίσης δράση στον καταβολισμό του PAF.



Εικόνα 1.2: Μεταβολισμός του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, PAF [11]. Η βιοσύνθεση του PAF πραγματοποιείται είτε μέσω μια πορείας ανασχηματισμού (remodelling pathway) είτε μέσω μιας πορείας εξ υπαρχής (de novo pathway).

1.6. Τα κυριότερα ένζυμα του μεταβολισμού του PAF

1.6.1. Φωσφολιπάσες A₂ (PLA₂)

Τα ένζυμα της οικογένειας των φωσφολιπασών A₂, αν και δομικά ετερογενή, καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού στην sn-2 θέση των γλυκεροφωσφολιποειδών. Μετρώντας πάνω από 20 μέλη στα θηλαστικά, η οικογένεια αυτή χωρίζεται σε υποκατηγορίες με βάση τη δομή και την ενζυμική συμπεριφορά των μελών. Υπάρχουν, λοιπόν, εκκριτικές, κυτοσολικές, ασβεστιο-ανεξάρτητες φωσφολιπάσες A₂ καθώς και οι PAF AH [12–14].

Από τις κυτοσολικές, μόνο η cPLA₂α έχει συνδεθεί με την σύνθεση του PAF και είναι η μόνη που φαίνεται να έχει σημαντική επιλεκτικότητα όσον αφορά τα φωσφολιποειδή που φέρουν αραχιδονικό οξύ στην sn-2 θέση. Επιπρόσθετα, η δράση του ενζύμου αυτού και η επιλεκτικότητά του επηρεάζονται από το βαθμό ακορεστότητας, τη θέση των διπλών δεσμών και το μήκος της λιπαρής αλυσίδας της sn-2 θέσης. Επίπεδα Ca²⁺ κάτω των 10⁻⁶ mol φαίνεται επίσης να προάγουν τη δράση του εν λόγω ενζύμου με μεταφορά του σε κυστίδια φωσφολιποειδών [14].

Οι εκκριτικές φωσφολιπάσες από την άλλη συμπεριλαμβάνουν στη δομή τους μια θηλιά πρόσδεσης ιόντος ασβεστίου, πέραν του καταλυτικού τους κέντρου. Όταν τα επίπεδα ασβεστίου είναι της τάξεως των 10⁻³ mol τότε τα ένζυμα της υποοικογένειας αυτής καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού στην sn-2 θέση χωρίς επιλεκτικότητα στην λιπαρή αλυσίδα. Τα φωσφολιποειδή που περιέχουν φωσφατιδυλοχολίνη υδρολύονται αποτελεσματικά μόνο από 3 μέλη της υποκατηγορίας των εκκριτικών [15]. Για ένα από αυτά τα μέλη έχειδειχθεί ότι καταλύει επιτυχώς τον PAF in vitro με ή χωρίς την παρουσία λιποπρωτεϊνών [8].

Η τρίτη υποκατηγορία διαφέρει από τις προηγούμενες καθώς τα ένζυμα που την αποτελούν δεν χρειάζονται ιόντα ασβεστίου για να είναι δραστήρια. Οι φωσφολιπάσες αυτές, που ονομάζονται ασβεστιο-ανεξάρτητες, δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα στα χαρακτηριστικά της λιπαρής αλυσίδας της sn-2 θέσης.

Οι PAF-AH (ακετυλοϋδρολάσες) θα αναλυθούν σε επόμενη υποενότητα. Όσον αφορά την πορεία ανασχηματισμού του PAF, οι φωσφολιπάσες που συμμετέχουν κάθε φορά εξαρτώνται μάλλον από τον τύπο του κυττάρου και το ερέθισμα που προκάλεσε την αντίδραση.

1.6.2. CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση (CoA-IT)

Η λειτουργία της εν λόγω τρανσακυλάσης είναι να μεταφέρει αλυσίδες λιπαρών οξέων από διακυλο-φωσφολιποειδή σε λυσοφωσφολιποειδή. Διαφέρει από την CoA-εξαρτώμενη τρανσακυλάση, καθώς δεν απαιτεί την παρουσία του ακετυλοσυνενζύμου A ή κάποιου άλλου συμπαραγόντα. Επίσης κατά την κατάλυση που πραγματοποιεί δεν απελευθερώνεται λιπαρή αλυσίδα όπως γίνεται κατά την δράση των PLA₂.

Από μελέτες ιστών έχειδειχθεί πως η τρανσακυλάση αυτή εμφανίζεται σε ιστούς που περιέχουν αιθερικά φωσφολιποειδή σε υψηλές ποσότητες, όπως στην καρδιά, στον εγκέφαλο και στα κύτταρα της φλεγμονώδους αντίδρασης (μακροφάγα, αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα, λεμφοκύτταρα). Αντίθετα, το ένζυμο απουσιάζει από ιστούς στους οποίους απουσιάζουν και τα αιθερικά φωσφολιποειδή [16].

Κατά την καταλυτική αντίδραση, ο δότης ακυλίου είναι αποκλειστικά λιπαρό οξύ εστεροποιημένο στην sn-2 θέση ενός διακυλο-φωσφολιποειδούς και δεν προέρχεται από ακυλο-CoA ή ελεύθερο λιπαρό οξύ. Επιπλέον, μεταφέρονται μεταξύ δότη και δέκτη αυστηρά πολυακόρεστες αλυσίδες 20 ή 22 ανθράκων, στις οποίες συμπεριλαμβάνονται και τα ω-6 και ω-3 λιπαρά οξέα. Όσον αφορά την προτίμηση στα φωσφολιποειδή-δότες, αυτά που έχουν χολίνη ενωμένη στην φωσφορική ομάδα προτιμώνται έναντι της φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνης και της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης. Τα λυσοφωσφολιποειδή-δέκτες μπορούν να χωριστούν σε τρεις υποκατηγορίες για την φωσφατιδυλο-χολίνη, ανάλογα με το είδος της αλυσίδας στην sn-1 θέση (1-αλκενυλο-PC, 1-αλκυλο-PC, 1-ακυλο-PC). Πιο αποτελεσματική ακυλίωση πραγματοποιείται στην 1-αλκυλο-φωσφατιδυλοχολίνη [5].

Αν και το ένζυμο είναι ευαίσθητο στην θερμοκρασία, την παρουσία οξέων και στα απορρυπαντικά, δεν επηρεάζεται από την παρουσία συνενζύμου A, ιόντων ασβεστίου ή ιόντων μαγνησίου [17]. Η ευαισθησία της τρανσακετυλάσης σε απορρυπαντικά καθιστά αδύνατη την απομόνωση της προς μελέτη της δομής.

1.6.3. Ακετυλο-CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (λυσο-PAF AT)

Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για το τελευταίο βήμα της πορείας ανασχηματισμού του PAF ενώ φαίνεται να ασκεί τη δράση του κυρίως ως συνδεδεμένο στο ενδοπλασματικό δίκτυο διαφόρων κυττάρων. Στην πορεία του ανασχηματισμού η κυτοπλασματική φωσφολιπάση A2 μετατρέπει τα αιθερικά ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης σε λυσο-PAF. Στη συνέχεια συμβαίνει ακετυλίωση του λυσο-PAF η οποία πραγματοποιείται από τη δράση τουλάχιστον δύο ισομορφών της ακετυλο-CoA: λυσο-PAF

ακετυλοτρανσφεράσης τις LPCAT1 και LPCAT2 [18,19]. Νεότερα ερευνητικά δεδομένα υποστηρίζουν πως η LPCAT2 ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής ενώ η LPCAT1 είναι ασβεστιο-ανεξάρτητη και δε συμμετέχει σε φλεγμονές.

Η ακετυλοτρανσφεράση προτιμά ως υποστρώματα μορφές λυσο-PC και λυσο-PE, ενώ οι λυσο-PI και λυσο-PS δεν αποτελούν υλικό για την ενζυμική αντίδραση [4,20]. Επιπλέον προτιμώνται λυσοφωσφολιποειδή με C-16 ανθρακική αλυσίδα στην sn-1 θέση, έναντι των C-18 αναλόγων [18]. Ανάλογα με την κατάσταση του κυττάρου, η ακετυλοτρανσφεράση προτιμά διαφορετικό ακυλο-CoA ως δότη αλυσίδας για την sn-2 θέση. Ενώ σε κατάσταση ηρεμίας χρησιμοποιείται κυρίως αραχιδονυλο-CoA, στην περίπτωση της οξείας φλεγμονώδους αντίδρασης λόγω λιποπολυσακχαριτών (LPS) προτιμάται το ακετυλο-CoA με σκοπό την παραγωγή PAF [18].

Η δραστηριότητα του ενζύμου είναι ασβεστιοεξαρτώμενη με ένα ιδανικό pH γύρω στο 7.4. Παρουσία χηλικών παραγόντων, όπως το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) ή το αιθυλενογλυκερολοτετραοξικό οξύ (EGTA) η δράση του ενζύμου αναστέλλεται. Αναστολείς του ενζύμου είναι και κάποια δισθενή ιόντα, όπως το Mg^{2+} και το Mn^{2+} , καθώς και συγκεκριμένες σουλφυδρυλο-ενώσεις, επί παραδείγματι το N-αιθυλομαλεϊμίδιο. Μελέτες *in vitro* έχουν δείξει πως τα φλαβονοειδή λουτεΐνη και κερκετίνη και το αντιφλεγμονώδες σουλφασαλαζίνη αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου [21,22]. Παρόμοια δράση *in vitro* έχει και η ασπιρίνη η οποία όμως μπορεί να προκαλέσει ακετυλίωση του λυσο-PAF μη ενζυμικά [23,24].

1.6.4. Μη ευαίσθητη σε DTT CDP-χολίνη:αλκυλακετυλγλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT)

Απαραίτητο ένζυμο για το τελικό βήμα της *de novo* βιοσύνθεσης του PAF, η PAF-CPT διαφέρει από τις άλλες χολινοφωσφοτρανσφεράσες καθώς δεν αναστέλλεται από την παρουσία της διθειοθρεϊτόλης (DTT) [4]. Μελέτες σε κύτταρα ιστών, και συγκεκριμένα στο μικροσωμικό τους κλάσμα, υποδεικνύουν πως η θέση του ενζύμου είναι στην κυτταροπλασματική επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου.

Οι αλκυλικές αλυσίδες 16:0 και 18:1 προτιμώνται ως υποστρώματα σε σχέση με την 18:0 ενώ μια ακετυλο- ή προπιονυλο-ομάδα στην sn-2 θέση ευνοεί την αντίδραση. Η δραστηριότητα του ενζύμου βελτιστοποιείται σε pH 8.0, με απαραίτητη την παρουσία του ιόντος Mg^{2+} . Αντίθετα η παρουσία ιόντων ασβεστίου αναστέλλει τη δράση της τρανσφεράσης. Το DTT ενισχύει ελαφρώς τη δράση του ενζύμου, τη στιγμή που *in vitro*

μελέτες με φάρμακα και βιοδραστικά συστατικά της Μεσογειακής Διατροφής εμφανίζουν ανασταλτική δράση [25].

1.6.5. PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH)

Η PAF ακετυλοϋδρολάση, με πολλές ισομορφές σε πλάσμα και ιστούς, είναι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων [26–28]. Εξωκυτάρια, το ένζυμο βρίσκεται προσδεσμένο στις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL (lp-PLA₂). Ενδοκυτάρια εμφανίζονται διάφορες ισομορφές επίσης, με χαρακτηρισμένες τις PAF AH Ib και PAF AH II. Και στις δύο περιπτώσεις το ένζυμο εμφανίζει μια μικρή περιοχή ομολογίας με τις εστεράσες.

Οι ακετυλοϋδρολάσες έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν εστερικούς δεσμούς και σε δομικά ανάλογα φωσφολιποειδή πέραν του PAF. Επιπλέον, η επιλεκτικότητα στο υπόστρωμα σχετίζεται με την εκάστοτε ισομορφή. Για παράδειγμα, ενώ οι ισομορφές που βρίσκονται στο πλάσμα αναγνωρίζουν πληθώρα υποστρωμάτων [29,30], η ενδοκυτάρια PAF AH II είναι λειτουργική αποκλειστικά για την υδρόλυση του PAF. Παρόλα αυτά η τελευταία ισομορφή παρουσιάζει τριπλή καταλυτική ιδιότητα, ως τρανσακετυλάση PAF λυσοφωσφολιποειδών (TAL) και σφιγγοσίνης (TAS) και ως PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF AH) [31,32]. Δράση τρανσακετυλάσης εμφανίζει και η PAF AH του πλάσματος καθώς έχει την ιδιότητα να μεταφέρει την ακετυλομάδα του PAF σε διάφορους αποδέκτες.

1.7. Ρυθμιστικοί μηχανισμοί του μεταβολισμού του PAF

Λόγω της εμφάνισης του PAF σε μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων, η μελέτη της ρύθμισης του μεταβολισμού του, καθώς και της σχετικής δραστικότητας των ενζύμων που εμπλέκονται σε αυτόν, είναι ιδιαίτερος σημαντική στην κατανόηση της επίδρασης του παράγοντα στον οργανισμό. Πειράματα σε ακέραια κύτταρα και ζωικά μοντέλα έδειξαν πως πολύ φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές, όπως οι κυταροκίνες, οι νευροδιαβιβαστές και οι ορμόνες ενδέχεται να επιδράσουν και να μεταβάλλουν τον μεταβολισμό του PAF [5].

Στην πορεία του ανασχηματισμού του PAF, η δραστικότητα των cPLA₂α και lyso-PAF AT ρυθμίζεται μέσω διαφόρων μηχανισμών ενώ η CoA-IT φαίνεται να είναι ένα μονίμως ενεργό ένζυμο του οποίου η απόδοση σε PAF μεταβάλλεται από τη διαθεσιμότητα φωσφολιποειδών-προερχόμενων από την δράση της PLA₂.

Όσον αφορά την PLA_2 , το ένζυμο αυτό ρυθμίζεται ως προς τη δραστικότητα του με διάφορους τρόπους [14]. Καταρχάς, είναι απαραίτητη η μεταφορά του από το κυτοσόλιο στις μεμβράνες η οποία ευνοείται από τα αυξημένα ενδοκυττάρια επίπεδα ιόντων ασβεστίου. Επιπλέον, στο καταλυτικό κέντρο υπάρχει δυνατότητα φωσφορυλίωσης σε σημαντικά σημεία, η οποία και ενεργοποιεί το ένζυμο. Πολλές ακόμη πρωτεΐνες επιδρούν στη δραστικότητα του ενζύμου αρνητικά ή θετικά, με σημαντικότερη την κασπάση-3 η οποία κατά την απόπτωση του κυττάρου οδηγεί σε καταστροφή του καταλυτικού κέντρου της PLA_2 και άρα απενεργοποίησής της.

Με έναν κύκλο φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης ελέγχεται και η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση της λυσο-PAF AT καθώς μελέτες *in vitro* με διάφορες κινάσες έχουν δείξει πως αυτές ενεργοποιούν το ένζυμο [4].

Στα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα το ερέθισμα για την σύνθεση PAF μπορεί να δοθεί από τον φορέα ιόντων A23187 (calcimycin, μεταφορέας ιόντων ασβεστίου) και τον χημειοτακτικό παράγοντα fMLP οι οποίοι ενεργοποιούν τους καταρράκτες κινασών και προάγουν την ταυτόχρονη φωσφορυλίωση των ενζύμων $cPLA_2$ και λυσο-PAF AT από τις κινάσες $ERK_{1,2}$ (μόνο τη $cPLA_2$) και p38 MAPK. Αντίθετα η CoA-IT δε φαίνεται να ενεργοποιείται από αυτά τα ένζυμα [33,34].

Το ισοένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, που λειτουργεί ως υδροϋπεροξειδάση των φωσφολιποειδών (PHGPx) δρα προστατευτικά κατά της υπεροξειδωσής των κυττάρων. Οι Sakamoto et al. [35] έδειξαν πως το ένζυμο αυτό δρα ως αρνητικός ρυθμιστής της βιοσύνθεσης του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων καθώς μπορεί και αναστέλλει την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των $cPLA_2$ και λυσο-PAF AT από το p38 MAPK. Αντίθετα, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων ενεργοποίησης ενζύμων οδηγεί στην ενεργοποίηση των $cPLA_2$ (από το p42/44 MAPK) και λυσο-PAF AT (από το p38 MAPK).

Όσον αφορά την *de novo* βιοσύνθεση του PAF, αν και τα στοιχεία είναι περιορισμένα, πιστεύεται πως η ρύθμιση γίνεται στο πρώτο ένζυμο της πορείας, την ALPA ακετυλοτρανσφεράση, καθώς παρουσιάζει τη μικρότερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με τα 2 άλλα ένζυμα της πορείας. Επιπλέον, ρόλο κλειδί στην ταχύτητα της σύνθεσης έχει και η κυτιδυλοτρανσφεράση, υπεύθυνη για την παραγωγή της CDP-χολίνης, η οποία αποτελεί συνυπόστρωμα για την PAF CPT.

Τέλος, η ρύθμιση της ακετυλοϋδρολάσης του PAF διαφοροποιείται καθώς εξαρτάται από την ισομορφή του ενζύμου. Για την ισομορφή του πλάσματος η ρύθμιση γίνεται στο μεταγραφικό επίπεδο με ενεργοποίηση του μεταγραφικού παράγοντα από το p38 MARK. Η θετική ρύθμιση είναι απαραίτητη για την απενεργοποίηση του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιποειδών. Από την άλλη, για την ενδοκυττάρια ισομορφή PAF AH II η ρύθμιση γίνεται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους και η μετατροπές που πραγματοποιούνται ευθύνονται για την διαφορετική δράση του ενζύμου, ως ακετυλοϋδρολάση ή ως τρανσακετυλάση. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι οι δομικές αλλαγές συμβαίνουν μέσω παραγόντων μετατροπής θειολών ή μεταμεταγραφικών παραγόντων, ενώ η ενδοκυττάρια μετακίνηση του ενζύμου είναι εξίσου σημαντική [5].

1.8. Υποδοχέας του PAF

Ο υποδοχέας του PAF βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη πολλών διαφορετικών κυττάρων θηλαστικών και είναι συζευγμένος με μια G πρωτεΐνη (GPCR) [11,36]. Σε αυτόν ο PAF προσδένεται και ασκεί την αυτοκρινή και παρακρινή του δράση. Ενδοκυτταρικά ο PAF προσδένεται σε πυρηνικούς υποδοχείς.

Η πρόσδεση του παράγοντα στον υποδοχέα του (PAFR) προκαλεί έναν καταρράκτη διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου αλλά και του οργανισμού [37,38]. Ο υποδοχέας, και κατ' επέκταση τα μονοπάτια που ενεργοποιεί, ρυθμίζεται με ομοιοπολικές μετατροπές, ενδοκύτωση του υποδοχέα καθώς και ρύθμιση της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου.

1.8.1. Έκφραση, δομή και λειτουργία του υποδοχέα

Από μελέτες με ραδιενεργούς υποκαταστάτες φάνηκε πως υποδοχείς του PAF βρίσκονται σχεδόν σε όλα τα είδη κυττάρων ,συμπεριλαμβανομένων των αιμοπεταλίων, των λευκοκυττάρων ,των ηπατικών, νεφρικών, εγκεφαλικών και καρδιακών κυττάρων. Μετά από κλωνοποίηση του υποδοχέα πραγματοποιήθηκαν και μελέτες προκειμένου να οριστούν τα επίπεδα έκφρασης του mRNA του PAFR. Συγκρίνοντας μελέτες για διαφορετικά είδη θηλαστικών φάνηκε πως η έκφραση εξαρτάται από το είδος και από τον ιστό που μελετάται. Στους ανθρώπους, μεγαλύτερη έκφραση παρατηρήθηκε στα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα, στα κύτταρα του πλακούντα, τα πνευμονικά, τα δενδριτικά και τα ενδοθηλιακά κύτταρα.

Στα ανθρώπινα κύτταρα εκφράζεται μόνο ένας υποδοχέας PAF και το υπεύθυνο γονίδιο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 1. Δεν υπάρχουν ιντρόνια στην αρχή του γονιδίου και

ανάλογα με το είδος του κυττάρου εκφράζονται δύο διαφορετικά μεταγραφήματα. Το πρώτο εκφράζεται κυρίως στα περιφερειακά λευκοκύτταρα και τα κύτταρα του μυελού των οστών ενώ το δεύτερο στην καρδιακές, πνευμονικές, σπληνικές, νεφρικές, δερματικές και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ρύθμιση της έκφρασης των δύο μεταγραφημάτων γίνεται από διαφορετικές ομάδες μεταγραφικών παραγόντων. Για το μεταγράφημα 1 εμπλέκονται ο πυρηνικός παράγοντας κΒ (NF-κΒ), ο μεταγραφικός παράγοντας Sp-1 και το στοιχείο απόκρισης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF-β). Για το μεταγράφημα 2 εμπλέκονται συναινετικές αλληλουχίες για τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-2, στοιχείο ανταποκρινόμενο στα οιστρογόνα (ERE), ο Sp-1, στοιχείο αναστολής του TGF-β (TIE) και στοιχείο ανταποκρινόμενο σε ορμόνες [37,38].

Και για τις δυο περιπτώσεις μεταγραφημάτων κωδικοποιείται μια συγκεκριμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα 342 αμινοξέων. Ο υποδοχέας του PAF παρουσιάζει την συνήθη δομή ενός υποδοχέα συζευγμένου με G πρωτεΐνη (GPCR), έχοντας 7 υδρόφοβες έλικες να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Στο καρβοξυ-τελικό του υποδοχέα που βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα, μια ομάδα καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης λειτουργεί ως σημείο φωσφορυλίωσης των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών κινασών. Οι κινάσες αυτές είναι υπεύθυνες για την ενδοκύτωση και απευαισθητοποίηση του υποδοχέα.

Από υπάρχουσες μελέτες φαίνεται πως, πέραν του PAF, ένα πλήθος μορίων έχει τη δυνατότητα να συνδέεται στον υποδοχέα PAFR. Η σύγκριση διαφόρων μορίων ανάλογων του PAF έδειξε πως η σύνδεση στον υποδοχέα ευνοείται όταν το μόριο έχει στην sn-1 θέση του σκελετού γλυκερόλης έναν αιθερικό δεσμό και στην sn-2 θέση μια μικρή ακυλική αλυσίδα [39]. Επιπλέον, φωσφολιποειδή με οξειδωμένη τουλάχιστον το μικρής αλύσου ακύλιο της sn-2 μπορούν εύκολα να προσδεθούν στον PAFR, και να προκαλέσουν έναν καταρράκτη μηνυμάτων οδηγώντας στην μετάφραση προφλεγμονωδών και προαθηρογόνων γονιδίων [40]. Τέλος, έχει παρατηρηθεί αλληλεπίδραση του υποδοχέα με συστατικά βακτηριακών τοιχωμάτων όπως λιποπολυσακχαρίτες [41] και φωσφορυλοχολίνη [42–44], με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού ως μέρος της φλεγμονώδους απόκρισης.

1.9. Αναστολείς του PAF

Οι αναστολείς του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων μπορεί να προέρχονται είτε από φυσικές πηγές με απομόνωσή τους είτε από σύνθεση στο εργαστήριο. Οι ενώσεις

αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί σε εργαστηριακές μελέτες προκειμένου να διαλευκανθεί ο τρόπος σύνδεσης του PAF στον υποδοχέα και ο μηχανισμός δράσης του συστήματος. Οι αναστολείς χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες ανάλογα με το σημείο δράσης, στους ειδικούς και στους μη ειδικούς αναστολείς του PAF. Οι μη ειδικοί αναστολείς είναι μόρια τα οποία παρεμβάλλονται και αναστέλλουν συγκεκριμένα σημεία του σηματοδοτικού μονοπατιού που προκαλεί ο PAF. Τα μόρια αυτά, όπως για παράδειγμα κάποιοι αναστολείς των G πρωτεϊνών, έχουν τη δυνατότητα να μειώνουν τη δράση του PAF λόγω της αλληλεπίδρασής τους με το σηματοδοτικό μονοπάτι του παράγοντα. Παρόλα αυτά, επειδή δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τον PAF και έχουν μικρή εξειδίκευση, δεν αποτελούν ιδανικές επιλογές για φαρμακευτική χρήση. Όσον αφορά τους ειδικούς αναστολείς του PAF, αυτοί δρουν είτε ανταγωνιστικά είτε μη ανταγωνιστικά και μπορούν επίσης να διαχωριστούν περαιτέρω σε φυσικά και συνθετικά μόρια [5].

1.9.1. Φυσικοί ανταγωνιστές του PAF

Στους φυσικούς ανταγωνιστές του PAF, κυρίαρχη θέση έχουν τα γκινγκολίδια, τα οποία προέρχονται από το δέντρο *Ginkgo Biloba*, το οποίο ευδοκιμεί στην Κίνα. Το εκχύλισμα των φύλλων του φυτού, πλούσιο σε γκινγκολίδια και φλαβονοειδή, είναι πολύ δημοφιλές ως φυτικό ιατρικό σκεύασμα για την αντιμετώπιση του πρώτου σταδίου της νόσου του Alzheimer αλλά και άλλων ασθενειών που οφείλονται στην κακή λειτουργία των αγγείων. Η κύρια δραστική ουσία ονομάζεται BN52021 με πολλαπλές δράσεις όπως ανταγωνιστής του PAF για τον υποδοχέα και αναστολέας της συσσώρευσης αιμοπεταλίων λόγω του PAF [45]. Άλλος ένας φυσικός ισχυρός ανταγωνιστής με κινέζικη προέλευση είναι το kadsurenone (από το βότανο *haifeteng*), ο οποίος μάλιστα έχει χρησιμοποιηθεί και ως μοντέλο για την παραγωγή συνθετικών ανταγωνιστών [46]. Πολλοί ακόμη φυσικοί ανταγωνιστές, λιγότερο ισχυροί, έχουν απομονωθεί από φυτά της Κινέζικης ιατρικής αλλά και από θαλάσσιους οργανισμούς.

1.9.2. Συνθετικοί ανταγωνιστές του PAF

Μια πληθώρα ανταγωνιστών του PAF έχει συντεθεί από ερευνητικές ομάδες και φαρμακευτικές εταιρίες. Αρχικά, η σύνθεση βασίστηκε στη δομή του PAF με σκοπό να κατασκευαστούν δομικά του ανάλογα. Σε αυτά ο κύριος σκελετός είναι είτε ένα μόριο γλυκερόλης, όπως και στο αρχικό μόριο, είτε έχει αντικατασταθεί από μια κυκλική ένωση. Παρόλα αυτά, ιδιαίτερα δημοφιλείς είναι και οι ανταγωνιστές που δε φέρουν δομικές ομοιότητες με τον PAF και μάλιστα υπερτερούν αριθμητικά των δομικά

ανάλογων ανταγωνιστών. Οι πρώτοι, λοιπόν περιλαμβάνουν στα μόρια τους ετεροκυκλικές δομές με sp^2 άζωτο, το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ως δέκτης δεσμών υδρογόνου.

Οι περισσότερες κλινικές δοκιμές με ειδικούς ανταγωνιστές του PAF προσπάθησαν ανεπιτυχώς να δείξουν την αποτελεσματικότητα των μορίων αυτών σε ασθενείς που ταλαιπωρούνται από φλεγμονώδεις νόσους όπως οι αλλεργίες και το άσθμα. Δεδομένων των παραπάνω αποτελεσμάτων η έρευνα έχει επικεντρωθεί σε μόρια που εμφανίζουν διττή δράση. Για το λόγω αυτό προτιμώνται ανταγωνιστές που ταυτόχρονα ανταγωνίζονται όχι μόνο τον PAF αλλά και κάποιον άλλον μεσολαβητή φλεγμονής. Για παράδειγμα, η ρουπαταδίνη δρα αποτελεσματικά ως διπλός ανταγωνιστής για τους υποδοχείς του PAF και της ισταμίνης $H(1)$ και χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις αλλεργικής ρινίτιδας και χρόνιας κνίδωσης [47].

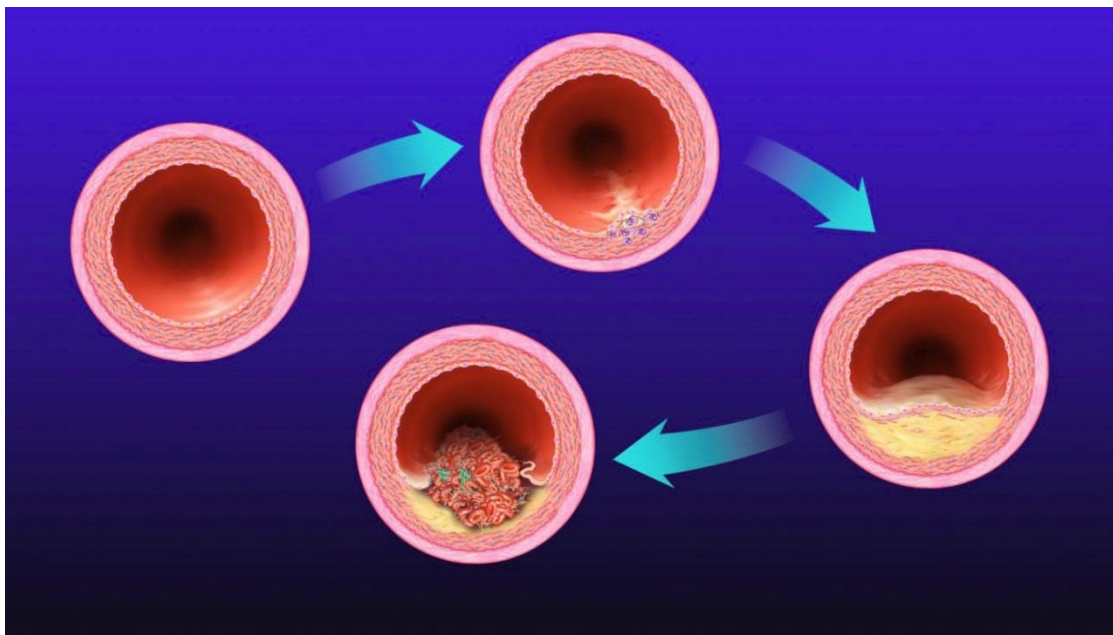
1.9.3. Επίδραση της διατροφής

Δεδομένου ότι ένας ικανοποιητικός αριθμός φυσικών ανταγωνιστών του PAF βρίσκεται σε μεγάλο αριθμό τροφίμων, μπορεί να επιτευχθεί μια πιο φυσική αντί-PAF δράση μέσω της διατροφής. Εκχυλίσματα λιποειδών σε μερικά από τα κυριότερα τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής (ελαιόλαδο, κρασί, μέλι, γιαούρτι, ψάρι) εμφανίζουν σημαντική *in vitro* δράση έναντι της πρόκλησης συσσώρευσης αιμοπεταλίων από τον PAF. Οι μελέτες αυτές επικεντρώνονται στο ελαιόλαδο [48–51], το κρασί [52–54], το μέλι [55], το γιαούρτι [56] και το ψάρι [57–61]. Η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της δομής αυτών των φυσικών αναστολέων έδωσε μια πληθώρα ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων περίπλοκων γλυκολιποειδών, παραγώγων γαγγλιοζιτών, φαινολικών ενώσεων και γλυκοζιτών. Πέραν των παραπάνω, τελευταία έχουν εντοπιστεί και ενδογενείς αναστολείς του PAF όπως η καρδιολιπίνη η οποία μπορεί να ρυθμίσει την δράση του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων *in vivo*. Τα παραπάνω δεδομένα δείχνουν πως η λήψη των παραπάνω από τη διατροφή, καθώς και οι ενδογενείς μορφές ανταγωνιστών, μπορούν να λειτουργήσουν ως εναλλακτικοί ρυθμιστές του μεταβολισμού του PAF, απουσία φαρμακευτικής αγωγής [62]. Επιπλέον, σε μια πολύ πρόσφατη κλινική μελέτη αναδείχθηκε η αντίστροφη συσχέτιση των υγιεινών διατροφικών συνηθειών στα πρότυπα της μεσογειακής διατροφής, με τα επίπεδα PAF και την δραστηριότητα των βιοσυνθετικών ενζύμων του [63].

Κεφάλαιο 2: ΡΑΦ και Αθηροσκλήρωση

2.1. Ορισμός της Αθηροσκλήρωσης

Τη σήμερον ημέρα, οι καρδιακές παθήσεις και τα εγκεφαλικά επεισόδια αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία θανάτου στις δυτικές κοινωνίες. Κύρια αιτία της εμφάνισης αυτών των νοσημάτων, είναι η αθηροσκλήρωση, μια συνηθισμένη πάθηση του οργανισμού, την οποία εισήγαγε ως όρο ο Marchand το 1933 προκειμένου να περιγράψει τη συσχέτιση του εκφυλισμού των λιποειδών με την σκλήρυνση των αρτηριών. Η αθηροσκλήρωση προκαλείται με την απόθεση διαφόρων ουσιών και κυττάρων του αίματος στα τοιχώματα των αρτηριών. Ένα στρώμα από λιποειδή, μόρια χοληστερόλης (LDL), ασβέστιο και ινώδη ιστό (προϊόν ιστικής αποδόμησης) καθώς και αιμοπετάλια και μονοκύτταρα προσκολλάται στα τοιχώματα και με τον καιρό αυξάνεται σε πάχος κάνοντας τις αρτηρίες πιο στενές και άκαμπτες. Η κατάσταση αυτή δημιουργεί προβλήματα στην κυκλοφορία του αίματος.



Εικόνα 2.1: Τα στάδια σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας και του θρόμβου.

Σε περίπτωση που η αθηρωματική πλάκα διαρραγεί σε κάποιο σημείο, αποκαλύπτεται το αρτηριακό τοίχωμα και ενεργοποιείται ο μηχανισμός επούλωσης τραύματος (αθηροθρόμβωση). Κατά τη διαδικασία αυτή πραγματοποιείται συσσώρευση αιμοπεταλίων με τη βοήθεια του ινωδογόνου που κυκλοφορεί ως ευδιάλυτο μόριο στο αίμα ούτως ώστε να σχηματιστεί ένα προστατευτικό ινώδες πλέγμα στο σημείο της

ρήξης. Στην ουσία προκαλείται θρόμβωση του αίματος (blood clotting) καθώς παγιδεύονται ερυθρά αιμοσφαίρια και άλλα μόρια στο ινώδες. Ανάλογα με το σημείο της θρόμβωσης μπορεί να προκληθούν σοβαρά προβλήματα στον οργανισμό, έως και θάνατος. Ενδεικτικά, η αθηροσκλήρωση ευθύνεται για παθήσεις όπως η στεφανιαία νόσος, τα ανευρύσματα, η περιφερειακή αποφρακτική αρτηριοπάθεια και η νόσος των καρωτίδων.

Ποικίλοι παράγοντες μπορούν να οδηγήσουν σε μια πρώιμη εμφάνιση της πάθησης καθώς και ενίσχυσή της. Η αυξημένη πρόσληψη χοληστερόλης μέσω της διατροφής σε συνδυασμό με μεγάλη κατανάλωση αλκοόλ και έλλειψη άσκησης ευνοούν την δημιουργία αθηρωματικής πλάκας, ιδίως σε υπέρβαρα άτομα. Επιπλέον, η συνύπαρξη άλλων παθήσεων όπως ο σακχαρώδης διαβήτης και η υπέρταση, καθώς και ένα οικογενειακό ιστορικό σε αθηροσκλήρωση αυξάνουν τις πιθανότητες εμφάνισής της σε άτομα μέσης ηλικίας ή και νεότερα. Τέλος, το κάπνισμα φαίνεται να ευνοεί την ενίσχυση της αθηρωματικής πλάκας εφόσον τα τοξικά παραπροϊόντα που περνούν στο αίμα βοηθούν στην οξείδωση της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), η οποία είναι κύρια υπεύθυνη στον σχηματισμό της πλάκας.

2.2. Παθογένεση της Αθηροσκλήρωσης

Η επιστημονική κοινότητα έχει προτείνει αρκετές θεωρίες για την αιτιολογία της εμφάνισης της αθηροσκλήρωσης χωρίς όμως να έχει διαλευκανθεί πλήρως ο μηχανισμός. Το 1977 ο Ross προτείνει μια αρκετά ολοκληρωμένη θεωρία για την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας είναι η απόκριση του αγγειακού τοιχώματος σε κάποιον τραυματισμό [64]. Η υπόθεση αυτή υποδηλώνει ότι ακόμη και πριν την ανάπτυξη της λιπαρής επίστρωσης, ένας τραυματισμός στο ενδοθήλιο που επενδύει το αιμοφόρο αγγείο θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη βλάβης. Αρχικά, θεωρήθηκε απαραίτητη την απογύμνωση του ενδοθηλίου από τραυματισμό προκειμένου να υπάρξει αθήρωμα, αλλά πιο πρόσφατες έρευνες τονίζουν τη σημασία της ενδοθηλιακής δυσλειτουργίας [65]. Συμφώνα με αυτή τη θεωρία η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι επαρκής προκειμένου να αυξηθεί η διαπερατότητά του σε λιποπρωτεΐνες και να προκληθεί η δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.

Τα πρώιμα στάδια της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας χαρακτηρίζονται από ενδοθηλιακή δυσλειτουργία και πιθανότατα είναι αποτέλεσμα της υπερέκφρασης μορίων προσκόλλησης λόγω της τυρβώδους ροής που δημιουργείται όταν υπάρχει δυσμενές λιπιδαιμικό προφίλ στον ορό. Φυσιολογικά, δεν υπάρχει κάποια

αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του αίματος και των ενδοθηλιακών. Αν όμως το σύστημα διεγερθεί προς μια αθηρογόνο πορεία, τότε πληθώρα κυττάρων και μορίων αλληλεπιδρά με τα τοιχώματα των αρτηριών. Η αυξημένη κυτταρική συγκόλληση που παρατηρείται, σε συνδυασμό με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία, δίνουν το έναυσμα για την στρατολόγηση φλεγμονωδών κυττάρων, παραγωγή μηνυματοφόρων κυτταροκινών καθώς και πρόσληψη λιποειδών στην σχηματιζόμενη αθηρωματική πλάκα. Αποτέλεσμα των παραπάνω είναι η αύξηση διαπερατότητας του ενδοθηλίου που συνεπάγεται τις ευνοϊκές συνθήκες για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας.

Εκτός τον παραπάνω, μετά από επισταμένη έρευνα στους μηχανισμούς σχηματισμού των αφρωδών κυττάρων, υποστηρίχτηκε η θεωρία της οξειδωτικής μετατροπής [62]. Στην προκειμένη περίπτωση, τα μόρια κλειδιά της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας είναι οι οξειδωμένες μορφές των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας, ox-LDL.

2.3. PAF και Δημιουργία Αθηρογένεσης

Μια νεότερη θεωρία τοποθετεί στο επίκεντρο τον παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων, PAF, ως το μόριο-κλειδί στους μηχανισμούς που προκαλούν θρόμβωση, φλεγμονή και οξείδωση [62].

Οι συνηθέστεροι παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης, όπως η χρόνια φλεγμονή, ο διαβήτης, το κάπνισμα και η οξειδωμένη LDL, συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα PAF και PAF αναλόγων.

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων ευνοεί την οξείδωση της LDL μέσω της ενεργοποίησης των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων προς παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου [66]. Κατά την οξείδωση της LDL παράγεται εκ νέου PAF [67]. Τα φλεγμονώδη ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν PAF, ο οποίος εκτίθεται στην επιφάνειά τους και προσελκύει λευκοκύτταρα ώστε να προσκολληθούν στο ενδοθήλιο [68]. Επιπλέον, στην ox-LDL απενεργοποιείται σταδιακά η PAF-AH [67,69], η οποία δρα προστατευτικά, ενάντια στη ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [70–72].

Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν ταχύτατα μόρια PAF τα οποία εκτίθενται στην επιφάνεια των κυττάρων και προκαλούν θετική παλίνδρομη ρύθμιση (positive feedback control). Επιπλέον με την ενεργοποίηση των κυττάρων απελευθερώνονται κυτταροκίνες και η διαδικασία ενισχύεται μέσω της παλίνδρομης

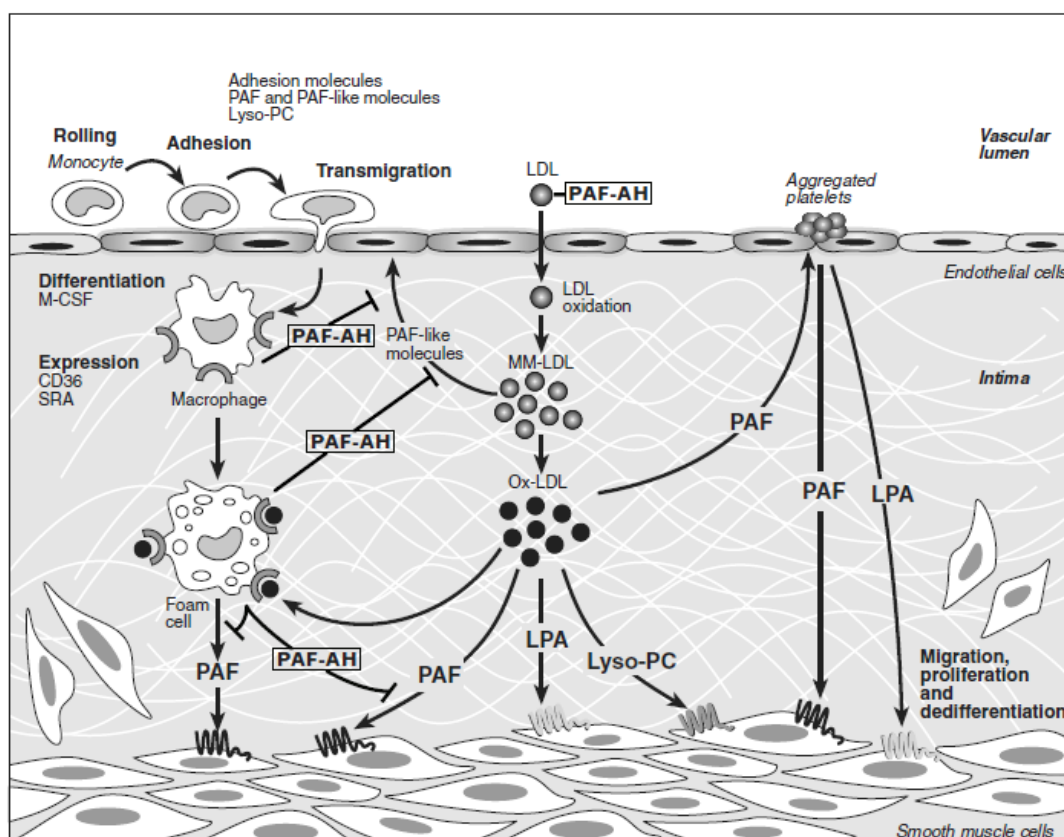
ρύθμισης. Η ενεργοποίηση του ενδοθηλίου οδηγεί σε αυξημένη διαπερατότητά του σε μακρομόρια όπως οι LDL, ox-LDL αλλά και κύτταρα του αίματος [73].

Διάφοροι παράγοντες που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια της κυτταρικής ενεργοποίησης προσελκύουν χημικά τα κύτταρα του αίματος στο ενδοθήλιο και ξεκινούν μια διαδικασία αθηροσκλήρωσης. Μετά την προσκόλληση των αιμοπεταλίων μεταξύ τους, μέσω ινωδογόνου, τα κύτταρα σταθεροποιούνται με κολλαγόνο, τον παράγοντα von Willebrand κ.ά. και σχηματίζουν μαζί με τα λευκοκύτταρα ένα στρώμα πάνω στο δυσλειτουργικό ενδοθήλιο. Τα ήδη προσκολλημένα αιμοπετάλια συνεισφέρουν και αυτά στην παραγωγή PAF ευνοώντας την προσκόλληση και των ουδετερόφιλων στο ενδοθήλιο ενώ η ox-LDL προάγει την προσκόλληση των μονοκυττάρων [5].

Τα λευκοκύτταρα μετακινούνται στον υποενδοθηλιακό χώρο (μετανάστευση) και τα μονοκύτταρα διαφοροποιούνται σε μακροφάγα. Η αυξημένη διαπερατότητα του δυσλειτουργικού ενδοθηλίου επιτρέπει σε μεγάλα μόρια όπως οι οξειδωμένες LDL να μεταναστεύσουν στον υποενδοθηλιακό χώρο μέσω των κυτταρικών κόμβων-συνδέσεων [73]. Η οξειδωμένη LDL προσλαμβάνεται από τα μακροφάγα και σχηματίζονται αφρώδη κύτταρα. Με τη σειρά τους, μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα, συνεισφέρουν στην παραγωγή PAF μέσω της φαγοκυτταρικής τους δραστηριότητας, δημιουργώντας έναν προφλεγμονώδη, προαθηρογόνο και προθρομβωτικό υποενδοθηλιακό χώρο [74].

Το αρχικό σήμα λόγω της κυκλοφορίας του PAF στο αίμα, ενισχυμένο από τον PAF που παράγεται από τα μακροφάγα και τα αφρώδη κύτταρα, διεγείρει τη μεταγραφή του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGF) στα μονοκύτταρα με αποτέλεσμα να συμβαίνει πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων και να καταστρέφεται η υποενδοθηλιακή δομή [75]. Καθώς συσσωρεύονται τα αφρώδη κύτταρα αυξάνεται το πάχος του έσω χιτώνα και σχηματίζεται μια λιπαρή επίστρωση, η οποία και είναι το πρώτο στάδιο της αθηροσκλήρωσης (ορατή με γυμνό μάτι).

Το λιπαρό στρώμα που σχηματίζεται καλύπτεται από ένα ινώδες περίβλημα και περιέχει αφρώδη κύτταρα, λεμφοκύτταρα, μονοκύτταρα, μακροφάγα, τα πολλαπλασιασμένα λεία μυϊκά κύτταρα, κυτταρικά θραύσματα, ασβέστιο και χοληστερόλη. Η φαγοκυτταρική ενεργοποίηση των αφρωδών κυττάρων έχει ως αποτέλεσμα να παράγεται PAF μέσα στο λιπαρό στρώμα και να προκαλούνται προχωρημένες βλάβες [76].



Εικόνα 2.2: Η εμπλοκή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας [77].

Μέσα στη βλάβη αυτή, η συνεχιζόμενη φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρική νέκρωση. Επίσης συνεχίζεται η προσθήκη μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων στο λιπαρό στρώμα ενώ ταυτόχρονα εκκρίνονται κυτταροκίνες, αυξητικοί παράγοντες και πρωτεολυτικά ένζυμα. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε εστιασμένη νέκρωση μέσα στην βλάβη και σε αυτοκαταλυτική επέκταση του φαινομένου. Σε αυτό το στάδιο σχηματίζεται η γνωστή ινώδης πλάκα. Όσο αυξάνεται η φλεγμονή η κυκλοφορία του αίματος εμποδίζεται και μειώνεται [78].

Στις προχωρημένες περιπτώσεις ύπαρξης ινώδους πλάκας υπάρχει κίνδυνος να σκιστεί το παραμορφωμένο ενδοθήλιο κυρίως στα λεπτά σημεία του ινώδους περιβλήματος και να προκληθεί αιμορραγία, θρόμβωση και ισχαιμία, η οποία είναι και η πρώτη παράμετρος που οδηγεί σε κλινική διαπίστωση αυτής της χρόνια εξελισσόμενης διαδικασίας. Τέλος, εφόσον επεκτείνεται η θρόμβωση και μειώνεται, έως και σταματάει, η κυκλοφορία του αίματος, συμβαίνει οξεία απόφραξη του αρτηριακού αυλού.

Κεφάλαιο 3: Κατανάλωση ψαριού και καρδιαγγειακά νοσήματα

3.1. Το ψάρι στη διατροφή

Μέσα από μελέτες οι οποίες συσχέτισαν τις διατροφικές συνήθειες με τους παράγοντες κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου, αναδείχθηκε, μεταξύ άλλων, η συχνή κατανάλωση των ψαριών ως ευεργετική για την καρδιαγγειακή υγεία. Η αξία του ψαριού στη διατροφή φάνηκε από πολύ νωρίς μέσα από τις πρώτες επιδημιολογικές μελέτες που αφορούσαν στην κατανάλωση του σε σχέση με την επίπτωση της στην καρδιαγγειακή νόσο. Λαοί με παραδοσιακά μεγάλη κατανάλωση ψαριού χαρακτηρίζονται από μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και θανάτου από αυτή. Τη δεκαετία του 1980 ιδιαίτερα δημοσιεύτηκαν μελέτες για τους Εσκιμώους [79,80], αλλά και η άκρως δημοφιλής μελέτη των Επτά Χωρών [81], οι οποίες προέβαλλαν την καλύτερη καρδιαγγειακή υγεία των λαών για τους οποίους το ψάρι αποτελεί βασικό στοιχείο της διατροφής (Ελλάδα, Ιαπωνία). Περαιτέρω μελέτες έδειξαν πως η ωφέλιμη δράση οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη των ω-3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου. Τα δεδομένα αυτά οδήγησαν την Αμερικάνικη Εταιρία Καρδιολογίας (AHA) να συμπεριλάβει τη συχνή κατανάλωση (2φορές/βδομάδα) ψαριού, και μάλιστα λιπαρού, στις συστάσεις για τη γενική υγεία και την πρωτογενή πρόληψη της στεφανιαίας νόσου. Σε ασθενείς με ήδη εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο συνιστάται η καθημερινή πρόσληψη 1g EPA και DHA [82]. Την σημασία της κατανάλωσης ψαριών για την προστασία από τα καρδιαγγειακά νοσήματα τονίζει και η Ευρωπαϊκή Καρδιολογική Εταιρία (ESC) συνιστώντας την κατανάλωση τουλάχιστον δύο γευμάτων την εβδομάδα με το ένα να αποτελείται από λιπαρό ψάρι [83].

Μια πολύ πρόσφατη ανασκόπηση έρχεται να επιβεβαιώσει την καλή φήμη της κατανάλωσης ψαριών τονίζοντας μάλιστα ότι η ευεργετική τους δράση ενισχύεται στα πλαίσια μιας μεσογειακού τύπου διατροφής [84].

Τα τελευταία χρόνια, πλήθος επιδημιολογικών και κλινικών μελετών υπογραμμίζουν την αρνητική συσχέτιση της διαιτητικής πρόσληψης ω-3 λιπαρών οξέων, μέσω της κατανάλωσης ψαριών, με τη καρδιαγγειακή θνητότητα.

3.2. Επιδημιολογικές Μελέτες

3.2.1. Συγχρονικές Μελέτες

Η συσχέτιση της κατανάλωσης ψαριού με διάφορους δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου αναδεικνύονται μέσα από αρκετές συγχρονικές μελέτες, οι οποίες όμως αναφέρονται στο γενικότερο διατροφικό σχήμα και όχι ειδικά στο ψάρι. Επιπλέον οι περισσότερες από αυτές αποτελούν στην πραγματικότητα τα επιδημιολογικά δεδομένα της έναρξης κάποιας προοπτικής μελέτης. Παρόλα αυτά αξίζει να αναφερθούν ενδεικτικά μερικές από αυτές.

Λαμβάνοντας δεδομένα από την έναρξη της Nurses' Health Study, οι Lopez et al. [85] συσχέτισαν την διατροφική πρόσληψη των ω-3 λιπαρών οξέων με δείκτες φλεγμονής και ενδοθηλιακής ενεργοποίησης σε 732 από τις γυναίκες που συμμετείχαν στη μελέτη. Η στατιστική ανάλυση ανέδειξε την μείωση των δεικτών αυτών με την αύξηση της πρόσληψης των ω-3 λιπαρών οξέων. Ειδικότερα, η ομάδα με την υψηλότερη πρόσληψη είχε μειωμένη την CRP κατά 29%, την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) κατά 23% ενώ 7-10% μειώθηκαν και οι Ε-σελεκτίνη και οι παράγοντες προσκόλλησης sICAM-1 και sVCAM-1.

Παρόμοια αποτελέσματα ήλθαν και από την ανάλυση των δεδομένων των εθελοντών κατά την εισαγωγή τους στη μελέτη ATTICA η οποία πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα [86]. Περίπου 1500 υγιείς άντρες και άλλες τόσες γυναίκες επιλέχθηκαν προκειμένου να συσχετιστούν οι διατροφικές συνήθειες με την καρδιαγγειακή τους υγεία. Η μείωση της CRP και της IL-6 άγγιξε το 33% για την ομάδα με την υψηλότερη κατανάλωση ψαριού (>300 γραμμάρια εβδομαδιαίως) και ο TNF-α έπεσε κατά 21%. Επιπλέον, στατιστικά σημαντική μείωση των παραπάνω δεικτών παρατηρήθηκε και στις ομάδες με πιο μέτρια κατανάλωση.

3.2.2. Προοπτικές Μελέτες

Το 1986 ξεκινά μια μελέτη σε σχεδόν 45.000 υγιείς εθελοντές με σκοπό να δειχθεί η επίδραση της αυξημένης κατανάλωσης ψαριών και της διαιτητικής πρόσληψης ω-3 λιπαρών οξέων στον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου [87]. Στα 6 χρόνια του επανέλεγχου δεν εμφανίζεται σημαντική θετική επίδραση της αυξημένης κατανάλωσης ψαριού από 1-2 μερίδες/εβδομάδα σε 5-6 μερίδες/εβδομάδα.

Όσον αφορά τη μελέτη ATTICA, που αναφέρθηκε και προηγουμένως, στον πενταετή επανέλεγχο πραγματοποιήθηκε συσχέτιση διάφορων διατροφικών σχημάτων με τον

καρδιαγγειακό κίνδυνο [88] και αναδείχθηκε ως ιδανικότερο σχήμα εκείνο που βασιζόταν σε δημητριακά, μικρά ψάρια, γαλέτες και ελαιόλαδο. Οι εθελοντές που ακολουθούσαν αυτό το διατροφικό σχήμα είχαν κατά μέσω όρο 28% μείωση κινδύνου για εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων.

Με την πάροδο των χρόνων και την πραγματοποίηση πληθώρας επιδημιολογικών μελετών τα αποτελέσματα φαίνεται να αλλάζουν. Σε μια μετα-ανάλυση των He K. et al. το 2004 σχετικά με 11 μελέτες αναδείχθηκε ότι αυξάνοντας την πρόσληψη ψαριών μειώνεται ο σχετικός κίνδυνος για θνητότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα [89]. Πιο συγκεκριμένα, κάθε 20γρ παραπάνω ημερήσια πρόσληψη ψαριού δύναται να μειώσει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακή θνητότητα κατά 7%. Πέντε χρόνια μετά οι ερευνητές επανέρχονται με μια ανασκόπηση συγκρίνοντας την κατανάλωση των ψαριών με την πρόσληψη συμπληρωμάτων ω-3 λιπαρών οξέων [90]. Τα στοιχεία συνηγόρησαν στην υπεροχή του ψαριού για την καρδιαγγειακή προστασία πιθανότατα λόγω και άλλων ευεργετικών συστατικών των ψαριών.

Το 2012 μια μετα-ανάλυση σχετικά με την καρδιαγγειακή ανεπάρκεια επίσης συσχετίζει αρνητικά την κατανάλωση ψαριού και τον κίνδυνο εμφάνισης ανεπάρκειας [91]. Λίγο πιο πρόσφατα το Βρετανικό Ίδρυμα Διατροφής δημοσίευσε μια ανασκόπηση για την επίδραση του ψαριού στην υγεία [92]. Αναλύοντας ένα μεγάλο μέρος των μέχρι τότε ανασκοπήσεων, οι Weichselbaum et al κατέληξαν στο ότι η προστατευτική δράση της κατανάλωσης ψαριών εμφανίζεται κυρίως όσον αφορά την καρδιαγγειακή θνητότητα ενώ δεν φαίνεται σημαντική ευεργετική δράση ως προς τα καρδιαγγειακά συμβάματα. Επιπλέον εμφανίζεται μια ήπια αλλά στατιστικά σημαντική ευεργετική επίδραση στην περίπτωση των αγγειοεγκεφαλικών συμβαμάτων. Η ερευνητική ομάδα συμπληρώνει πως η πραγματοποίηση σχετικών μελετών σε λαούς με παραδοσιακή κατανάλωση ψαριού ενδέχεται να μη δώσει στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα καθώς ακόμη και οι εθελοντές με τη μικρότερη πρόσληψη πιθανότατα λαμβάνουν την επαρκή ευεργετική ποσότητα λιπαρών οξέων. Επιπρόσθετα, στην πλειοψηφία των μελετών το ψάρι θεωρείται ως μία διατροφική κατηγορία και δεν διαχωρίζεται σε άλιπο και λιπαρό. Δεδομένου ότι το δεύτερο εμφανίζει κυρίως ευεργετική δράση λόγω των επαρκών ω-3 λιπαρών οξέων, προτείνεται ο παραπάνω διαχωρισμός για σωστότερη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων. Ως εκ τούτου οι μελλοντικές μελέτες ενδείκνυται να λαμβάνουν υπόψη τους δύο αυτούς παράγοντες.

3.3. Κλινικές Μελέτες

Με τις υποσχόμενες θετικές ενδείξεις για την συχνή κατανάλωση ψαριών από τις επιδημιολογικές μελέτες, η επιστημονική κοινότητα σχεδιάζει κλινικές μελέτες προκειμένου να παρατηρήσει πιο προσεκτικά αυτήν την ευεργετική δράση. Οι μελέτες αυτές είτε περιορίζονται στις διατροφικές συστάσεις προς τις ομάδες παρέμβασης είτε περιλαμβάνουν διατροφική παρέμβαση με συγκεκριμένα γεύματα καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Στις μελέτες συστάσεων αν και υπάρχει συμμετοχή μεγαλύτερου αριθμού εθελοντών, είναι δυσχερέστερος ο έλεγχός τους ως προς την προσκόλληση στις διατροφικές συστάσεις που τους δίνονται. Αντίθετα στις μελέτες διατροφικής παρέμβασης, όπου τα γεύματα της παρέμβασης παρέχονται στους εθελοντές, υπάρχει δυνατότητα για αποτελεσματικότερο έλεγχο και συνεπώς μεγαλύτερη προσκόλληση των εθελοντών.

Κατά τη βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις εν λόγω μελέτες, έγινε αναζήτηση στις βάσεις δεδομένων Scopus και PubMed με λέξεις κλειδιά όπως fish consumption, clinical trial, inflammation, atherosclerosis, cardiovascular disease, thrombosis. Λόγω της εξειδίκευσης της αναζήτησης δεν υπήρξε περιορισμός στο έτος δημοσίευσης αλλά δόθηκε βάρος στις μελέτες που βασίζονταν στην διατροφική παρέμβαση με συγκεκριμένα γεύματα και όχι απλώς συστάσεις. Παρόλα αυτά δεν λήφθηκαν υπόψη οι μελέτες που περιελάμβαναν διατροφικά σχήματα με σκοπό την απώλεια βάρους ούτε εκείνες που χορηγούσαν μόνο ω-3 μέσω ιχθυελαίων κατά την παρέμβαση.

3.3.1. Μελέτες συστάσεων

Από τις πιο δημοφιλείς μελέτες διατροφικών συστάσεων είναι η μελέτη DART (Diet and Reinfarction Trial) η οποία ξεκίνησε το 1983 με 2033 εθελοντές που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε 7 συνολικά ομάδες όπου λάμβαναν χωριστά ή συνδυαστικά διατροφικές συμβουλές σχετικά με αυξημένη κατανάλωση ψαριών-κυρίως λιπαρών- και φυτικών ινών και μείωση του ποσοστού προσλαμβανόμενου λίπους. Μετά από δύο χρόνια παρακολούθησης και συμβουλευτικής οι εθελοντές επανεξετάστηκαν ως προς τα θανατηφόρα ισχαιμικά επεισόδια αλλά και την ολική θνητότητα μεταξύ άλλων και φάνηκε πως η αυξημένη κατανάλωση ψαριών έδρασε προστατευτικά, μειώνοντας τον κίνδυνο για τα παραπάνω κατά 16% και 29% αντίστοιχα [93].

Κάνοντας ένα βήμα παραπέρα, οι ερευνητές αποφάσισαν να κάνουν έναν επανέλεγχο το 2000 και παρατήρησαν πως περίπου οι μισοί από τους αρχικούς εθελοντές είχαν

αποβιώσει, χωρίς να υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά σε αυτούς που είχαν λάβει την διατροφική συμβουλή για την αύξηση της κατανάλωσης ψαριών σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Το αποτέλεσμα αυτό αποδόθηκε στο γεγονός ότι στα ενδιάμεσα έτη δεν έγινε καμία άλλη συλλογή πληροφοριών για τους εν λόγω εθελοντές και δεν υπήρχαν ακριβή στοιχεία για τη μεταβολή των διατροφικών τους συνηθειών μετά την διακοπή της αρχικής παρέμβασης. Επιπλέον, υποστηρίχτηκε και η υπόθεση πως η αυξημένη κατανάλωση ψαριών αποδίδει προστασία στον καταναλωτή βραχυχρόνια και η ευεργετική δράση τους χάνεται όσο ο ασθενής απομακρύνεται από αυτή τη διατροφική συνήθεια [94].

Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης DART το 1989, η ερευνητική ομάδα του Michael L. Burr πραγματοποιεί εκ νέου τη μελέτη σε ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή για στηθάγχη αλλά αυξάνει κατά πολύ το χρόνο παρακολούθησης στα 3-9 έτη (Diet and Angina Randomized Trial, DART-2) [95]. Τα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα με αυτά της πρώτης μελέτης καθώς δεν εμφανίζεται καμία ευεργετική επίδραση από την αυξημένη κατανάλωση ψαριού ενώ μάλιστα γίνεται συσχέτιση της πρόληψης ω-3 λιπαρών οξέων (κάψουλες) με αυξημένο κίνδυνο για καρδιακό ή ξαφνικό θάνατο. Οι πιθανότερες εξηγήσεις για τα παραπάνω είναι πως η φαρμακευτική αγωγή καταρχάς εφησυχάζει τους ασθενείς και επομένως δεν νιώθουν επιτακτική ανάγκη να αλλάξουν τρόπο ζωής και διατροφικές συνήθειες με αποτέλεσμα να επηρεάζεται το δείγμα της μελέτης. Επιπλέον έχει φανεί πως πολλά θρεπτικά συστατικά της διατροφής αλληλεπιδρούν με ορισμένα φάρμακα που δίνονται σε καρδιαγγειακούς ασθενείς με διαφορετικό τρόπο όσον αφορά το φάρμακο και το θρεπτικό συστατικό. Συνέπεια αυτού είναι η διαφορετική επίδραση μιας διατροφικής παρέμβασης μεταξύ ασθενών που λαμβάνουν διαφορετική θεραπεία.

3.3.2. Μελέτες παρέμβασης

Παρεμβάσεις με ψάρι

Η ιστορία των κλινικών παρεμβάσεων με ψάρι ξεκινάει την δεκαετία του 1980 όταν η Margaret Thorngren και οι συνεργάτες της πραγματοποιούν δύο σχετικές κλινικές μελέτες στη Σουηδία. Στην πρώτη παρέμβαση οι εθελοντές αντικαθιστούν ένα μέρος της συνηθισμένης τους διαίτας με ψάρι προκειμένου να λαμβάνουν 2-3 γραμμάρια EPA και DHA ημερησίως. Μετά από 11 εβδομάδες υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση του χρόνου αιμορραγίας των εθελοντών (42%) καθώς και μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων προκαλούμενης είτε από κολλαγόνο είτε από ADP [96]. Τα αποτελέσματα

αυτά επιβεβαιώθηκαν 3 χρόνια μετά στη δεύτερη μελέτη κατά την οποία οι εθελοντές κατανάλωναν επιπλέον της διατροφής τους 150 γραμμάρια λιπαρού ψαριού ημερησίως, κυρίως ρέγγας, σολομού ή σκουμπριού [97]. Επιπρόσθετα, βρέθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση της κατανάλωσης ψαριού και της παραγωγής θρομβοξάνης A_2 με μέτρηση της συγκέντρωσης της δεύτερης σε πηγμένο αίμα. Η μειωμένη παραγωγή της TxA_2 διατηρήθηκε έως και 8 εβδομάδες μετά το πέρας της παρέμβασης σε αντίθεση με το χρόνο αιμορραγίας ο οποίος επανήλθε σταδιακά στα αρχικά επίπεδα.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1980, οι Atkinson et al [98] πραγματοποίησαν μια παρέμβαση 4 εβδομάδων όπου 8 εθελοντές κατανάλωναν 750 γραμμάρια πέστροφα την ημέρα ως αντικατάσταση όλων των ζωικών προϊόντων. Παρά τη μεγάλη ημερήσια πρόσληψη ψαριού μόνο στην περίπτωση ενεργοποίησης της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης από αραχιδονικό οξύ φάνηκε πτώση των τιμών στο τέλος της παρέμβασης. Οι ερευνητές απέδωσαν το γεγονός αυτό στο ότι δε χρησιμοποιήθηκε επαρκώς λιπαρό ψάρι όπως σε αντίστοιχες μελέτες. Μάλιστα, στην περίπτωση του κολλαγόνου χρειάστηκε μικρότερη ποσότητα ώστε να επιτευχθεί συσσώρευση. Τέλος, παρατηρήθηκε και αύξηση του χρόνου αιμορραγίας από τα μέσα της παρέμβασης. Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί πως δεν υπήρξε ομάδα ελέγχου στη μελέτη, και ως εκ τούτου δεν γίνεται σύγκριση αποτελεσμάτων με κάποια άλλη ομάδα.

Την ίδια περίοδο οι Van Houwelingen et al πραγματοποίησαν μια μελέτη 8 εβδομάδων οι 2 πρώτες εκ των οποίων λειτούργησαν ως περίοδος προσαρμογής με τους 84 εθελοντές να καταναλώνουν 135 γραμμάρια πάστα κρέατος ημερησίως. Στη συνέχεια χωρίστηκαν σε δύο ομάδες με την πρώτη να συνεχίζει την κατανάλωση του κρέατος (ομάδα ελέγχου) και τη δεύτερη να καταναλώνει αντ' αυτού 135 γραμμάρια πάστα από σκουμπρί ημερησίως (ομάδα παρέμβασης). Ο χρόνος αιμορραγίας αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά μόλις από την τρίτη εβδομάδα της παρέμβασης και διατηρήθηκε έως το τέλος [99] όπου και υπήρξε στατιστικά σημαντική μείωση του αριθμού αιμοπεταλίων χωρίς αυτό να συσχετίζεται με τον αυξημένο χρόνο αιμορραγίας. Επιπλέον, παρατηρήθηκε μείωση των τριακυλογλυκερολών, της διαστολικής και συστολικής πίεσης και μια τάση αύξησης της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας (HDL) [99,100]. Παράλληλα, μετρήθηκε πληθώρα αιμοστατικών παραμέτρων όμως δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική επίδραση της διατροφικής παρέμβασης σε αυτές, πλην ίσως της αύξησης στο παράγοντα X (factor X) [101]. Υπήρξε επίσης μια μικρή επίδραση της παρέμβασης με ψάρι στο μεταβολισμό των εικοσανοειδών με πιθανή μείωση της δραστηριότητας των

αιμοπεταλίων καθώς και στατιστικά σημαντικής μείωσης της θρομβοξάνης B_2 κατά την πήξη του αίματος [102]. Τέλος, σε ένα μέρος των παραπάνω εθελοντών διενεργήθηκε και μέτρηση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (με κολλαγόνο) αναδεικνύοντας μια ήπια αλλά στατιστικά σημαντική αναστολή της στην περίπτωση των εθελοντών που κατανάλωναν το σκουμπρί [103,104].

Παράλληλα, οι Agren et al πραγματοποίησαν επίσης δύο μελέτες στη Φινλανδία προκειμένου να αναδείξουν αρνητική συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης ψαριού και της θρόμβωσης. Στην πρώτη μελέτη συμμετείχαν 43 υγιείς εθελοντές οι οποίοι κατανάλωσαν κατά μέσο όρο 3.7 γεύματα ψαριού εβδομαδιαίως για 15 εβδομάδες [105]. Περίπου οι μισοί δέχτηκαν να μειώσουν και τη συνολική πρόσληψη λίπους παράλληλα με την παρέμβαση. Σε αυτή την ομάδα παρατηρήθηκε μείωση της ολικής χοληστερόλης του ορού ενώ για όλους τους εθελοντές ίσχυσε μείωση των απολιποπρωτεϊνών A_1 και B. Επιπρόσθετα, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση στην παραγόμενη θρομβοξάνη B_2 κατά την πήξη του αίματος και στις δύο ομάδες. Με σκοπό να εμβαθύνουν και στη δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ κατανάλωσης ψαριού και θρόμβωσης, κατά τη διάρκεια της δεύτερης μελέτης, 100 εθελοντές χωρίστηκαν τυχαία σε 4 ομάδες οι οποίες κατανάλωναν 0.9, 1.5, 2.3 και 3.8 γεύματα με ψάρι εβδομαδιαίως [106]. Η πρώτη ομάδα λειτούργησε και ως ομάδα ελέγχου. Όσον αφορά την συσσώρευση αιμοπεταλίων (με κολλαγόνο ή ADP) φάνηκε να μειώνεται στο τέλος της παρέμβασης και μόνο για την ομάδα με την υψηλότερη πρόσληψη ψαριού (η τρίτη ομάδα δε μετρήθηκε). Η μείωση της παραγωγής θρομβοξάνης B_2 και της προσταγλαδίνης $1a$ ήταν στατιστικά σημαντική επίσης μόνο για την τέταρτη ομάδα και μετά τις 12 εβδομάδες παρέμβασης. Σημαντικό εύρημα της μελέτης είναι και η θετική συσχέτιση μεταξύ της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης λόγω της ADP και της παραγωγής θρομβοξάνης B_2 .

Προκειμένου να μελετήσουν την επίδραση διαφορετικών ψαριών σε δείκτες σχετιζόμενους με την καρδιαγγειακή υγεία, οι Gerhard και Patton πραγματοποιούν μαζί με την ερευνητική τους ομάδα μια διασταυρούμενη κλινική δοκιμή συνολικής διάρκειας παρέμβασης 5 εβδομάδων [107,108]. Οι 23 εθελοντές χωρίστηκαν σε τρεις εβδομάδες και κατανάλωσαν κυκλικά 200 γραμμάρια γλώσσα, σολομό και μαύρο μπακαλιάρο (sablefish) για 18 μέρες το καθένα. Μεταξύ των διαφορετικών παρεμβάσεων υπήρξαν 3 εβδομάδες κάθαρσης (washout period). Η θρομβοξάνη B_2 μειώθηκε στατιστικά σημαντικά και για τις τρεις ομάδες. Παρόλα αυτά δεν υπήρξαν άλλες σημαντικές διαφορές όσον αφορά την κατανάλωση γλώσσας. Για τις άλλες δύο παρεμβάσεις

υπήρξε μείωση των τριακυλογλυκερολών και του αραχιδονικού οξέος των αιμοπεταλίων. Επιπλέον παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική πτώση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης τόσο προκαλούμενης από κολλαγόνο (μόνο για την παρέμβαση με το μαύρο μπακαλιάρο) όσο και από ADP (και για τις δύο παρεμβάσεις). Ωστόσο, για τις δύο αυτές παρεμβάσεις εμφανίστηκε αύξηση της LDL-C και της ApoB.

Στατιστικά σημαντική μείωση της θρομβοξάνης B₂ που παράγεται από ενεργοποιημένα με κολλαγόνο αιμοπετάλια παρατηρήθηκε και σε μια άλλη μελέτη που συνέκρινε τρεις διαφορετικές διατροφικές παρεμβάσεις: κόκκινο κρέας, λευκό κρέας ή ψάρι [109]. Η μείωση του θρομβωτικού παράγοντα συνέβη μόνο στην περίπτωση της κατανάλωσης ψαριού και μετρήθηκε μετά από 3 εβδομάδες παρέμβασης. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε και μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από αυτό το διάστημα. Η μελέτη ήταν διασταυρούμενη και συμμετείχαν σε αυτή 29 υγιείς άντρες και γυναίκες.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1990 μια ιαπωνική κλινική μελέτη αναδεικνύει ότι η ευεργετική δράση του ψαριού εμφανίζεται μόνο βραχυχρόνια [110]. Επτά εθελοντές καταναλώνουν για 17 διαδοχικές ημέρες 200-400 γραμμάρια ημερησίως. Η παρέμβαση οδηγεί σε στατιστικά σημαντική αύξηση του όγκου των αιμοπεταλίων και παράλληλα μείωση του αριθμού τους, της συσσώρευσης τους λόγω κολλαγόνου. Επιπλέον παρατηρείται και βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ των εθελοντών με σημαντική μείωση των τριακυλογλυκερολών της ολικής χοληστερόλης και της LDL-C. Οποιαδήποτε ευεργετική δράση που συνέβη κατά τη διάρκεια της παρέμβασης εξαλείφθηκε 2-12 μέρες μετά το πέρας της.

Μερικά χρόνια αργότερα μια ερευνητική ομάδα στην Νορβηγία αποφασίζει να μελετήσει την επίδραση της τροφής των ψαριών στους δείκτες καρδιαγγειακής υγείας των καταναλωτών [111]. Στην μελέτη αυτή, οι 59 εθελοντές είχαν εγκατεστημένη στεφανιαία νόσο και έπρεπε να καταναλώσουν 700 γραμμάρια σολομό σε 5 γεύματα την εβδομάδα για 6 εβδομάδες. Οι εθελοντές χωρίστηκαν σε 3 ομάδες βάσει της ιχθυοτροφής του σολομού που έφαγαν: 1. 100% ιχθυέλαιο, 2. 50% ιχθυέλαιο-50% κραμβέλαιο, 3. 100% κραμβέλαιο. Στην τελευταία ομάδα υπήρξε μόνο στατιστικά σημαντική μείωση της ολικής χοληστερόλης. Στη δεύτερη ομάδα υπήρξε συνολική βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ πλην της HDL-C που δεν άλλαξε στατιστικά σημαντικά ενώ υπήρξε μείωση και του TNF-α. Ο παράγοντας αυτός μειώθηκε και για την ομάδα του ιχθυελαίου (1) μαζί με την ιντερλευκίνη 6 (IL-6), το μόριο προσκόλλησης VCAM-1 και τις τριακυλογλυκερόλες ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση της HDL.

Με ένα πιο περίπλοκο σχεδιασμό οι Moore et al θέλησαν να αναλύσουν την επίδραση της κατανάλωσης ψαριού σε συνδυασμό με τα φυτικά έλαια [112]. Στη μελέτη εντάχθηκαν 134 υπέρβαροι και παχύσαρκοι άντρες και γυναίκες και τους ζητήθηκε να καταναλώσουν 2 μερίδες ψάρι εβδομαδιαίως, λιπαρό (OF) ή άλιπο (WF), με ταυτόχρονη αντικατάσταση των φυτικών ελαίων με κραμβέλαιο (RS) ή ηλιέλαιο (SF). Συνολικά σχηματίστηκαν 5 ομάδες, η μία εκ των οποίων ήταν η ομάδα ελέγχου. Παρότι η παρέμβαση διήρκεσε για 24 εβδομάδες το μόνο στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα ήταν η μείωση των τριακυλογλυκερολών για τους εθελοντές που κατανάλωσαν το λιπαρό ψάρι ανεξαρτήτως του φυτικού ελαίου.

Την επαναφορά του λιπιδαιμικού προφίλ μετά το πέρας μια παρέμβασης μελέτησαν και οι Lara et al [113]. Για τους 48 εθελοντές που κατανάλωναν ημερησίως 125 γραμμάρια σολομό για 4 εβδομάδες βελτιώθηκε η συνολική εικόνα του λιπιδαιμικού τους προφίλ και υπολογίστηκε πως ο κίνδυνος για καρδιαγγειακή νόσο μειώθηκε κατά 25%. Για τους 41 από αυτούς, που δέχθηκαν για 4 εβδομάδες ακόμη να μην καταναλώσουν ψάρι, η ευεργετική επίδραση της παρέμβασης χάθηκε λίγο μετά το τέλος της.

Την επίδραση της κατανάλωσης ψαριού στο μέγεθος των μορίων της HDL ανέδειξαν δύο μελέτες της Lindqvist et al στη Σουηδία. Και στις δύο περιπτώσεις οι εθελοντές κατανάλωσαν είτε 150 γραμμάρια ρέγγα ψητή (ομάδα παρέμβασης) είτε 120 γραμμάρια άπαχο χοιρινό ή 150 γραμμάρια κοτόπουλο (ομάδα ελέγχου) σε σχεδιασμό διασταυρούμενης μελέτης (cross-over). Η ποσότητα του γεύματος αναφέρεται σε γραμμάρια ανά ημέρα ενώ τα γεύματα ήταν 5 μέρες την εβδομάδα. Η πρώτη μελέτη διήρκεσε 4 εβδομάδες και αφορούσε 13 παχύσαρκους εθελοντές οι οποίοι υποβλήθηκαν ανάμεσα στις παρεμβάσεις σε 2 εβδομάδες κάθαρσης (washout) [114]. Η θεωρία της επίδρασης της παρέμβασης στο μέγεθος των HDL επιβεβαιώθηκε καθώς οι εθελοντές που κατανάλωσαν ψάρι όχι μόνο είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερη HDL αλλά και υψηλότερο αριθμό HDL₂ τα οποία θεωρούνται καλύτερα ως προς την εκκαθάριση. Η θετική επίδραση ενισχύθηκε και από τα αποτελέσματα της δεύτερης μελέτης όπου 35 υπέρβαροι εθελοντές επανέλαβαν τον παραπάνω σχεδιασμό για 6 εβδομάδες με 12 εβδομάδες κάθαρσης ανάμεσα στις 2 παρεμβάσεις [115]. Και σε αυτή τη μελέτη αυξήθηκαν οι HDL και HDL₂ αλλά παρατηρήθηκε και στατιστικά σημαντική μείωση του αραχιδονικού οξέος.

Στη μοναδική μελέτη των τελευταίων ετών που αφορούσε την συσσώρευση αιμοπεταλίων και μονοκυττάρων συμμετείχαν 28 υγιείς εθελοντές οι μισοί εκ των οποίων κατανάλωναν 500 γραμμάρια σκουμπρί την εβδομάδα για 4 εβδομάδες ενώ

ακολούθησαν και άλλες 4 εβδομάδες κάθαρσης [116]. Η ομάδα παρέμβασης εμφάνισε περίπου 35% μείωση στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και των μονοκυττάρων αλλά όπως έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες η ευεργετική δράση εξαλείφθηκε λίγο καιρό μετά το πέρας της παρέμβασης. Επιπρόσθετα η ερευνητική ομάδα συσχέτισε αντίστροφα την συγκέντρωση EPA και DHA στο αίμα με την συσσώρευση των εν λόγω κυττάρων.

Η υπεροχή του λιπαρού ψαριού ως προς το άπαχο σχετικά με την HDL αναδείχθηκε από μια άλλη μελέτη όπου συμμετείχαν ασθενείς που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου ή ασταθές ισχαιμικό επεισόδιο και λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή [117–119]. Οι ασθενείς κατανάλωσαν για 8 εβδομάδες λιπαρό ψάρι ή άπαχο ψάρι ή άπαχο κρέας (3 ομάδες με ομάδα ελέγχου αυτή του κρέατος). Η παρέμβαση διήρκησε 8 εβδομάδες και απαιτούσε κατανάλωση 100-150 γραμμάρια ψαριού ανά γεύμα τουλάχιστον 4 φορές την εβδομάδα. Μόνο στην παρέμβαση με το λιπαρό ψάρι αυξήθηκε ο αριθμός και το μέγεθος των HDL μορίων [119] ενώ δεν υπήρξε κάποια άλλη στατιστικά σημαντική διαφορά στους υπόλοιπους λιπιδαιμικούς δείκτες ούτε σε μόρια που έχουν συσχετιστεί με τη φλεγμονή.

Μια άλλη, αρκετά πρωτότυπη, μελέτη θέλησε να συγκρίνει την επίδραση μιας παρέμβασης πλούσιας σε ψάρι με μία υψηλής πρόσληψης καρυδιών [120,121]. Η δεύτερη παρέμβαση προσέφερε σχετικά μεγάλες ποσότητες λινολεϊκού και α-λινολενικού οξέος. Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν διασταυρούμενος με 3 περιόδους 4 εβδομάδων για τις παρεμβάσεις, οι οποίες παρεμβάλλονταν από ένα σαββατοκύριακο ως περίοδο κάθαρσης. Συνολικά συμμετείχαν 25 υγιείς άντρες και γυναίκες, ελαφρώς υπερλιπιδαιμικοί, οι οποίοι μετά από μια εβδομάδα τυπικής αμερικάνικης δίαιτας μοιράστηκαν τυχαία σε 3 ομάδες. Η ομάδα ελέγχου λάμβανε δύο μερίδες εβδομαδιαίως 113 γραμμαρίων κρέατος ενώ η ομάδα ψαριού κατανάλωνε την αντίστοιχη ποσότητα σε σολομό. Όσον αφορά την ομάδα για το καρύδι, οι εθελοντές έπρεπε να τρώνε 42,5 γραμμάρια από αυτό, 6 μέρες την εβδομάδα. Μετά την παρέμβαση με το ψάρι οι εθελοντές είχαν αυξημένη HDL και μειωμένες τριακυλογλυκερόλες αν και παράλληλα αυξήθηκαν η LDL και η απολιποπρωτεΐνη B [120]. Επιπλέον μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά η 11-δευδρο-θρομβοξανή B₂ (11-D-TXB₂), ο μεταβολίτης της προσταγλαδίνης E (PGEM) και το μόριο προσκόλλησης sICAM [121].

Το 2010 δημοσιεύεται ακόμη μια μελέτη που αφορά κατανάλωση ψαριών τα οποία έχουν λάβει διαφορετική τροφή [122]. Οι υγιείς άντρες που εντάσσονται στη μελέτη οφείλουν για 8 εβδομάδες να καταναλώνουν ημερησίως είτε 150 γραμμάρια πέστροφα

ταϊσμένη με ιχθυοτροφή (ομάδα πρώτη) είτε 150 γραμμάρια πέστροφα ταϊσμένη με φυτική τροφή (ομάδα δεύτερη) είτε 150 γραμμάρια κοτόπουλο μαζί με 3.5 γραμμάρια κραμβέλαιο (ομάδα ελέγχου, ίση ποσότητα λίπους με τις ομάδες παρέμβασης). Στο τέλος της μελέτης δεν εμφανίστηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στο λιπιδαιμικό προφίλ και κάποιους δείκτες φλεγμονής. Το μόνο αναμενόμενο γεγονός ήταν η αύξηση των ω-3 λιπαρών οξέων και ιδιαίτερα των EPA και DHA στο αίμα των εθελοντών της πρώτης ομάδας.

Πολύ πρόσφατα, μια κλινική μελέτη σε δυσλιπιδαιμικές κινέζες έδειξε βελτίωση σε απολιποπρωτεΐνες και κάποιους δείκτες φλεγμονής [123]. Οι 3 ομάδες παρέμβασης έπρεπε να καταναλώσουν για 8 εβδομάδες (5μέρες/εβδομάδα) 80 γραμμάρια σολομό, ρέγγα ή λίτσα (romano) αντίστοιχα ενώ υπήρξε και ομάδα ελέγχου. Όλες οι παρεμβάσεις οδήγησαν σε στατιστικά σημαντική μείωση των απολιποπρωτεϊνών B, CII, CIII. Για τους εθελοντές που κατανάλωσαν σολομό ή ρέγγα εμφανίστηκε και επιπλέον όφελος καθώς μειώθηκε ο παράγοντας TNF-α και αυξήθηκε η αδιπονεκτίνη. Τέλος για την ομάδα του σολομού υπήρξε και μείωση την ιντερλευκίνης 6.

Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται συγκεντρωτικά όλες οι παραπάνω μελέτες με τα αποτελέσματά τους (ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΨΑΡΙ).

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΨΑΡΙ		
ΜΕΛΕΤΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
<u>Thorngren et al. 1981</u> [96] 11 εβδομάδες Ημερήσια κατανάλωση ψαριού με σκοπό τα 2-3 γρ EPA&DHA.	10 υγιείς άντρες Παράλληλη χορήγηση: ακετυλοσαλικυλικό οξύ	↑ 42% χρόνος αιμορραγίας ↓ συσσώρευση αιμοπεταλίων (κολλαγόνο, ADP)
<u>Thorngren et al. 1984</u> [97] 6 εβδομάδες 150 γρ λιπαρό ψάρι/ημέρα (ρέγγα, σολωμός, σκουμπρί)	12 υγιείς άντρες	↑ 37% χρόνος αιμορραγίας (μετά την 6 ^η εβδομάδα) ↓ συσσώρευση αιμοπεταλίων (κολλαγόνο, ADP) ↓ θρομβοξάνη A ₂ (διατήρηση έως και 8 εβδομάδες μετά)
<u>Atkinson, Wheeler et al. 1987</u> [98] 4εβδομάδες 750g/ημέρα πέστροφα (αντικατάσταση όλων των ζωικών προϊόντων)	8 υγιείς (5Α και 3Γ) Χωρίς ομάδα ελέγχου	↓ συσσώρευσης μόνο στην περίπτωση του κολλαγόνου ↑ LDL-C ↑ EPA, ↑ DHA
<u>Van Houwelingen et al.</u> [99–104] 8 εβδομάδες Μετρήσεις: 2η, 5η, 8η εβδομάδα	84 υγιείς μη παχύσαρκοι G1: 8 εβδομάδες: 135g πάστα κρέατος/ημέρα G2: 2 εβδομάδες: 135g πάστα κρέατος/ημέρα &6 εβδομάδες: 135g πάστα σκουμπρί/ημέρα 4 ερευνητικά κέντρα	G2: ↑ HDL, ↓TAG, ↓SBP, ↓DBP ↑ χρόνου αιμορραγίας (5 ^η και 8 ^η εβδ) ↓ αιμοπεταλίων ↓BCHE ↓ παράγοντας X (τάση) ↓ θρομβοξάνη B ₂ ↓ συσσώρευση αιμοπεταλίων (κολλαγόνο)
<u>Agren et al. 1988</u> [105] 15 εβδομάδες 3.7 γεύματα ψάρι/εβδομάδα	62 υγιείς άντρες G1: 3.7 γεύματα ψάρι/εβδομάδα (22 άτομα) G2: και μείωση λίπους (21 άτομα) Ομάδα Ελέγχου: 19 άτομα	G1: ↓ ApoA, ApoB, ↓ θρομβοξάνη B ₂ G2: ↓ TC
<u>Agren et al. 1990</u> [106] 12 εβδομάδες Διαφορετική κατανάλωση ψαριού εβδομαδιαίως	100 υγιείς άντρες G1: 0.9 γεύματα με ψάρι εβδομαδιαίως G2: 1.5 γεύματα με ψάρι εβδομαδιαίως G3: 2.3 γεύματα με ψάρι εβδομαδιαίως G4: 3.8 γεύματα με ψάρι εβδομαδιαίως	G4: ↓ συσσώρευση αιμοπεταλίων (κολλαγόνο, ADP) ↓ θρομβοξάνη B ₂ Θετική συσχέτιση μεταξύ της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης ADP παραγωγής θρομβοξάνης B ₂ .

<u>Gerhard, Patton et al. 1991, Wander and Patton 1991</u> [107,108] 5 μήνες διασταυρούμενη 18μέρες x3 (3 εβδ washout) 200g/μέρα, καθημερινά Γλώσσα, σολομός ή μαύρος μπακαλιάρος (sablefish)	23 υγιείς άντρες G1: γλώσσα G2: σολομός G3: μαύρος μπακαλιάρος	G1: ↓10% HDL-C, ↓TXB ₂ G2: ↑14% ApoB, ↑16% LDL-C, ↓5% TC, ↓13% TAG, ↓TXB ₂ , ↓συσσώρευσης (ADP: Vmax μόνο), ↑χρόνου αιμορραγίας, ↓AA αιμοπεταλίων G3: ↑17% ApoB, ↑14% LDL-C, ↑7% TC, ↓TAG, ↓TXB ₂ , ↓συσσώρευσης (κολλαγόνο: Tmax, Vmax. ADP: Vmax μόνο), ↓AA αιμοπεταλίων
<u>Mann et al. 1997</u> [109] Διασταυρούμενη 3X3 εβδομάδες παρέμβαση, 3 εβδομάδες καθάρσης Παρέμβαση: 1 εβδ. χορτοφαγική 2 εβδομάδες κρέας ή ψάρι	29 εθελοντές G1: λευκό κρέας G2: κόκκινο κρέας G3: ψάρι Καθημερινή κατανάλωση	G3: ↓ θρομβοξάνη B ₂ (κολλαγόνο)
<u>Imano et al. 1999</u> [110] 17 μέρες 200-400γρ.ψάρι ημερησίως	7 υγιείς εθελοντές	↓ όγκου & αριθμού αιμοπεταλίων ↓ συσσώρευση αιμοπεταλίων (κολλαγόνο) ↓ TAG, TC, LDL-C
<u>Seierstad, Seljeflot et al. 2005</u> [111] 700g την εβδομάδα σε 5 γεύματα 6 εβδομάδες	3 ομάδες: A+Γ με Σ. Ν. (κάποιοι & με OEM> 3μήνες)& φαρμακευτική αγωγή σταθερή G1: 20 ατ. (100% fish oil) G2: 20 ατ. (50% F.O. 50% rapeseed oil (ελαιοκράμβη)) G3: 19 ατ. (100% R.O.)	1. έντονη αλλαγή με την αλλαγή της τροφής 2. G1: ↑EPA, n-3/n-6 ratio G1: ↓ TAG, ↑HDL-C, ↓VCAM-1, ↓TNF-α, ↓ IL-6 G2: ↓TC, ↓TAG, ↓LDL-C, ↓ox-LDL-C, ↓TNF-α G3: ↓TC
<u>Moore, Bryant et al. 2006</u> [112] 24 εβδομάδες WF: white fish OF: oily fish SF: sunflower oil RS: rapeseed oil	134 υπέρβαροι και παχύσαρκοι (A+Γ) G1: 34 ατ. Ομάδα ελέγχου G2: 29 ατ. WF/RS (↓LCn-3 ↓LA:LNA) G3: 30 ατ. WF/SF (↓LCn-3 ↑ LA:LNA) G4: 32 ατ. OF/RS (↑LCn-3 ↓ LA:LNA) G5: 32 ατ. OF/SF (↑LCn-3 ↑ LA:LNA)	G4,G5: ↓ TAG
<u>Lara, Economou et al. 2007</u> [113] 8 εβδομάδες: APXH:4 εβδομάδες: 125g/ημέρα σολομό ΕΠΕΙΤΑ: 4 εβδομάδες χωρίς ψάρι	1 ομάδα: 48 A+Γ, υγιείς μη παχύσαρκοι ΕΠΕΙΤΑ 41 ατ.	Salmon: ↓13% TAG, ↓14% VLDL-C, ↑8% HDL-C, ↓ 9% LDL/HDL, ↓ 7% TC/HDL, ↑17% αδιπνονεκτίνη, ↓SBP ↓25% CHD risk
<u>Lindqvist, Langkilde et al. 2007</u> [114] Διασταυρούμενη, τυχαιοποιημένη 4 εβδομάδες Ρέγγα ψητή: 150g/ημέρα, 5 μέρες/εβδομάδα	13 παχύσαρκοι (A+Γ) G1: 120g άπαχο χοιρινό ή 150g κοτόπουλο G2: 150g ρέγγα 2 εβδομάδες wash-out	G2: ↑HDL, ↑ HDL ₂ , Μη σημαντική τάση ↓TAG, ↓ CRP

<u>Lindqvist, Langkilde et al. 2009</u> [115] Τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη 12 εβδομάδες wash-out Ρέγγα: 150g/ημέρα, 5μέρες/εβδομάδα 6 εβδομάδες	35 υπέρβαροι άντρες G1: 120g άπαχο χοιρινό ή 150g κοτόπουλο G2: 150g ρέγγα Προπαρασκευασμένα γεύματα Max 2 φορές την εβδομάδα άλλο ψάρι	G2: ↓AA, ↑HDL, ↑HDL ₂ G1&G2: ↓TAG Συμπέρασμα: %CHO, PROT, FAT επηρεάζουν τα επίπεδα TAG μάλλον και όχι η αυξημένη κατανάλωση ψαριού
<u>Din, Harding et al. 2008</u> [116] 500g εβδομάδα (≈1g EPA & DHA/ημέρα) 4 εβδομάδες& washout μέτρηση στις 8 εβδομάδες	2 ομάδες: υγιείς άντρες G1: 14 ατ. (σκουμπρί) G2: 14 ατ. (καμία παρέμβαση)	G1: ↓35% συσσώρευση αιμοπεταλίων & μονοκυττάρων, επαναφορά στις 8 εβδομάδες στα αρχικά επίπεδα Αντίστροφη συσχέτιση EPA&DHA με τη συσσώρευση
<u>Erkkilä, et al. 2008, 2009, 2014</u> [117–119] 8 εβδομάδες 100-150g/ γεύμα τουλάχιστον 4 φορές την εβδομάδα Λιπαρό ψάρι: σολομός, πέστροφα, ρέγγα κ.α. Άπαχο ψάρι: τούρνα, πέρκα, μπακαλιάρος	3 ομάδες: EM ή ασταθές ισχαιμικό επεισόδιο &φαρμακευτική αγωγή G1: 11 ατ. λιπαρό ψάρι (FF) G2: 12 ατ. Άπαχο ψάρι (LF) G3: 10 ατ. ελέγχου: άπαχο κρέας (μοσχάρι, χοιρινό, κοτόπουλο)	G1: ↑HDL-C, ↑EPA, ↑DHA, ↑μεγέθους HDL G2: ↓ ICAM1
<u>Rajaram, Haddad et al. 2009; Chiang, Haddad et al. 2012</u> [120,121] Τυχαιοποιημένη διασταυρούμενη 3 περίοδοι 4 εβδομάδων με ένα ΣΚ wash-out ανάμεσα	25 υγιείς (A+Γ) έως ήπια υπερλιπιδαιμικοί 1 εβδ: μέση αμερικάνικη διαίτα (34%) G1:ομάδα ελέγχου (113g κρέας, 2φορές/εβδ) G2: καρύδι (42,5g, 6 μέρες/εβδ) G3: σολομός (113g, 2φορές/εβδ)	G2: ↑TC, ↑ LDL-C, ↑ HDL-C, ↓ TAG, ↑ ApoB, ↓11-D-TXB ₂ , ↓ PGEM, ↓ sICAM G3: ↓TC, ↓ LDL-C, ↓ ApoB, ↓11-D-TXB ₂ , ↓ PGEM, ↓ sE-σελεκτίνη
<u>Hallund et al. 2010</u> [122] 150g ημερησίως 8 εβδομάδες	3 ομάδες: υγιείς άντρες G1: 23 ατ. [πέστροφα (πλήρης τροφή)] G2: 23 ατ. [πέστροφα (φυτική τροφή)] G3: 22 ατ. [κοτόπουλο+3.5g ελαιοκράμβης για ίση ποσότητα λίπους]	G1: ↓% total n-6 PUFA, ↑ % total n-3 PUFA, ↑EPA, ↑DHA
<u>Zhang, Wang et al. 2012</u> [123] 80g 5 μέρες την εβδομάδα 8 εβδομάδες	4 ομάδες: γυναίκες με υπερτριακυλογλυκερολαιμία Σολωμός: 32 ατ. (54.9±7.7) Ρέγγα: 29 ατ. (55.6±8.6) Λίτσα: 33 ατ. (56.5±3.8) Ελέγχου: 32 ατ. (56.3±6.6)	Όλες οι παρεμβάσεις: ↓TAG, ↓ApoB, ↓ApoCII, ↓ApoCIII ↑ EPA, ↑DHA, ↑total ω-3 PUFA Σολωμός: ↓ IL-6 ↓TNF-α Ρέγγα: ↓ TNF-α Σολωμός + Ρέγγα: ↑ Αδιπονεκτίνη

Παρεμβάσεις με ψάρι και συμπλήρωμα ω-3 λιπαρών οξέων.

Στις αρχές της δεκαετίας του '90, λίγο μετά τις πρώτες κλινικές μελέτες διατροφικής παρέμβασης με ψάρια, η ερευνητική κοινότητα διερωτάται κατά πόσο η κατανάλωση ιχθυελαίων θα μπορέσει να αποδώσει τις ευεργετικές ιδιότητες της κατανάλωσης ψαριών. Ως εκ τούτου, δημιουργούνται μελέτες που συγκρίνουν την κατανάλωση ψαριών και ιχθυελαίων. Το 1991 πραγματοποιείται μία από τις πρώτες τέτοιου είδους μελέτες [124] όπου μελετάται η οξεία επίδραση των παραπάνω στα αιμοπετάλια μετά από την κατανάλωση ενός μόνο γεύματος. Οι δέκα υγιείς εθελοντές που συμμετείχαν κατανάλωσαν σε δύο διαφορετικές μέρες είτε 182 γραμμάρια τόνου είτε 12 κάψουλες ιχθυελαίου (12 γραμμάρια συμπυκνώματος TAG) μαζί με ψωμί. Ο σχεδιασμός της μελέτης ήταν διασταυρούμενος και οι παρεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν με μία εβδομάδα εκκαθάρισης και μετά από 3 εβδομάδες αποχής από ψάρι. Στατιστικά σημαντική αύξηση του Ed_{50} και αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση ενός συνθετικού αναλόγου της PGH_2 . Όσον αφορά την αναστολή, αυτή έφτασε στο 35% στην περίπτωση του τόνου και σχεδόν διπλασιάστηκε (60%) στην περίπτωση του ιχθυελαίου.

Την ίδια χρονική περίοδο οι Brown et al. [125,126] πραγματοποιούν μια 3x3 διασταυρούμενη μελέτη με 12 εθελοντές. Πέραν της ομάδας ελέγχου, οι δύο άλλες ομάδες καταναλώνουν 200 γραμμάρια άπαχο ψάρι ημερησίως με την μια εκ των δύο να λαμβάνει συμπληρωματικά 5 γραμμάρια ιχθυελαίου ημερησίως. Κάθε παρέμβαση διήρκησε 6 εβδομάδες ενώ υπήρξαν και 6 εβδομάδες κάθαρσης μεταξύ των παρεμβάσεων. Οι στατιστικά σημαντικές αλλαγές στο λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών περιορίζονται στην μείωση των TAG, ιδίως στην ομάδα που λάμβανε και το ιχθυέλαιο, στην οποία μάλιστα παρατηρήθηκε και μείωση της VLDL-C. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων επίσης μειώθηκε μόνο στην ομάδα του ιχθυελαίου κατά 6%. Καλύτερα αποτελέσματα φάνηκαν και για τις δύο παρεμβάσεις στην περίπτωση της μείωσης των λευκοκυττάρων η οποία άγγιξε το περίπου 14% καθώς και στην ενεργότητα ινωδολύσης η οποία αυξήθηκε 5 έως 6 φορές σε σχέση με την ομάδα ελέγχου.

Λίγα χρόνια μετά, με ένα πολύ πολυπλοκότερο πρωτόκολλο, η ερευνητική ομάδα του Trevor A. Mori [58,127] προσπαθεί να μελετήσει τη διαφορετική επίδραση του ψαριού, των καψουλών ιχθυελαίου καθώς και του ποσοστού λίπους της διατροφής. Το ημερήσιο γεύμα ψαριού περιελάμβανε διάφορα ψάρια σε ποσότητες τέτοιες ώστε να παραμένει σταθερή σχετικά η πρόσληψη ω-3 και ω-6. Οι ομάδες στις οποίες

χωρίστηκαν οι εθελοντές φαίνονται στον πίνακα 3.3.1. Οι ομάδες 1 και 6 χρησιμοποιήθηκαν ως ομάδες ελέγχου.

% λίπος	40					30	
Ομάδα	1	2	3	4	5	6	7
Εθελοντές	18	17	17	17	16	17	18
Παρέμβαση	Placebo	1 γεύμα ψάρι ημερησίως	6 κάψουλες	Όπως σε 2+3	12 κάψουλες	Placebo	Όπως στη 2

Πίνακας 3.3.1: Διαχωρισμός εθελοντών σε ομάδες παρέμβασης

Στα αποτελέσματα που δημοσιεύτηκαν εμφανίζεται καταρχάς η συσχέτιση του ποσοστού λίπους με το λιπιδαιμικό προφίλ των εθελοντών. Αν και υπήρξε μείωση των TAG για όλες τις παρεμβάσεις, οι ομάδες που ακολουθούσαν διατροφικό σχήμα με 40% λίπος (ομάδες 2-5) αύξησαν την ολική χοληστερόλη, την LDL-C, την ApoB αλλά και την HDL-C ενώ στις ομάδες 6 και 7 με 30% λίπος οι παραπάνω τιμές μειώθηκαν σημαντικά. Ειδικά για την HDL μετρήθηκαν και οι επιμέρους συγκεντρώσεις για τα HDL₂ και τα HDL₃ αναδεικνύοντας την αύξηση του μεγέθους των σωματιδίων με αύξηση του αριθμού των HDL₂ και μείωση των HDL₃. Μεγαλύτερη επίδραση στο φαινόμενο αυτό είχε η παρέμβαση 4 με συνδυασμό ψαριού και ιχθυελαίου ενώ ο διπλασιασμός του ιχθυελαίου (12 κάψουλες) στην ομάδα 5 δεν φάνηκε να έχει σημαντικότερη επίδραση στην αύξηση των HDL₂ από ότι η παρέμβαση της ομάδας 3 (6 κάψουλες). Σχετικά με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση σε όλες τις ομάδες παρέμβασης, στις περιπτώσεις που αυτή προκλήθηκε από PAF ή κολλαγόνο. Ίδια επίδραση παρατηρήθηκε και στα επίπεδα της θρομβοξάνης B₂ που παράγεται όταν τα αιμοπετάλια ενεργοποιούνται από κολλαγόνο, ιδιαίτερα στην ομάδα 5.

Το 1997 δημοσιεύονται τα αποτελέσματα από μία μελέτη 15 εβδομάδων η οποία συνέκρινε την επίδραση ψαριού, ιχθυελαίου ή συμπληρώματος DHA σε αιμοστατικούς παράγοντες και την αιμοπεταλιακή συσσώρευση [128]. Οι 55 εθελοντές που συμμετείχαν διαχωρίστηκαν σε 4 ομάδες: ελέγχου, δίαιτας με ψάρι (4,3 γεύματα την εβδομάδα), 4 γραμμάρια ιχθυελαίου ημερησίως και 4 γραμμάρια DHA ελαίου ημερησίως. Μόνο στην περίπτωση του ψαριού παρατηρήθηκε μια ελαφριά μείωση του παραγόμενου παράγοντα X ενώ για τους υπόλοιπους αιμοστατικούς παράγοντες δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική μεταβολή σε καμία από τις παρεμβάσεις. Όσον

αφορά την αιμοπεταλιακή συσσώρευση αυτή μειώθηκε στατιστικά σημαντικά μόνο στην περίπτωση ενεργοποίησης με κολλαγόνο και μόνο για τις παρεμβάσεις με ψάρι και ιχθυέλαιο. Η παρέμβαση με το συμπλήρωμα DHA δεν έδωσε κανένα στατιστικά σημαντικό αποτέλεσμα.

Περίπου μια δεκαετία μετά, οι Elvenoll et al. θέλησαν να συγκρίνουν την επίδραση διαφορετικών ψαριών καθώς και ιχθυελαίου στο λιπιδαιμικό προφίλ, τα κύτταρα του αίματος καθώς και ένα πλήθος παραγόντων [129]. Χωρίζοντας τους 71 εθελοντές σε 5 ομάδες, τους έδωσαν 400 γραμμάρια εβδομαδιαίως είτε καπνιστό σολομό (ομάδα 1) είτε μαγειρεμένο σολομό (ομάδα 2) ή μπακαλιάρο (ομάδα 3), μια ομάδα (4) έλαβε 15ml ημερησίως μωρουνέλαιο ενώ η τελευταία λειτούργησε ως ομάδα ελέγχου. Μετά από 8 εβδομάδες παρέμβασης η μόνη στατιστικά σημαντική αλλαγή που παρατηρήθηκε ήταν η αύξηση του όγκου των αιμοπεταλίων στην ομάδα που κατανάλωσε τον μαγειρεμένο σολομό. Αν και δεν υπήρξαν άλλα στατιστικά σημαντικές μεταβολές φάνηκε πως η κατανάλωση ψαριού είναι πιο αποτελεσματική στον εμπλουτισμό του αίματος με EPA και DHA σε σχέση με το ιχθυέλαιο. Η ερευνητική ομάδα απέδωσε την παρατήρηση αυτή στην διαφορετική φυσικοχημική δομή που έχουν τα λιπίδια αυτά στα ψάρια και στο μωρουνέλαιο.

Στον πίνακα που ακολουθεί εμφανίζονται συγκεντρωτικά όλες οι παραπάνω μελέτες με τα αποτελέσματά τους (ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΨΑΡΙ Ή ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟΥ).

ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ ΜΕ ΨΑΡΙ Ή ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟΥ		
ΜΕΛΕΤΗ	ΔΕΙΓΜΑ	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑ
<u>Silverman et al. 1991</u> [124] 2 ανεξάρτητες μέρες Διασταυρούμενη	10 εθελοντές 1. 182γρ τόνος & ψωμί ή 2. 12 κάψουλες ιχθυέλαιο & ψωμί	↑ Ed ₅₀ (συνθετικό ανάλογο PGH ₂) ↑ αναστολή της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης (συνθετικό ανάλογο PGH ₂) 35% (τόνος) & 60% (ιχθυέλαιο)
<u>Brown et al. 1990-1991</u> [125,126] 3x3 διασταυρούμενη 6 εβδομάδες παρέμβασης 6 εβδομάδες κάθαρσης	12 εθελοντές Ομάδα Ελέγχου G1: 200γρ άπαχο ψάρι/ημέρα G2: 200γρ άπαχο ψάρι & 5γρ ιχθυέλαιο/ημέρα	↓TAG και στις 2 παρεμβάσεις ↓ λευκοκυττάρων και στις 2 παρεμβάσεις ↑ 5-6 φορές η ενεργότητα ινωδόλυσης ↓ VLDL-C στη G2 ↓ 6% αριθμός αιμοπεταλίων
<u>Mori, Vandongen et al. 1994</u> <u>Mori, Beilin et al. 1997</u> [58,127] 12 εβδομάδες Ψάρι (εναλλαγή): καλκάνι≈160g/ημέρα, σαρδέλες (κονσ)≈95 g/ημέρα, τόνος≈90 g/ημέρα, σολομός≈90 g/ημέρα	7 ομάδες G1: 18 ατ. Placebo, 40% fat G2: 17 ατ. Ψάρι, 40% fat G3: 17 ατ. 6 FO κάψουλες, 40% fat G4: 17 ατ. Ψάρι & 6 FO κάψουλες, 40% fat G5: 16 ατ. 12 FO κάψουλες, 40% fat G6: 17 ατ. Placebo, 30% fat G7: 18 ατ. Ψάρι, 30% fat	↓TAG: G2-5, G7, ↑TC: G2-5, ↓TC: G6-7 ↑HDL-C: G2-5, ↓HDL-C: G6 ↑ HDL ₂ : G4> G2, G3, G4> G7 ↓ HDL ₃ : G4,G6> G5,G7> G2,G3 ↑ LDL: G2-5, ↓ LDL: G6-7 ↑ ApoB: G2-G5, ↓ ApoB: G6-7 ↓ Na ⁺ σε όλες τις ομάδες, ↑ K ⁺ : G6-7 ↓Συσσώρευση (PAF, κολλαγόνο): G2-5, G7 ↓TXB ₂ : ↓ παραγωγής που προκαλείται από το κολλαγόνο, G2-5, G7
<u>Agren JJ et al. 1997</u> [128] 15 εβδομάδες παρέμβασης	55 εθελοντές G1: 4,3 γεύματα ψάρι την εβδομάδα G2: 4 γρ. Ιχθυελαίου/ημέρα G3: 4 γραμμάρια. DHA ελαίου/ημέρα Ομάδα ελέγχου	↓ παράγοντα X μόνο στο G1 ↓ αιμοπεταλιακή συσσώρευση (κολλαγόνο) σε G1 & G2
<u>Elvevoll et al. 2006</u> [129] 8 εβδομάδες παρέμβασης	71 εθελοντές G1: 400 γρ. καπνιστό σολομό/εβδομάδα G2: 400 γρ. μαγειρεμένο σολομό/εβδομάδα G3: 400 γρ. μπακαλιάρο /εβδομάδα G4: 15ml μουρουνέλαιο/ ημέρα Ομάδα ελέγχου	↑ όγκου αιμοπεταλίων στην G2 Η κατανάλωση ψαριού είναι πιο αποτελεσματική στον εμπλουτισμό του αίματος με EPA και DHA σε σχέση με το ιχθυέλαιο.

Σκοπός

Μετά την συσχέτιση της κατανάλωσης ψαριού με το λιπιδαιμικό προφίλ, καθώς και της συσχέτισης της δραστικότητας των ενζύμων του μεταβολισμού του PAF, οφείλουμε να μελετήσουμε την επίδραση της κατανάλωσης στα ένζυμα αυτά. Για το λόγο αυτό, η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό να ερευνήσει αν υπάρχει οποιαδήποτε συσχέτιση μεταξύ των ενζύμων του μεταβολισμού και της συχνής κατανάλωσης ψαριού. Επομένως, επιλέχθηκαν εθελοντές ούτως ώστε να καταναλώνουν συγκεκριμένα γεύματα ψαριού για 8 εβδομάδες, μια ενδιάμεση διάρκεια βάση των προηγούμενων παρεμβάσεων. Τα δείγματα αίματος που συλλέχθηκαν διαχωρίστηκαν και αποθηκεύτηκαν κατάλληλα προκειμένου να ελεγχθούν για την ενζυμική τους δραστικότητα.

Κεφάλαιο 4: Μεθοδολογία

4.1. Πρώτοκολλο Κλινικής Μελέτης Παρέμβασης

Συμμετέχοντες

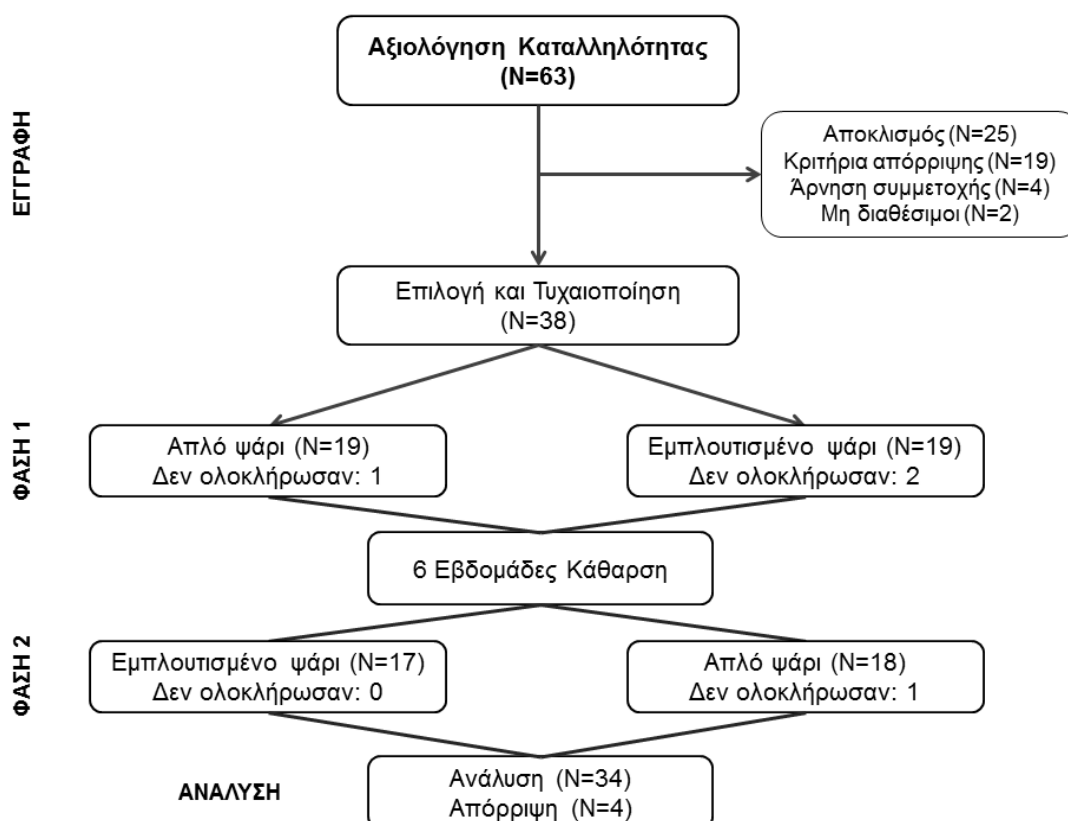
Η ενημέρωση για την προσέλευση πιθανών εθελοντών για τη μελέτη πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο και το Νοέμβριο του 2012 στην περιοχή της Αττικής στην Ελλάδα. Τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη ήταν: (1) ηλικία μεταξύ 30 και 65 ετών, (2) δείκτης μάζας σώματος (BMI: βάρος σε κιλά/ ύψος στο τετράγωνο, m^2) μεταξύ 24 και 31 kg/m^2 , (3) κατανάλωση ψαριού μικρότερη από μια μερίδα (150 γρ) εβδομαδιαίως, (4) διαθεσιμότητα για 22 εβδομάδες και (5) θέληση για συμμετοχή στη μελέτη. Τα κριτήρια απόρριψης των εθελοντών: (1) εγκυμοσύνη, (2) σε δίαιτα απώλειας βάρους, (3) λήψη διατροφικών συμπληρωμάτων και (4) υπό φαρμακευτική αγωγή. Παρόλα αυτά στις περιπτώσεις φαρμακευτικής αγωγής για διαταραχές του θυρεοειδούς, λήψης συμπληρωμάτων σιδήρου ή φολικού οξέος, αντισυλληπτικών ή σε γυναίκες που λαμβάνουν θεραπεία ορμονικής αποκατάστασης, οι εθελοντές μπορούσαν να συμμετάσχουν στη μελέτη με την προϋπόθεση ότι θα συνέχιζαν την εκάστοτε αγωγή καθόλη τη διάρκεια της μελέτης. Με τη βοήθεια ενός κατάλληλου ερωτηματολογίου πραγματοποιήθηκε τηλεφωνική συνέντευξη σε 63 πιθανούς εθελοντές, 19 από τους οποίους δεν τηρούσαν όλα τα κριτήρια ένταξης, 2 δεν ήταν διαθέσιμοι και 4 επέλεξαν να μην πάρουν μέρος στη μελέτη. Η πορεία της παρέμβασης φαίνεται στην εικόνα 4.1.

Σχεδιασμός Μελέτης

Η μελέτη ήταν διπλά τυφλή τυχαιοποιημένη και διασταυρούμενη. Τριάντα οκτώ φαινομενικά υγιείς άντρες και γυναίκες τυχαιοποιήθηκαν και ξεκίνησαν τη διασταυρούμενη μελέτη όπου ακολούθησαν 2 συνεχόμενες διατροφικές παρεμβάσεις για 8 εβδομάδες την καθεμία. Μεταξύ των δύο παρεμβάσεων μεσολάβησε περίοδος κάθαρσης 6 εβδομάδων, οπότε και οι εθελοντές επέστρεψαν στις κανονικές διατροφικές τους συνήθειες. Οι δύο παρεμβάσεις ήταν ίδιες με εξαίρεση το ψάρι που καταναλώθηκε, στη μία περίπτωση ήταν η απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου και στην άλλη η ίδια τσιπούρα εμπλουτισμένη όμως με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης. Στη διάρκεια κάθε παρέμβασης οι εθελοντές λάμβαναν εβδομαδιαίως 2 μερίδες φρέσκου ψαριού (380γρ ανά μερίδα) καθαρισμένου από εντόσθια, βράγχια και λέπια. Επιπλέον, έλαβαν οδηγίες προκειμένου να καταναλώνουν τις μερίδες σε δύο διαφορετικά γεύματα (1 μερίδα/ γεύμα) 2 φορές μέσα στην εβδομάδα. Με την έναρξη της κάθε παρέμβασης δόθηκαν στους εθελοντές προφορικές και γραπτές οδηγίες που αφορούσαν στην προετοιμασία

του γεύματος καθώς και στις διατροφικές συνήθειες και τον τρόπο ζωής. Η προετοιμασία του γεύματος περιελάμβανε ψήσιμο του ψαριού με μπαχαρικά και μυρωδικά της αρεσκείας του εθελοντή, με την προϋπόθεση να ακολουθείται η ίδια προετοιμασία για κάθε γεύμα. Επιπλέον ζητήθηκε από τους συμμετέχοντες να διατηρήσουν τις διατροφικές τους συνήθειες και την φυσική τους δραστηριότητα και να αποφύγουν την προσπάθεια για απώλεια βάρους καθόλη τη διάρκεια της παρέμβασης. Τέλος, οι εθελοντές έλαβαν τη συμβουλή να αποφύγουν τη λήψη φαρμάκων, όπως ασπιρίνη, αντιβιοτικά, αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά φάρμακα. Λόγω του γεγονότος ότι έγινε λήψη φαρμακευτικού σκευάσματος κατά τη διάρκεια των παρεμβάσεων από 4 εθελοντές, τελικά στα αποτελέσματα παρουσιάζονται 30 εθελοντές (14 γυναίκες, 16 άνδρες).

Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την Επιτροπή Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου και διενεργήθηκε σύμφωνα με τη Διακήρυξη του Ελσίνκι [130]. Πριν από τη συμμετοχή στη μελέτη, όλοι οι εθελοντές ενημερώθηκαν για τους στόχους και τις διαδικασίες της μελέτης και έδωσαν τη γραπτή συγκατάθεσή τους.



Εικόνα 4.1: Διάγραμμα Σχεδιασμού Μελέτης (CONSORT diagram)

Αξιολόγηση

Οι ανθρωπομετρικές και εργαστηριακές μετρήσεις καθώς και η καταγραφή των διατροφικών συνηθειών και της φυσικής δραστηριότητας έλαβαν μέρος πριν την έναρξη και στο τέλος της κάθε περιόδου παρέμβασης.

4.1.1. Αξιολόγηση ανθρωπομετρικών μετρήσεων

Το σωματικό βάρος των εθελοντών μετρήθηκε με ψηφιακή ζυγαριά (Seca robusta 813, Hamburg, Germany) με ακρίβεια 100 γραμμαρίων και το ύψος με ακρίβεια 0,5 εκατοστών. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) υπολογίστηκε ως βάρος (kg) διαιρούμενο με το τετράγωνο του ύψους (m²). Η περίμετρος μέσης μετρήθηκε με ακρίβεια 0,1 εκατοστών εις διπλούν και στη συνέχεια υπολογίστηκε η μέση τιμή.

Η συστολική και διαστολική πίεση των συμμετεχόντων μετρήθηκαν δύο φορές, με απόσταση 2 λεπτών, σε καθιστή θέση, χρησιμοποιώντας ένα αυτοματοποιημένο σφυγμομανόμετρο Omron M4 και καταγράφηκε ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων.

4.1.2. Εκτίμηση διατροφικής πρόσληψης και φυσικής δραστηριότητας

Η συνήθης διατροφική πρόσληψη των συμμετεχόντων κατά τον μήνα πριν την έναρξη της παρέμβασης εκτιμήθηκε με τη βοήθεια ενός ερωτηματολογίου συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων (FFQ) 76 σημείων. Το ερωτηματολόγιο είναι ημι-ποσοτικό και έχει αναπτυχθεί και δοκιμαστεί για την επαναληψιμότητα του και την ισχύ του στον ελληνικό πληθυσμό [131]. Με βάση τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από το FFQ υπολογίστηκε η ημερήσια πρόσληψη ενέργειας και μακροθρεπτικών συστατικών. Επιπλέον, η διαιτητική πρόσληψη των ομάδων τροφίμων εκφράστηκε ως μερίδες την ημέρα, με τη βοήθεια των μεγεθών που δίνονται από τους πίνακες σύστασης τροφίμων του Υπουργείου Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών [132] καθώς και από τους ελληνικούς πίνακες σύστασης τροφίμων [133].

Για να αξιολογηθεί το επίπεδο τήρησης της μεσογειακής διατροφής, χρησιμοποιήθηκε το Σκορ Μεσογειακής Διατροφής (MedDietScore) [134]. Ειδικότερα, για τον υπολογισμό της βαθμολογίας, λήφθηκε υπόψη η κατανάλωση τροφίμων από τις 9 ομάδες τροφών (μη ραφινάρισμα αμυλώδη τρόφιμα, πατάτες, φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ψάρια, κρέας και προϊόντα κρέατος, πουλερικά και πλήρη σε λιπαρά γαλακτοκομικά προϊόντα), καθώς και η κατανάλωση ελαιολάδου και αλκοολούχων ποτών. Όσον αφορά την κατανάλωση τροφίμων κοντά στο μεσογειακό διατροφικό πρότυπο, οι εθελοντές λάμβαναν την τιμή 0 στην περίπτωση της μη κατανάλωσης ενώ οι τιμές 1-5 αναφέρονται στην κλιμάκωση της κατανάλωσης από σπάνια έως καθημερινή. Αντίθετα,

για τρόφιμα που βρίσκονται μακριά από το μεσογειακό πρότυπο διατροφής η βαθμολόγηση γίνεται ανάποδα, με το 0 να εκφράζει την καθημερινή κατανάλωση και το 5 την σπάνια έως μηδενική κατανάλωση. Ειδικά για τις πατάτες η κλίμακα 0-3 αφορά τη μηδενική έως καθημερινή κατανάλωση, το 5 την κατανάλωση 1-2 μερίδων καθημερινά και το 4 την ημερήσια κατανάλωση περισσότερων των 2 μερίδων. Το εύρος του MedDietScore είναι 0-55 και οι υψηλότερες τιμές του διαιτητικού σκορ αντιστοιχούν σε μεγαλύτερη προσκόλληση της μεσογειακής διατροφής.

Η κατανάλωση ψαριών από τους εθελοντές και κατά συνέπεια η προσκόλλησή τους στο πρωτόκολλο της παρέμβασης πραγματοποιήθηκε με καταγραφή της κατανάλωσης σε ημερολόγιο τόσο για την περίοδο των παρεμβάσεων όσο και για την ενδιάμεση περίοδο κάθαρσης. Πιο συγκεκριμένα, ζητήθηκε από τους εθελοντές να σημειώνουν σε εβδομαδιαία βάση τα γεύματα ψαριού που κατανάλωσαν καθώς και τη μέρα κατανάλωσης. Τα συμπληρωμένα ημερολόγια παραδόθηκαν στην ερευνητική ομάδα μετά το πέρας κάθε περιόδου. Το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας των εθελοντών αξιολογήθηκε μέσω ενός σύντομου ερωτηματολογίου που συμπλήρωσαν μόνοι τους οι συμμετέχοντες, το Ερωτηματολόγιο Φυσικής Δραστηριότητας του Χαροκοπείου, το οποίο έχει αναπτυχθεί, επικυρωθεί και ελεγχθεί για την αξιοπιστία τους σε ενήλικους Έλληνες [135]. Το ερωτηματολόγιο αυτό συλλέγει την αυτο-αναφερόμενη σωματική δραστηριότητα της προηγούμενης εβδομάδας και εξετάζει το χρόνο που δαπανάται σε δραστηριότητες χαμηλής, μέτριας και υψηλής έντασης ενώ παράλληλα καταγράφει και τις ώρες ύπνου. Βασίζεται στις μεταβολικά ισοδύναμα όλων των δραστηριοτήτων της προηγούμενης εβδομάδας, συμπεριλαμβανομένων των δραστηριοτήτων κατά την εργασία, τον ελεύθερο χρόνο, την ανάπαυση ή τον ύπνο. Μετά την συμπλήρωση υπολογίστηκε για τον κάθε συμμετέχοντα η συνολική ημερήσια ενεργειακή δαπάνη και το μέσο επίπεδο σωματικής δραστηριότητας, δηλαδή η αναλογία της συνολικής ημερήσιας ενεργειακής δαπάνης διαιρούμενη με μεταβολικό ρυθμό ηρεμίας.

4.1.3. Εργαστηριακές Μετρήσεις

Δείγμα αίματος λήφθηκε από τους εθελοντές, μετά από δεκάωρη νηστεία, μεταξύ 8 και 10 το πρωί. Οι συμμετέχοντες κλήθηκαν να αποφύγουν την έντονη άσκηση μια μέρα πριν την αιμοληψία, καθώς και το κάπνισμα το ίδιο πρωί. Τους ζητήθηκε επίσης να μην λάβουν αντι-φλεγμονώδη φάρμακα, ασπιρίνη ή αντιβιοτικά για δύο εβδομάδες ούτε αναλγητικά φάρμακα για πέντε ημέρες πριν από κάθε αιμοληψία.

4.2. Προσδιορισμός Πρωτεΐνης με τη Μέθοδο Bradford

Όργανα

- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φωτόμετρο PowerWave HT Microplate Spectrophotometer, BioTek

Αντιδραστήρια

- Πρότυπο stock διάλυμα αλβουμίνης βοδινού ορού (BSA, bovine serum albumin) συγκέντρωσης 100μg/ml: Ζυγίζονται 100μg BSA και διαλύονται σε 1ml H₂O. Το διάλυμα μοιράζεται σε aliquots (250μl διαλύματος στο καθένα) και αυτά φυλάσσονται στους -20°C.
- Working διάλυμα BSA: Αραίωση 1:4 του stock διαλύματος BSA ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 25μg/ml (Προσθήκη 750μl H₂O στα παραπάνω aliquots).
- Stock διάλυμα Bradford: σε 50ml μεθανόλης διαλύονται 100mg Coomassie Brilliant Blue G 250 (C.I. #42655). Το διάλυμα αυτό προστίθεται σε 100ml διαλύματος 85% H₃PO₄ και αραιώνεται με H₂O σε τελικό όγκο 200ml. Το τελικό διάλυμα χαρακτηρίζεται από βαθύ κόκκινο χρώμα και έχει τελικές συγκεντρώσεις 0,5mg/ml Coomassie Blue G, 25% μεθανόλη και 42,5% H₃PO₄. Η φύλαξη του διαλύματος πραγματοποιείται σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4°C, συνθήκες οι οποίες επιτρέπουν τη διατήρησή του για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Working διάλυμα Bradford: Αραίωση 1ml stock Bradford σε 4ml H₂O. Το διάλυμα διαθέτει σκούρο καφέ χρώμα και pH 1.1 και διατηρείται σταθερό για αρκετές εβδομάδες με φύλαξή του σε σκουρόχρωμη φιάλη στους 4°C.
- Πρότυπη καμπύλη αναφοράς: Η μέτρηση της πρωτεΐνης πραγματοποιείται με μέτρηση σε ELISA plate. Οι δύο πρώτες στήλες πηγαδιών του plate χρησιμεύουν στη δημιουργία καμπύλης αναφοράς σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Πηγάδι Plate	C (μg/ml)	m (μg)	V (μl) working BSA (25μg/ml)	V (μl) H ₂ O
A	0	0	0	200
B	0.625	0.125	5	195
C	1.25	0.25	10	190
D	2.5	0.5	20	180
E	5	1.0	40	160
F	7.5	1.5	60	140
G	10	2.0	80	120
H	15	3.0	120	80

Αρχή Μεθόδου

Η χρωστική της μεθόδου υφίσταται σε τρεις μορφές: κατιοντική, ουδέτερη και ανιοντική. Οι τρεις αυτές μορφές έχουν διαφορετικά χρώμα με αποτέλεσμα να απορροφούν σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Κατιοντική μορφή	⇔ Ουδέτερη μορφή	⇔ Ανιοντική μορφή
Κόκκινο χρώμα	Πράσινο Χρώμα	Μπλε Χρώμα
470nm	650nm	595nm

Με τη σύνδεση της χρωστικής με την πρωτεΐνη στο όξινο περιβάλλον της μεθόδου η πρώτη χάνει 2 πρωτόνια και μετατρέπεται από κόκκινη σε μπλε. Χάρη σε αυτή τη μετατροπή είμαστε σε θέση να μετρήσουμε την απορρόφηση της χρωστικής στα 595nm με τη βοήθεια φωτομέτρου [136].

Πειραματική πορεία

Στα δείγματα πραγματοποιείται αραιώση 1/10 με νερό. Στο πηγάδι τοποθετούνται 7-10μl του αραιωμένου δείγματος και όγκος συμπληρώνεται με νερό έως τα 200μl. Σε κάθε πηγάδι προστίθενται 50μl working διαλύματος Bradford και το όλο διάλυμα αναδεύεται. Το plate επωάζεται για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και η φωτομέτρηση πραγματοποιείται στα 595nm.

4.3. Προσδιορισμός της Δραστικότητας της Lp-PLA₂ και της PAF-AH των Λευκοκυττάρων

Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μl
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Σωληνάκια erpendorf

Αντιδραστήρια

- Tris [Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο]
- PAF (C_{16:0}) (Sigma)
- Βόεια αλβουμίνη ορού (BSA) ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)

- Διάλυμα φύλαξης (stock) PAF 2,308mM σε μεθανόλη: Το διάλυμα φυλάσσεται σε στους -20°C.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) ραδιενεργού PAF (PAF*) σε μεθανόλη: Αναγράφεται ως συγκέντρωση η τιμή των counts/μl και το διάλυμα φυλάσσεται σε στους -20°C.
- Διάλυμα BSA 100 mg/ml: Διαλύονται 500 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (100 mM-pH 7,2). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυμα BSA 10 mg/ml: Το διάλυμα BSA 100 mg/mL αραιώνεται 1/10 με Tris Tris-HCl (100 mM-pH 7,2). Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- Διάλυμα PAF σε BSA (10mg/ml) συγκέντρωσης 800 μM και ειδικής δραστηριότητας 4.000 cpm/μl (διάλυμα εργασίας): Φέρεται κατάλληλη ποσότητα διαλύματος PAF 10^{-4} M καθώς και ραδιενεργού PAF σε βιδωτό σωλήνα, εξατμίζεται ο διαλύτης σε ρεύμα αζώτου και το ίζημα αναδιαλύεται σε κατάλληλη ποσότητα διαλύματος BSA 10 mg/ml έτσι ώστε να προκύψει συγκέντρωση PAF 800 μM ειδικής δραστηριότητας 4.000 cpm/μl. Το διάλυμα παρασκευάζεται εκ νέου για κάθε ενζυμική δοκιμασία. Προσθήκη 5 μl από το διάλυμα αυτό στον ενζυμικό προσδιορισμό δίνουν τελική συγκέντρωση PAF 20 μM (20.000 cpm) και τελική συγκέντρωση BSA 0,25 mg/ml.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100 mM-pH 7,2) : Διαλύονται 1,21 g Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,2 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 mL νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100 mM-pH 7,2) με 1 mM EGTA : Διαλύονται 1,21 και 38,04 mg EGTA Tris σε νερό, ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 7,2 και αραιώνεται το διάλυμα στα 100 mL νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα TCA 40% : Διαλύονται 40 g TCA σε 100 mL αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος αυτή για τη μέτρηση της δραστηριότητας της ακετυλοϋδρολάσης βασίζεται στην μέτρηση του ραδιενεργού προϊόντος ($[H^3]$ -CH₃COOH). Το επισημασμένο οξικό οξύ απελευθερώνεται και διαχωρίζεται από τον αντιδρώντα $[H^3]$ -PAF καθώς αυτό καταβυθίζεται παρουσία BSA. Παρουσία του TCA μετά το πέρας της ενζυμικής διαδικασίας καταβυθίζονται και οι πρωτεΐνες οπότε και παραλαμβάνεται μέρος του υπερκείμενου υγρού, το οποίο περιέχει το επισημασμένο οξικό, προς μέτρηση ραδιενέργειας [137].

Πειραματική πορεία

Σε σωλήνα errendorf τοποθετούνται 145 µl ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 100 mM-pH 7,2 (για την εξωκυττάρια PAF-AH χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό που περιέχει EGTA), 5 µl διαλύματος εργασίας PAF/PAF* σε BSA (τελική συγκέντρωση 20 µM). Το ενζυμικό παρασκεύασμα που θα προστεθεί θα πρέπει να αντιστοιχεί 2 µl ορού, και 60 µg πρωτεΐνης ομογενοποιηήματος λευκοκυττάρων στην ενζυμική δοκιμασία για τις ισομορφές Lp-PLA₂ και PAF-AH, αντίστοιχα. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, ενδέχεται να κυμαίνεται από 10 έως 50 µl (2µl για τον ορό) προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 µL ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Τα errendorf προεπωάζεται για 5 λεπτά στους 37°C. Με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος ξεκινά η ενζυμική δοκιμασία. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης είναι 200 µL. Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 15 λεπτά. Για τον τερματισμό της αντίδρασης προστίθενται 2µl BSA 100 mg/ml και μετά από 30 δευτερόλεπτα 64 µl ψυχρού διαλύματος TCA 40 % (τελική συγκέντρωση TCA 10 %). Το διάλυμα αφήνεται σε πάγο για 30 λεπτά προκειμένου να καταβυθιστούν οι πρωτεΐνες. Στη συνέχεια πραγματοποιείται σε μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά στους 4°C. Παραλαμβάνονται 100µl από το υπερκείμενο για τη μέτρηση της ραδιενέργειας.

4.4. Μέτρηση ραδιενέργειας με μετρητή σπινθηρισμού υγρών**Όργανα**

- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Πλαστικά φιαλίδια μιας χρήσης (vials) όγκου 20 ml
- Ειδικές υποδοχές του μετρητή για τα vials (racks)
- Μετρητής σπινθηρισμού υγρών Wallac 1209 Racbeta, Pharmacia, συνδεδεμένος με καταγραφέα Facit B3100

Αντιδραστήρια

- 5-Διφαινυλοξαζόλιο (PPO), BDH Chemicals
- 1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο (POPOP), BDH Chemicals
- Ναφθαλίνιο (Sigma)
- Διοξάνη

- Υγρό σπινθηρισμού Dioxane base: Το διάλυμα παρασκευάζεται με διάλυση 7 g PPO, 0,3 g POPOP και 100 g ναφθαλινίου σε 1 L διοξάνης και 200 ml νερό. Το υγρό φυλάσσεται σε μπουκάλι και θερμοκρασία δωματίου για μεγάλο διάστημα.

Αρχή Μεθόδου

Το διάλυμα σπινθηρισμού, με το οποίο αναμειγνύεται το εκάστοτε δείγμα, περιέχει μία ή και περισσότερες ουσίες που φθορίζουν. Το ραδιενεργό δείγμα εκπέμπει β σωματίδια τα οποία προκαλούν διέγερση του διαλύτη. Ο διεγερμένος διαλύτης διεγείρει με τη σειρά του τις φθορίζουσες ουσίες που εκπέμπουν φωτόνια τα οποία και καταγράφονται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή. Το σύνολο των φωτονίων, που εκπέμπονται μετά από κάθε εκπομπή β σωματιδίων, ανιχνεύεται ως παλμός ο οποίος καταγράφεται ως μια κρούση από το σύστημα καταγραφής [25].

Πειραματική πορεία

Από το υπερκείμενο παραλαμβάνονται με πιπέτα 100 μ L τα οποία και μεταφέρονται σε vials που περιέχουν 5 ml υγρό σπινθηρισμού (dioxane base) για την μέτρηση της ραδιενέργειας. Παράλληλα μετριέται και η ραδιενέργεια σε δείγμα αναφοράς που δεν περιέχει ενζυμικό ομογενοποίημα (ακολουθείται η πειραματική διαδικασία) καθώς και σε 5ml διαλύματος εργασίας PAF/PAF* σε BSA προκειμένου να βρεθεί η ειδική δραστηριότητα του $[H^3]$ -PAF. Είναι απαραίτητη η ισχυρή ανάδευση των δειγμάτων με το υγρό σπινθηρισμού. Η μέτρηση των κρούσεων διαρκεί 5 λεπτά και τα αποτελέσματα εκφράζονται σε κρούσεις ανά λεπτό (cpm).

4.5. Προσδιορισμός της Δραστηριότητας της DTT-Ανεξάρτητης CDP- Χολίνη: Αλκυλοακετυλογλυκεροφωσφοχολινوترansφεράσης (PAF-CPT)

Όργανα

- Αυτόματες πιπέτες 1-10, 10-100, 100-1000 μ l
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)
- Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο
- Σωλήνες πολυπροπυλενίου

Αντιδραστήρια

- Tris
- EDTA (Το EDTA δεσμεύει το Ca^{++} που είναι αναστολέας της de novo πορείας βιοσύνθεσης του PAF)

- MgCl_2
- DTT (διχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο)
- Αλκυλο-ακετυλο-γλυκερόλη (AAG) ($\text{C}_{16:0}$) (Biomol)
- Κιτιδυλο-διφωσφο-χολίνη (CDP-χολίνη) (Sigma)
- BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma)
- Μεθανόλη
- Χλωροφόρμιο
- Οξικό οξύ
- DMSO (διμεθυλο-σουλφοξείδιο)
- Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (100 mM-pH 8,0)/EDTA 0,5 mM/ MgCl_2 10mM/DTT 15 mM: Διαλύονται 1,2114 g Tris, 0,2033 g MgCl_2 , 0,0146 g EDTA και 0,2313 g σε αποσταγμένο νερό και ρυθμίζεται το pH με HCl 1 M στο 8,0. Αραιώνεται το διάλυμα στα 100 ml νερό. Το διάλυμα φυλάσσεται στους 4°C .
- Διάλυμα AAG 10mM φύλαξης: Διαλύονται τα 5 mg του φιαλιδίου σε 1324 μl EtOH. Το διάλυμα φυλάσσεται σε βιδωτό σωλήνα στους -20°C (σταθερό για 6 μήνες).
- Διάλυμα AAG 10mM εργασίας: Λαμβάνεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος AAG 10mM φύλαξης. Πραγματοποιείται πλήρης εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου και αναδιάλυση σε DMSO ακριβώς στον ίδιο όγκο.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) CDP-Choline 100mM: Διαλύονται 100 mg σε 1830 μl αποσταγμένου νερού. Το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C .
- Διάλυμα εργασίας (working) CDP-Choline 4mM: Αναμειγνύονται 40 μl διαλύματος φύλαξης CDP-Choline με 960 μl αποσταγμένο νερό και το διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C .
- Διάλυμα BSA 40 mg/ml: Διαλύονται 200 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) σε 5 ml ρυθμιστικού διαλύματος.

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της PAF-CPT βασίζεται στη μέτρηση του παραγόμενου PAF μετά την επώαση του ενζυμικού παρασκευάσματος με CDP-χολίνη και AAG παρουσία BSA. Ο παραγόμενος PAF εκχυλίζεται μετά το πέρας της ενζυμικής διαδικασίας με όξινη εκχύλιση Bligh-Dyer, και διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα συστατικά με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Το κλάσμα που απομονώνεται υποβάλλεται σε βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Πειραματική πορεία

Σε σωλήνα πολυπροπυλενίου φέρονται το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl/EDTA/MgCl₂/DTT (100 mM-pH 8), 5 μl διαλύματος BSA 40 mg/mL (τελική συγκέντρωση 1mg/ml) και το ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης. Το ενζυμικό παρασκεύασμα που θα προστεθεί θα πρέπει να αντιστοιχεί 20 μg πρωτεΐνης ομογενοποιηήματος λευκοκυττάρων. Επειδή η προστιθέμενη ποσότητα του ενζυμικού παρασκευάσματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε ρυθμιστικό διάλυμα αναδιάλυσης, μπορεί να κυμαίνεται από 10-50 μl, προστίθεται κατάλληλη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης ώστε όλοι οι προσδιορισμοί να περιέχουν 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος αναδιάλυσης. Ο τελικός όγκος του μίγματος επώασης θα είναι 200 μl. Γίνεται προεπώαση για 5 min στους 37°C. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη του ενζυμικού παρασκευάσματος (20 μg πρωτεΐνης ομογενοποιηήματος λευκοκυττάρων), μετά από 30 sec προστίθενται 2 μl διαλύματος AAG 10mM σε DMSO (τελική συγκέντρωση 100 μM).) και μετά από 30 sec προστίθενται 5 μl διαλύματος CDP-choline 4 mM (τελική συγκέντρωση 100 μM). Η επώαση της αντίδρασης γίνεται σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C για 5 λεπτά. Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται 1000 μl μίγματος CHCl₃/MeOH (2 % AcOH), 300 μl παγωμένου H₂O και άλλα 111 μl μίγματος CHCl₃/MeOH (2 % AcOH). Μετά από έντονη ανάδευση το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στους 4°C και παραλαμβάνεται από αυτό η χλωροφορμική φάση (κάτω). Το υδατικό υπόλειμμα εκπλένεται με 500μl χλωροφόρμιο και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση. Η δεύτερη χλωροφορμική φάση παραλαμβάνεται και ενώνεται με την πρώτη. Το όλο διάλυμα αποθηκεύεται στους -20°C.

4.6. Χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC)

Όργανα

- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC Desaga (Germany)
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20 cm και 20x10 cm
- Ψυχόμενη Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R και Sorvall RC-5B.
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 20x25x10 cm
- Διηθητικό χαρτί
- Πυραντήριο (Memmert-854, Schwabach)
- Κυκλοαναδευτήρας (vortex)

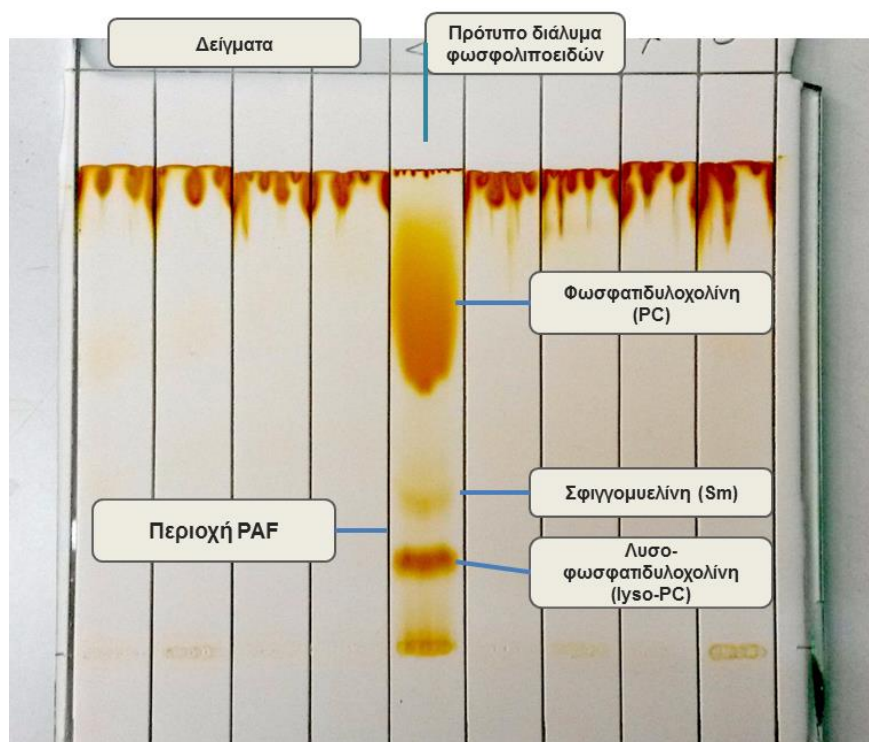
Αντιδραστήρια

- Χλωροφόρμιο

- Μεθανόλη
- Οξικό οξύ
- Απεσταγμένο νερό
- Πυριτικό οξύ για χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Silica Gel G 60, Merck)
- Πρότυπα φωσφολιποειδή (Merck)

Αρχή Μεθόδου

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας έχει ως σκοπό να διαχωρίσει το δείγμα σε διάφορες ζώνες. Ο διαχωρισμός εξαρτάται από την πολικότητα του λιποειδούς, και ο επιτυχής διαχωρισμός πραγματοποιείται χάρη στη διαφορετική προσρόφηση των συστατικών του δείγματος από τη στατική φάση σε συνδυασμό με την δυνατότητα απομάκρυνσής τους από την υγρή φάση ανάπτυξης, με την κατάλληλη αναλογία διαλυτών στο μίγμα. Η απόσταση που διατρέχει η εκάστοτε ουσία από την αρχή προς το μέτωπο της πλάκας ονομάζεται R_f και είναι χαρακτηριστική για την ουσία αυτή.



Εικόνα 4.2: Γυάλινη πλάκα ανάπτυξης μετά από χρωματισμό σε θάλαμο Ι2. Σημειώνονται οι περιοχές εμφάνισης της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της σφιγγομυελίνης (Sm) και της λυσο-φωσφατιδυλοχολίνης (lyso-PC) καθώς και η περιοχή που εμφανίζεται ο PAF. Εκατέρωθεν του πρότυπου διαλύματος φωσφολιποειδών έχουν τοποθετηθεί τα δείγματα προς διαχωρισμό.

Πειραματική πορεία

Παρασκευάζεται μίγμα 60 g Silica Gel G60 με 120 ml νερό και το όλο αναδεύεται έντονα για 2 λεπτά ακριβώς. Το μίγμα απλώνεται με τη βοήθεια της συσκευής Desaga σε καθαρές γυάλινες πλάκες 20 x 20 cm. Οι επιστρωμένες πλάκες αφήνονται να

στεγνώσουν πλήρως σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες και έπειτα ενεργοποιούνται στο πυραντήριο στους 100°C για 1 ώρα. Όταν οι πλάκες κρυώσουν είναι έτοιμες για χρήση. Οι πλάκες χαράζονται σε ζώνες των 2 cm ενώ αφήνεται απόσταση 3 cm από την κάτω άκρη για να τοποθετηθεί το δείγμα.

Η χλωροφορμική φάση που απομονώθηκε από την ενζυμική δοκιμασία εξατμίζεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύεται σε 50 μl C:M 1:1. Η ποσότητα τοποθετείται στην εκάστοτε ζώνη της πλάκας ενώ η αναδιάλυση σε 50 μl και η τοποθέτηση επαναλαμβάνονται. Χρησιμοποιείται δείγμα πρότυπου λιποειδούς ως δείκτης της ανάπτυξης των δειγμάτων. Οι πλάκες αναπτύσσονται σε προεξισορροπημένο θάλαμο με σύστημα ανάπτυξης χλωροφορμίου: μεθανόλης:οξικού:νερού (C:M:AcOH:W) 100:57:16:8 (v:v). Μετά το πέρας της ανάπτυξης η πλάκα αφήνεται να στεγνώσει πλήρως και τοποθετείται σε θάλαμο με κρυστάλλους I₂ προκειμένου να χρωματιστούν οι περιοχές της φωσφατιδυλοχολίνης (PC), της σφιγγομυελίνης (Sm) και της λυσο- φωσφατιδυλοχολίνης (λυσο-PC) (πορτοκαλί κηλίδες). Ο PAF εντοπίζεται (άχρωμος) στην περιοχή μεταξύ Sm και λυσο-PC (Εικόνα 4.2). Η περιοχή εντοπισμού αποξύνεται με γυάλινη αντικειμενοφόρο πλάκα και παραλαμβάνεται σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα.

Η εκχύλιση του PAF από τη Silica πραγματοποιείται με 2 ml μίγματος χλωροφορμίου:μεθανόλης:νερού (C:M:W) 1:2:0,8 (v:v:v) για 15 λεπτά. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 1000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Παραλαμβάνεται το έκπλυμα με γυάλινη πιπέτα Pasteur σε νέο γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα και η εκχύλιση επαναλαμβάνεται με την ίδια διαδικασία. Το μονοφασικό διάλυμα που έχει παραληφθεί μετατρέπεται σε διφασικό με προσθήκη 1ml χλωροφορμίου και 1 ml νερού ώστε οι νέες αναλογίες να είναι (C:M:W) 1:1:0,9 (v:v:v). Παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση που περιέχει τον PAF σε γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα μετά από φυγοκέντρηση στις 1000 στροφές για 10 λεπτά στους 4°C. Το υδατικό υπόλειμμα εκπλένεται με 0.5 ml χλωροφόρμιο και παραλαμβάνεται η χλωροφορμική φάση μετά από φυγοκέντρηση. Οι 2 χλωροφορμικές φάσεις ενώνονται και φυλάσσονται στους -20°C μέχρι να γίνει ο προσδιορισμός του PAF με τη δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

4.7. Βιολογική δοκιμασία *in vitro* σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Όργανα

- Πλαστικά σιφώνια των 10 ml.

- Αυτόματες πιπέτες
- pH-μετρο (Orion model 410A).
- Φωτόμετρο Helios B Unicam.
- Υδρόλουτρο Julabo
- Φυγόκεντρος Heraeus Labofuge 400R
- Aggregometer (CHRONO-LOG Corporation).
- Σωλήνες falcon 15 ml και 50 ml.
- Βελόνες σύριγγας.

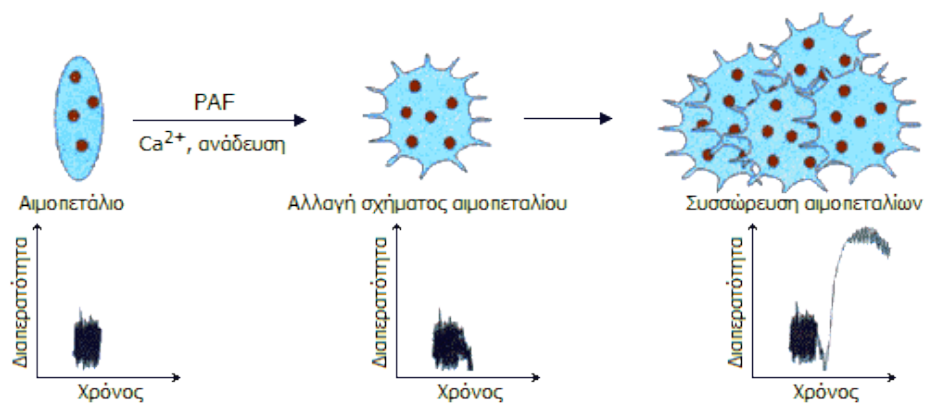
Αντιδραστήρια

- Ξυλόλιο
- Αιθανόλη
- Βαμβάκι
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 100 ml νερού διαλύονται 1,365 g κιτρικού οξέος, 2,5 g κιτρικού νατρίου και 2,0 g γλυκόζης. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1%) ελεύθερος παθογόνων. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα φύλαξης 10xTyrodes stock: Σε 1L περιέχονται 80g NaCl, 1,95g KCl, 2,13g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ και 10g γλυκόζη. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα φύλαξης 100x $CaCl_2$ stock: Ποσότητα 1,911g $CaCl_2$ διαλύεται σε 100ml H_2O . Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα 0,2M EGTA stock: Ποσότητα 0,76g EGTA διαλύεται σε 10ml H_2O . Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στα 7,5 με 5M NaOH. Φυλάσσεται στους 4°C.
- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό.
- Ρυθμιστικά διαλύματα για ρύθμιση του pH-μέτρου.
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg-EGTA pH 6,5): Σε 80ml νερό προστίθενται 10ml Tyrodes 10x. Με την παράλληλη λειτουργία μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται 2,5ml ζελατίνης 10% (τηγμένη στο σημείο βρασμού). Κατόπιν προστίθενται 5ml διαλύματος $NaHCO_3$ (0,203g $NaHCO_3$ σε 10ml H_2O) το οποίο παρασκευάζεται αμέσως πριν τη χρήση. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50ml. Στο ένα από τα δύο προστίθενται 25μl 0.2M EGTA. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με 1N HCl. Αμέσως γεμίζονται σωλήνες των 16ml μέχρι επάνω (χωρίς φουσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

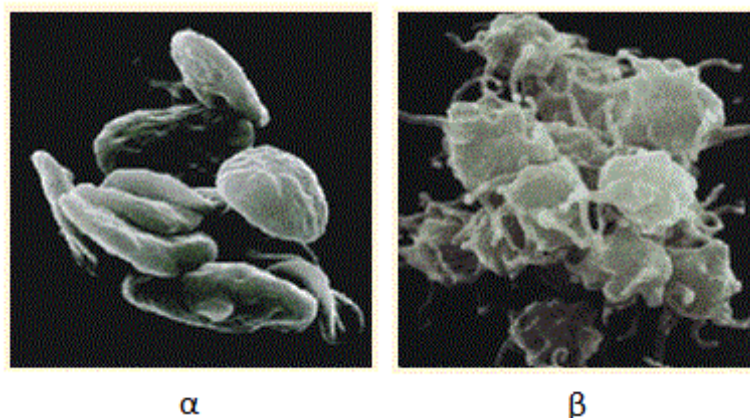
- Διάλυμα Tyrodes και ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2): Σε 5ml Tyrodes 10×stock προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml 10% ζελατίνη. Στη συνέχεια προστίθενται 0,5ml 100×CaCl₂ καθώς και 2,5ml διαλύματος NaHCO₃ (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με 1N HCl. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς με parafilm σωλήνες.
- Αλβουμίνη βοδινού ορού (BSA) stock: Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) /ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους 20°C.
- Διάλυμα BSA 2,5mg/ml φυσιολογικού ορού (working): Από 10ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μl και προστίθενται 250μl BSA stock.

Αρχή Μεθόδου

Στη μέθοδο αυτή πραγματοποιείται απομόνωση αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού και στη συνέχεια μετράται ποσοτικά η συσσώρευση τους από το προς ανάλυση δείγμα με ειδικό φωτόμετρο, το συσσωρευματομέτρο.



Εικόνα 4.3: Ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και απόδοση της καταγραφόμενης καμπύλης ως αύξηση διαπερατότητας με το χρόνο



Εικόνα 4.4: Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση (α) και συσσωρευμένα (β)

Πειραματική πορεία

4.7.1. Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml (falcon) προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού και ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50ml. Οι σωλήνες αναστρέφονται ήπια αρκετές φορές προκειμένου να αναμειχθεί το αίμα με το αντιπηκτικό.

Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 630 xg για 13min στους 24 °C. Παράλληλα μεταφέρονται 2ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14ml. Μετά τη φυγοκέντρηση αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος πλούσιου σε αιμοπετάλια (platelet rich plasma, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml. Το πλάσμα τοποθετείται πάνω στο στρώμα του Ficoll, το οποίο δρα ως μοριακό φίλτρο και διαχωρίζει τα αιμοπετάλια από τα λευκοκύτταρα και τα ερυθροκύτταρα τα οποία διαπερνούν τον πολυσακχαρίτη. Το πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια μοιράζεται στους πλαστικούς σωλήνες με τα 2 ml Ficoll ώστε να περιέχουν 6-9 ml PRP. Το PRP μεταφέρεται με πλαστικά σιφόνια και τοποθετείται με πολύ αργή ροή πάνω στο Ficoll έτσι ώστε να μην υπάρξει καμία ανάμειξη των δύο διαλυμάτων. Μετά από φυγοκέντρηση στα 1525 xg για 21 min στους 25°C, τα αιμοπετάλια εμφανίζονται ως μεσοστιβάδα μεταξύ της υπερκείμενης στιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (platelet poor plasma, PPP) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με πιπέτα μιας χρήσεως, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Τα αιμοπετάλια εκπλένονται ήπια με 4-5 ml διαλύματος Tg-EGTA ώστε να δεσμευτεί το ασβέστιο (Ca^{2+}). Το εναιώρημα που προκύπτει μεταφέρεται εκ νέου σε πλαστικούς σωλήνες με 2 ml Ficoll. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρηση στα 1525 xg για 15 min στους 25°C, οπότε και προκύπτει πάλι μεσοστιβάδα αιμοπεταλίων. Ο διαχωρισμός γίνεται όπως και στο προηγούμενο στάδιο. Έπειτα προστίθενται ίσοι όγκοι (~8ml) Tg σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και μετά από ήπια μεταφέρεται το αιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14ml. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 1636 xg για 15min στους 25°C. Στη συνέχεια το υπερκείμενο απορρίπτεται με αναστροφή και το σωληνάκι αφήνεται να αποστραγγίσει πλήρως πάνω σε διηθητικό χαρτί. Προστίθενται με αυτόματη πιπέτα 0,8 ml Tg σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωληνών ενώνεται σε ένα καθαρό πλαστικό σωλήνα και παράλληλα μετρίεται ο όγκος. Από το διάλυμα αιμοπεταλίων παραλαμβάνονται 10 μl τα οποία

αραιώνονται σε 990 μl Tg και το αραιωμένο διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 λ δίνεται από τη σχέση: αριθμός κυττάρων / 10 λ = $A \times 1.25 \times 10^8$ (A: απορρόφηση).

Με βάση την πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων, το οποίο έχει τελική συγκέντρωση αιμοπεταλίων $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ml [1].

4.7.2. Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 50 μl από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 200 μL Tg-Ca και ακολουθεί επώαση για 30 min σε υδρόλουτρο 37°C. Μετά την επώαση, η κυψελίδα με το εναιώρημα, αφού προστεθεί σε αυτή μικρός μαγνητικός αναδευτήρας, τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη υποδοχή του συσσωρευματομέτρου. Ο μαγνητικός αναδευτήρας περιστρέφεται με 1.200 στροφές το λεπτό κατά τη διάρκεια της μέτρησης. Για κάθε μέτρηση που πραγματοποιείται ο όγκος συμπληρώνεται με BSA 2,5 mg/ml έτσι ώστε σε κάθε μέτρηση ο συνολικός όγκος που προκύπτει να είναι 330 μl . Αρχικά προστίθενται όγκοι από πρότυπο διάλυμα PAF 10^{-9} σε BSA 2,5 mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη αναφοράς του ύψους της προκαλούμενης συσσώρευσης. Το ύψος και η μορφή της συσσώρευσης είναι ανάλογα της συσσώρευσης, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Τα αποθηκευμένα στους -20 °C δείγματα εξατμίζονται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 100 μl BSA 2,5 mg/ml. Αφήνονται 10 λεπτά και έπειτα πραγματοποιείται σε αυτά η κατάλληλη αραιώση (1/10, 1/100, 1/1000) προκειμένου 2-20 μl της αραιώσης να προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων τέτοια ώστε να περιλαμβάνεται στην καμπύλη αναφοράς.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα Πειραμάτων

5.1. Προσκόλληση Εθελοντών

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παρέμβασης οι εθελοντές που επιλέχθηκαν να συμμετέχουν έπρεπε να παρουσιάζουν μικρή κατανάλωση ψαριών, λιγότερο από μία μερίδα (150 γρ) την εβδομάδα. Επιπλέον, για την επιτυχή διεξαγωγή της μελέτης κρίθηκε απαραίτητη η καλή προσκόλληση των συμμετεχόντων στο πρωτόκολλο της παρέμβασης. Συνεπώς έπρεπε να καταναλώνουν καθόλη τη διάρκεια της μελέτης 2 γεύματα των 380 γραμμαρίων ωμού ψαριού εβδομαδιαίως. Στον πίνακα 5.1 φαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα κατανάλωσης ψαριών και για τις 2 ομάδες παρέμβασης, όπως προέκυψε από την καταγραφή των διατροφικών συνηθειών των εθελοντών. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν ότι υπήρξε καλή προσκόλληση στο πρωτόκολλο και για τις 2 παρεμβάσεις. Λόγω του γεγονότος ότι έγινε λήψη φαρμακευτικού σκευάσματος κατά τη διάρκεια των παρεμβάσεων από 4 εθελοντές, τελικά στα αποτελέσματα παρουσιάζονται 30 εθελοντές (14 γυναίκες, 16 άνδρες).

	Αριθμός εθελοντών	Διάμεσος	Τεταρτημόρια (25- 75)
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>			
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στην έναρξη	30	0,18	0,3-0,18
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στη λήξη	30	0,53	0,53-0,61
Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης			
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στην έναρξη	30	0,18	0,18-0,35
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στη λήξη	30	0,53	0,53-0,61

Πίνακας 5.1: Η συχνότητα κατανάλωσης ψαριών πριν και μετά τις δυο παρεμβάσεις, η αύξηση της οποίας είναι στατιστικώς σημαντική ($p<0,000$) μετά το πέρας της παρέμβασης όπως και αναμένεται.

5.2. Βασικά Χαρακτηριστικά Εθελοντών:

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν τους 30 εθελοντές που ολοκλήρωσαν τη μελέτη χωρίς αποκλίσεις με λήψη φαρμακευτικών παρασκευασμάτων. Οι 16 ήταν άντρες και οι 14 γυναίκες. Στον παρακάτω πίνακα (5.2) βλέπουμε τη μέση τιμή του

βάρους, του Δείκτη Μάζας Σώματος, της περιφέρειας μέσης, της συστολικής και της διαστολικής πίεσης, όπως αυτή καταγράφηκε στην έναρξη της κάθε παρέμβασης. Μεταξύ των τιμών των δεικτών αυτών δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για τις δύο παρεμβάσεις. Επιπλέον, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά το πέρας της παρέμβασης στα χαρακτηριστικά του ΔΜΣ, της περιφέρειας μέσης, της συστολικής και της διαστολικής πίεσης σε καμία από τις δύο ομάδες παρέμβασης.

Χαρακτηριστικά εθελοντών	Αριθμός εθελοντώ ν (N)	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση (SD)
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>					
Ηλικία εθελοντών	30	33	65	43,33	7,44
Έτη καπνίσματος	12	4	40	22,00	11,81
Βάρος (Kg)	30	60,10	123,10	84,54	15,20
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m ²)	30	24,32	38,25	29,61	3,55
Περιφέρεια μέσης (cm)	30	84,35	128,25	98,64	10,98
Συστολική πίεση (mmHg)	30	101,00	139,00	125,82	11,38
Διαστολική πίεση (mmHg)	30	65,00	93,00	79,13	7,76
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>					
Ηλικία εθελοντών	30	33	65	43,33	7,44
Έτη καπνίσματος	12	4	40	22,00	11,81
Βάρος (Kg)	30	58,70	127,00	85,03	16,01
Δείκτης Μάζας σώματος (kg/m ²)	30	23,84	39,15	29,74	3,64
Περιφέρεια μέσης (cm)	30	83,90	129,00	99,43	11,00
Συστολική πίεση (mmHg)	30	103,00	151,00	126,40	12,96
Διαστολική πίεση (mmHg)	30	56,00	95,00	78,48	8,76

Πίνακας 5.2: Τα βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών κατά την έναρξη των παρεμβάσεων.

Στους παρακάτω πίνακες εμφανίζονται οι βιοχημικοί δείκτες που μετρήθηκαν πριν και μετά το πέρας της παρέμβασης. Οι δείκτες αυτοί είναι: ολική χοληστερόλη (TC), χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας (LDL), χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας (HDL), τριακυλογλυκερόλες (TAG), γλυκόζη, ινσουλίνη και αντίσταση στην ινσουλίνη (HOMA-IR). Αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος (Kolmogorov-Smirnov test) όλων των δεικτών ούτως ώστε να φανεί εάν ακολουθούν κανονική κατανομή. Στον πίνακα 5.3 εμφανίζονται οι δείκτες που ακολουθούν κανονική κατανομή, οι μέσοι όροι τους με την τυπική απόκλιση για κάθε χρονική στιγμή. Επιπλέον περιλαμβάνονται και τα

αποτελέσματα του paired t-test που πραγματοποιήθηκε, προκειμένου να ελεγχθεί αν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των δεικτών μεταξύ της αρχικής και τελικής τιμής. Μόνο στην παρέμβαση με την εμπλουτισμένη τσιπούρας με τους φυσικής προέλευσης αναστολείς του PAF και μόνο στην περίπτωση της LDL φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$) όπου ο δείκτης αυξήθηκε μετά το πέρας της παρέμβασης.

Τιμές δεικτών πριν και μετά την παρέμβαση					Paired t-test
Βιοχημικός δείκτης	N	Χρονική Στιγμή	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση (SD)	Sig. (2-tailed)
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>					
Τριακυλογλυκερόλες (TAG)	30	0	104,96	43,34	
	30	1	97,53	46,47	
					,345
Χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας (LDL)	30	0	132,04	39,61	
	30	1	137,58	45,69	
					,390
Γλυκόζη	30	0	85,30	10,18	
	30	1	84,47	10,90	
					,643
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>					
Τριακυλογλυκερόλες (TAG)	30	0	97,37	39,74	
	30	1	96,82	42,94	
					,914
Χοληστερόλη χαμηλής πυκνότητας (LDL)	30	0	126,37	33,30	
	30	1	137,17	38,40	
					,025*
Γλυκόζη	30	0	85,10	8,44	
	30	1	88,08	11,02	
					,089

Πίνακας 5.3: Βιοχημικοί δείκτες που ακολουθούν κανονική κατανομή. Οι τιμές δίνονται σε mg/dL εκτός αν αναφέρονται διαφορετικές μονάδες. Η χρονική στιγμή μηδέν (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή 1 το τέλος της. Το (*) συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Για τους υπόλοιπους δείκτες, το Kolmogorov-Smirnov test έδειξε πως δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Για τους δείκτες αυτούς συνεπώς οι τιμές δίνονται ως διάμεσοι με τα τεταρτημόρια 25-75 ενώ η διαφοροποίηση μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης ελέγχθηκε με Wilcoxon.

Στην περίπτωση της απλής τσιπούρας η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά αποτυπώθηκε στην αύξηση της ινσουλίνης μετά το πέρας της παρέμβασης ($p = 0,032$).

Αντίθετα στην παρέμβαση όπου οι συμμετέχοντες κατανάλωσαν την εμπλουτισμένη τσιπούρα παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων της ολικής χοληστερόλης ($p=0,04$), της ινσουλίνης ($p=0,02$ και του δείκτη HOMA-IR($p=0,03$) (Πίνακας 5.4).

Τιμές δεικτών πριν και μετά την παρέμβαση					Wilcoxon test
Βιοχημικός δείκτης	N	Χρονική Στιγμή	Διάμεσος	Τεταρτημόρια (25-75)	Asymp. Sig. (2-tailed)
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>					
Ολική Χοληστερόλη (TC)	30	0	198,28	164,40-227,68	
	30	1	194,23	176,52-227,78	
					0,456
Χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας (HDL)	30	0	44,30	39,15-52,68	
	30	1	46,88	38,00-54,76	
					0,187
Ινσουλίνη (μU/L)	30	0	10,84	7,20-19,49	
	30	1	14,56	8,75-17,41	
					0,032*
Αντίσταση στην ινσουλίνη (HOMA-IR) (καθαρός αριθμός)	30	0	2,16	1,60-3,93	
	30	1	3,00	1,52-3,80	
					0,057
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>					
Ολική Χοληστερόλη(TC)	30	0	192,36	161,63-214,48	
	30	1	191,52	167,70-240,65	
					0,040*
Χοληστερόλη υψηλής πυκνότητας (HDL)	30	0	44,84	39,42-57,03	
	30	1	45,17	36,91-55,80	
					0,837
Ινσουλίνη (μU/L)	30	0	10,46	6,28-17,98	
	30	1	11,75	8,08-23,47	
					0,002*
Αντίσταση στην ινσουλίνη (HOMA-IR) (καθαρός αριθμός)	30	0	2,15	1,28-3,67	
	30	1	2,40	1,71-4,60	
					0,003*

Πίνακας 5.4: Βιοχημικοί δείκτες που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Οι τιμές δίνονται σε mg/dL εκτός αν αναφέρονται διαφορετικές μονάδες. Η χρονική στιγμή μηδέν (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή 1 το τέλος της. Το (*) συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$).

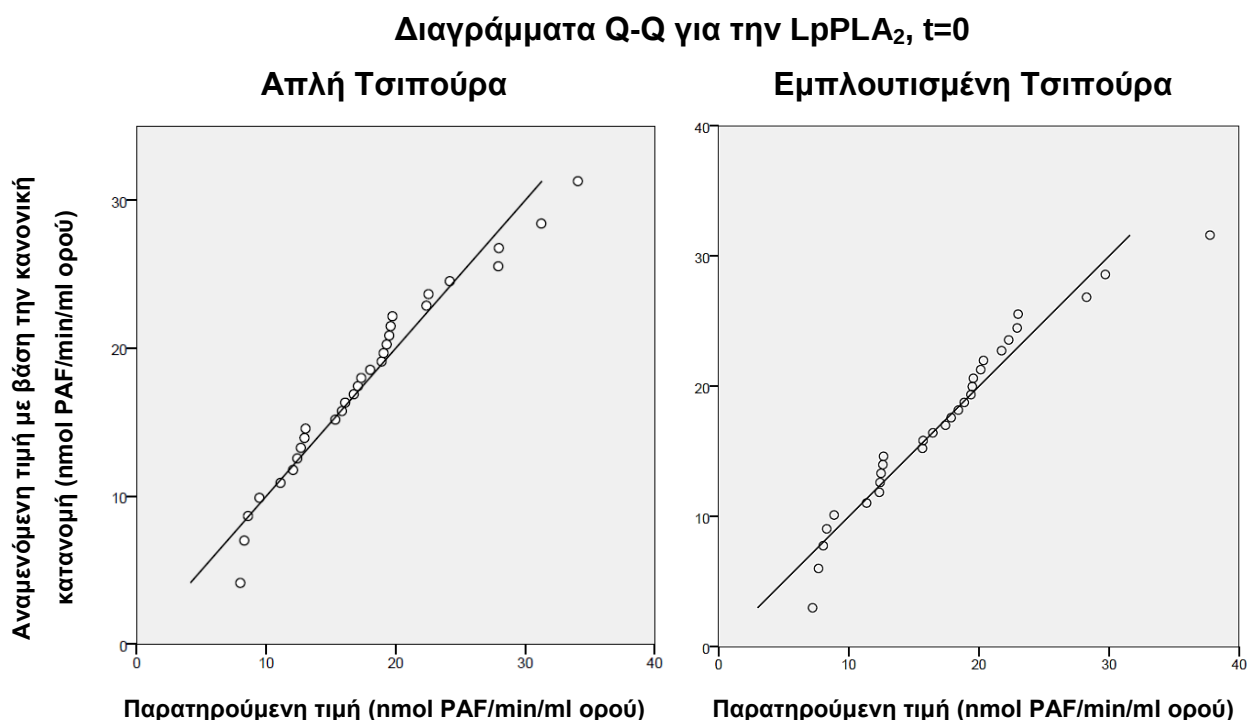
Μετά την πραγματοποίηση repeated measures ANCOVA (ANalysis Of COVariance) για την LDL-χοληστερόλη παρουσιάστηκε διαφοροποίηση ως προς τον χρόνο $p_{\text{time}}=0,04$) η οποία οφείλεται κυρίως στην αύξηση των επιπέδων του δείκτη μετά την παρέμβαση με την εμπλουτισμένη τσιπούρα. Παρόλα αυτά τα δύο ψάρια δεν φάνηκε να διαφοροποιούνται στατιστικώς σημαντικά ($p_{\text{trial}} > 0,05$). Επιπλέον στο Repeated

measures ANOVA για τη γλυκόζη, εμφανίζεται μία τάση για διαφοροποίηση στο χρόνο ($p_{\text{time}}=0,055$) αλλά χάνεται εντελώς μεταξύ των δύο παρεμβάσεων ($p_{\text{trial}}=0,47$).

Είδαμε παραπάνω πως και στις δύο παρεμβάσεις υπήρξε στατιστικά σημαντική αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης. Παρόλα αυτά, μετά την πραγματοποίηση repeated measures ANOVA για τον δείκτη, όπου $p_{\text{time}}=0,000$ $p_{\text{trial}}=0,72$ τα δύο ψάρια δεν φαίνεται να διαφοροποιούνται. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρούνται και στο δείκτη HOMA-IR (δείκτης ινσουλινοαντίστασης) μετά την κατανάλωση των δύο ψαριών (Wilcoxon: απλή τσιπούρα $p=0,057$, εμπλουτισμένη τσιπούρα $p=0,003$), καθώς στο repeated measures ANOVA η στατιστικά σημαντική αύξηση του δείκτη στην περίπτωση της εμπλουτισμένης τσιπούρας παύει τελικά να είναι στατιστικά σημαντική όταν συγκρίνεται με την παρέμβαση της απλής τσιπούρας ($p_{\text{time}}=0,000$, $p_{\text{trial}}=0,23$). Όσον αφορά τους υπόλοιπους βιοχημικούς δείκτες δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές αλλαγές ως προς τον χρόνο ή την παρέμβαση.

5.3. Δραστικότητα Μεταβολικών Ενζύμων PAF

Μετά την πραγματοποίηση των πειραμάτων και τη συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε έλεγχος (Kolmogorov-Smirnov test) για το κάθε ένζυμο ούτως ώστε να ελεγχθεί αν ακολουθεί κανονική κατανομή. Ενδεικτικά παρουσιάζονται παρακάτω τα διαγράμματα Q-Q για τα επίπεδα των ενζύμων στην αρχή της κάθε παρέμβασης.



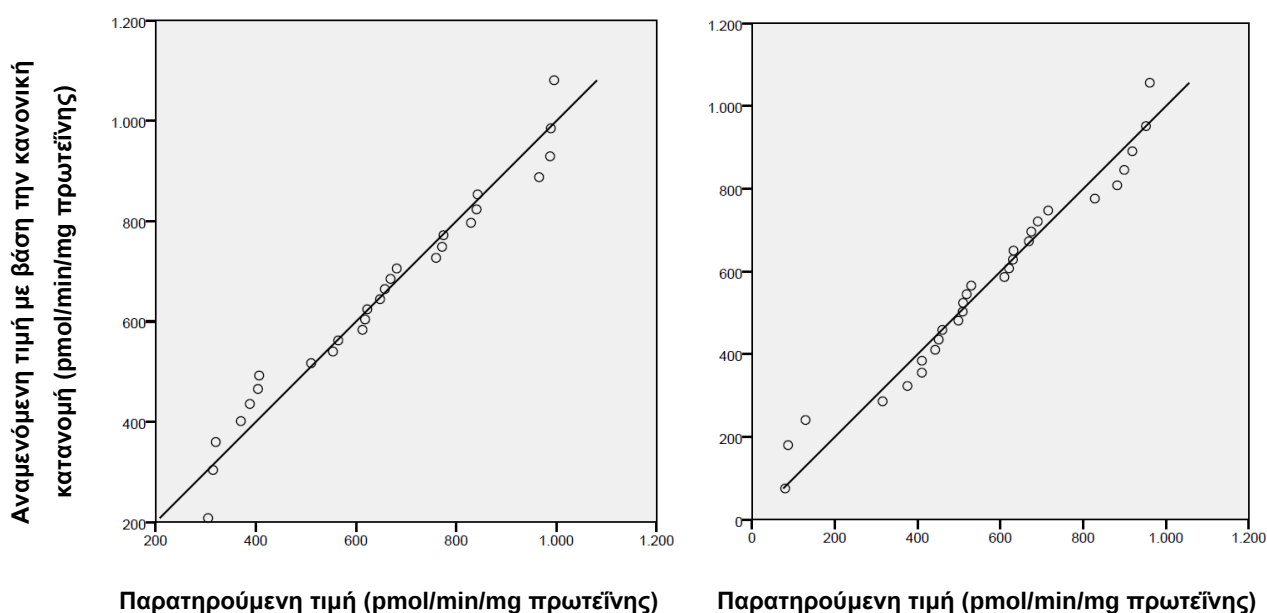
Η LpPLA₂ και η PAF-CPT έδειξαν να ακολουθούν κανονική κατανομή και δίνονται για αυτές η μέση τιμή καθώς και η τυπική απόκλιση (Πίνακας 4.5). Αντίθετα η PAF-AH δεν

παρουσίασε κανονική κατανομή, γεγονός που διακρίνεται εύκολα στα διαγράμματα Q-Q, και επομένως δίνονται για αυτή η διάμεσος και τα τεταρτημόρια (25% και 75%) (Πίνακας 5.6). Στην περίπτωση της PAF-CPT η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λιγότερους εθελοντές (27 για την απλή τσιπούρα και 29 για την εμπλουτισμένη, καθώς ο βιολογικός προσδιορισμός δεν έδωσε καθόλου δραστικότητα για 4 συνολικά ενζυμικά παρασκευάσματα (3 στην απλή τσιπούρα και 1 στην εμπλουτισμένη) που αφορούσαν όλα σε δείγμα από το χρόνο 0 της παρέμβασης.

Διαγράμματα Q-Q για την PAF-CPT, $t=0$

Απλή Τσιπούρα

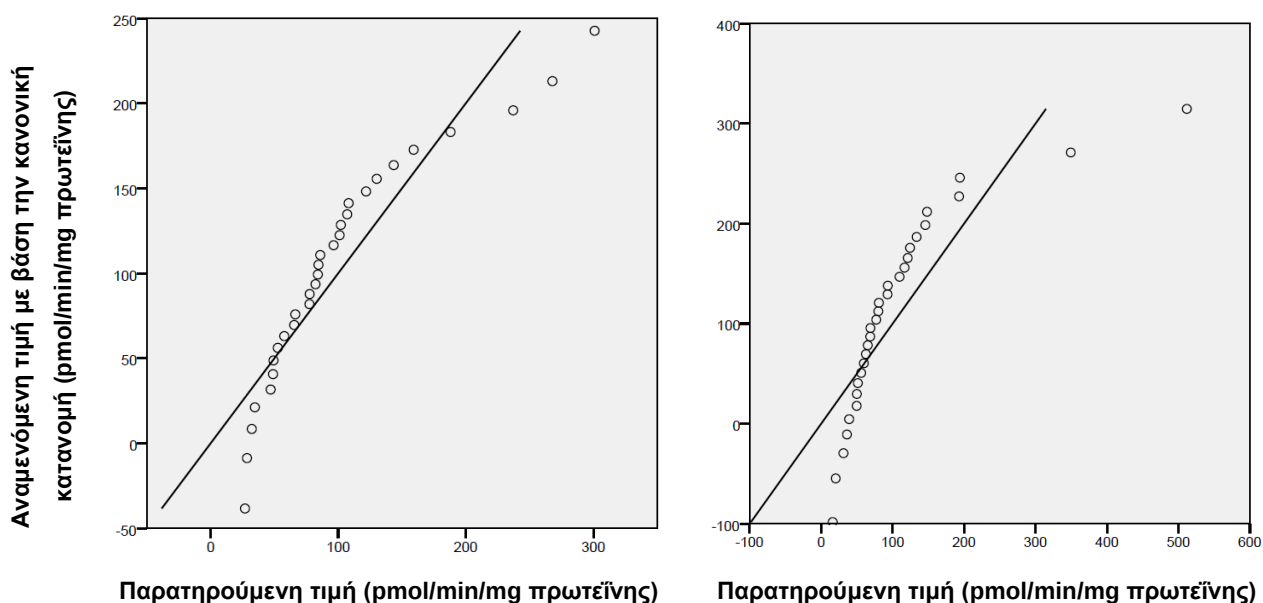
Εμπλουτισμένη Τσιπούρα



Διαγράμματα Q-Q για την PAF-AH, $t=0$

Απλή Τσιπούρα

Εμπλουτισμένη Τσιπούρα



Τιμές δεικτών πριν και μετά την παρέμβαση				
Βιοχημικός δείκτης	N	Χρονική Στιγμή	Μέση Τιμή	Τυπική Απόκλιση (SD)
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>				
LpPLA ₂ (nmol /min /ml ορού)	30	0	17,71	6,65
	30	1	17,58	7,49
PAF-CPT (pmol/min/mg πρωτεΐνης)	27	0	644,54	218,58
	27	1	537,94	269,17
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>				
LpPLA ₂ (nmol /min /ml ορού)	30	0	17,30	7,01
	30	1	16,50	7,04
PAF-CPT (pmol/min/mg πρωτεΐνης)	29	0	565,77	242,04
	29	1	570,70	240,66

Πίνακας 5.5: Η δραστικότητα των ενζύμων LpPLA₂ και PAF-CPT εκφρασμένη σε ποσότητα PAF ανά λεπτό επώασης και ανά μονάδα παρασκευάσματος (ml ορού ή mg πρωτεΐνης). Η χρονική στιγμή μηδέν (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή 1 το τέλος της. Το (*) συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$).

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε έλεγχος για τυχόν διαφοροποίηση μεταξύ των αρχικών τιμών ($t=0$) για το κάθε ένζυμο στις δύο παρεμβάσεις (γενικό γραμμικό μοντέλο, general linear model), όπου δε φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση για κανένα ένζυμο. Για να ελεγχθεί και η PAF-AH, πραγματοποιήθηκε προηγουμένως παραμετροποίηση των τιμών της προκειμένου να ακολουθούν κανονική κατανομή.

Τιμές δεικτών πριν και μετά την παρέμβαση				
Βιοχημικός δείκτης	N	Χρονική Στιγμή	Διάμεσος	Τεταρτημόρια (25-75)
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>				
PAF-AH (pmol/min/mg πρωτεΐνης)	30	0	84,31	51,84-123,94
	30	1	85,64	63,07-134,51
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>				
PAF-AH (pmol/min/mg πρωτεΐνης)	30	0	78,50	50,95-126,66
	30	1	75,70	51,15-127,19

Πίνακας 5.6: Η δραστικότητα της PAF-AH εκφρασμένη σε ποσότητα PAF ανά λεπτό επώασης και ανά μονάδα παρασκευάσματος (mg πρωτεΐνης). Η χρονική στιγμή μηδέν (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή 1 το τέλος της.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και σύγκριση των επιπέδων των ενζύμων στο baseline μεταξύ των δύο φύλων, χωρίς να γίνει διαχωρισμός για την κάθε παρέμβαση. Για τις PAF-AH (ranked) και PAF-CPT δεν φάνηκε κάποια διαφοροποίηση ως προς το φύλο ενώ στην περίπτωση της LpPLA₂ η μειωμένη τιμή στο γυναικείο φύλο ($14,74 \pm 6,29$ nmol /min /ml ορού) έναντι του αντρικού ($19,93 \pm 6,33$) επίσης δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($p=0,110$).

5.3.1. Συσχέτιση των ενζύμων

Για να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχέτιση των επιπέδων των ενζύμων κατά την αρχή της παρέμβασης, υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης του Pearson, r , αφού πρώτα λήφθηκε υπόψη η παραμετροποίηση της PAF-AH. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε ήταν η ισχυρή θετική συσχέτιση των επιπέδων της PAF-AH (ranked) και της PAF-CPT με $p=0,001$ (Πίνακας 5.7).

Συσχέτιση Δραστικότητας των Ενζύμων				
Ένζυμο		LpPLA ₂	PAF-AH (ranked)	PAF-CPT
LpPLA ₂	Pearson Correlation	1		
	Sig. (2-tailed)			
PAF-AH (ranked)	Pearson Correlation	-0,134	1	
	Sig. (2-tailed)	0,325		
PAF-CPT	Pearson Correlation	-0,171	0,441**	1
	Sig. (2-tailed)	0,207	0,001	

Πίνακας 5.7: Συσχέτιση δραστικότητας ενζύμων. Το ** υποδηλώνει συσχέτιση με στατιστική σημαντικότητα $p<0.01$.

5.3.2. Επίδραση της κάθε παρέμβασης

Η LpPLA₂ και η PAF-CPT έδειξαν να ακολουθούν κανονική κατανομή και επομένως ελέγχθηκαν με paired t-test για την διαφοροποίηση των αρχικών και τελικών επιπέδων δραστικότητας. Αντίθετα η PAF-AH ελέγχθηκε για σημαντική διαφοροποίηση με Wilcoxon test καθώς δεν ακολούθησαν οι τιμές της κανονική κατανομή.

Για την LpPLA₂ και την PAF-CPT το paired t-test ανέδειξε ως στατιστικά σημαντική μόνο τη μείωση της δραστικότητας της PAF-CPT και μόνο στην περίπτωση της απλής τσιπούρας ($p=0,011$). Η επίδραση της εμπλουτισμένης με φυσικούς αναστολείς του

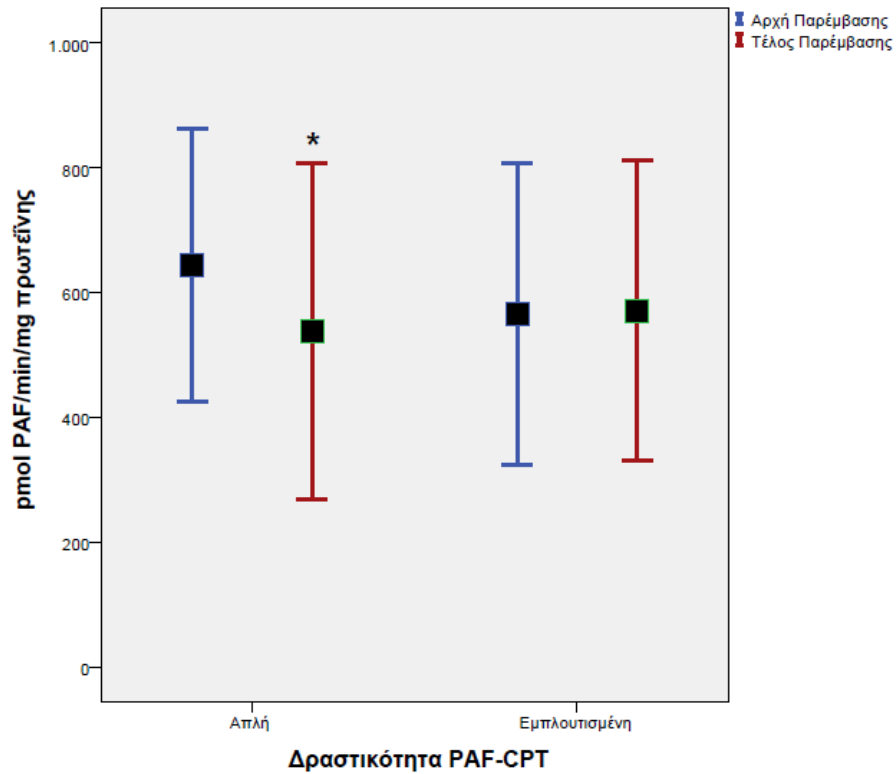
PAF τσιπούρας στη δραστικότητα φάνηκε ελαφρώς στην περίπτωση της LpPLA₂. Παρόλα αυτά η μείωση που υφίστανται τα επίπεδα δραστικότητας του ενζύμου δεν καθίσταται σημαντική σύμφωνα με τον στατιστικό έλεγχο ($p=0,051$). Για τις δύο άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρείται καμία διαφοροποίηση στη δραστικότητα των ενζύμων (LpPLA₂ στην απλή τσιπούρα $p=0,876$ και PAF-CPT στην εμπλουτισμένη $p=0,790$).

Για την ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH), το Wilcoxon test που πραγματοποιήθηκε, δεν έδειξε στατιστικά σημαντική μεταβολή των επιπέδων του ενζύμου από καμία από τις δύο παρεμβάσεις. Μάλιστα φάνηκε επιπλέον πως στους μισούς περίπου εθελοντές ο δείκτης αυξήθηκε ενώ στους υπόλοιπους μειώθηκε (απλή τσιπούρα: ↓13, ↑17 και εμπλουτισμένη τσιπούρα: ↓15 και ↑15).

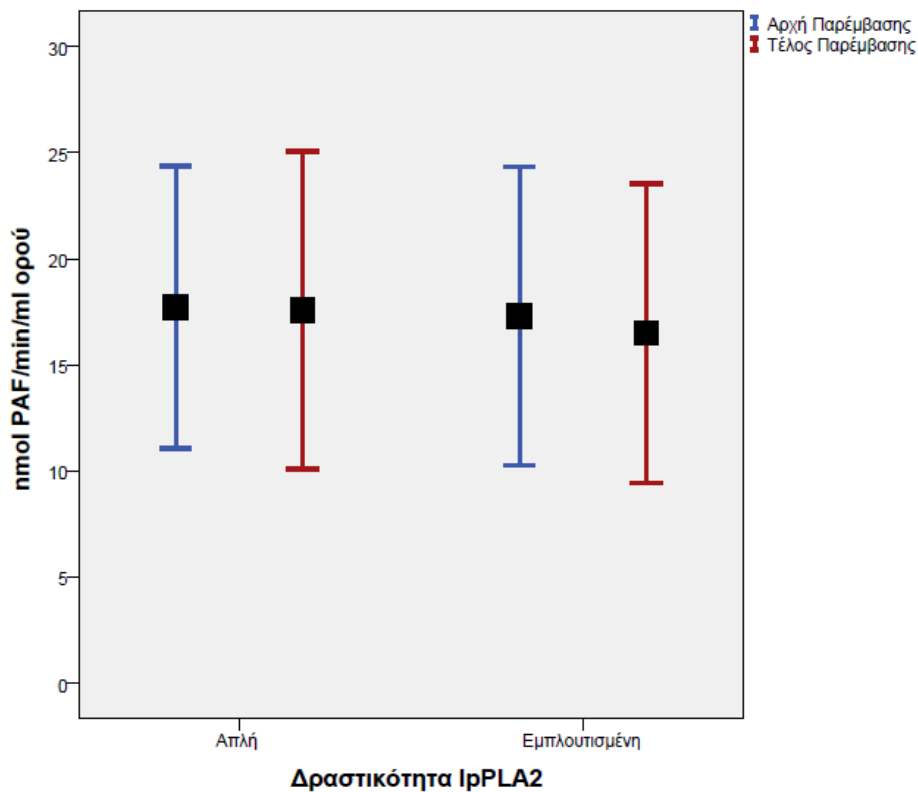
Στατιστική Σημαντικότητα μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης			
Βιοχημικός δείκτης	LpPLA ₂	PAF-CPT	PAF-AH
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>			
Paired t-test, Sig. (2-tailed)	0,876	0,011*	-
Wilcoxon test, Asymp. Sig. (2-tailed)	-	-	0,453
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>			
Paired t-test, Sig. (2-tailed)	0,051	0,790	-
Wilcoxon test, Asymp. Sig. (2-tailed)	-	-	0,829

Πίνακας 5.8: Η σύγκριση έγινε με paired t-test για τα ένζυμα που ακολούθησαν κανονική κατανομή σύμφωνα με το κριτήριο Kolmogorov-Smirnov και με Wilcoxon test για την PAF-AH, της οποίας οι τιμές δεν ακολούθησαν κανονική κατανομή. Το (*) συμβολίζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0.05$).

Στις εικόνες 2 και 3 διακρίνονται οι μέσες δραστικότητες για τις δύο παρεμβάσεις για την PAF-CPT και την LpPLA₂ αντίστοιχα.

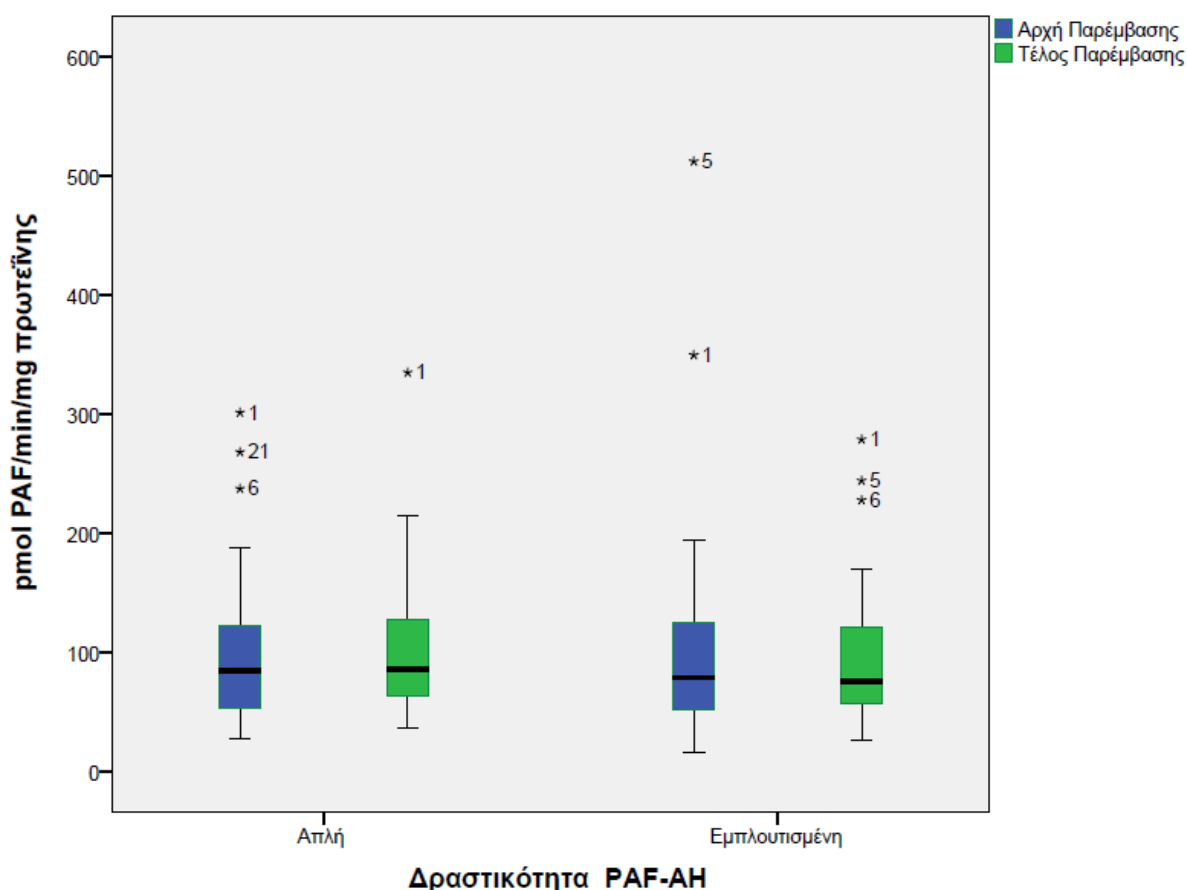


Εικόνα 5.1: Σύγκριση δραστικότητας της PAF-CPT πριν και μετά την κατανάλωση απλής και εμπλουτισμένης τσιπούρας. Το (■) εκφράζει τη μέση τιμή και οι μπάρες αφορούν σε μία τυπική απόκλιση (1SD). Ο * εκφράζει τη στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε $t=0$ και $t=1$, όπου $p<0,05$.



Εικόνα 5.2: Σύγκριση δραστικότητας της IpPLA₂ πριν και μετά την κατανάλωση απλής και εμπλουτισμένης τσιπούρας. Το (■) εκφράζει τη μέση τιμή και οι μπάρες αφορούν σε μία τυπική απόκλιση (1SD). Δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε $t=0$ και $t=1$ σε καμία από τις δύο παρεμβάσεις.

Η μη κανονική κατανομή των τιμών για την PAF-AH κατέστησε απαραίτητη τη χρήση του Wilcoxon test για την σύγκριση των αποτελεσμάτων μεταξύ της αρχής και του τέλους των παρεμβάσεων. Όπως φαίνεται στον πίνακα 5.8 αλλά και στην εικόνα 5.3 (boxplots) δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική αλλαγή των επιπέδων της δραστηριότητας του ενζύμου από καμία παρέμβαση. Μάλιστα η ανάλυση ανέδειξε την ύπαρξη ακραίων τιμών όσον αφορά κυρίως 3 εθελοντές.



Εικόνα 5.3: Σύγκριση δραστηριότητας της PAF-AH πριν και μετά την κατανάλωση απλής και εμπλουτισμένης τσιπούρας. Η οριζόντια γραμμή εκφράζει τη διάμεσο των τιμών και η έγχρωμη περιοχή ορίζονται από τα τεταρτημόρια: Το κάτω όριο αφορά στο 25% και το επάνω στο 75%. Οι μπάρες αφορούν τη μέγιστη και ελάχιστη τιμή ενώ ο * εκφράζει τις ακραίες τιμές. Δε παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα σε $t=0$ και $t=1$ σε καμία από τις δύο παρεμβάσεις.

5.3.3. Σύγκριση μεταξύ των δύο παρεμβάσεων

Για τις περιπτώσεις της LpPLA₂ και της PAF-CPT πραγματοποιήθηκε ανάλυση repeated measures ANCOVA προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση του χρόνου και της παρέμβασης στις δραστηριότητες των ενζύμων αυτών καθώς και η ενδεχόμενη αλληλεπίδραση των παρεμβάσεων στη διάρκεια της διασταυρούμενης μελέτης (Πίνακας 5.9). Η ανάλυση υπέδειξε πως τελικά δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση των δύο παραπάνω ενζύμων ούτε ως προς τον χρόνο (ptime) ούτε ως προς την παρέμβαση (ptrial). Όσον αφορά την αλληλεπίδραση των παρεμβάσεων (ptime*trial),

δεν παρατηρείται ούτε σε αυτήν την περίπτωση στατιστικά σημαντική επίπτωση, παρόλο που στην περίπτωση της PAF-CPT το p είναι αρκετά κοντά στο όριο του 0,05.

Μετά από παραμετροποίηση της PAF-AH, κατέστη δυνατός ο παραπάνω έλεγχος και για την ακετυλοϋδρολάση. Τα αποτελέσματα ήταν επίσης μη στατιστικά σημαντικά ως προς το χρόνο και την παρέμβαση ενώ δεν υπήρξε και αλληλεπίδραση των δύο παρεμβάσεων στα πλαίσια της διασταυρούμενης μελέτης.

Ένζυμο	p_{time}	p_{trial}	$p_{\text{time*trial}}$
LpPLA ₂	0,177	0,606	0,482
PAF-CPT	0,360	0,642	0,066
PAF-AH (ranked)	0,747	0,524	0,576

Πίνακας 5.9: Αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης Repeated Measures ANCOVA. Το p_{time} εκφράζει τη διαφοροποίηση των δύο παρεμβάσεων ως προς το χρόνο. Το p_{trial} εκφράζει την επίδραση των παρεμβάσεων στα δύο ένζυμα. Το $p_{\text{time*trial}}$ εκφράζει την αλληλεπίδραση των δύο παρεμβάσεων στη διάρκεια της διασταυρούμενης μελέτης.

Κεφάλαιο 6: Συζήτηση

Η ανάδειξη της Μεσογειακής Διατροφής ως εργαλείο για την καλή καρδιαγγειακή υγεία έχει οδηγήσει την επιστημονική κοινότητα στην επιμέρους μελέτη των κυριότερων τροφών που την αποτελούν. Σκοπός είναι να αναδειχθούν οι δυνατότητες και η ευεργετικότητά τους όσον αφορά τις καρδιαγγειακές ασθένειες. Ένα ισχυρό παράδειγμα είναι τα ψάρια, τα οποία μελετούνται εκτενώς προκειμένου να ελεγχθεί η επίδρασή τους σε υγιή και ασθενή πληθυσμό ως προς τη βελτίωση της καρδιαγγειακής υγείας. Η εν δυνάμει δράση τους φαίνεται να οφείλεται κυρίως στα υψηλά επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων που περιέχουν, ιδίως τα λιπαρότερα ψάρια.

Με αυτό το σκεπτικό, η παρούσα μελέτη επιχείρησε να εξάγει συμπεράσματα ως προς την επίδραση της κατανάλωσης ψαριού σε παράγοντες που σχετίζονται με την αθηροσκληρωτική διαδικασία και συγκεκριμένα με τη ενδεχόμενη μεταβολή της δραστηριότητας των μεταβολικών ενζύμων του PAF, ανάμεσα σε πλήθος άλλων δεικτών.

Αρχικά, ο δείκτης MedDietScore (0-55) υπολογίστηκε μέσα από τα κατάλληλα ερωτηματολόγια με σκοπό την εκτίμηση της προσκόλλησης των επιλεγμένων εθελοντών στο πρότυπο της μεσογειακής διατροφής καθώς και τη σύγκρισή του με τις αναμενόμενες τιμές για τον ελληνικό πληθυσμό. Σύμφωνα με τη μελέτη ATTICA, όπου συμμετείχαν πάνω από 3000 εθελοντές, η μέση τιμή του MedDietScore στον ελληνικό πληθυσμό κυμαίνεται μεταξύ $25,46 \pm 2,94$ (για τους άντρες) και $27,18 \pm 3,21$ μονάδων (για τις γυναίκες) [1]. Τα αποτελέσματα της τωρινής μελέτης συμφωνούν με τα αναμενόμενα για τον ελληνικό πληθυσμό καθώς η μέση τιμή για το MedDietScore των εθελοντών υπολογίστηκε σε 26 και 26,82 μονάδες για τις δύο παρεμβάσεις.

Όσον αφορά το λιπιδαιμικό προφίλ των συμμετεχόντων, τα επίπεδα των λιποπρωτεϊνών δεν παρεκκλίνουν από τις μέσες τιμές που υπολογίζονται στη μελέτη ATTICA. Επίσης έρχονται σε συμφωνία σε μεγάλο ποσοστό με τα αποτελέσματα μιας μικρότερου μεγέθους μελέτης η οποία διερεύνησε τη σχέση του μεταβολισμού του PAF και των διατροφικών παραγόντων. Οι Ντετοπούλου κ.ά. δημοσίευσαν αποτελέσματα μετά από λεπτομερείς μετρήσεις σε 106 εθελοντές [2]. Για την LpPLA₂ η μέση τιμή δραστηριότητας ήταν 22 ± 6 nmol/min/ml ορού και για την PAF-AH 334 ± 118 pmol/min/mg πρωτεΐνης. Και στις δύο αυτές περιπτώσεις τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ήταν κάπως μειωμένα, ιδίως στην περίπτωση της PAF-AH. Αντίθετα, στην περίπτωση της PAF-CPT, τα επίπεδα δραστηριότητας των ενζύμων στην παρούσα μελέτη

εμφανίζονται ιδιαιτέρως υψηλά σε σχέση με την προαναφερθείσα μελέτη (120 ± 83 pmol/min/mg πρωτεΐνης).

Αν και τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν εμφανίζονται να συμβαδίζουν με την προηγούμενη μελέτη σε υγιείς εθελοντές, υπάρχουν ορισμένες διαφορές μεταξύ των δύο μελετών που ενδέχεται να εξηγούν, εν μέρει τουλάχιστον, τις μεγάλες αποκλίσεις. Κατ' αρχάς, ο μικρότερος αριθμός δείγματος επηρεάζει τη στατιστική ανάλυση στην περίπτωση της PAF-AH η οποία δεν παρουσιάζει κανονική κατανομή και επομένως δίνονται για αυτή διάμεσος και τεταρτημόρια αντί μέσης τιμής και τυπικής απόκλισης. Βασικό σημείο διαφοράς αποτελεί και το BMI των εθελοντών το οποίο είναι αυξημένο κατά 3 μονάδες σχεδόν στην παρούσα μελέτη σε σχέση με την προαναφερθείσα ($26,9 \pm 4,95$ kg/m²). Ενδεχομένως ο αυξημένος δείκτης μάζας σώματος να συσχετίζεται αρνητικά με τα επίπεδα των υδρολυτικών ενζύμων του PAF, σχέση η οποία δεν αναδεικνύεται από τις υπάρχουσες μελέτες, πιθανότητα λόγω του σχετικά μικρού αριθμού των εθελοντών και της μεγάλης διακύμανσης που παρουσιάζει η δραστηριότητα των ενζύμων.

Παρόλα αυτά, τα επίπεδα δραστηριότητας της PAF-CPT είναι πολλαπλάσια αυτών της προηγούμενης μελέτης, ενώ πλησιάζουν αυτά εθελοντών, σε άλλες μελέτες, με εγκατεστημένες φλεγμονώδεις καταστάσεις, όπως για παράδειγμα ασθενείς με HIV [3]. Δεδομένης της περιορισμένης βιβλιογραφίας δε μπορεί να δοθεί ικανοποιητική εξήγηση για την τόσο μεγάλη διαφοροποίηση. Καθίσταται, λοιπόν απαραίτητη η μέτρηση των επιπέδων του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, ελεύθερου και δεσμευμένου, προκειμένου να υπάρξει και ένα δεύτερο μέτρο σύγκρισης. Στην περίπτωση που τα επίπεδα του PAF δε δικαιολογήσουν την τόσο αυξημένη δραστηριότητα τη PAF-CPT, θα πρέπει να αναζητηθούν πιθανότατα μεθοδολογικά σφάλματα τα οποία οδήγησαν σε αυτό το αποτέλεσμα.

Η ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων PAF-AH και PAF-CPT που παρατηρήθηκε στην παρούσα κλινική μελέτη έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Ντετοπούλου κ.ά. [2]. Μια πιθανή εξήγηση για αυτή τη βιοχημική συμπεριφορά είναι πως η αυξημένη λειτουργία τη PAF-CPT αυξάνει τα επίπεδα PAF τα οποία με τη σειρά τους προκαλούν αύξηση της δραστηριότητας του ενδοκυτταρικού καταβολικού ενζύμου PAF-AH. Ο μηχανισμός αυτός λειτουργεί ομοιοστατικά σε υγιείς ανθρώπους προκειμένου να διατηρούνται φυσιολογικά τα επίπεδα του PAF στο αίμα. Παρόλα αυτά δεν παρατηρήθηκε αντίστοιχη συσχέτιση για την εξωκυτάρια φωσφολιπάση LpPLA₂ με κανένα από τα δύο άλλα ένζυμα.

Δεδομένου, πάντως, πως τα επίπεδα των ενζύμων συμβαδίζουν για το μεγαλύτερο μέρος των εθελοντών, η σύγκριση μεταξύ της αρχής και του τέλους των παρεμβάσεων καθώς και των παρεμβάσεων μεταξύ τους είναι εφικτή. Στην υπάρχουσα βιβλιογραφία δεν υπάρχει μελέτη που να αναφέρεται στις δραστηριότητες των μεταβολικών ενζύμων του PAF μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρι. Γνωρίζουμε όμως πως τα επίπεδα του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων και η δραστηριότητα των μεταβολικών του ενζύμων μπορούν και συσχετίζονται με το εκάστοτε λιπιδαιμικό προφίλ του εθελοντή [2]. Επίσης από άλλες μελέτες παρέμβασης με ψάρι έχει μελετηθεί εκτενώς η επίδραση του στους δείκτες αυτούς καθώς και σε φλεγμονώδεις και οξειδωτικούς παράγοντες και τη συσσώρευση αιμοπεταλίων. Η παρούσα εργασία δεν είχε στους σκοπούς της μια τέτοια διερεύνηση και επομένως κάθε άμεση συσχέτιση με την δραστηριότητα των ενζύμων του PAF είναι αδύνατη.

Αναλύοντας τη βιβλιογραφία των μελετών παρέμβασης μπορούμε να παρατηρήσουμε πως οι περισσότερες μελέτες αφορούν σε πάνω από 4 γεύματα ψαριού εβδομαδιαίως ενώ οι ποσότητες κυμαίνονται από 113 έως μέχρι και 700 γραμμάρια ψάρι ανά γεύμα. Σε μεγάλο μέρος των παρεμβάσεων αυτών παρατηρείται μείωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων προκαλούμενης είτε από ADP είτε από κολλαγόνο [4–10]. Η μελέτη των Agren et al. [11] ανάδειξε την επίδραση της αυξημένης κατανάλωσης ψαριού καθώς μόνο για τη συχνότερη κατανάλωση (περίπου 4 γεύματα/εβδομάδα) παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης. Με αυτό το κριτήριο ενδεχομένως θα μπορέσει να εξηγηθεί το γεγονός πως στην παρούσα μελέτη (2 γεύματα/εβδομαδιαίως) δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική μεταβολή των ενζυμικών δραστηριοτήτων, οι οποίες με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν (μέσω των επιπέδων PAF) την αιμοπεταλιακή συσσώρευση. Επιπλέον υπήρξε περίπτωση όπου δεν εμφανίστηκε μείωση της αιμοπεταλιακής συσσώρευσης παρά την ημερήσια πρόσληψη ψαριού [12].

Η πολύ υψηλή κατανάλωση ψαριού φαίνεται από τις παραπάνω μελέτες να οδηγεί και σε μείωση της θρομβοξάνης B_2 κατά κύριο λόγο, ενώ ακολουθούν και σε κάποιες περιπτώσεις κι άλλοι φλεγμονώδεις παράγοντες όπως ο TNF- α , η IL-6 και ο παράγοντας VCAM [10,13–15]. Σε άλλη περίπτωση, παρόλα αυτά η θετική επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ δεν ακολουθήθηκε από αντίστοιχη σε φλεγμονώδεις και οξειδωτικούς δείκτες [16]. Η μετριασμένη, σχετικά με τις υπόλοιπες μελέτες, κατανάλωση ψαριού στην παρούσα μελέτη ενδέχεται, λοιπόν, να μην έχει τόσο μεγάλη επίδραση σε φλεγμονώδεις παράγοντες ώστε να υποστηρίζεται αυτή στατιστικά

σημαντικά στα αποτελέσματα. Με άλλα λόγια, αν η μελέτη περιλάμβανε συχνότερα γεύματα, η στατιστικά σημαντική μείωση της δραστηριότητας της PAF-CPT, στην παρέμβαση της απλής τσιπούρας, ενδέχεται να επεκτεινόταν και στα υπόλοιπα μεταβολικά ένζυμα. Ένδειξη για αυτό μπορεί να αποτελέσει η μείωση της δραστηριότητας της LpPLA₂ μετά την παρέμβαση με εμπλουτισμένο ψάρι, η οποία όμως δεν είναι στατιστικά σημαντική. Βιβλιογραφικά έχει εμφανιστεί θετική συσχέτιση της LpPLA₂ με την LDL, επομένως, θα πρέπει να ελέγξουμε την παραπάνω παρατήρηση με συγχυτικό παράγοντα την LDL.

ενώ σε άλλες αύξηση δεικτών όπως τα TAG και η LDL. Μια σημαντική παρατήρηση σχετικά με τα επίπεδα των τριακυλογλυκερολών και των λιποπρωτεϊνών έχει υποστηριχτεί από 2 μελέτες [17], σύμφωνα με τις οποίες, τα επίπεδα αυτά επηρεάζονται κυρίως από το συνολικό ποσοστό λίπους της διατροφής του εθελοντή και όχι από την κατανάλωση των εκάστοτε ψαριών. Επομένως, και στην παρούσα μελέτη ενδέχεται η αύξηση της LDL που παρατηρείται στην ομάδα παρέμβασης με εμπλουτισμένη τσιπούρα να οφείλεται στο ποσοστό λίπους της διατροφής και θα πρέπει να ερευνηθεί περαιτέρω.

Θα μπορούσε ενδεχομένως να υποστηριχτεί για την παρούσα μελέτη ότι είναι αναγκαίος ο υπολογισμός της ενέργειας που προέρχεται από λίπος και κατά συνέπεια το ποσοστό λίπους που κατανάλωναν οι εθελοντές κατά τη διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον θα πρέπει να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ των επιπέδων αυτών και της δραστηριότητας των μεταβολικών ενζύμων.

Όσον αφορά τη μη στατιστική σημαντικότητα μεταξύ της επίδρασης των δύο παρεμβάσεων, αυτή ενδεχομένως υποδηλώνει πως ο αριθμός των γευμάτων, και κατ'επέκταση η πρόσληψη των αναστολέων PAF φυσικής προέλευσης, δεν ήταν επαρκής ώστε να προκαλέσει σημαντικές διαφορές στη δραστηριότητα των ενζύμων μετά την εν λόγω παρέμβαση.

Συνολικά, η μελέτη αυτή έθεσε βάσεις και ενδείξεις για τα επίπεδα δραστηριότητας των ενζύμων, και την επιρροή τους από διατροφικές μεταβολές. Μια μελλοντική μελέτη με μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών και γευμάτων ίσως μπορέσει να αναδείξει την σημαντική επίδραση της κατανάλωσης ψαριού στην βελτίωση των μεταβολικών διεργασιών για τον PAF in vivo. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορέσει να αναδειχθεί και η επιπρόσθετη δράση της ύπαρξης των αναστολέων φυσικής προέλευσης του PAF, στην περίπτωση που αυτή μπορεί όντως να συμβεί στα πλαίσια μιας διατροφής μεσογειακού προτύπου.

Συγκεντρωτικά αποτελέσματα δραστηριότητας ενζύμων			
<i>Απλή τσιπούρα ιχθυοτροφείου</i>			
Βιοχημικός δείκτης	LpPLA ₂	PAF-CPT	PAF-AH
Αριθμός εθελοντών, N	30	27 ^a	30
Μέση Τιμή, t=0	17,71	644,54	-
Τυπική Απόκλιση (SD), t=0	6,65	218,58	-
Μέση Τιμή, t=1	17,58	537,94	-
Τυπική Απόκλιση (SD), t=1	7,49	269,17	-
Διάμεσος, t=0	-	-	84,31
Τεταρτημόρια (25-75), t=0	-	-	51,84- 123,94
Διάμεσος, t=1	-	-	85,64
Τεταρτημόρια (25-75), t=1	-	-	63,07- 134,51
Paired t-test, Sig. (2-tailed)	0,876	0,011*	-
Wilcoxon test, Asymp. Sig. (2-tailed)	-	-	0,453
<i>Τσιπούρα εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF φυσικής προέλευσης</i>			
Βιοχημικός δείκτης	LpPLA ₂	PAF-CPT	PAF-AH
Αριθμός Εθελοντών, N	30	29 ^a	30
Μέση Τιμή, t=0	17,30	565,77	-
Τυπική Απόκλιση (SD), t=0	7,01	242,04	-
Μέση Τιμή, t=1	16,50	570,70	-
Τυπική Απόκλιση (SD), t=1	7,04	240,66	-
Διάμεσος, t=0	-	-	78,50
Τεταρτημόρια (25-75), t=0	-	-	50,95- 126,66
Διάμεσος, t=1	-	-	75,70
Τεταρτημόρια (25-75), t=1	-	-	51,15- 127,19
Paired t-test, Sig. (2-tailed)	0,051	0,790	-
Wilcoxon test, Asymp. Sig. (2-tailed)	-	-	0,829
<i>Συνολικά (για την PAF-AH προηγήθηκε παραμετροποίηση)</i>			
Βιοχημικός δείκτης	LpPLA ₂	PAF-CPT	PAF-AH
LpPLA ₂ , Pearson correlation	-	-0,171	-0,134
PAF-CPT, Pearson correlation	-0,171	-	0,441**
PAF-AH (ranked) , Pearson correlation	-0,134	0,441**	-
Repeated Measures, p _{time}	0,177	0,360	0,747
Repeated Measures, p _{trial}	0,606	0,642	0,524
Repeated Measures, p _{time*trial}	0,482	0,066	0,576

Πίνακας 6.1: Συγκεντρωτικά αποτελέσματα στατιστικής ανάλυσης. Το (a) υποδηλώνει λιγότερους εθελοντές στις προκείμενες περιπτώσεις λόγω έλλειψης αποτελεσμάτων. Το (*) υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα $p < 0,05$. Το (**) υποδηλώνει στατιστική σημαντικότητα $p < 0,01$.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AA	Αραχιδονικό Οξύ
AAG	Αλκυλο-ακετυλο-γλυκερόλη
ACD	Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη
AcOH	Οξικό οξύ
ADP	Διφωσφορική αδενοσίνη
ApoA	Απολιποπρωτεΐνη A
ApoB	Απολιποπρωτεΐνη B
BCHE	Βουτυρυλο-χολινεστεράση
BMI	Δείκτης Μάζας Σώματος (ΔΜΣ)
BSA	Αλβουμίνη βοδινού ορού
CDP-χολίνη	Κυτιδυλο-διφωσφορική χολίνη
CHCl ₃	Χλωροφόρμιο
CHD	Στεφανιαία Νόσος
CoA-IT	CoA-ανεξάρτητη τρανσακυλάση
cPLA ₂	Φωσφολιπάση A ₂ του κυτοπλάσματος
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
DBP	Διαστολική αρτηριακή πίεση
DHA	Εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ
DMSO	Διμεθυλο-σουλφοξείδιο
DTT	Διθειοθρεϊτόλη
EDTA	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
EGF	Επιδερμικός Αυξητικός Παράγοντας
EGTA	Αιθυλενογλυκερολοτετραοξικό οξύ
EPA	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
FFQ	Ερωτηματολόγιο Συχνότητας Κατανάλωσης Τροφίμων
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HOMA-IR	Δείκτης Αντίστασης στην Ινσουλίνη
IL-6	Ιντερλευκίνη 6
LCAT	Λεκιθίνη: χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
LpPLA ₂	Συνδεδεμένη σε λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A ₂

lyso-PAF AT	Ακετυλο-CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση
MeOH	Μεθανόλη
MgCl ₂	Χλωριούχο μαγνήσιο
NF-κB	Πυρηνικός παράγοντας κB
ox-LDL	Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
PAF	Παράγοντας Ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor)
PAF-AH	PAF-Ακετυλοϋδρολάση
PAF-CPT	DTT CDP-χολίνη:αλκυλακετυλογλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση
PAFR	Υποδοχέας του PAF
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PI	Φωσφατιδυλοϊνositόλη
POPOP	1,4-Δι-2-(5-φαινυλοξαζόλιο) βενζόλιο
PPO	5-Διφαινυλοξαζόλιο
PPP	Πλάσμα Φτωχό σε Αιμοπετάλια
PRP	Πλάσμα Πλούσιο σε Αιμοπετάλια
PS	Φωσφατιδυλοσερίνη
PUFA	Πολυακόρεστα Λιπαρά Οξέα
SBP	Συστολική αρτηριακή πίεση
TAG	Τριακυλογλυκερόλες
TC	Ολική χοληστερόλη
TCA	Τριχλωρο-οξικό οξύ
TLC	Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (Thin Layer Chromatography)
TNF-α	Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων
Tris	Τρις(υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο
TXB ₂	Θρομβοξάνη B ₂
VCAM	Πρωτεΐνη Προσκόλλησης Αγγειακών Κυττάρων
VEGF	Αγγειακός Ενδοθηλιακός Αυξητικός Παράγοντας
VLDL	Λιποπρωτεΐνη πολύ χαμηλής πυκνότητας

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem*. 1979;9355–8.
2. Benveniste J, Tencé M, Varenne P, Bidault J, Boullet C, Polonsky J. Semi-synthesis and proposed structure of platelet-activating factor (P.A.F.): PAF-acether an alkyl ether analog of lysophosphatidylcholine [Semi-synthèse et structure proposée du facteur activant les plaquettes (P.A.F.): PAF-acether, un alkyl ether analog. *Comptes rendus des seances l'Academie des Sci Ser D, Sci Nat*. 1979;1037–40.
3. Blank ML, Snyder F, Byers LW, Brooks B, Muirhead EE. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;1194–200.
4. Snyder F. Platelet-activating factor: The biosynthetic and catabolic enzymes [Internet]. *Biochemical Journal*. 1995. p. 689–705.
5. Antonopoulou S, Nomikos T, Karantonis HC, Fragopoulou E, Demopoulos CA. PAF, a potent lipid mediator. *Bioactive Phospholipids Role in Inflammation and Atherosclerosis*. Transworld Research Network; 2008. p. 85–134.
6. Ninio E, Breton M, Bidault J, Colard O. Biosynthesis of paf-acether XVII. Regulation by the CoA-independent transacylase in human neutrophils. *FEBS Lett*. 1991;138–40. DOI:10.1016/0014-5793(91)81053-B.
7. Snyder F, Lee TC, Blank ML. The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor. *Prog Lipid Res*. 1992;65–86.
8. Gora S, Lambeau G, Bollinger JG, Gelb M, Ninio E, Karabina S-A. The proinflammatory mediator Platelet Activating Factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1093–9. DOI:10.1016/j.bbalip.2006.08.004.
9. Lee TC, Uemura Y, Snyder F. A novel CoA-independent transacetylase produces the ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of platelet-activating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells. *J Biol Chem*. 1992;19992–20001.
10. Liu M, Subbaiah P V. Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase. *Proc Natl Acad Sci*. 1994;6035–9. DOI:10.1073/pnas.91.13.6035.
11. Chao W, Olson MS. Platelet-activating factor: Receptors and signal transduction [Internet]. *Biochemical Journal*. 1993. p. 617–29.
12. Gijón MA, Spencer DM, Leslie CC. Recent advances in the regulation of cytosolic phospholipase A2. *Adv Enzyme Regul*. 2000;255–68. DOI:10.1016/S0065-2571(99)00031-X.
13. Six DA, Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2000;1–19. DOI:10.1016/S1388-1981(00)00105-0.

14. Kudo I, Murakami M. Phospholipase A2 enzymes. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 2002;3–58. DOI:10.1016/S0090-6980(02)00020-5.
15. Murakami M, Kudo I. Phospholipase A2 [Internet]. Journal of Biochemistry. 2002. p. 285–92.
16. Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells [Internet]. Journal of Biochemistry. 1997. p. 1–16.
17. Nixon AB, Greene DG, Wykle RL. Comparison of acceptor and donor substrates in the CoA-independent transacylate reaction in human neutrophils. Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab. 1996;187–96. DOI:10.1016/0005-2760(96)00011-2.
18. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, Harayama T, Ishii S, Taguchi R, Shimizu T. A single enzyme catalyzes both platelet-activating factor production and membrane biogenesis of inflammatory cells. Cloning and characterization of acetyl-CoA:LYSO-PAF acetyltransferase. J Biol Chem. 2007;6532–9. DOI:10.1074/jbc.M609641200.
19. Harayama T, Shindou H, Ogasawara R, Suwabe A, Shimizu T. Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor. J Biol Chem. 2008;11097–106. DOI:10.1074/jbc.M708909200.
20. Baker RR. Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor. Neurochem Res. 2000;677–83.
21. Yanoshita R, Chang HW, Son KH, Kudo I, Samejima Y. Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids. Inflamm Res. 1996;546–9.
22. Faison LD, White HL. Sulfasalazine inhibits lyso-PAF: Acetyl-CoA acetyltransferase. Prostaglandins. 1992;245–9. DOI:10.1016/0090-6980(92)90017-N.
23. White HL, Faison LD. Inhibition of lyso-PAF: Acetyl-CoA acetyltransferase by salicylates and other compounds. Prostaglandins. 1988;939–44. DOI:10.1016/0090-6980(88)90117-7.
24. Mabuchi-Itoh K, Sugiura T, Cheng N, Waku K. Aspirin induces non-enzymatic formation of platelet-activating factor from lyso platelet-activating factor. FEBS Lett. 1993;233–6. DOI:10.1016/0014-5793(93)80639-C.
25. Tsoupras AB, Fragopoulou E, Nomikos T, Iatrou C, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells. Mediators Inflamm. 2007;27683.
26. Karasawa K, Harada A, Satoh N, Inoue K, Setaka M. Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH). Prog Lipid Res. 2003;93–114. DOI:10.1016/S0163-7827(02)00049-8.
27. Stafforini DM, Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases. Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab. 1996;161–73. DOI:10.1016/0005-2760(96)00040-9.

28. Tselepis AD, John Chapman M. Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase. *Atheroscler Suppl.* 2002;57–68. DOI:10.1016/S1567-5688(02)00045-4.
29. Avramopoulou V, Antonopoulou S, Argyropoulos D, Froussios C, Demopoulos CA. Synthesis of a new phosphoglycolipid with biological activity towards platelets. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;767–74. DOI:10.1016/S1357-2725(97)00020-4.
30. Demopoulos CA, Antonopoulou S. A discovery trip to compounds with PAF-like activity [Internet]. *Advances in Experimental Medicine and Biology.* 1997. p. 59–63.
31. Bae K, Longobardi L, Karasawa K, Malone B, Inoue T, Aoki J, Arai H, Inoue K, Lee T. Platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase and its relationship with PAF acetylhydrolases. *J Biol Chem.* 2000;26704–9. DOI:10.1074/jbc.M003951200.
32. Servillo L, Balestrieri C, Giovane A, Pari P, Palma D, Giannattasio G, Triggiani M, Balestrieri ML. Lysophospholipid transacetylase in the regulation of PAF levels in human monocytes and macrophages. *FASEB J.* 2006;1015–7. DOI:10.1096/fj.05-5059fje.
33. Nixon AB, O’Flaherty JT, Salyer JK, Wykle RL. Acetyl-CoA:1-O-Alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine Acetyltransferase Is Directly Activated by p38 Kinase. *J Biol Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc.;* 1999;5469–73. DOI:10.1074/jbc.274.9.5469.
34. Geijsen N, Dijkers PF, Lammers J-WJ, Koenderman L, Coffey PJ. Cytokine-mediated cPLA2 phosphorylation is regulated by multiple MAPK family members. *FEBS Lett.* 2000;83–8. DOI:10.1016/S0014-5793(00)01373-9.
35. Sakamoto H, Tosaki T, Nakagawa Y. Overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase modulates acetyl-CoA, 1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase activity. *J Biol Chem.* 2002;50431–8. DOI:10.1074/jbc.M204190200.
36. Hwang SB. Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms [Internet]. *Journal of Lipid Mediators.* 1990. p. 123–58.
37. Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res.* 2000;41–82. DOI:10.1016/S0163-7827(99)00016-8.
38. Honda Z ichiro, Ishii S, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor [Internet]. *Journal of Biochemistry.* 2002. p. 773–9.
39. McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN. PAF molecular heterogeneity: Pathobiological implications [Internet]. *Laboratory Investigation.* 1993. p. 639–50.
40. Pégrier S, Stengel D, Durand H, Croset M, Ninio E. Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2006;433–43. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2005.11.015.
41. Nakamura M, Honda Z, Waga I, Matsumoto T, Noma M, Shimizu T. Endotoxin transduces Ca²⁺ signaling via platelet-activating factor receptor. *FEBS Lett.* 1992;125–9. DOI:10.1016/0014-5793(92)80957-I.

42. Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI. Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature*. 1995;435–8.
43. Fillon S, Soulis K, Rajasekaran S, Benedict-Hamilton H, Radin JN, Orihuela CJ, El Kasmi KC, Murti G, Kaushal D, et al. Platelet-activating factor receptor and innate immunity: Uptake of gram-positive bacterial cell wall into host cells and cell-specific pathophysiology. *J Immunol*. 2006;6182–91.
44. Swords WE, Buscher BA, Ver Steeg li K, Preston A, Nichols WA, Weiser JN, Gibson BW, Apicella MA. Non-typeable Haemophilus influenzae adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor. *Mol Microbiol*. 2000;13–27. DOI:10.1046/j.1365-2958.2000.01952.x.
45. Braquet PG, Spinnewyn B, Braquet M, Bourgain RH, Taylor JE, Etienne A, Drieu K. BN 52021 and related compounds: A new series of highly specific PAF-acether receptor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L. *Blood Vessel*. 1985;558–72. DOI:10.2491/jjsth1970.16.558.
46. Singh P, Singh IN, Mondal SC, Singh L, Garg VK. Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin. *Fitoterapia*. 2013;180–201. DOI:10.1016/j.fitote.2012.11.002.
47. Mullol J, Bousquet J, Bachert C, Canonica GW, Giménez-Arnau A, Kowalski ML, Simons FER, Maurer M, Ryan D, Scadding G. Update on rupatadine in the management of allergic disorders. *Allergy*. Blackwell Publishing Ltd; 2015;1–24. DOI:10.1111/all.12531.
48. Koussissis SG, Semidalas CE, Antonopoulou S, Kapoulas VM, Demopoulos CA, Kalyvas V. PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF in virgin olive oil [Internet]. *Rev. Fr. Corps Gras*. 1993. p. 323–7.
49. Karantonis HC, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Antithrombotic Lipid Minor Constituents from Vegetable Oils. Comparison between Olive Oils and Others. *J Agric Food Chem*. 2002;1150–60. DOI:10.1021/jf010923t.
50. Tsantila N, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators Inflamm*. 2007;36204. DOI:10.1155/2007/36204.
51. Karantonis HC, Antonopoulou S, Perrea DN, Sokolis DP, Theocharis SE, Kavantzias N, Iliopoulos DG, Demopoulos CA. In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;174–85. DOI:10.1016/j.numecd.2005.07.003.
52. Fragopoulou E, Nomikos T, Tsantila N, Mitropoulou A, Zabetakis I, Demopoulos CA. Biological Activity of Total Lipids from Red and White Wine/Must. *J Agric Food Chem*. 2001;5186–93. DOI:10.1021/jf0106392.
53. Fragopoulou E, Antonopoulou S, Demopoulos CA. Biologically Active Lipids with Antiatherogenic Properties from White Wine and Must. *J Agric Food Chem*. 2002;2684–94. DOI:10.1021/jf011288u.
54. Xanthopoulou MN, Asimakopoulos D, Antonopoulou S, Demopoulos CA, Fragopoulou E. Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes

- activity on U937 cells. *Food Chem. Elsevier Ltd*; 2014;50–9. DOI:10.1016/j.foodchem.2014.05.085.
55. Koussissis SG, Semidalas CE, Hadzistavrou EC, Kalyvas V, Antonopoulou S, Demopoulos CA. PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF in honey and wax [Internet]. *Revue Francaise des Corps Gras*. p. 127–32.
 56. Antonopoulou S, Semidalas CE, Koussissis S, Demopoulos CA. Platelet-Activating Factor (PAF) Antagonists in Foods: A Study of Lipids with PAF or Anti-PAF-like Activity in Cow's Milk and Yogurt. *J Agric Food Chem*. 1996;3047–51.
 57. Nasopoulou C, Tsoupras AB, Karantonis HC, Demopoulos CA, Zabetakis I. Fish polar lipids retard atherosclerosis in rabbits by down-regulating PAF biosynthesis and up-regulating PAF catabolism. *Lipids Health Dis*. 2011;213. DOI:10.1186/1476-511X-10-213.
 58. Mori TA, Beilin LJ, Burke V, Morris J, Ritchie J. Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;279–86.
 59. Nasopoulou C, Karantonis HC, Andriotis M, Demopoulos CA, Zabetakis I. Antibacterial and anti-PAF activity of lipid extracts from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chem*. 2008;433–8. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.04.011.
 60. NOMIKOS T, KARANTONIS H, SKARVELIS C, DEMOPOULOS C, ZABETAKIS I. Antiatherogenic properties of lipid fractions of raw and fried fish. *Food Chem*. 2006;29–35. DOI:10.1016/j.foodchem.2005.01.060.
 61. Nasopoulou C, Karantonis HC, Perrea DN, Theocharis SE, Iliopoulos DG, Demopoulos CA, Zabetakis I. In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits. *Food Chem*. 2010;831–6. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.11.023.
 62. Demopoulos CA, Karantonis HC, Antonopoulou S. Platelet activating factor— a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2003;705–16. DOI:10.1002/ejlt.200300845.
 63. Detopoulou P, Fragopoulou E, Nomikos T, Yannakoulia M, Stamatakis G, Panagiotakos DB, Antonopoulou S. The relation of diet with PAF and its metabolic enzymes in healthy volunteers. *Eur J Nutr*. 2015;25–34. DOI:10.1007/s00394-014-0682-3.
 64. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977;675–84.
 65. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;115–26. DOI:10.1056/NEJM199901143400207.
 66. Rouis M, Nigon F, John Chapman M. Platelet activating factor is a potent stimulant of the production of active oxygen species by human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1988;1293–301. DOI:10.1016/S0006-291X(88)80773-3.
 67. Liapikos TA, Antonopoulou S, Karabina S-AP, Tsoukatos DC, Demopoulos CA, Tselepis AD. Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab*. 1994;353–60. DOI:10.1016/0005-2760(94)90210-0.

68. Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM. Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem.* 2000;419–45. DOI:10.1146/annurev.biochem.69.1.419.
69. Dentan C, Lesnik P, John Chapman M, Ninio E. PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994;353–60.
70. Tjoelker LW, Wilder C, Eberhardt C, Stafforini DM, Dietsch G, Schimpf B, Hooper S, Le Trong H, Cousens LS, et al. Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase. *Nature.* 1995;549–53.
71. Stafforini DM, McIntyre TM, Carter ME, Prescott SM. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor. *J Biol Chem.* 1987;4215–22.
72. Stafforini DM, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein. *Trans Assoc Am Physicians.* 1992;44–63.
73. Handley DA, Arbeeny CM, Lee ML, Van Valen RG, Saunders RN. Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules. *Immunopharmacology.* 1984;137–42. DOI:10.1016/0162-3109(84)90017-1.
74. Dentan C, Lesnik P, Chapman MJ, Ninio E. Phagocytic activation induces formation of platelet-activating factor in human monocyte-derived macrophages and in macrophage-derived foam cells - Relevance to the inflammatory reaction in atherogenesis. *Eur J Biochem.* Blackwell Publishing Ltd; 1996;48–55.
75. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature.* 1993;801–9.
76. Mueller HW, Haught CA, McNatt JM, Cui K, Gaskell SJ, Johnston DA, Willerson JT. Measurement of platelet-activating factor in a canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advanced coronary artery disease. *Circ Res.* 1995;54–63.
77. Ninio E. Phospholipid mediators in the wall: Involvement in atherosclerosis [Internet]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care.* 2005. p. 123–31.
78. Keaney J. Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction. *Mol Aspects Med.* 2000;99–166. DOI:10.1016/S0098-2997(00)00005-4.
79. Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand.* 1980;401–6.
80. Bang HO, Dyerberg J, Sinclair HM. The composition of the Eskimo food in north Western Greenland. *Am J Clin Nutr.* 1980;2657–61.
81. Keys A. Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease [Internet]. *Seven Countries: A Multivariate Analysis of Death and Coronary Heart Disease.*
82. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, De Jesus JM, Houston Miller N, Hubbard VS, Lee IM, Lichtenstein AH, Loria CM, et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to

- reduce cardiovascular risk: A report of the American College of cardiology/American Heart Association task force on practice guidelines. *Circulation*. 2014;76–99. DOI:10.1161/01.cir.0000437740.48606.d1.
83. Perk J, De Backer G, Gohlke H, Graham I, Reiner Ž, Verschuren M, Albus C, Benlian P, Boysen G, et al. European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012). *Eur Heart J*. 2012;1635–701. DOI:10.1093/eurheartj/ehs092.
84. Widmer RJ, Flammer AJ, Lerman LO, Lerman A. “The Mediterranean Diet, its Components, and Cardiovascular Disease.” *Am J Med*. Elsevier Inc.; 2014;229–38. DOI:10.1016/j.amjmed.2014.10.014.
85. Lopez-Garcia E, Schulze MB, Manson JE, Meigs JB, Albert CM, Rifai N, Willett WC, Hu FB. Consumption of (n-3) fatty acids is related to plasma biomarkers of inflammation and endothelial activation in women. *J Nutr*. 2004;1806–11.
86. Zampelas A, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Chrysoshoou C, Skoumas Y, Stefanadis C. Fish consumption among healthy adults is associated with decreased levels of inflammatory markers related to cardiovascular disease: the ATTICA study. *J Am Coll Cardiol*. 2005;120–4. DOI:10.1016/j.jacc.2005.03.048.
87. Ascherio A, Rimm EB, Stampfer MJ, Giovannucci EL, Willett WC. Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men. *N Engl J Med*. 1995;977–82. DOI:10.1056/NEJM199504133321501.
88. Panagiotakos D, Pitsavos C, Chrysoshoou C, Palliou K, Lentzas I, Skoumas I, Stefanadis C. Dietary patterns and 5-year incidence of cardiovascular disease: a multivariate analysis of the ATTICA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2009;253–63. DOI:10.1016/j.numecd.2008.06.005.
89. He K, Song Y, Daviglius ML, Liu K, Van Horn L, Dyer AR, Greenland P. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality: a meta-analysis of cohort studies. *Circulation*. 2004;2705–11. DOI:10.1161/01.CIR.0000132503.19410.6B.
90. He K. Fish, Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Prevention of Cardiovascular Disease-Eat Fish or Take Fish Oil Supplement? *Prog Cardiovasc Dis*. 2009;95–114. DOI:10.1016/j.pcad.2009.06.003.
91. Djoussé L, Akinkuolie AO, Wu JHY, Ding EL, Gaziano JM. Fish consumption, omega-3 fatty acids and risk of heart failure: A meta-analysis. *Clin Nutr*. Elsevier Ltd; 2012;846–53. DOI:10.1016/j.clnu.2012.05.010.
92. Weichselbaum E, Coe S, Buttriss J, Stanner S. Fish in the diet: A review. *Nutr Bull*. 2013;128–77. DOI:10.1111/nbu.12021.
93. Burr ML, Gilbert JF, Holliday RM, Elwood PC, Fehily AM, Rogers S, Sweetnam PM, Deadman NM. Effects of changes in fat, fish, and fiber intakes on death and myocardial infarction: Diet And Reinfarction Trial (DART). *Lancet*. 1989;757–61. DOI:10.1016/S0140-6736(89)90828-3.
94. Ness R, Hughes J, Elwood PC, Whitley E, Smith GD, Burr ML. The long-term effect of dietary advice in men with coronary disease: follow-up of the Diet and Reinfarction trial (DART). *Eur J Clin Nutr*. 2002;512–8. DOI:10.1038/sj.ejcn.1601342.

95. Burr ML. Secondary prevention of CHD in UK men: the Diet and Reinfarction Trial and its sequel. *Proc Nutr Soc.* 2007;9–15. DOI:10.1017/S0029665107005241.
96. Thorngren M, Gustafson A. Effects of 11-week increase in dietary Eicosapentaenoic Acid on bleeding time, lipids and platelet aggregation. *Lancet.* 1981;1190–3. DOI:10.1016/S0140-6736(81)91436-7.
97. Thorngren M, Shafi S, Born GVR. Delay in primary haemostasis produced by a fish diet without change in local thromboxane A₂. *Br J Haematol.* 1984;567–78.
98. Atkinson PM, Wheeler MC, Mendelsohn D, Pienaar N, Chetty N. Effects of a 4-week freshwater fish (trout) diet on platelet aggregation, platelet fatty acids, serum lipids, and coagulation factors. *Am J Hematol.* 1987;143–9. DOI:10.1002/ajh.2830240205.
99. Houwelingen a. C, Hornstra G. Effect of a moderate fish intake on blood pressure, platelet function and safety aspects. *Agents Actions.* 1987;371–2. DOI:10.1007/BF02009083.
100. Houwelingen V. Dietary-fish a controlled effects on serum lipids and apolipoproteins ,. 1990;
101. Muller AD, Van Houwelingen AC, Van Dam-Mieras MCE, Bas BM, Hornstra G. Effect of a moderate fish intake on haemostatic parameters in healthy males. *Thromb Haemost.* 1989;468–73.
102. Honstra G, van Houwelingen AC, Kivits GAA, Fischer S, Uedelhoven W. Influence of dietary fish on eicosanoid metabolism in man. *Prostaglandins.* 1990;311–29. DOI:10.1016/0090-6980(90)90018-Q.
103. Houwelingen AC v., Kester ADM, Hornstra G. Effect of moderate fish intake on platelet aggregation and ATP release in human blood. *Nutr Res.* 1989;1187–96. DOI:10.1016/S0271-5317(89)80141-1.
104. Houwelingen VAC, Hennissen AAHM, Verbeek-Schippers F, Simonsen T, Kester ADM, Hornstra G. Effect of a moderate fish intake on platelet aggregation in human platelet-rich plasma. *Thromb Haemost.* 1988;507–13.
105. Ågren JJ, Hänninen O, Laitinen M, Seppänen K, Bernhardt I, Fogelholm L, Herranen J, Penttilä I. Boreal freshwater fish diet modifies the plasma lipids and prostanoids and membrane fatty acids in man. *Lipids.* Springer-Verlag; 1988;924–9. DOI:10.1007/BF02536338.
106. Ågren JJ, Hänninen O, Hänninen A, Seppänen K. Dose responses in platelet fatty acid composition, aggregation and prostanoid metabolism during moderate freshwater fish diet. *Thromb Res.* 1990;565–75. DOI:10.1016/0049-3848(90)90073-L.
107. Gerhard GT, Patton BD, Lindquist SA, Wander RC. Comparison of three species of dietary fish: Effects on serum concentrations of low-density-lipoprotein cholesterol and apolipoprotein in normotriglyceridemic subjects. *Am J Clin Nutr.* 1991;334–9.
108. Wander RC, Patton BD. Comparison of three species of fish consumed as part of a Western diet: Effects on platelet fatty acids and function, hemostasis, and production of thromboxane. *Am J Clin Nutr.* 1991;326–33.

109. Mann N, Sinclair A, Pille M, Johnson L, Warrick G, Reder E, Lorenz R. The effect of short-term diets rich in fish, red meat, or white meat on thromboxane and prostacyclin synthesis in humans. *Lipids*. 1997;635–44. DOI:10.1007/s11745-997-0081-5.
110. Imano H, Kudo M, Ohira T, Sankai T, Tanigawa T, Iso H, Shimamoto T, Umemura U, Koike K, et al. The effects of fish supplementation of platelet function, count and metabolism in healthy Japanese. *Nihon Eiseigaku Zasshi*. 1999;601–10. DOI:10.1265/jjh.53.601.
111. Seierstad SL, Seljeflot I, Johansen O, Hansen R, Haugen M, Rosenlund G, Frøyland L, Arnesen H. Dietary intake of differently fed salmon; the influence on markers of human atherosclerosis. *Eur J Clin Invest*. 2005;52–9. DOI:10.1111/j.1365-2362.2005.01443.x.
112. Moore CS, Bryant SP, Mishra GD, Krebs JD, Browning LM, Miller GJ, Jebb SA. Oily fish reduces plasma triacylglycerols: a primary prevention study in overweight men and women. *Nutrition*. 2006;1012–24. DOI:10.1016/j.nut.2006.07.005.
113. Lara JJ, Economou M, Wallace AM, Rumley A, Lowe G, Slater C, Caslake M, Sattar N, Lean MEJ. Benefits of salmon eating on traditional and novel vascular risk factors in young, non-obese healthy subjects. *Atherosclerosis*. 2007;213–21. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2006.06.018.
114. Lindqvist H, Langkilde AM, Undeland I, Rådendal T, Sandberg AS. Herring (*Clupea harengus*) supplemented diet influences risk factors for CVD in overweight subjects. *Eur J Clin Nutr*. 2007;1106–13. DOI:10.1038/sj.ejcn.1602630.
115. Lindqvist HM, Langkilde AM, Undeland I, Sandberg A-S. Herring (*Clupea harengus*) intake influences lipoproteins but not inflammatory and oxidation markers in overweight men. *Br J Nutr*. 2009;383–90. DOI:10.1017/S0007114508003073.
116. Din JN, Harding SA, Valerio CJ, Sarma J, Lyall K, Riemersma RA, Newby DE, Flapan AD. Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man. *Atherosclerosis*. 2008;290–6. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2007.04.047.
117. Erkkilä AT, Schwab US, de Mello VDF, Lappalainen T, Mussalo H, Lehto S, Kemi V, Lamberg-Allardt C, Uusitupa MIJ. Effects of fatty and lean fish intake on blood pressure in subjects with coronary heart disease using multiple medications. *Eur J Nutr*. 2008;319–28. DOI:10.1007/s00394-008-0728-5.
118. De Mello VDF, Erkkilä AT, Schwab US, Pulkkinen L, Kolehmainen M, Atalay M, Mussalo H, Lankinen M, Oresic M, et al. The effect of fatty or lean fish intake on inflammatory gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with coronary heart disease. *Eur J Nutr*. 2009;447–55. DOI:10.1007/s00394-009-0033-y.
119. Erkkilä AT, Schwab US, Lehto S, de Mello VD, Kangas AJ, Soininen P, Ala-Korpela M, Uusitupa MIJ. Effect of fatty and lean fish intake on lipoprotein subclasses in subjects with coronary heart disease: a controlled trial. *J Clin Lipidol*. 2014;126–33. DOI:10.1016/j.jacl.2013.09.007.
120. Rajaram S, Haddad EH, Mejia A, Sabaté J. Walnuts and fatty fish influence different serum lipid fractions in normal to mildly hyperlipidemic individuals: A randomized controlled study. *Am J Clin Nutr*. 2009;1657–63. DOI:10.3945/ajcn.2009.26736S.
121. Chiang Y-L, Haddad E, Rajaram S, Shavlik D, Sabaté J. The effect of dietary walnuts compared to fatty fish on eicosanoids, cytokines, soluble endothelial adhesion molecules

- and lymphocyte subsets: a randomized, controlled crossover trial. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2012;111–7. DOI:10.1016/j.plefa.2012.07.007.
122. Hallund J, Madsen BO, Bügel SH, Jacobsen C, Jakobsen J, Krarup H, Holm J, Nielsen HH, Lauritzen L. The effect of farmed trout on cardiovascular risk markers in healthy men. *Br J Nutr*. 2010;1528–36. DOI:10.1017/S0007114510002527.
123. Zhang J, Wang C, Li L, Man Q, Meng L, Song P, Frøyland L, Du Z-Y. Dietary inclusion of salmon, herring and pompano as oily fish reduces CVD risk markers in dyslipidaemic middle-aged and elderly Chinese women. *Br J Nutr*. 2012;1455–65. DOI:10.1017/S0007114511006866.
124. Silverman DI, Ware JA, Sacks FM, Pasternak RC. Comparison of the absorption and effect on platelet function of a single dose of n-3 fatty acids given as fish or fish oil [Internet]. *American Journal of Clinical Nutrition*. 1991. p. 1165–70.
125. Brown AJ, Roberts DCK, Pritchard JE, Truswell AS. A mixed Australian fish diet and fish-oil supplementation: Impact on the plasma lipid profile of healthy men. *Am J Clin Nutr*. 1990;825–33.
126. Brown AJ, Roberts DCK. Fish and fish oil intake: Effect on haematological variables related to cardiovascular disease. *Thromb Res*. 1991;169–78. DOI:10.1016/0049-3848(91)90116-E.
127. Mori TA, Vandongen R, Beilin LJ, Burke V, Morris J, Ritchie J. Effects of varying dietary fat, fish, and fish oils on blood lipids in a randomized controlled trial in men at risk of heart disease. *Am J Clin Nutr*. 1994;1060–8.
128. Ågren JJ, Väisänen S, Hänninen O, Muller AD, Hornstra G. Hemostatic factors and platelet aggregation after a fish-enriched diet or fish oil or docosahexaenoic acid supplementation. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1997. p. 419–21.
129. Elvevoll EO, Barstad H, Breimo ES, Brox J, Eilertsen K-EE, Lund T, Olsen JO, Østerud B. Enhanced incorporation of n-3 fatty acids from fish compared with fish oils. *Lipids*. 2006;1109–14. DOI:10.1007/s11745-006-5060-3.
130. World Medical Association declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *JAMA*. 1997;925–6.
131. Bountziouka V, Bathrellou E, Giotopoulou A, Katsagoni C, Bonou M, Vallianou N, Barbetseas J, Avgerinos PC, Panagiotakos DB. Development, repeatability and validity regarding energy and macronutrient intake of a semi-quantitative food frequency questionnaire: methodological considerations. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2012;659–67. DOI:10.1016/j.numecd.2010.10.015.
132. U.S. Department of Agriculture ARS. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 22. 2009.
133. Trichopoulou A. Composition tables of simple and composite foods. Athens, Greece; 1992.
134. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvaniti F, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and

- obesity, among healthy adults; the accuracy of the MedDietScore. *Prev Med (Baltim)*. 2007;335–40. DOI:10.1016/j.ypmed.2006.12.009.
135. Kollia, M. et al. Development, validity and reliability of the Harokopio Physical Activity Questionnaire in Greek adults. in 8th Panhellenic Congress on Nutrition and Dietetics. Proceedings of the 8th Panhellenic Congress on Nutrition and Dietetics Abstract book. 2006. p. 130–1.
 136. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;248–54. DOI:10.1016/0003-2697(76)90527-3.
 137. Pinckard RN, Ludwig JC. Determination of PAF-2-acetylhydrolase activity. *Fed Proc*. 1986;856.
 138. Detopoulou P, Nomikos T, Fragopoulou E, Stamatakis G, Panagiotakos DB, Antonopoulou S. PAF and its metabolic enzymes in healthy volunteers: interrelations and correlations with basic characteristics. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. Elsevier Inc.; 2012;43–9. DOI:10.1016/j.prostaglandins.2011.10.003.
 139. Tsoupras AB, Chini M, Mangafas N, Tsogas N, Stamatakis G, Tsantila N, Fragopoulou E, Antonopoulou S, Gargalianos P, et al. Platelet-activating factor and its basic metabolic enzymes in blood of naive HIV-infected patients. *Angiology*. 2012;343–52. DOI:10.1177/0003319711420608.