

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΚΑΙ ΑΓΩΓΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΠΜΣ: ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΤΡΟΦΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Επίδραση διατροφικής παρέμβασης με γιαούρτι (εμπλουτισμένο ή μη) σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό σε δείκτες θρόμβωσης

Καψάλης Χaráλαμπος



Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο

ΑΘΗΝΑ 2015

**Επίδραση διατροφικής παρέμβασης με γιαούρτι
(εμπλουτισμένο ή μη) σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό
σε δείκτες θρόμβωσης**

Καψάλης Χαράλαμπος

Τριμελής επιτροπή

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (επιβλέπουσα), 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

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καρδιαγγειακή νόσος είναι η πρώτη αιτία θνησιμότητας παγκοσμίως, με τη θρόμβωση, η οποία προάγεται από τη συσσώρευση αιμοπεταλίων και με τη δράση του PAF, να αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό της. Έτσι, σκοπός της εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση της καθημερινής λήψης εμπλουτισμένου σε OOPLE (βιοδραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα) γιαουρτιού στην ικανότητα των αιμοπεταλίων να ενεργοποιούνται προς συσσώρευση από τρεις παράγοντες: PAF, ADP και TRAP. Στη μελέτη συμμετείχαν 69 υγιείς εθελοντές (25–60 ετών, BMI 25–35 kg/m²), τυχαιοποιημένοι σε 3 ομάδες (ελέγχου, κοινό και εμπλουτισμένο γιαούρτι) για δυο μήνες. Ελήφθησαν 3 δείγματα αίματος (0, 4 και 8 εβδομάδες). Στατιστικά σημαντικές αυξήσεις φάνηκαν στις τιμές EC50_{PAF} (P=0,008) και logEC50_{PAF} (P=0,005) της ομάδας εμπλουτισμένου γιαουρτιού μεταξύ 0 και 4 εβδομάδων και, στο ίδιο χρονικό διάστημα, στις τιμές EC50_{PAF} (P=0,029), EC50_{TRAP} (P=0,037) και logEC50_{TRAP} (P=0,048) της ομάδας κοινού γιαουρτιού. Επομένως, η καθημερινή κατανάλωση τόσο κοινού, όσο και εμπλουτισμένου σε OOPLE γιαουρτιού μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της θρομβωτικής ικανότητας του οργανισμού, δηλαδή να εμφανίσει καρδιοπροστατευτική δράση, κατά τη διάρκεια του πρώτου μήνα.

Λέξεις – Κλειδιά: Καρδιαγγειακή νόσος, αιμοπετάλια, PAF, OOPLE, εμπλουτισμένο γιαούρτι

ABSTRACT

Cardiovascular disease is the leading cause of mortality worldwide and thrombosis, caused by platelet aggregation via PAF activation, is one of its basic aspects. Thus, the purpose of this study is to investigate the effect of the daily consumption of OOPLE (olive pomace bioactive lipid extract)-enriched yoghurt on platelet aggregation caused by PAF, ADP and TRAP. The 69 healthy volunteers (aged 25-60, BMI 25-35 kg/m²) which participated were randomly assigned to 3 groups (control, plain and enriched yoghurt) for 2 months. Three blood samples were obtained (0, 4 and 8 weeks). Statistically significant increases were found for the EC50_{PAF} (P=0,008) and logEC50_{PAF} (P=0,005) values in the enriched yoghurt group during the first four weeks and, during the same period, for the EC50_{PAF} (P=0,029), EC50_{TRAP} (P=0,037) and logEC50_{TRAP} (P=0,048) values in the plain yoghurt group. So, the daily consumption of OOPLE-enriched, as well as plain, yoghurt can lead to a decrease in thrombotic potential during the first month and, thus, exhibit cardioprotective properties.

Keywords: Cardiovascular disease, platelets, PAF, OOPLE, enriched yoghurt

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο	Σελ.
1. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF).....	6
1.1. Γενικά.....	6
1.2. Ιστορική Αναδρομή.....	6
1.3. Χημική Δομή του PAF.....	7
1.4. Μεταβολισμός του PAF.....	8
1.4.1. Βιοσύνθεση του PAF.....	8
1.4.2. Καταβολισμός του PAF.....	9
1.5. Μεταβολικά Ένζυμα του PAF.....	9
1.5.1. Ακετυλο-CoA: λυσο-PAF ακετυλο-τρανσφεράση (lyso-PAF-AT).....	9
1.5.2. Ανεξάρτητη DTT CDP-χολίνη: Αλκυλο-ακετυλο-γλυκερο-χολινο-φωσφοτραν- σφεράση (PAF-CPT).....	10
1.5.3. PAF Ακέτυλο-υδρολάση (PAF-AH).....	10
1.6. Υποδοχείς και Σηματοδότηση του PAF.....	11
1.6.1. Ο Υποδοχέας του PAF (PAFR).....	11
1.6.2. Μηχανισμός Μεταγωγής Σήματος του Επαγόμενου PAF.....	11
1.7. Αναστολείς του PAF.....	12
1.8. Παθοφυσιολογικές Δράσεις του PAF.....	13
1.8.1. Φλεγμονή.....	13
1.8.2. Αθηροσκλήρωση.....	14
1.8.3. Σακχαρώδης Διαβήτης.....	16
1.8.4. Καρκίνος.....	16
1.8.5. Νεφρικές Νόσοι.....	17
2. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ.....	18
2.1. Γενικά.....	18
2.2. Θεωρίες Ανάπτυξης της Αθηροσκλήρωσης.....	19
2.2.1. Θεωρία Απόκρισης σε Τραυματισμό.....	19
2.2.2. Θεωρία Οξειδωτικής Τροποποίησης.....	20
2.3. Θρόμβωση και Αθηροσκλήρωση.....	20
2.3.1. Ο Ρόλος των Αιμοπεταλίων.....	20
2.3.2. Ο Καταρράκτης της Πήξης.....	21
2.3.3. Εξωγενής Πορεία.....	22
2.3.4. Ενδογενής Πορεία.....	22
2.4. Ο Ρόλος του PAF στην Αθηροσκλήρωση.....	23

2.4.1. Έναρξη της Αθηρογένεσης.....	23
2.4.2. Επιδράσεις του PAF σε Κύτταρα Εμπλεκόμενα στην Αθηροσκλήρωση..	25
3. ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΓΙΑΟΥΡΤΙ.....	28
3.1. Πρότυπα Ταυτότητας.....	28
3.1.1. Γιαούρτι.....	28
3.1.2. Επιδόρπια Γιαουρτιού.....	29
3.2. Επίδραση στα Αιμοπετάλια και σε Δείκτες Θρόμβωσης.....	29
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ.....	30
5. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ.....	31
5.1. Δοκιμασία Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων.....	32
5.2. Εύρεση των EC50.....	33
5.3. Στατιστική Ανάλυση.....	33
5.4. Βιοηθική.....	34
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
7. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	40
7.1. Σχολιασμός Αποτελεσμάτων.....	40
7.2. Περιορισμοί της Μελέτης.....	41
7.3. Συμπεράσματα.....	41
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	44

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ

(PAF)

1.1) Γενικά

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) με συστηματική ονομασία 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη, είναι ένα φωσφογλυκεριναιθετικό λιποειδές. Είναι από τους ισχυρότερους φλεγμονώδεις και αλλεργιογόνους παράγοντες που έχουν ανιχνευθεί μέχρι σήμερα.

Βιοσυντίθεται σε διάφορους τύπους κυττάρων (προκαρυωτικά, ευκαρυωτικά, ζωικά και φυτικά). Προκαλεί πλήθος βιολογικών δράσεων όπως συσώρευση αιμοπεταλίων, ερεθισμό, διαστολή των αιμοφόρων αγγείων και αναφυλαξία. Συμμετέχει σε ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών λειτουργιών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (της τάξης των 10^{-12} M) σε διάφορα συστήματα και σχεδόν πάντα σε συγκεντρώσεις της τάξης των 10^{-9} M ως ενδοκυτταρικός αγγελιαφόρος. Ωστόσο, ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (pM) μπορεί να προκαλέσει έντονο ερεθισμό των αεραγωγών και συμπτώματα άσθματος.

1.2) Ιστορική αναδρομή

Το 1966 οι Barbaro και Zvaifler παρατήρησαν ενεργοποίηση και συσώρευση αιμοπεταλίων, με ταυτόχρονη έκκριση ισταμίνης, μετά από επίδραση αντιγόνου σε λευκοκύτταρα που βρίσκονταν στο μικροπεριβάλλον τούζ¹. Το 1970 ο Henson απέδειξε ότι η επίδραση ειδικού αντιγόνου σε λευκοκύτταρα ζώου ευαισθητοποιημένου σε αυτό, προκαλεί την απελευθέρωση ενός διαλυτού παράγοντα, που προκαλεί έκκριση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια². Το 1972 οι Benveniste, Henson και Cochrane ονόμασαν τον παράγοντα αυτό παράγοντα ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF)³. Το 1974 ο Benveniste αναφέρει τη λιποειδική φύση του μορίου. Το 1979 διευκρινίζεται η δομή του PAF μέσω της ημισυνθετικής παρασκευής του από τους Demopoulos, Pinckard και Hanahan⁴.

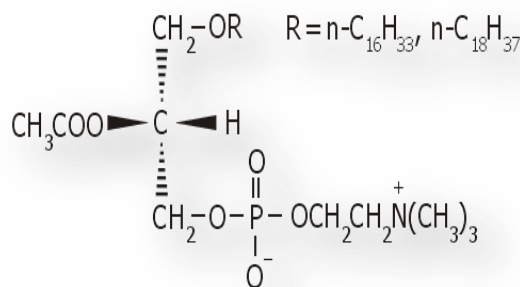
1.3) Χημική Δομή του PAF

Ο PAF είναι ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές, το οποίο διαφέρει από άλλα φωσφολιποειδή, λόγω δύο ασυνήθιστων δομικών χαρακτηριστικών.

Το πρώτο αφορά τον άνθρακα C1 της γλυκερόλης, ο οποίος συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με ένα αλκύλιο 16-18 ατόμων άνθρακα, έναντι του συνηθισμένου εστερικού δεσμού με λιπαρά οξέα μακράς αλύσου.

Το δεύτερο αφορά το υδροξύλιο του ασύμμετρου άνθρακα C2 της γλυκερόλης, το οποίο είναι εστεροποιημένο με οξικό οξύ, ενώ συνήθως η εστεροποίηση γίνεται με μεγαλύτερης αλυσίδας οξέα. Από τα δύο εναντιομερή, μόνο ο L-PAF εμφανίζει βιολογική δραστητικότητα.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι απαραίτητα για την εμφάνιση της βιολογικής δράσης του PAF. Τα εστερικά ανάλογά του παρουσιάζουν δραστητικότητα μειωμένη κατά τρεις τάξεις μεγέθους, ενώ η αντικατάσταση της ακετυλομάδας με ανθρακική αλυσίδα μεγαλύτερη των 4 ατόμων άνθρακα στη θέση 2 του σκελετού, στερεί από την ένωση τη βιολογική της δράση⁵.



Σχήμα 1.1. Η δομή του PAF

1.4) Μεταβολισμός του PAF

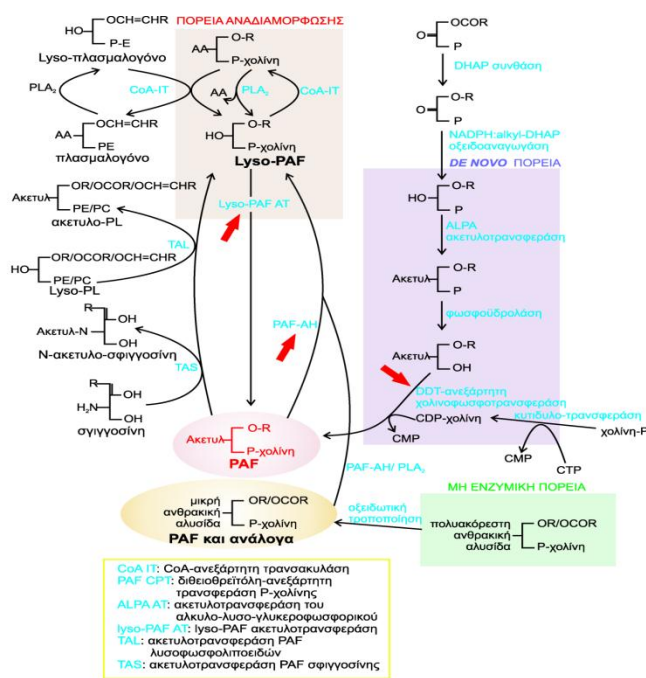
1.4.1) Βιοσύνθεση του PAF

Ο PAF μπορεί να συντεθεί μέσω δύο διαφορετικών ενζυμικών πορειών: την πορεία αναδιαμόρφωσης –remodeling- (παίζει κρίσιμο ρόλο στην οξεία φλεγμονή), και τη εξ υπαρχής -*de novo*- πορεία (υπεύθυνη για τη συνεχή σύνθεση PAF και τη διατήρηση των βασικών επιπέδων του σε ιστούς και αίμα)⁶.

Η βιοσυνθετική πορεία αναδιαμόρφωσης αποτελείται από το μετασχηματισμό ενός ήδη υπάρχοντος μεμβρανικού φωσφολιποειδούς. Σε αυτό συνδέεται με αιθερικό δεσμό η χολίνη. Μετά από κυτταρική διέγερση, η κυτταροπλασματική φωσφολιπάση A_2 (cPLA₂) ενεργοποιείται, συνδέεται στη μεμβράνη και υδρολύει το εστεροποιημένο λιπαρό οξύ της θέσης 2 του μεμβρανικού φωσφολιποειδούς. Το παραγόμενο 2-λυσο-φωσφολιποειδές χρησιμεύει ως υπόστρωμα για τη lyso-PAF ακετυλο-τρανσφεράση (lyso-PAF-AT), που μεταφέρει μια ακετυλο-ομάδα από το ακετυλο-CoA στον lyso-PAF.

Εκτός από την άμεση απόσπαση άκυλο-ομάδας, υπάρχει κι άλλος τρόπος παραγωγής 2-λυσο-φωσφολιποειδών, μέσω της ανεξάρτητης από CoA αντίδρασης τρανσακυλίωσης μεταξύ των αλκυλοακυλογλυκεροφωσφολιποειδών και των λυσο-φωσφολιποειδών που σχηματίζονται με δράση της PLA₂. Η πορεία της ανεξάρτητης από CoA τρανσακυλίωσης (CoA IT) είναι υπεύθυνη για την ταυτόχρονη σύνθεση PAF και κινητοποίηση αραχιδονικού οξέος, αφού είναι εξειδικευμένη για αλκυλο-χολινοφωσφογλυκερίδια που περιέχουν αραχιδονικό⁷.

Η *de novo* βιοσυνθετική πορεία αποτελείται από μια σειρά αντιδράσεων. Ξεκινά με την ακετυλίωση και στη συνέχεια ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση του 1-*O*-αλκυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφορικού. Οι αντιδράσεις αυτές καταλύονται διαδοχικά από την ακετυλο-CoA:αλκυλο-λυσο-γλυκεροφωσφορική ακετυλο-τρανσφεράση (ALPA AT) και αλκυλο-ακετυλο-γλυκεροφωσφορική φωσφοϋδρολάση αντίστοιχα. Η παραγόμενη 1-*O*-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλη μετατρέπεται σε PAF από την ανεξάρτητη διθειοθρεϊτόλης CDP-χολίνη:1-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερόλη φωσφοχολινοτρανσφεράση (PAF-CPT).



Σχήμα 1.2. Οι βιοσυνθετικές πορείες του PAF

1.4.2) Καταβολισμός του PAF

Το κύριο ένζυμο καταβολισμού του PAF είναι η PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF AH), η οποία υδρολύει την ακετυλομάδα από τη θέση sn-2, σχηματίζοντας τον βιολογικά ανενεργό lyso-PAF⁸. Εναλλακτικά, η ανεξάρτητη CoA PAF τρoσσυκλάση (TA), μεταφέρει την ακετυλο-ομάδα σε λυσoφωσφολιποειδή, μετατρέποντας τον PAF σε lyso-PAF⁹.

1.5) Μεταβολικά Ένζυμα του PAF

1.5.1) Ακετυλο-CoA: λυσo-PAF ακετυλο-τρoσσυκλάση (lyso-PAF-AT)

Το τελικό στάδιο σχηματισμού PAF μέσω της βιοσυνθετικής πορείας αναδιαμόρφωσης καταλύεται από τη lyso-PAF ακετυλοτρoσσυκλάση (lyso-PAF AT), αποτελώντας ρυθμιστικό στάδιο. Το ένζυμο είναι δραστικό όταν είναι συνδεδεμένο με μεμβράνες. Η δραστικότητά του είναι αυξημένη σε μικροσωμικά κλάσματα διαφόρων ιστών και κυττάρων^{6, 10, 11, 12, 13}. Απαντά κυρίως στο ενδοπλασματικό δίκτυο.

Υπό συνθήκες ηρεμίας το ένζυμο δείχνει προτίμηση στο αραχιδονυλο-CoA και συνεισφέρει στη βιοσύνθεση μεμβρανών. Υπό συνθήκες οξείας φλεγμονής το ενεργο-

ποιημένο ένζυμο αξιοποιεί πιο αποτελεσματικά το ακετυλο-CoA για να παράγει PAF^{1,14}. Επιπλέον, το ένζυμο δείχνει μια προτίμηση προς τα 16C λυσο-φωσφολιποειδή έναντι των 18C αναλόγων τους¹⁴.

Το βέλτιστο pH δράσης για τη lyso-PAF-AT είναι 7.4. Επιπλέον, ενεργοποιείται από Ca^{2+} , γι' αυτό και αναστέλλεται από χηλικά αντιδραστήρια (π.χ. EDTA, EGTA) και δισθενή ιόντα (π.χ. Mg^{2+} , Mn^{2+}). Επιπλέον, ως *in vitro* αναστολείς της δρουν κάποια φλαβονοειδή (λουτεολίνη, κερκετίνη) και αντιφλεγμονώδη (sulfasalazine)¹⁵, καθώς επίσης και η ασπιρίνη και η τριφλουο-περαζίνη¹⁶.

Πρόσφατα δεδομένο δείχνουν ότι το ένζυμο έχει δύο τουλάχιστον ισομορφές (LPCAT1, LPCAT2), από τις οποίες η LPCAT2 ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής ενώ η LPCAT1 δεν εξαρτάται από τα επίπεδα ασβεστίου και δεν φαίνεται να συμμετέχει σε φλεγμονώδεις διεργασίες^{17, 193}.

1.5.2) Ανεξάρτητη DTT CDP-χολίνη:Αλκυλο-ακετυλο-γλυκερο-χολινο-φωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT)

Η PAF-CPT καταλύει το τελικό βήμα της *de novo* βιοσυνθετικής πορείας του PAF⁶,¹⁸. Δρα σε βέλτιστο pH 8.0 και απαιτεί ιόντα Mg^{2+} για τη δράση της, γι' αυτό και αναστέλλεται από Ca^{2+} . Το DTT διεγείρει τη δράση της PAF-CPT σε μικρό βαθμό, ενώ άλλα σουλφυδριλικά αντιδραστήρια, όπως η μερκαπτοαιθανόλη, δεν έχουν καμμία επίδραση. Τέλος, ορισμένα φάρμακα και βιοενεργές ενώσεις της Μεσογειακής διατροφής την αναστέλλουν *in vitro*¹⁹.

1.5.3) PAF ακετυλο-υδρολάση (PAF-AH)

Η PAF-AH είναι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του PAF^{6, 20, 21, 22}. Έχουν χαρακτηριστεί δύο ενδοκυτταρικά ισοένζυμα, η PAF-AH Ib και η PAF-AH II. Η PAF-AH του πλάσματος και η ενδοκυτταρική ισομορφή II αναγνωρίζουν ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων, ενώ η ενδοκυτταρική μορφή Ib, υδρολύει μόνο PAF. Επιπλέον, η PAF-AH του πλάσματος (γνωστή και ως Lp-PLA2, λόγω του γεγονότος ότι είναι συνδεδεμένη στις λιποπρωτεΐνες) και η PAF-AH II έχουν δράση τρανσακετυλάσης, μεταφέροντας μια ακετυλο-ομάδα από τον PAF σε μια ομάδα ενώσεων^{23, 24}.

1.6) Υποδοχείς και Σηματοδότηση του PAF

Ο PAF δρα μέσω σύνδεσης στον μεμβρανικό υποδοχέα του (στην περικυτταρική μεμβράνη), οπότε ενεργοποιείται μια G-πρωτεΐνη. Οι ενδοκυτταρικές δράσεις του PAF επάγονται μέσω της σύνδεσής του σε πυρηνικούς υποδοχείς. Η αλληλεπίδραση του PAF με τον υποδοχέα του (PAFR) ενεργοποιεί έναν καταρράκτη ποικίλων ενδοκυτταρικών σηματοδοτικών πορειών. Το ποιά πορεία θα ενεργοποιηθεί εξαρτάται από το είδος του κυττάρου και του οργανισμού.

1.6.1) Ο Υποδοχέας του PAF (PAFR)

Ο υποδοχέας του PAF, PAFR, αποτελείται από 7 υδρόφοβες διαμεμβρανικές έλικες και είναι συνδεδεμένος με G-πρωτεΐνη (7-TM GPCR). Μια ομάδα καταλοίπων σερίνης και θρεονίνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο της κυτταροπλασματικής περιοχής εξυπηρετεί ως περιοχή φωσφορυλίωσης για ενδοκυτταρικές πρωτεϊνικές κινάσες, οι οποίες ρυθμίζουν την ενδοκύτωση και την απευαισθητοποίηση του PAFR.

Τα δύο εξέχοντα χαρακτηριστικά του PAF, δηλαδή ο αιθερικός δεσμός στη sn-1 θέση και η μικρή ακυλική αλυσίδα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, ευνοούν ισχυρά τη δέσμευσή του στον PAFR²⁵. Οξειδωμένα φωσφολιποειδή που φέρουν μια μικρή οξειδωμένη ακυλο- αλυσίδα στην sn-2 θέση εύκολα δεσμεύονται στον PAFR, ξεκινώντας έναν ενδοκυτταρικό καταρράκτη ενεργειών, οι οποίες οδηγούν στην μεταγραφή προφλεγμονωδών και προαθηρωματικών γονιδίων^{26, 27}. Επίσης, ο PAFR μπορεί να αλληλεπιδρά με συστατικά του βακτηριακού τοιχώματος (π.χ. λιποπολυσακχαρίτες²⁸ και φωσφατιδυλοχολίνη^{29, 30}). Οι αλληλεπιδράσεις αυτές προάγουν φλεγμονώδεις αποκρίσεις στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος ή μεσολαβούν στην βακτηριακή εισβολή στα ευκαρυωτικά κύτταρα.

1.6.2) Μηχανισμός μεταγωγής σήματος του επαγόμενου PAF

Με δέσμευση του PAF στον υποδοχέα του, ο τελευταίος ενεργοποιείται και, ακολούθως, σε αυτόν δεσμεύεται και ενεργοποιείται μια G-πρωτεΐνη. Ο κυτταρικός τύπος και το προσδεδεμένο μόριο καθορίζουν την ισομορφή της G-πρωτεΐνης που ενεργοποιείται από τον PAFR κάθε φορά. Η ικανότητα του PAF να διεγείρει συγκεκριμένες σηματοδοτικές πορείες μέσω διαφορετικών G-πρωτεϊνών πιθανώς να εξηγεί τις διάφορες βιολογικές αποκρίσεις των ανθρώπινων κυττάρων^{31, 32}.

Η πρώτη από τις δράσεις που ενεργοποιούνται από την δέσμευση του PAF στον PAFR είναι η παροδική υδρόλυση των φωσφοϊνοσιτιδίων της μεμβράνης που οδηγεί στο σχηματισμό ινοσιτολ-1,4,5-τρισφωφορικού (IP^3) και διακυλογλυκερόλης (DAG). Αυτά με τη σειρά τους επάγουν την κινητοποίηση ιόντων Ca^{2+} από ενδοκυτταρικές αποθήκες και την ενεργοποίηση της PKC^{31, 32}. Εκτός αυτού, ο PAF προάγει την αύξηση των ενδοκυτταρικών συγκεντρώσεων Ca^{2+} και μέσω υποδοχέων που επιτρέπουν την εισροή εξωκυτταρικού ασβεστίου.

Άλλος ένας μηχανισμός είναι αυτός της φωσφορυλίωσης και ενεργοποίησης διαφόρων τυροσινικών κινασών (π.χ. c-Src, PTK2 (protein tyrosine kinase 2) γνωστή και ως FAK (Focal Adhesion Kinase) για την μετανάστευση των κυττάρων, Syk, Fyn, Lyn), οι οποίες με την σειρά τους ρυθμίζουν ενδοκυτταρικές πορείες. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων είναι μια από τις πορείες που ρυθμίζονται από την επαγόμενη από PAF φωσφορυλίωση τυροσινικών κινασών^{31, 32, 33}.

Επιπλέον, ο PAF επάγει την έκφραση κυτταροκινών^{34, 35}, ενζύμων του μεταβολισμού των εικοσανοειδών, συστατικών των μεταλλοπρωτεϊνών, καθώς και την έκφραση του ίδιου του υποδοχέα του²⁷. Φαίνεται επίσης πως το C-τελικό άκρο του PAFR, ανεξάρτητα G-πρωτεΐνης, προάγει την ενεργοποίηση του NF-κΒ, επάγοντας την έκφραση πρωτεϊνών σχετιζόμενων με φλεγμονή³⁶.

1.7) Αναστολείς του PAF

Οι αναστολείς του PAF με βάση την ειδικότητα, μπορούν να διακριθούν σε ειδικούς και μη ειδικούς. Οι μη ειδικοί είναι συνήθως μόρια τα οποία αναστέλλουν κάποιο μεσολαβητή της επαγόμενης από τον PAF πορείας σηματοδότησης (π.χ. παρεμποδιστές των διαύλων ασβεστίου, αναστολείς τυροσινικής κινάσης, ρυθμιστές των επίπεδων κυκλικών νουκλεοτιδίων, αναστολείς φωσφολιπασών, κυκλοξυγονασών και λιποξυγονασών, αναστολείς G-πρωτεϊνών, αναστολείς της PKC). Οι ειδικοί αναστολείς του PAF ανταγωνίζονται την πρόσδεση του PAF στον υποδοχέα του και χωρίζονται σε φυσικούς και συνθετικούς. Οι πιο καλά μελετημένοι φυσικοί ανταγωνιστές του PAF είναι τα γκινγκολίδια (από τα φύλλα του κινέζικου δέντρου Ginkgo Biloba, δομής τερπενίου). Άλλοι τέτοιοι αναστολείς είναι η kadsurenone (ένα βενζοφουρανοϊκό νεολιγνάνιο, από το κινέζικο βότανο haifeteng, του οποίου η δομή εξυπηρετεί ως πρότυπο για την ανάπτυξη των συνθετικών

ανταγωνιστών του PAF^{37, 38}), το τετραϋδροκανναβινολ-7-ικό οξύ (κύριος μεταβολίτης της κάνναβης), κ.ά.

Όσον αφορά τους συνθετικούς ανταγωνιστές, οι περισσότεροι δεν έχουν δομικές ομοιότητες με τον PAF. Χαρακτηρίζονται από ετεροκυκλικούς σκελετούς, όπου ένα άτομο αζώτου αλληλεπιδρά με τον PAFR μέσω δεσμού υδρογόνου. Τέτοιοι είναι κάποια θειαζολιδινικά παράγωγα (SM-10661), ιμιδαζολυλο-παράγωγα (modipafant, lexipafant) και παράγωγα ετραζεπίνης^{37, 39, 40}.

Καλή ρύθμιση των δράσεων του PAF μπορεί να επιτευχθεί με λήψη αναστολέων του οι οποίοι απαντούν σε αφθονία σε τρόφιμα χαρακτηριστικά της μεσογειακής διατροφής (π.χ. ελαιόλαδο, κρασί, μέλι, γιαούρτι, ψάρι). Φαίνεται πως υπάρχει μεγάλη ποικιλία τέτοιων ενώσεων (π.χ. πολύπλοκα γλυκολιποειδή, παράγωγα γαγγλιοζιτών, φαινολικοί γλυκοζίτες). Επιπλέον, έχουν αναγνωρισθεί και ενδογενείς αναστολείς του PAF, όπως η καρδιολιπίνη του αίματος⁴¹.

1.8) Παθοφυσιολογικές Δράσεις του PAF

Ο PAF συμμετέχει σε πλήθος παθοφυσιολογικών αποκρίσεων. Μεγάλος αριθμός ερεθισμάτων, σχετιζόμενα κυρίως με την προαγωγή φλεγμονής, οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του. Όταν μειώνεται η ένταση των πορειών αποικοδόμησής του, τα αυξημένα επίπεδα PAF είναι δυνατόν να οδηγήσουν στην προαγωγή παθολογικών καταστάσεων, με τη φλεγμονή να είναι το κύριο χαρακτηριστικό τους.

1.8.1) Φλεγμονή

Η φλεγμονή αποτελεί μια πολύπλοκη βιολογική απόκριση. Ο φυσιολογικός ρόλος της είναι η απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών και νεκρών ιστών. Με αυτόν τον τρόπο προστατεύεται ο οργανισμός από μολύνσεις και διευκολύνεται η επούλωση των ιστών. Όμως η ανεξέλεγκτη προαγωγή φλεγμονής μπορεί να προκαλέσει σοβαρό τραυματισμό στους ιστούς και δυσλειτουργίες στον οργανισμό. Η έκκριση PAF από φλεγμονώδη κύτταρα (π.χ. μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα) αποτελεί μηχανισμό ενίσχυσης της φλεγμονώδους απόκρισης⁴². Ο PAF που έχει παραχθεί από αυτά ενεργοποιεί άλλα κύτταρα, ενισχύοντας έτσι την αρχική σηματοδότηση. Προκαλεί

συσσώρευση αιμοπεταλίων και απελευθέρωση ισταμίνης³, ενώ ασκεί παρόμοιες δράσεις στα ουδετερόφιλα και σε άλλα φλεγμονώδη κύτταρα⁴³. Οι ειδικές αποκρίσεις ποικίλλουν στους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους^{44, 45}.

Ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκθέτουν PAF στις επιφάνειες τους προάγοντας την προσκόλληση ουδετερόφιλων σε αυτά⁴². Η σύνθεση του PAF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι ταχύτατη και η έκθεσή του οδηγεί σε απελευθέρωση πλήθους ειδικών αγωνιστών, όπως θρομβίνη, βραδυκινίνη, λευκοτριένιο D4, ισταμίνη και ADP. Η προσκόλληση των ουδετερόφιλων και των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο επιτυγχάνεται με έκθεση P-σελεκτίνης στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων⁴⁶. Η αρχικά μη ισχυρή πρόσδεση της P-σελεκτίνης των ενδοθηλιακών κυττάρων με την γλυκοπρωτεΐνη-στόχο της στην επιφάνεια των ουδετερόφιλων, ενισχύεται από τη δράση των CD11/CD18 (β2 ιντεγκρίνες, των οποίων η έκκριση προάγεται κατά τη φλεγμονώδη απόκριση). Η ενεργοποίηση και προσκόλληση των φλεγμονωδών κυττάρων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα παρεμποδίζεται από τους αγωνιστές του PAFR ή/και με έκθεση των διεγερμένων ενδοθηλιακών κυττάρων σε PAF AH πριν εκτεθούν στα ουδετερόφιλα⁴². Οι προαναφερθείσες αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων είναι μείζονος σημασίας για την προαγωγή της φλεγμονώδους απόκρισης και ο ρόλος του PAF υπό αυτές τις συνθήκες είναι απαραίτητος.

1.8.2) Αθηροσκλήρωση

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή που μπορεί να οδηγήσει σε μια οξεία κλινική διαταραχή μέσω ρήξης της αθηρωματικής πλάκας και θρόμβωσης. Παράγοντες κινδύνου που προάγουν την εμφάνισή της είναι τα αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL (Ox-LDL), το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης και η συστηματική φλεγμονή⁴¹. Ο PAF παίζει σημαντικό ρόλο σε κρίσιμα σημεία της πορείας αθηρογένεσης^{41, 47}. Επιπλέον, η οξείδωση των LDL οδηγεί σε περαιτέρω παραγωγή PAF^{48, 49}.

Ο PAF συντίθεται στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα, εκτίθεται στην κυτταρική τους επιφάνεια και επιτρέπει την προσκόλληση λευκοκυττάρων σε αυτά⁴⁴. Ταυτόχρονα αυξάνει τη διαπερατότητα⁵⁰ του ενδοθηλίου επιτρέποντας σε

μακρομόρια (LDL, Ox-LDL) και κύτταρα να μεταναστεύουν στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο. Ο PAF συντίθεται και από τα προσκολλημένα στο ενδοθήλιο ενεργοποιημένα αιμοπετάλια⁵¹. Επιπλέον, τα μόρια Ox-LDL επάγουν μερικώς την προσκόλληση των μονοκυττάρων στο ενδοθήλιο, μέσω του PAFR⁵².

Ο PAF παράγεται από τα μακροφάγα και αφρώδη κύτταρα ενεργοποιώντας τη φαγοκύτωση, ενισχύοντας ταυτόχρονα τα σήματα φλεγμονής στον υποενδοθηλιακό χώρο ασκώντας προφλεγμονώδη, προαθηρωματική και προθρομβωτική δράση⁵³. Επιπλέον προωθεί τον πολλαπλασιασμό των αγγειακών κυττάρων και την σύνθεση IL-6 στα λεία μυϊκά κύτταρα^{41, 54}. Επίσης, προκαλεί την απελευθέρωση πρωτε-ασών, όπως η ελαστάση, από τα λευκοκύτταρα διευκολύνοντας τη ρήξη της αθηρω-ματικής πλάκας. Οι παραπάνω επιδράσεις παρεμποδίζονται από ανταγωνιστές του PAF και αύξηση της δραστηριότητας της PAF AH⁴¹.

Κλινικές μελέτες σε ασθενείς με προχωρημένου σταδίου αθηροσκλήρωση δείχνουν υψηλά επίπεδα PAF στα στεφανιαία αγγεία⁵⁵. Επιπλέον, μελέτες σε ζώα αποδεικνύουν την προστατευτική επίδραση των ανταγωνιστών του PAF εναντίον της αθηροσκλήρωσης. Η χορήγηση αγωνιστών του PAFR μειώνει σημαντικά το ποσοστό της εστεροποιημένης χοληστερόλης στην αορτή κουνελιών που ακολούθησαν υπερχοληστερολαιμική διαίτα, χωρίς να επηρεάζονται τα επίπεδα χοληστερόλης του πλάσματος⁵⁶. Επιπρόσθετα, η PAF AH δρα ως ένας προληπτικός ή εναλλακτικός παράγοντας κατά της παθολογικής φλεγμονής σε ένα πλήθος ζωικών μοντέλων²². Η αυξημένη έκφραση της PAF AH σε ζώα οδηγεί και σε αύξηση της δραστηριότητάς της, αναστέλλοντας την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης⁵⁷.

Επίσης, να σημειωθεί πως το κάπνισμα προκαλεί οξείδωση των LDL, ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων και αύξηση των επιπέδων PAF. Ταυτόχρονα, ενώσεις που περιέχονται στον καπνό του τσιγάρου φαίνεται να μειώνουν τη δραστηριότητα της PAF AH⁵⁸, άρα και τις αντιαθηρογόνες ιδιότητές της^{41, 59}. Η οξείδωση της LDL προκαλεί επίσης μείωση της δραστηριότητάς της^{48, 53}.

1.8.3) Σακχαρώδης Διαβήτης

Ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1 (DM1) είναι μια χρόνια φλεγμονώδης διαταραχή. Στους ασθενείς παρατηρείται αυξημένη ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων⁶⁰ ενώ βρίσκονται αυξημένα και τα επίπεδα PAF στον ορό^{61, 62}. Η χορήγηση φυσικών ή συνθετικών αγωνιστών του PAFR, μειώνει τη βαρύτητα της ασθένειας με δοσο-εξαρτώμενο τρόπο σε αρουραίους^{63, 64}, ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί σε διαβητικούς αρουραίους με χρήση ανασυνδυασμένης PAF AH⁶⁵.

Επίσης, τα επίπεδα PAF στα ούρα ασθενών με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (DM2) είναι αυξημένα, κάτι που υποδεικνύει την εμπλοκή του PAF και σε αυτόν τον τύπο της ασθένειας⁶⁶.

1.8.4) Καρκίνος

Ο PAF φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη των νεοπλασιών⁶⁷ και μοιάζει να εμπλέκεται σε διάφορες μορφές καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού⁶⁸, του ηπατοκυτταρικού καρκινώματος⁶⁹, του καρκίνου του παχέος εντέρου⁷⁰, των μηνιγγιωμάτων⁷¹ και του νεφροκυτταρικού καρκινώματος⁷². Ο ρόλος του PAF υποδεικνύεται από το γεγονός ότι προάγει την ανάπτυξη καρκινικών κυτταρικών σειρών^{72, 73}, ενισχύει την έκφραση ογκογονιδίων⁷⁴, ενισχύει την ικανότητα προσκόλλησης καρκινοκυττάρων στο αγγειακό ενδοθήλιο⁷⁵ και διεγείρει τη διαδικασία αγγειογένεσης⁷⁶. Επιπλέον, αγγειογενετικοί παράγοντες (TNF- α ⁷⁷, VEGF⁷⁸) προάγουν τη σύνθεση PAF σε φυσιολογικά και καρκινικά κύτταρα, με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενίσχυση του σήματος.

Τα επίπεδα του PAF εμφανίζονται αυξημένα σε ασθενείς με διάφορους τύπους καρκίνου^{60, 79}. Αλλαγές έχουν παρατηρηθεί και στις δραστικότητες ενζύμων σχετιζόμενων με το μεταβολισμό του PAF^{70, 71}. Χρήση αγωνιστών του PAFR μειώνει τη μετάσταση^{67, 80} και την ανάπτυξη όγκων⁸⁰, καθώς και την προκαλούμενη από τον PAF κινητικότητα σε καρκινικές κυτταρικές σειρές⁸¹.

1.8.5) Νεφρικές Νόσοι

Διάφορες μελέτες σε κυτταρικές καλλιέργειες από ζώα και ανθρώπους εμπλέκουν τον PAF στην παθογένεση της νεφρικής βλάβης^{82, 83}. Για παράδειγμα, σε ζωικά μοντέλα, η έγχυση PAF στη νεφρική αρτηρία οδηγεί σε αυξημένη πρωτεϊνουρία και σπειραματική διαπερατότητα⁸⁴. Επίσης, αυξάνεται το ποσοστό νερού στα ούρα και η απέκκριση ηλεκτρολυτών, μειώνεται η νεφρική αγγειακή αντίσταση και δραστηριότητα και προκαλείται νατριούρηση και καλιούρηση, καθώς και εξασθένηση της νεφρικής αγγειοσυστολής⁸⁵. Επίσης έχει παρατηρηθεί αυξημένη παραγωγή PAF σε διάφορα πειραματικά μοντέλα νεφρικής βλάβης, όπου η χορήγηση αγωνιστών του PAFR μπορεί να βελτιώσει την κλινική εικόνα⁸⁶.

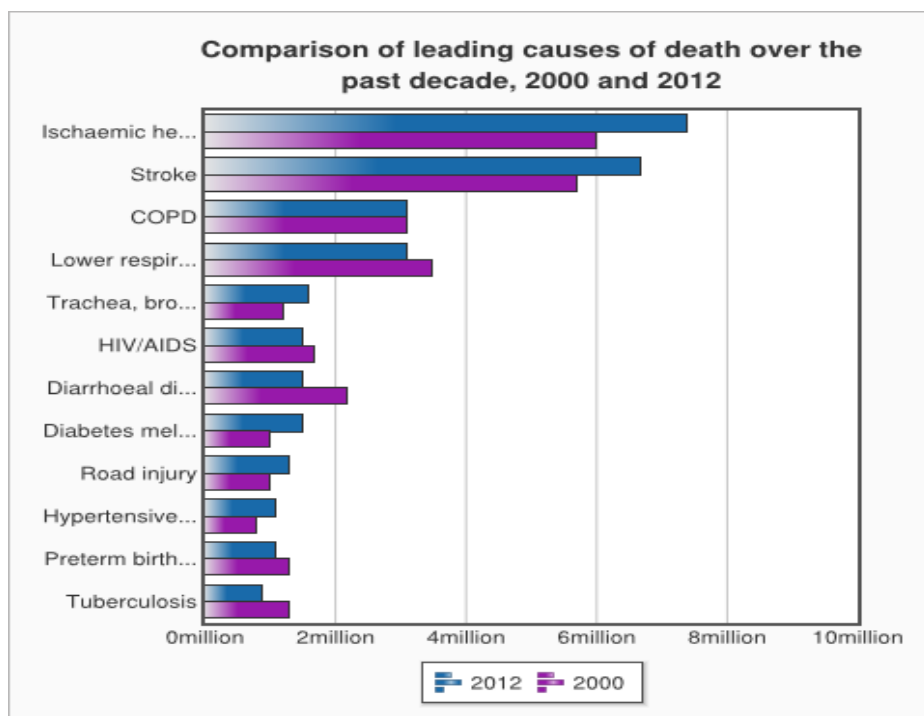
Γενικά, ο PAF έχει διάφορες επιδράσεις στα νεφρικά κύτταρα. Οι δράσεις του στα μεσαγγειακά κύτταρα είναι πιο σαφείς από ότι σε άλλους κυτταρικούς τύπους. Διεγείρει πλήθος σηματοδοτικών πορειών σε καλλιεργημένα μεσαγγειακά κύτταρα⁸⁷ προκαλώντας μεσαγγειακή κυτταρική συστολή⁸³ και σχηματισμό αφρωδών μεσαγγειακών κυττάρων^{88, 89}.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

2.1) Γενικά

Η αθηροσκλήρωση είναι μια αργή διαδικασία η οποία προάγεται από τη φλεγμονή, τη θρόμβωση και το οξειδωτικό stress, και οδηγεί στην εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου μέσω της ανάπτυξης αθηρωματικής πλάκας στα στεφανιαία και σε περιφερειακά αγγεία. Η διάρρηξη της πλάκας οδηγεί στην απελευθέρωση θραυσμάτων της στην κυκλοφορία του αίματος. Τα θραύσματα αυτά με τη σειρά τους είναι ικανά να αποφράξουν αγγεία, οδηγώντας τελικά σε οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, πνευμονική εμβολή, καρδιακή ανεπάρκεια και άλλες παθολογικές καταστάσεις.

Σύμφωνα με τον WHO, η καρδιαγγειακή νόσος είναι η κύρια αιτία θανάτου παγκοσμίως⁹⁰, προκαλώντας 17.5 εκατομμύρια θανάτους το 2012 (περίπου 30% της ολικής θνησιμότητας). Στην Ελλάδα, η καρδιαγγειακή νόσος είναι η αιτία του 48% της ολικής θνησιμότητας (περίπου 53,760 θάνατοι)⁹¹. Μάλιστα, φαίνεται πως από το 2000 ως το 2012 ο αριθμός των θανάτων από καρδιαγγειακά έχει αυξηθεί σημαντικά.



Σχήμα 2.1. Η ισχαιμική καρδιακή νόσος και τα εγκεφαλικά επεισόδια, κύριες επιπλοκές της καρδιαγγειακής νόσου, αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου παγκοσμίως

Η διαδικασία της αθηρογένεσης είναι πολυπαραγοντική και ιδιαίτερα πολύπλοκη. Οι κύριοι παράγοντες κινδύνου που μέχρι σήμερα έχουν συνδεθεί με την εμφάνισή της ανήκουν από τη μία πλευρά στους μη τροποποιήσιμους όπως είναι το φύλο, η ηλικία και το οικογενειακό ιστορικό και από την άλλη πλευρά στους τροποποιήσιμους όπως η παχυσαρκία, η υπέρταση (>140/90 mm Hg), το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης και τα αυξημένα επίπεδα οξειδωμένης LDL (ox-LDL).

2.2) Θεωρίες Ανάπτυξης της Αθηροσκλήρωσης

Η επικρατούσα θεωρία για την ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης είναι αυτή της φλεγμονής. Οι πρώτες συσχετίσεις αθηροσκλήρωσης-φλεγμονής έγιναν από τον Rayer (1823)⁹² και τον Virchow (1856)⁹³, όμως οι πρώτες αποδείξεις ήρθαν μόλις το 1950⁹⁴.

2.2.1) Θεωρία της Απόκρισης σε Τραυματισμό

Από τις πρώτες θεωρίες που συμπεριέλαβαν τη θρόμβωση στο μηχανισμό αθηρογένεσης ήταν αυτή του Rockitansky⁹⁵, ενώ ο Virchow⁹⁶ ήταν ο πρώτος που συμπεριέλαβε τα λιποειδή ως στοιχείο στη δική του θεωρία. Όμως ο Ross ήταν εκείνος που πρότεινε τελικά τη θεωρία της απόκρισης σε τραυματισμό⁹⁷.

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή⁹⁸ ο τραυματισμός του ενδοθηλίου αυξάνει τη συγκολλητικότητα του για λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια, καθιστώντας το μικροπεριβάλλον του προ-θρομβωτικό. Τα προσκολλημένα κύτταρα εκκρίνουν κυτταροκίνες και πλήθος παραγόντων (αγγειοδραστικούς, αυξητικούς) που έχουν προφλεγμονώδη δράση. Η φλεγμονώδης απόκριση ξεκινά με τη μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων στην περιοχή, οπότε σχηματίζεται η πρώτη βλάβη. Τότε τα μακροφάγα προσεγγίζουν το αρτηριακό τοίχωμα και προσλαμβάνουν μόρια ox-LDL, σχηματίζοντας αφρώδη κύτταρα, η συσσώρευση των οποίων προάγει περαιτέρω τη φλεγμονή και τη συσσώρευση κυττάρων στο τοίχωμα. Αυτή η διαρκής φλεγμονή είναι ικανή να οδηγήσει σε νέκρωση των κυττάρων και επιπλέον προσκόλληση μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων, με αποτέλεσμα να αυξάνονται τα επίπεδα κυτταροκινών, πρωτεολυτικών ενζύμων και αυξητικών παραγόντων. Αυτή η νέκρωση μπορεί να οδηγήσει σε αυτοκαταλυόμενη επέκταση του τραύματος.

Αρχικά είχε θεωρηθεί πως η απογύμνωση του ενδοθηλίου είναι απαραίτητη για να ξεκινήσει η αθηρογενετική πορεία⁹⁹. Όταν αποδείχθηκε ότι αυτό δεν ισχύει, προτάθηκε μια βελτιωμένη εκδοχή της θεωρίας, σύμφωνα με την οποία η δυσλειτουργία και μόνο των ενδοθηλιακών κυττάρων αρκεί, λόγω της αύξησης της διαπερατότητας του ενδοθηλίου από τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες.

2.2.2) Θεωρία της Οξειδωτικής Τροποποίησης

Η θεωρία αυτή αποτελεί επέκταση της θεωρίας απόκρισης σε τραυματισμό, μετά από τα περαιτέρω δεδομένα που ανέκυψαν σχετικά με τους μηχανισμούς του, καταλυτικού για τη διαδικασία αθηρογένεσης, σταδίου σχηματισμού των αφρωδών κυττάρων.

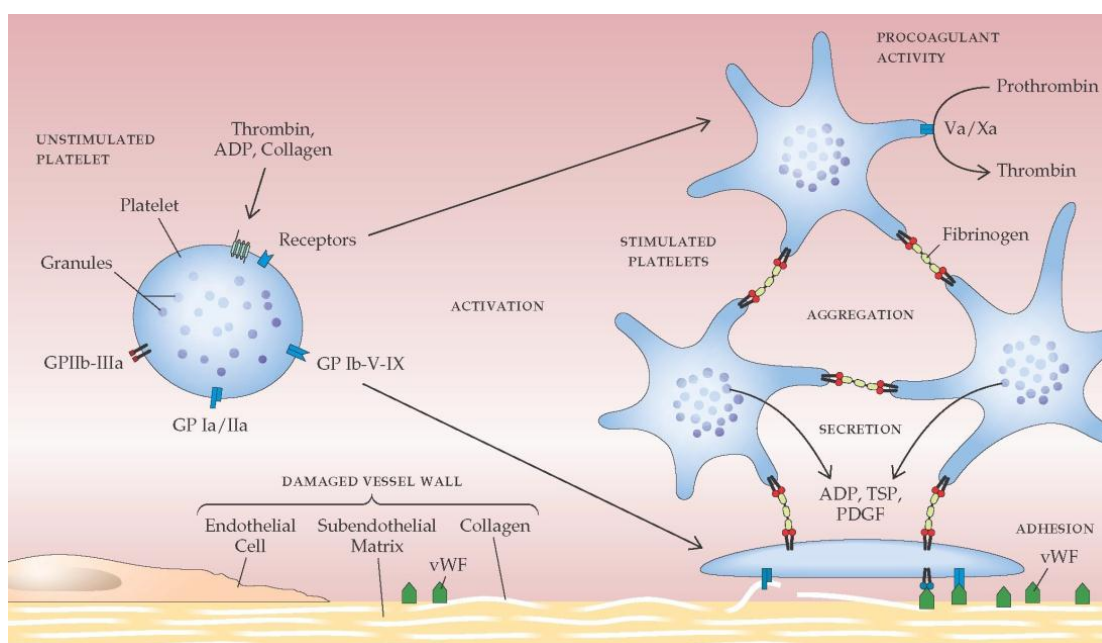
2.3) Θρόμβωση και Αθηροσκλήρωση

Η διαδικασία της πήξης του αίματος μέσω της δημιουργίας θρόμβων παίζει τον καταλυτικό ρόλο στην ικανότητα του οργανισμού να επουλώνει ρήξεις σε ιστούς. Είναι μια ιδιαίτερα πολύπλοκη διαδικασία, στην οποία συμμετέχει πλήθος κυττάρων και μορίων ως απόκριση σε τραυματισμό κάποιου ιστού ή αγγείου. Η ίδια, όμως, διαδικασία είναι υπεύθυνη και για τη δημιουργία θρόμβων σε παθολογικές καταστάσεις, όπως είναι η αθηροσκλήρωση. Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα θρομβωτικά επεισόδια αποτελούν την πιο κοινή και σοβαρή επιπλοκή στην αθηροσκλήρωση, καθώς είναι ικανά να προκαλέσουν οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και εγκεφαλικά επεισόδια. Επιπλέον, η δημιουργία του θρόμβου είναι από τα πρωταρχικά στάδια της αθηρογένεσης.

2.3.1) Ο Ρόλος των Αιμοπεταλίων

Η διαδικασία της θρόμβωσης ξεκινά με τη ρήξη του ενδοθηλιακού συνεχούς ενός αιμοφόρου αγγείου. Αυτή έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση ανιοντικών επιφανειών του υπο-ενδοθηλίου, οι οποίες είναι πλούσιες σε μόρια κολλαγόνου, στη ροή του αίματος. Τότε τα αιμοπετάλια αρχίζουν να συνδέονται με το κολλαγόνο είτε άμεσα (μέσω της $\alpha_2\beta_1$ ιντεγκρίνης και της γλυκοπρωτεΐνης GPVI), είτε έμμεσα (μέσω της γλυκοπρωτεΐνης GPIB ή της ιντεγκρίνης $\alpha IIb\beta_3$, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μόρια του παράγοντα von Willebrand) και να προσκολλώνται στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο¹⁰⁰. Αυτή η δέσμευση των αιμοπεταλίων προωθεί την απελευθέρωση των

πυκνών εκκριτικών κυστιδίων τους, τα οποία περιέχουν μια πληθώρα χημικών παραγόντων. Αρκετοί από αυτούς, όπως το ADP και η σεροτονίνη, προάγουν ένα πλήθος τροποποιήσεων στις μεμβρανικές πρωτεΐνες των αιμοπεταλίων, σε μια διαδικασία η οποία καλείται ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, και η οποία οδηγεί σε αλλαγή στο σχήμα τους¹⁰¹. Αυτή με τη σειρά της οδηγεί σε περαιτέρω συσσώρευση αιμοπεταλίων μέσω μιας διαδικασίας θετικής ανατροφοδότησης, οπότε και δημιουργείται ο αιμοπεταλιακός θρόμβος. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία παίζει η Ρ-σελεκτίνη (ή CD62P), η οποία εκτίθεται στην επιφάνεια των τραυματισμένων ενδοθηλιακών κυττάρων και προάγει την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καθώς και ο PAF, περισσότερο για τον οποίο θα αναφερθούν στη συνέχεια.

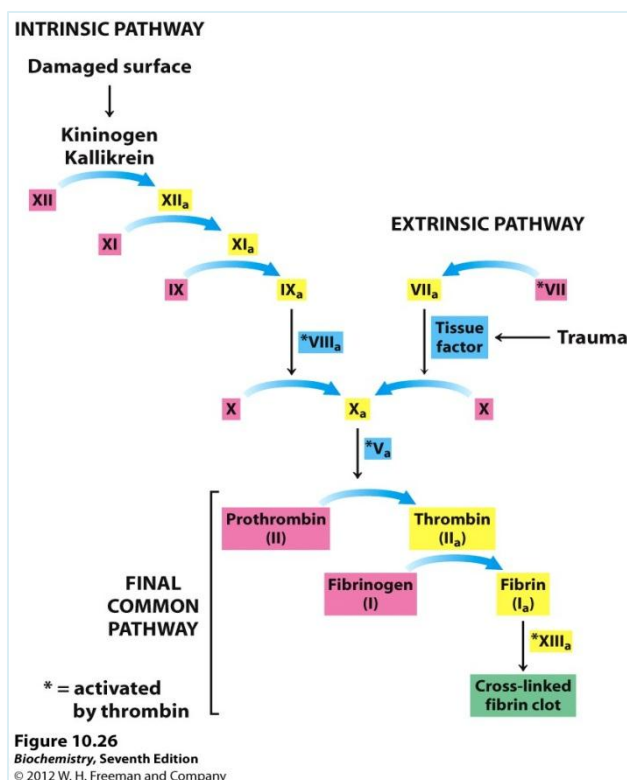


Σχήμα 2.2. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων τα καθιστά ικανά να προσκολληθούν ισχυρά στην περιοχή όπου εμφανίστηκε η ρήξη

2.3.2) Ο Καταρράκτης της Πήξης

Από εκεί και πέρα ξεκινά ο καταρράκτης της πήξης, μια διαδικασία η οποία αποτελείται από δυο ξεχωριστές πορείες, την εξωγενή και την ενδογενή, οι οποίες καταλήγουν στα ίδια δυο τελικά βήματα: την ενεργοποίηση της προθρομβίνης προς θρομβίνη από τον παράγοντα X_a και τη μετατροπή του ινωδογόνου σε μονομερές ινώδους, καταλυόμενη από θρομβίνη. Τελικά, πολλά μονομερή ινώδους συνδέονται μεταξύ τους με δράση του παράγοντα $XIII_a$, οπότε και δημιουργείται ένας

διασυνδεδεμένος θρόμβος ινώδους¹⁰². Επιπλέον, η θρομβίνη είναι και ένας από τους σημαντικότερους ενεργοποιητές των αιμοπεταλίων.



2.3.3) Εξωγενής Πορεία

Η εξωγενής είναι η απλούστερη από τις δύο πορείες και ενεργοποιείται από την εμφάνιση τραύματος. Σημαντικό ρόλο σε αυτήν παίζει ο ιστικός παράγοντας, TF, μια μεμβρανική πρωτεΐνη η οποία καταλύει την ενεργοποίηση του παράγοντα X από τον (ήδη ενεργοποιημένο, λόγω έκθεσης στο τραύμα) παράγοντα VII_a. Ο TF έχει βρεθεί πως εκφράζεται και εκτίθεται στις κυτταρικές επιφάνειες τόσο σε ενεργοποιημένα αιμοπετάλια¹⁰³, όσο και σε

ενεργοποιημένα πολυμορφοπύρρηνα¹⁰⁴, ενώ το ειδικό του αντιγόνο έχει βρεθεί να εκφράζεται σε ενδοθηλιακά κύτταρα¹⁰⁵. Τα τελευταία έχει φανεί πως, τουλάχιστον in vitro, είναι ικανά να συνθέτουν TF υπό την επίδραση κατάλληλων ερεθισμάτων (TNF-α, IL-1β)¹⁰⁶. Φαίνεται, λοιπόν, πως η εξωγενής πορεία της πήξης, και ιδιαίτερα ο TF, πιθανώς να παίζουν σημαντικό ρόλο στα πρώτα στάδια της διαδικασίας της αθηρογένεσης.

2.3.4) Ενδογενής Πορεία

Η ενδογενής πορεία ξεκινά με τη ρήξη του ενδοθηλιακού συνεχούς ενός αιμοφόρου αγγείου. Αυτή έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση ανιοντικών επιφανειών του υπο-ενδοθηλίου, οι οποίες είναι πλούσιες σε μόρια κολλαγόνου, στη ροή του αίματος. Τότε τα αιμοπετάλια αρχίζουν να συνδέονται με το κολλαγόνο είτε άμεσα (μέσω της α₂β₁ ιντεγκρίνης και της γλυκοπρωτεΐνης GPVI), είτε έμμεσα (μέσω της γλυκοπρωτεΐνης GPIB ή της ιντεγκρίνης αIIbβ₃, οι οποίες αλληλεπιδρούν με μόρια του παράγοντα von Willebrand) και να προσκολλώνται στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο.

Κατόπιν, ξεκινά η καθ' αυτό ενδογενής πορεία. Η έκθεση των προαναφερθεισών ανιοντικών επιφανειών του αγγειακού υπο-ενδοθηλίου πυροδοτεί έναν καταρράκτη διαδοχικών μετατροπών ενός πλήθους πρωτεϊνών και ενζύμων (των παραγόντων πήξης) από τις πρόδρομες στις ενεργές μορφές τους. Οι πρώτες τέτοιες είναι η προ-καλλικρεΐνη και το κινινογόνο, και ακολουθούν κατά σειρά οι παράγοντες XII (παράγοντας Hageman)¹⁰⁷, XI (θρομβοπλαστίνη πλάσματος), IX (παράγοντας Christmas) και X. Τελικά ο ενεργοποιημένος παράγοντας Χα ενεργοποιεί τη θρομβίνη, με αποτέλεσμα τελικά να δημιουργείται το πλέγμα ινώδους, όπως ήδη αναφέρθηκε¹⁰². Το πλέγμα αυτό δημιουργείται συνήθως γύρω από τον αιμοπεταλιακό θρόμβο.

2.4) Ο Ρόλος του PAF στην Αθηροσκλήρωση

Η οξειδωση, η φλεγμονή και η θρόμβωση αποτελούν τις ακρογωνιαίες λίθους της ανάπτυξης της αθηροσκλήρωσης και φαίνεται πως μπορούν να ενοποιηθούν μέσω της δράσης του PAF. Ο PAF έχει την ικανότητα να ενεργοποιεί κύτταρα-στόχους σε καίρια σημεία των διαδικασιών αυτών, μέσω της βιοσύνθεσής του από ενδοθηλιακά κύτταρα και αιμοπετάλια¹⁰⁸ και της παραγωγής του κατά την οξειδωση των LDL¹⁰⁹.

Πολύ σημαντικό στοιχείο είναι ότι οι LDL δεν παρουσιάζουν αθηρογόνες ιδιότητες *in vitro*¹¹⁰, παρά μόνο στην οξειδωμένη τους μορφή^{111, 112}. Στη μορφή τους αυτή μοιάζουν να δρουν μέσω σύνδεσης με τον PAFR, καθώς έχει φανεί πως ανταγωνιστές του PAF μειώνουν τις επαγόμενες δράσεις τους¹¹³. Επιπλέον οι ox-LDLs, επίσης μέσω της δράσης του PAF¹¹⁴, ενεργοποιούν γειτονικά λεία μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα οπότε αυτά εκκρίνουν την μονοκυτταρική χημειοτακτική πρωτεΐνη 1 (MCP-1)¹¹⁵, η οποία προσελκύει μονοκύτταρα που κατόπιν μεταναστεύουν στον υπο-ενδοθηλιακό χώρο, όπου και διαφοροποιούνται σε μακροφάγα¹¹⁶. Πλήθος ακόμα πειραματικών δεδομένων υποδεικνύουν τον PAF ως τον υπεύθυνο μεσολαβητή των αθηρογόνων δράσεων των μορίων ox-LDL, καταδεικνύοντας έτσι το σημαντικό του ρόλο στην πορεία της αθηρογένεσης.

2.4.1) Έναρξη της Αθηρογένεσης

Στο αίμα, τα επίπεδα του PAF αυξάνονται σε παθοφυσιολογικές φλεγμονώδεις καταστάσεις, καθώς και σε περιπτώσεις αυξημένου οξειδωτικού stress λόγω οξειδωσης των LDL και υπεροξειδωσης των φωσφολιποειδών των μεμβρανών.

Υπάρχουν δύο βασικές αιτίες που οδηγούν σε αυτό: είτε ανεπάρκεια προσλαμβανόμενων ή ενδογενών αντιοξειδωτικών, είτε μείωση της δραστηριότητας της PAF-AH. Επιπλέον, η μειωμένη πρόσληψη (μέσω της διατροφής) ή σύνθεση (ενδογενώς) ανταγωνιστών του PAF οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα του τελευταίου.

Πλήθος παθοφυσιολογικών καταστάσεων οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων του PAF: φλεγμονή¹¹⁷, αλλεργία^{118, 119, 120}, άσθμα^{121, 122}, σήψη, τραύμα, shock¹²³, οξεία παγκρεατίτιδα¹²⁴, εντερική νόσος¹²⁵, πνευμονική νόσος¹²⁶ και σακχαρώδης διαβήτης^{127, 128}. Επιπλέον το κάπνισμα οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων των κυκλοφορούντων PAF-αναλόγων¹²⁹. Αυτά, όπως και ο ίδιος ο PAF, προάγουν την απελευθέρωση δραστικών ριζών οξυγόνου^{130, 131, 132, 133, 134}, οι οποίες οδηγούν σε οξείδωση των LDL¹³⁵. Αυτή, με τη σειρά της, συμβάλλει σημαντικά στην περαιτέρω αύξηση των επιπέδων του PAF. Έχει φανεί πως, κατά την οξείδωση των LDL, παράγεται C16:0 PAF¹³⁶.

Η PAF-AH του πλάσματος, η οποία απαντά κυρίως στις LDL (σε ποσοστό περίπου 80%) καθώς και στις HDL είναι υπεύθυνη για την υδρόλυση των PAF-αναλόγων λιποειδών¹³⁷. Γενικότερα, η PAF-AH μπορεί να καταστέλλει τις αθηρογόνες μεταβολές στις LDL, τη φλεγμονή, την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων^{138, 139, 140, 141}. Ταυτόχρονα, όμως, η προαγωγή της οξείδωσης των LDL οδηγεί σε σταδιακή απενεργοποίηση της PAF-AH^{136, 142}, στην οποία συμβάλλουν και οι δραστικές ρίζες οξυγόνου¹⁴³.

Η υπερ-έκφραση της PAF-AH έχει φανεί πως αναστέλλει τη διαδικασία της αθηρογένεσης. Αρσενικά ποντίκια με έλλειψη της της απολιποπρωτεΐνης E (apo-E) εμφανίζουν υψηλότερη δραστηριότητα PAF-AH πλάσματος και λιγότερες αθηροσκληρωτικές κακώσεις σε σχέση με τα θηλυκά. Αντιστρόφως, η έκφραση ανθρώπινης PAF-AH στα ποντίκια αυτά οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων της PAF-AH στο πλάσμα, αναστέλλει την προαγόμενη από τραυματισμό σύνθεση νέου έσω χιτώνα και καταστέλλει την αυθόρμητη δημιουργία αθηροσκληρωτικών βλαβών απουσία μηχανικού τραυματισμού¹⁴⁴.

Ο σημαντικός ρόλος του PAF στις διάφορες παθοφυσιολογικές καταστάσεις έχει φανεί ιδιαίτερα σε ζωικά μοντέλα τα οποία παράγουν μεταλλαγμένα μόρια PAFR.

Πειραματόζωα στα οποία ο PAFR ήταν μη δραστικός έδειξαν καλύτερη απόκριση στην αναπαραγωγή, τη συστηματική αναφυλαξία και στη φλεγμονή¹⁴⁵.

Άλλες μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει την αντι-αθηρογόνο δράση των αναστολέων του PAF^{146, 147}. Επιπλέον, πλήθος παραδοσιακών τροφίμων της Μεσογειακής Διατροφής (ελαιόλαδο^{148, 149}, κρασί^{150, 151, 152}, ψάρι^{153, 154, 155}, μέλι¹⁵⁶, γάλα και γιαούρτι¹⁵⁷) έχουν εμφανίσει αντι-PAF δραστηριότητα σε βιολογικές δοκιμασίες σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Στα εκχυλίσματα των τροφίμων αυτών έχει βρεθεί μεγάλος αριθμός ανταγωνιστών του PAF, τόσο στο κλάσμα των πολικών, όσο και σε αυτό των ουδέτερων λιποειδών.

Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί πως ενδογενείς ανταγωνιστές του PAF έχουν αναγνωριστεί τόσο σε αρουραίους¹⁵⁸ όσο και στον άνθρωπο¹⁵⁹. Τέλος, κάποιες καρδιολιπίνες του αίματος έχουν επίσης αναγνωριστεί in vivo ως αναστολείς του PAF^{160, 161}.

2.4.2) Επιδράσεις του PAF σε Κύτταρα Εμπλεκόμενα στην Αθηροσκλήρωση

Ο PAF επιδρά, είτε άμεσα είτε έμμεσα, σε πλήθος κυττάρων τα οποία συνδέονται με την αθηροσκλήρωση. Στη συνέχεια περιγράφονται οι δράσεις του κατά σειρά στους διαφόρους εμπλεκόμενους κυτταρικούς τύπους:

- Αιμοπετάλια:

Ο PAF δρα ως ισχυρός ενεργοποιητής των αιμοπεταλίων και συσσωρευτικός παράγοντας^{162, 163, 164}. Ως μεσολαβητής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων δρα η ιντεγκρίνη αIIbβ3, μέσω της οποίας το εξωκυττάριο μήνυμα περνά στον ενδοκυττάριο χώρο με αποτέλεσμα τη δέσμευση του ινωδογόνου. Αυτό υποδεικνύει πως ο PAFR σχετίζεται με την ενδοκυτταρική προθρομβωτική οδό. Περαιτέρω εμπλοκή της ιντεγκρίνης αIIbβ3 προαγάγει μία νέα, από μέσα προς τα έξω, σηματοδοτική πορεία, η οποία επιτρέπει την ενίσχυση του αρχικού σήματος¹⁶⁵. Ακολουθεί απελευθέρωση αραχιδονικού από τα μεμβρανικά φωσφολιποειδή, το οποίο λειτουργεί ως μητρικό μόριο για την άμεση σύνθεση εικοσανοειδών¹⁶⁶.

Επιπλέον, εκκρίνεται πλήθος προ-φλεγμονωδών και προ-θρομβωτικών μορίων (όπως χημειοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικοί παράγοντες) τα οποία βρίσκονταν αποθηκευμένα σε ενδοκυτταρικά κοκκία¹⁶⁷. Να σημειωθεί πως, σε αυτήν την φάση, η έκκριση ιντερλευκίνης-1β (IL-1β) από τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια προάγει την προσκόλληση των ενδοθηλιακών κυττάρων σε πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα. Η παραπάνω διαδικασία υποδεικνύει έναν τρόπο μέσω του οποίου ο PAF συνδέει τις διαδικασίες θρόμβωσης και φλεγμονής¹⁶⁸, καθώς ο μηχανισμός αυτός αποτελεί συνδετικό κρίκο μεταξύ των δύο πορειών¹⁶⁹. Η ιντερλευκίνη-1β προάγει την έκφραση μίας πληθώρας γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων σχετίζονται άμεσα με τη μετάβαση από την φάση της επί τόπου συσσωμάτωσης ουδετερόφιλων, στη φάση της ενεργού διακίνησης μονοπύρηνων λευκοκυττάρων, δηλαδή της χρόνιας φλεγμονής^{170, 171}.

Συνοψίζοντας, η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από τον PAF οδηγεί σε έκκριση ιντερλευκίνης-1β από αυτά. Κατόπιν αυτή δρα πάνω στα ενδοθηλιακά κύτταρα, επιτρέποντας την προσκόλληση των πολυμορφοπύρηνων σε αυτά. Αποτέλεσμα της όλης διαδικασίας είναι η εγκαθίδρυση μίας κατάστασης χρόνιας φλεγμονής.

- Ουδετερόφιλα:

Και στα ουδετερόφιλα, ο PAF δρα μέσω του υποδοχέα του. Η ενεργοποίησή τους από τον PAF προάγει μία σηματοδοτική πορεία από μέσα προς τα έξω, μεσολαβητές της οποίας είναι οι β2 ιντεγκρίνες (CD11/CD18). Η πορεία αυτή οδηγεί στην προσκόλληση και συσώρευση των ουδετερόφιλων, δύο διαδικασίες που αποτελούν την απαρχή της ενισχυμένης φλεγμονώδους απόκρισης, της πόλωσης και της κατευθυνόμενης μετανάστευσής τους, της αποκοκκίωσής τους, καθώς και της παραγωγής δραστικών ριζών οξυγόνου¹⁷². Μέσω της αποκοκκίωσης, ο PAF προάγει την απελευθέρωση πλήθους παραγόντων. Ένας τέτοιος είναι και η ελαστάση, η οποία μεσολαβεί στον φλεγμονώδη τραυματισμό των ιστών, ενώ τοπικά έχει τη δυνατότητα να προκαλέσει και θρόμβωση^{168, 173}.

- Μονοκύτταρα:

Ομοίως, ο PAF ενεργοποιεί τα ανθρώπινα μονοκύτταρα μέσω σύνδεσης στον PAFR¹⁷³. Τότε ξεκινά να εκφράζεται ο γλυκοπρωτεϊνικός συνδέτης-1 της P-σελεκτίνης (PSGL-1 ή CD162) σε αυτά, με αποτέλεσμα να προσκολλώνται ταχύτατα σε κύτταρα τα οποία εκθέτουν P-σελεκτίνη στην κυτταρική τους μεμβράνη (ενεργοποιημένα αιμοπετάλια και ενδοθηλιακά κύτταρα), οπότε και ξεκινά η σύνθεση χημειοκινών, κυτταροκινών και ιστικού παράγοντα (παράγοντας III της εξωγενούς πορείας θρόμβωσης). Πιο συγκεκριμένα, ο PAF ενισχύει τη μετανάστευση του NF-κΒ στον πυρήνα των μονοκυττάρων –όταν αυτά έχουν ενεργοποιηθεί – και προάγει την κατακόρυφη αύξηση της σύνθεσης μονοκυτταρικής χημειοτακτικής πρωτεΐνης-1 (MCP-1), ιντερλευκίνης-8, TNF-α και άλλων φλεγμονωδών παραγόντων¹⁷⁴. Αυτή η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση καθίσταται πρωτεύουσα μετά τη στέρεη προσκόλληση των μονοκυττάρων με ενεργοποιημένα αιμοπετάλια¹⁷⁵ και είναι χαρακτηριστική τόσο της ίδιας της πορείας θρόμβωσης, όσο και διαφόρων αγγειακών συνδρόμων¹⁷⁶.

- Ενδοθηλιακά Κύτταρα:

Η σύνδεση του PAF στον υποδοχέα του στα επιθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου¹⁷⁷, γεγονός το οποίο, σύμφωνα και με τη θεωρία της απόκρισης σε τραυματισμό, είναι μεγάλης σημασίας για την έναρξη της διαδικασίας αθηρογένεσης. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν και εκθέτουν μόρια PAF στην επιφάνειά τους. Αυτό αποτελεί άλλον έναν σημαντικό ρόλο για τον PAF, αφού έτσι δρα, ουσιαστικά, σαν ένα αυτοκρινές σήμα για την τοπική ρύθμιση της ενεργοποίησης και της προσκόλλησης ουδετερόφιλων και μονοκυττάρων¹⁶⁸. Σημαντικό ρόλο στη διαδικασία αυτή παίζει και η P-σελεκτίνη¹⁰⁸.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΟ ΓΙΑΟΥΡΤΙ

3.1) Πρότυπα Ταυτότητας

3.1.1) Γιαούρτι

Σύμφωνα με την τελευταία αναθεώρηση (2014) του Food and Drug Administration (FDA)¹⁷⁸ και τις οδηγίες του Food and Agricultural Organization (FAO, Codex Alimentarius, 2011)¹⁷⁹ το γιαούρτι είναι τρόφιμο το οποίο παράγεται από κάποιο γαλακτοκομικό συστατικό (κρέμα, γάλα, πλήρως και μερικώς αποκορυφωμένο γάλα, χρησιμοποιούμενα κατά μονάδες ή σε συνδυασμό), μετά από προσθήκη συμβιωτικών καλλιεργειών των οξυγαλακτικών βακτηρίων *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*, και ζύμωση. Προκειμένου να επιτευχθεί η επώαση της καλλιέργειας, προστίθεται 1.5–3% συμβιωτική καλλιέργεια και το μίγμα διατηρείται σε θερμοκρασία 42–45°C για 3 ώρες¹⁸⁰. Οι προστιθέμενοι μικροοργανισμοί πρέπει να είναι βιώσιμοι, ενεργοί και να απαντούν σε σημαντικούς πληθυσμούς στο προϊόν μέχρι την ελάχιστη ημερομηνία διατηρησιμότητας.

Η σύνθεση του τελικού προϊόντος πρέπει να έχει ως εξής¹⁷⁹:

Πρωτεΐνη Γάλακτος ^α (% m/m)	Τουλάχιστον 2.7%
Λίπος Γάλακτος (% m/m)	Λιγότερο από 15%
Τιτλοδοτούμενη οξύτητα, εκφρασμένη ως % γαλακτικό οξύ (% m/m)	Τουλάχιστον 0.6%
Συνολικός πληθυσμός των μικροοργανισμών που αποτελούσαν την αρχική συμβιωτική καλλιέργεια (cfu/g)	Τουλάχιστον 10 ⁷
Επιπλέον επισημασμένοι μικροοργανισμοί ^β	Τουλάχιστον 10 ⁶

α: το πρωτεϊνικό περιεχόμενο υπολογίζεται ως το ποσό ολικού αζώτου κατά Kjeldahl πολλαπλασιασμένο επί 6.38.

β: στην περίπτωση που περιέχονται, σύμφωνα με την ετικέτα του προϊόντος, μικροοργανισμοί πέραν εκείνων της αρχικής συμβιωτικής καλλιέργειας (π.χ. προβιοτικοί μικροοργανισμοί)

3.1.2) Επιδόρπια Γιαουρτιού

Τα επιδόρπια γιαουρτιού είναι σύνθετα προϊόντα γάλακτος τα οποία περιέχουν, σε περιεκτικότητα το πολύ έως 50%, μη γαλακτοκομικά συστατικά (π.χ. θρεπτικά ή μη συστατικά, φρούτα και λαχανικά ή χυμός, πολτός, πουρές και/ή άλλο συστατικό προερχόμενο από αυτά, δημητριακά, μέλι, σοκολάτα, ξηροί καρποί, καφές, μπαχαρικά και άλλα ασφαλή φυσικά τρόφιμα) ή/και αρτύματα (flavourings)¹⁷⁹. Ο εμπλουτισμός του γιαουρτιού με το εκάστοτε προστιθέμενο συστατικό μπορεί να λάβει χώρα είτε πριν, είτε μετά τη διαδικασία ζύμωσης.

Τα χαρακτηριστικά της σύνθεσης που αναφέρθηκαν για τα απλά γιαούρτια ισχύουν και εδώ, αλλά μόνο για το μέρος του προϊόντος που αποτελείται από τα γαλακτοκομικά συστατικά. Για τα προϊόντα που υπόκεινται σε θερμική επεξεργασία μετά τη διαδικασία ζύμωσης δεν τίθενται θέματα βιωσιμότητας, ενεργότητας και πληθυσμού των μικροοργανισμών της αρχικής συμβιωτικής καλλιέργειας¹⁷⁹.

3.2) Επίδραση στα Αιμοπετάλια και σε Δείκτες Θρόμβωσης

Το γιαούρτι και τα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι βασικά συστατικά της ανθρώπινης διατροφής, και για το λόγο αυτό πολλές έρευνες έχουν γίνει σχετικά με την επίδραση των προϊόντων αυτών στη διαδικασία της αθηρογένεσης. Συγκεκριμένα, έχει διερευνηθεί αρκετά η επίδραση γαλακτοκομικών εμπλουτισμένων με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα¹⁸¹, με συζευγμένα λινελαϊκά οξέα^{182, 183}, με ελαιόλαδο¹⁸⁴, με προβιοτικά¹⁸⁵ και ιδιαίτερα με φυτικές στερόλες^{186, 187, 188, 189, 190, 191} στην αθηροσκλήρωση. Αντίθετα, όμως, οι γνώσεις μας σχετικά με την επίδραση τέτοιου είδους προϊόντων σε δείκτες θρόμβωσης (δραστικότητα αιμοπεταλίων, PAF, κ.ά.) είναι μηδαμινές, ενώ ακόμη και αυτές σχετικά με την επίδραση του απλού γιαουρτιού σε τέτοιους δείκτες είναι ελάχιστες¹⁹². Η σημασία των πορειών θρόμβωσης στη διαδικασία της αθηρογένεσης, όμως, υποδεικνύει πως πιθανώς θα έπρεπε να δοθεί περισσότερο βάρος σε τέτοιου είδους έρευνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Όπως έχει αναφερθεί, η καρδιαγγειακή νόσος, μέσω των διαφόρων εκφάνσεών της, ευθύνεται για το 30% περίπου της ολικής θνησιμότητας παγκοσμίως⁹⁰. Επιπλέον, έχει ήδη γίνει κατανοητή η σημασία της θρόμβωσης στην αθηρογενετική πορεία καθώς και ο πολυσχιδής ρόλος που διαδραματίζει ο PAF στις διαδικασίες αυτές. Αν συνυπολογιστεί και η αποδεδειγμένη επίδραση της διατροφής στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης¹⁹⁴, καθίσταται προφανής η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα σχετικά με τα βιοδραστικά συστατικά των τροφίμων τα οποία εμφανίζουν αντι – PAF δράση.

Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα κυριότερα συστατικά της Μεσογειακής διατροφής, η οποία παραδοσιακά θεωρείται προστατευτική έναντι των καρδιαγγειακών. Έρευνες έχουν δείξει πως το εκχύλισμα πολικών λιποειδών του ελαιολάδου καθώς και εκείνο του ελαιοπυρήνα (olive oil polar lipid extract, OOPLE, OPPLE olive pomace polar lipid extract) περιέχουν ισχυρούς αναστολείς της βιολογικής δράσης του PAF, οι οποίοι επιπλέον ανταγωνίζονται και τη σύνδεσή του με τον υποδοχέα του και εμφανίζουν αντιαθηρογόνο δράση σε ζωικά μοντέλα¹⁹⁵. Φαίνεται, λοιπόν, πως η δράση αυτή του ελαιολάδου/ελαιοπυρήνα οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στην ύπαρξη βιοδραστικών λιποειδών, BAL, τα οποία αναστέλλουν τον PAF. Η αντιαθηρογόνη δράση, μάλιστα, είναι ισχυρότερη όταν χρησιμοποιείται μόνο το εκχύλισμα αυτό, σε σύγκριση με ελαιόλαδο που περιείχε ίδια ποσότητα OOPLE¹⁹⁶. Επομένως υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι ένα προϊόν, εν προκειμένω γιαούρτι, εμπλουτισμένο με αναστολείς του PAF από το πολικό κλάσμα του ελαιοπυρήνα, θα μπορούσε να εμφανίζει καρδιοπροστατευτική δράση στον άνθρωπο.

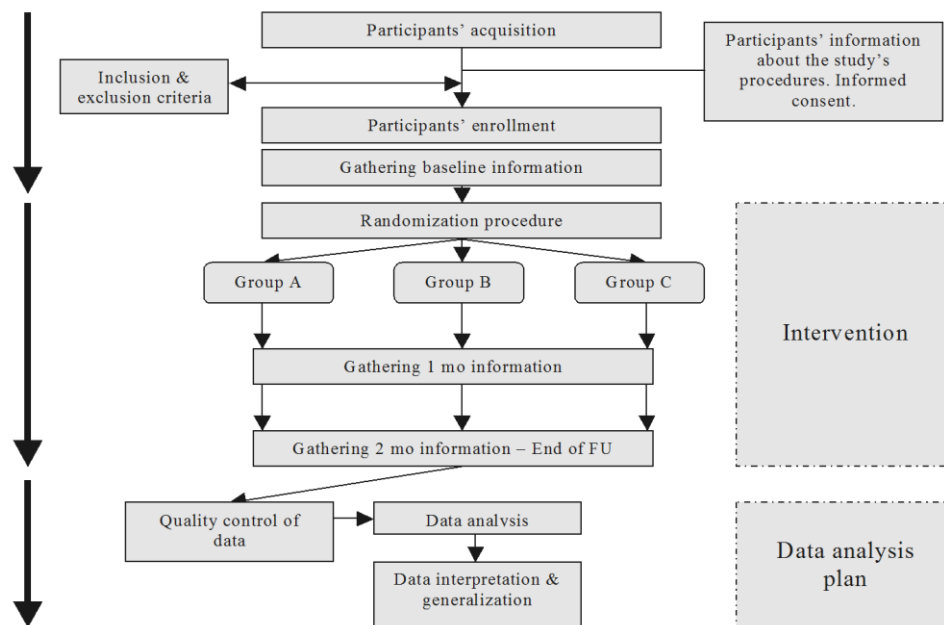
Έτσι λοιπόν, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η ex vivo επίδραση της επί διμήνου καθημερινής λήψης από υγ35 ιείς εθελοντές, κοινού και εμπλουτισμένου σε OPPLE γιαουρτιού στην ικανότητα των αιμοπεταλίων να ενεργοποιούνται από τρεις ξεχωριστούς παράγοντες: PAF, ADP και TRAP (πεπτίδιο – ενεργοποιητής του υποδοχέα της θρομβίνης) και, ακολούθως, να συσσωρεύονται.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

5.1) Μεθοδολογία Πρωτοκόλλου

Οι εθελοντές, οι οποίοι στρατολογήθηκαν μέσω τοπικών διαφημίσεων, ήταν υπέρβαροι ή παχύσαρκοι ($BMI\ 25 - 35\ kg/m^2$), ηλικίας 25 – 60 ετών. Τα κριτήρια αποκλεισμού ήταν τα εξής: ιστορικό καρδιαγγειακής ή άλλης φλεγμονώδους νόσου, συμπτώματα κρυολογήματος ή γρίπης, οξεία αναπνευστική λοίμωξη, οδοντικά προβλήματα και ηπατικές ή νεφρικές ασθένειες, ενώ αποκλείστηκαν και όσοι βρίσκονταν σε υπολιπιδαιμική φαρμακευτική αγωγή. Πριν την έναρξη της διατροφικής παρέμβασης όλοι οι εθελοντές ενημερώθηκαν σχετικά με τις διαδικασίες και τους στόχους της μελέτης και υπέγραψαν μια γραπτή συναίνεση. Το πρωτόκολλο της μελέτης εγκρίθηκε από την επιτροπή βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου.

Οι εθελοντές χωρίστηκαν τυχαία (με τυχαιοποίηση κατά block) σε τρεις ομάδες παρέμβασης. Όλοι οι συμμετέχοντες ακολούθησαν τη συνήθη δίαιτά τους, με αυτούς της ομάδας Α να καταναλώνουν το πολύ ένα κοινό (μη εμπλουτισμένο) γιαούρτι ανά δύο εβδομάδες, αυτούς της ομάδας Β να καταναλώνουν ένα κοινό γιαούρτι την ημέρα και αυτούς της ομάδας Γ να καταναλώνουν ένα γιαούρτι εμπλουτισμένο με OPPLΕ ανά ημέρα. Η παρέμβαση διήρκεσε 8 εβδομάδες. Η προσκόλληση των εθελοντών στο πρωτόκολλο της μελέτης διαπιστωνόταν με 2 τηλεφωνικές ανακλήσεις εικοσιτετράωρου ανά δύο εβδομάδες, τις οποίες διεξήγαγε ειδικευμένο προσωπικό. Επιπλέον, ανά τέσσερις εβδομάδες γινόταν έλεγχος του σωματικού βάρους τους και, στην περίπτωση ανεπιθύμητης μεταβολής του, δίνονταν κατάλληλες συμβουλές από έμπειρους διαιτολόγους ώστε να επανέλθει στα αρχικά επίπεδα. Τέλος, ελήφθησαν δείγματα αίματος κατά την έναρξη του πρωτοκόλλου, στις 4 και στις 8 εβδομάδες.



Σχήμα 5.1. Το διάγραμμα ροής του πρωτοκόλλου

5.2) Δοκιμασία Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων

Λαμβάνονται 14 ml αίματος σε πλαστικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 1.4 ml αντιπηκτικό διάλυμα ACD (τελική αναλογία αίμα/αντιπηκτικό 10/1). Το περιεχόμενο αναδεύεται και φυγοκεντρείται στα 173g (1300 rpm) για 18 min στους 24°C. Το υπερκείμενο, πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα και το υπόλοιπο φυγοκεντρείται ξανά, στα 1120g (3000 rpm) για 20 min στους 24°C. Το νέο υπερκείμενο, πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια (PPP), μεταφέρεται σε πλαστικό σωλήνα.

Ύστερα μετράται η απορρόφηση του PRP στα 530 nm. Απορρόφηση ίση με 0.8 αντιστοιχεί σε περίπου 500,000 αιμοπετάλια/μl. Αν βρεθεί μεγαλύτερη, τότε το PRP αραιώνεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας PPP.

Κατόπιν, σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 250 μl PRP και επώζονται για 20 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C. Ταυτόχρονα στη θερμοστατούμενη θέση του προτύπου στο συσσωρευματομέτρο εισάγεται κυψελίδα που περιέχει PPP, ως τυφλό.

Τέλος, μετά το πέρας της επώασης, στην κυψελίδα με το PRP τοποθετείται μικρός μαγνητικός αναδευτήρας, ο οποίος περιστρέφεται με 1200 rpm, και αυτή εισάγεται στην ειδική θερμοστατούμενη θέση του συσσωρευματομέτρου, οπότε και

προστίθεται ο εκάστοτε συσσωρευτικός παράγοντας (PAF, ADP ή TRAP) ορισμένης τελικής συγκέντρωσης και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η τελευταία οφείλεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, η δε ένταση της συσσώρευσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

5.3) Εύρεση των EC50

Από τα δεδομένα του συσσωρευματομέτρου κατασκευάζονται οι επιμέρους καμπύλες % συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του συσσωρευτικού παράγοντα, οι οποίες είναι χαρακτηριστικές του εκάστοτε εθελοντή, χρησιμοποιούμενου παράγοντα και χρονικής στιγμής. Οι καμπύλες αυτές είναι σιγμοειδείς, με το ευθύγραμμο τμήμα να εκτείνεται από το 20 – 80 % περίπου της μέγιστης συσσωρευτικής ικανότητας. Βάσει του τμήματος αυτού υπολογίζεται το EC50 (Effective Concentration 50), το οποίο αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του παράγοντα η οποία προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων ίση με το 50% της μέγιστης.

5.4) Στατιστική Ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος Kolmogorov – Smirnov για τον έλεγχο της κανονικότητας της κατανομής των μετρούμενων χαρακτηριστικών στο δείγμα. Εκείνα που χαρακτηρίζονται από κανονική κατανομή (ηλικία, επίπεδα γλυκόζης, BMI) παρουσιάζονται ως Μέσος Όρος ($\pm$ Τυπική απόκλιση). Τα EC50, που δεν εμφανίζουν κανονική κατανομή, παρουσιάζονται ως Διάμεσος και τεταρτημόρια (25% ; 75%).

Τα πρώτα συγκρίθηκαν συγχρονικά (στιγμή 0) με one way ANOVA μεταξύ των ομάδων και διαχρονικά (μεταξύ 0 και 8 εβδομάδων παρέμβασης) με paired samples T-test.

Τα EC50 συγκρίθηκαν διαχρονικά (0 έως 8 εβδομάδες) με (μη παραμετρικό) Wilcoxon paired samples test. Τέλος, υπέστησαν λογαρίθμιση και, εφόσον οι logEC50 εμφάνισαν κανονική κατανομή με τη μέθοδο Kolmogorov - Smirnov, παρουσιάζονται ως Μέσος Όρος ($\pm$ Τυπική απόκλιση) και τελικά συγκρίθηκαν

διαχρονικά (0 έως 4 και 0 έως 8 εβδομάδες) με paired samples T – tests. Το πρόγραμμα στατιστικής ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε είναι το SPSS.

5.5) Βιοηθική

Η έρευνα έγινε με βάση τις αρχές βιοηθικής, όπως αυτές ορίζονται από την Εθνική Επιτροπή Βιοηθικής και την ελληνική νομοθεσία. Επίσης τηρήθηκαν οι αρχές της Διακήρυξης του Ελσίνκι. Όλοι οι συμμετέχοντες είχαν ενημερωθεί για τους σκοπούς της μελέτης και συναίνεσαν εγγράφως για τη συμμετοχή τους σε αυτή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση Kolmogorov – Smirnov έδειξε στη χρονική στιγμή 0 κανονική κατανομή για τα: ηλικία, BMI και επίπεδα γλυκόζης, αλλά μη κανονική για τα EC50s. Έτσι, λοιπόν, τα μεν παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα σαν Μέσος Όρος ($\pm$ Τυπική απόκλιση), τα δε σαν Διάμεσος (25% ; 75%) :

t=0		ΟΜΑΔΑ			P
		Ελέγχου	Κοινό γιαούρτι	Εμπλουτισμένο Γιαούρτι	
N		14	26	29	-
% Άνδρες		50	50	51,7	-
Ηλικία		44,3($\pm$ 7,8)	48,8($\pm$ 9,2)	46,7($\pm$ 8,5)	> 0,05
BMI		25,0($\pm$ 3,7)	28,4($\pm$ 3,9)	27,2($\pm$ 3,6)	0,023*
Γλυκόζη		103,9($\pm$ 10,2)	109,4($\pm$ 10,7)	111,0($\pm$ 30,4)	> 0,05
EC50 (μ M)	PAF	0,0316 (0,0228 ; 0,0591)	0,0373 (0,0207 ; 0,0956)	0,0411 (0,0270 ; 0,0715)	> 0,05
	ADP	4,5775 (2,8319 ; 7,0550)	4,6023 (3,2582 ; 6,2880)	4,5574 (3,0215 ; 6,2412)	> 0,05
	TRAP	0,8987 (0,6653 ; 1,0548)	0,9127 (0,6668 ; 1,1143)	0,9470 (0,7074 ; 1,2764)	> 0,05

Πίνακας 6.1: Σύγκριση των κύριων χαρακτηριστικών μεταξύ των 3 ομάδων στο χρόνο 0

Όσον αφορά τη στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των BMI, η ανάλυση Bonferroni έδειξε πως οφείλεται στη διαφορά μεταξύ των ομάδων ελέγχου και κοινού γιαουρτιού (P = 0,019).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται οι μεταβολές στις τιμές BMI και επιπέδων γλυκόζης και για τις 3 ομάδες μεταξύ χρόνου 0 και 8 εβδομάδων:

		ΟΜΑΔΑ		
		Ελέγχου	Κοινό Γιαούρτι	Εμπλουτισμένο Γιαούρτι
BMI	t=0	25,0 (±3,7)	28,4 (±3,9)	27,2 (±3,6)
	t=8 w	24,8 (±3,6)	28,2 (±3,8)	27,1 (±3,7)
P		>0,05	0,025*	>0,05
Γλυκόζη	t=0	103,9 (±10,2)	109,4 (±10,7)	111,0 (±30,4)
	t=8 w	102,0 (±10,2)	107,5 (±10,8)	113,0 (±50,4)
P		>0,05	>0,05	>0,05

Πίνακας 6.2: Οι μεταβολές των πιθανών συγγενικών παραγόντων στη διάρκεια των 8 εβδομάδων

Μόνη στατιστικά (αλλά όχι και κλινικά) σημαντική διαφορά αυτή στην ομάδα που κατανάλωσε το κοινό γιαούρτι.

Στον επόμενο πίνακα συγκρίνονται τα EC50 των ομάδων μετά το πέρας των 8 εβδομάδων:

t=8 εβδομάδες		ΟΜΑΔΑ			P
		Ελέγχου	Κοινό γιαούρτι	Εμπλουτισμένο Γιαούρτι	
EC50 (μM)	PAF	0,0429 (0,0234 ; 0,0822) [N=14]	0,0310 (0,0232 ; 0,1865) [N=26]	0,0518 (0,0260 ; 0,0934) [N=29]	> 0,05
	ADP	3,8906 (2,6295 ; 7,0036) [N=14]	5,0000 (3,2695 ; 7,9939) [N=25]	4,6762 (3,0441 ; 7,2866) [N=29]	> 0,05
	TRAP	1,0266 (0,6591 ; 1,6105) [N=12]	0,9163 (0,7075 ; 1,3882) [N=26]	0,8779 (0,7052 ; 1,2961) [N=28]	> 0,05

Πίνακας 6.3: Σύγκριση των EC50 μεταξύ των ομάδων μετά το πέρας των 8 εβδομάδων παρέμβασης

Κατόπιν παρουσιάζεται η μεταβολή των EC50 (μM) εντός της κάθε ομάδας κατά τη διάρκεια της παρέμβασης:

		ΟΜΑΔΑ		
		Ελέγχου	Κοινό γιαούρτι	Εμπλουτισμένο Γιαούρτι
PAF	t= 0	0,0316 (0,0228 ; 0,0591) [N=14]	0,0373 (0,0207 ; 0,0956) [N=26]	0,0411 (0,0270 ; 0,0715) [N=29]
	t= 4	0,0308 (0,0241 ; 0,0952) [N=6]	0,0481 (0,0236 ; 0,1057) [N=23]	0,0621 (0,0279 ; 0,1159) [N=27]
	P	> 0,05	0,029*	0,008*
	t= 8	0,0429 (0,0234 ; 0,0822) [N=14]	0,0310 (0,0232 ; 0,1865) [N=26]	0,0518 (0,0260 ; 0,0934) [N=29]
	P	> 0,05	> 0,05	> 0,05
ADP	t= 0	4,5775 (2,8319 ; 7,0550) [N=14]	4,6023 (3,2582 ; 6,2880) [N=26]	4,5574 (3,0215 ; 6,2412) [N=29]
	t= 4	5,8451 (3,4470 ; 11,7199) [N=6]	3,5935 (3,0638 ; 6,6897) [N=23]	4,8333 (2,9274 ; 9,1824) [N=27]
	P	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	t= 8	3,8906 (2,6295 ; 7,0036) [N=14]	5,0000 (3,2695 ; 7,9939) [N=25]	4,6762 (3,0441 ; 7,2866) [N=29]
	P	> 0,05	> 0,05	> 0,05
TRAP	t= 0	0,8987 (0,6653 ; 1,0548) [N=14]	0,9127 (0,6668 ; 1,1143) [N=26]	0,9470 (0,7074 ; 1,2764) [N=29]
	t= 4	0,7146 (0,4592 ; 1,2337) [N=6]	1,1318 (0,7590 ; 1,4248) [N=20]	0,9217 (0,6614 ; 1,3570) [N=27]
	P	> 0,05	0,037*	> 0,05
	t= 8	1,0266 (0,6591 ; 1,6105) [N=12]	0,9163 (0,7075 ; 1,3882) [N=26]	0,8779 (0,7052 ; 1,2961) [N=29]
	P	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Πίνακας 6.4: Μεταβολή των EC50 εντός της κάθε ομάδας κατά τη διάρκεια της παρέμβασης

Τελικά, μετά από κανονικοποίηση των EC50 με λογαρίθμιση, παρατηρούνται οι παρακάτω μεταβολές μεταξύ των χρονικών στιγμών 0 έως 4 και 0 έως 8 εβδομάδων για τα logEC50:

			ΟΜΑΔΑ		
			Ελέγχου	Κοινό γιαούρτι	Εμπλουτισμένο Γιαούρτι
logEC50	PAF	t= 0	-1,4628 (±0,3530) [N=6]	-1,2888 (±0,4464) [N=23]	-1,3743 (±0,3258) [N=27]
		t=4 w	-1,3717 (±0,3202) [N=6]	-1,2230 (±0,5132) [N=23]	-1,2178 (±0,4066) [N=27]
		P	> 0,05	> 0,05	0,005*
	ADP	t= 0	0,7406 (±0,3592) [N=6]	0,6747 (±0,2055) [N=23]	0,6399 (±0,2224) [N=27]
		t=4 w	0,7370 (±0,3576) [N=6]	0,6407 (±0,2852) [N=23]	0,7176 (±0,2780) [N=27]
		P	> 0,05	> 0,05	> 0,05
	TRAP	t= 0	-0,1157 (±0,2227) [N=6]	-0,0534 (±0,1333) [N=20]	-0,0325 (±0,1797) [N=27]
		t=4 w	-0,1333 (±0,2128) [N=6]	0,0387 (±0,1661) [N=20]	-0,0307 (±0,2644) [N=27]
		P	> 0,05	0,048*	> 0,05

Πίνακας 6.5: Μεταβολή των logEC50 εντός της κάθε ομάδας μεταξύ 0 και 4 εβδομάδων

t= 8 w			ΟΜΑΔΑ		
			Ελέγχου	Κοινό γιαούρτι	Εμπλουτισμένο Γιαούρτι
logEC50	PAF	t= 0	-1,4598 (±0,2790) [N=14]	-1,3295 (±0,4422) [N=26]	-1,3697 (±0,3217) [N=29]
		t=8 w	-1,3685 (±0,4870)[N=14]	-1,2108 (±0,5817) [N=26]	-1,2905 (±0,4065) [N=29]
		P	> 0,05	> 0,05 (0,070)	> 0,05
	ADP	t= 0	0,6549 (±0,2538) [N=14]	0,6570 (±0,1728) [N=25]	0,6380 (±0,2221) [N=29]
		t=8 w	0,5921 (±0,4583) [N=14]	0,7573 (±0,3351) [N=25]	0,6959 (±0,2366) [N=29]
		P	> 0,05	> 0,05	> 0,05 (0,090)
	TRAP	t= 0	-0,0434 (±0,1588) [N=12]	-0,0618 (±0,1460) [N=26]	-0,0124 (±0,1888) [N=29]
		t=8 w	-0,0325 (±0,3574) [N=14]	-0,0465 (±0,2920) [N=26]	-0,0866 (±0,2624) [N=29]
		P	> 0,05	> 0,05	> 0,05

Πίνακας 6.6: Μεταβολή των logEC50 εντός της κάθε ομάδας μεταξύ 0 και 8 εβδομάδων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 : ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1) Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Στην αρχή της παρέμβασης (Πίνακας 6.1) η μόνη στατιστικά σημαντική διαφορά που υπάρχει μεταξύ των 3 ομάδων παρατηρείται στο BMI ανάμεσα στις ομάδες ελέγχου και κοινού γιαουρτιού ($P=0,019$), χωρίς όμως να εμφανίζει κάποια κλινική σημαντικότητα ($25,0 (\pm 3,7) \text{ kg/m}^2$ έναντι $28,4 (\pm 3,9) \text{ kg/m}^2$, αντίστοιχα) ικανή να επηρεάσει τα αποτελέσματα. Αντίστοιχα, παρατηρείται μια στατιστικά ($P=0,025$) αλλά όχι και κλινικά (από $28,4 (\pm 3,9) \text{ kg/m}^2$ σε $28,2 (\pm 3,8) \text{ kg/m}^2$) σημαντική μείωση του BMI στην ομάδα του κοινού γιαουρτιού κατά τη διάρκεια της παρέμβασης (Πίνακας 6.2).

Όσον αφορά τις τιμές των EC_{50} , δεν παρατηρείται στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων [είτε στο χρόνο 0 (Πίνακας 6.1), είτε στο τέλος της παρέμβασης (Πίνακας 6.3)], αλλά διαχρονικά μέσα στις ομάδες υπάρχουν 3 στατιστικά σημαντικές αυξήσεις, όλες μεταξύ χρόνου 0 και τεσσάρων εβδομάδων (Πίνακας 6.4): (α) Στην ομάδα του κοινού γιαουρτιού στην τιμή $EC_{50_{PAF}}$, από $0,0373 (0,0207 ; 0,0956) \mu\text{M}$ σε $0,0481 (0,0236 ; 0,1057) \mu\text{M}$ ($P=0,029$), (β) Στην ίδια ομάδα, στην τιμή του $EC_{50_{TRAP}}$, από $0,9127 (0,6668 ; 1,1143) \mu\text{M}$ σε $1,1318 (0,7590 ; 1,4248) \mu\text{M}$ ($P=0,037$), και (γ) Στην ομάδα του εμπλουτισμένου γιαουρτιού στην τιμή $EC_{50_{PAF}}$, από $0,0411 (0,0270 ; 0,0715) \mu\text{M}$ σε $0,0621 (0,0279 ; 0,1159) \mu\text{M}$ ($P=0,008$).

Όταν έγινε λογαρίθμιση ώστε να κανονικοποιηθούν οι τιμές, φάνηκαν δυο στατιστικά σημαντικές αυξήσεις, και οι δυο στις πρώτες 4 εβδομάδες (Πίνακας 6.5): (α) Στην τιμή του $\log EC_{50_{PAF}}$ της ομάδας του εμπλουτισμένου γιαουρτιού (από $-1,3743 (\pm 0,3258)$ σε $-1,2178 (\pm 0,4066)$, $P=0,005$), και (β) Στην τιμή του $\log EC_{50_{TRAP}}$ της ομάδας του κοινού γιαουρτιού (από $-0,0534 (\pm 0,1333)$ σε $0,0387 (\pm 0,1661)$, $P=0,048$). Επιπλέον, αναδείχθηκαν και δυο (οριακά) μη στατιστικά (αλλά πιθανώς κλινικά) σημαντικές αυξήσεις, και οι δυο μετά το πέρας των 8 εβδομάδων (Πίνακας 6.6): (α) Στην τιμή του $\log EC_{50_{ADP}}$ της ομάδας του εμπλουτισμένου γιαουρτιού (από $0,6380 (\pm 0,2221)$ σε $0,6959 (\pm 0,2366)$, $P=0,09$), και (β) Στην τιμή του $\log EC_{50_{PAF}}$ της ομάδας του κοινού γιαουρτιού (από $-1,3295 (\pm 0,4422)$ σε $-1,2108 (\pm 0,5817)$, $P=0,07$).

Το γεγονός ότι δεν υπάρχουν στατιστικές σημαντικές διαφορές στα EC50 μεταξύ χρόνου 0 και 8 εβδομάδων μπορεί να οφείλεται σε δυο παράγοντες: (α) Τα αιμοπετάλια εμφανίζουν σταδιακά μια ανοχή έναντι της παρατηρούμενης αντιθρομβωτικής δράσης, ή/και (β) Με το πέρας του χρόνου μειώνεται η προσκόλληση των εθελοντών στο πρωτόκολλο.

Από τα παραπάνω καταλαβαίνουμε, λοιπόν, πως η καθημερινή κατανάλωση τόσο κοινού, όσο και εμπλουτισμένου σε OPPLC γιαουρτιού μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση των EC50 των PAF, ADP και TRAP (ιδιαίτερα κατά τον πρώτο μήνα της λήψης), δηλαδή στην απευαισθητοποίηση των αιμοπεταλίων ως προς αυτούς τους συσσωρευτικούς παράγοντες και, κατ' επέκταση, μείωση της θρομβωτικής ικανότητας του οργανισμού. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να δρα προστατευτικά έναντι των διαφόρων θρομβωτικών επεισοδίων (οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ισχαιμικό εγκεφαλικό επεισόδιο, πνευμονική εμβολή κ.ά.) τα οποία κατά κύριο λόγο ευθύνονται για την υψηλή θνησιμότητα που χαρακτηρίζει την καρδιαγγειακή νόσο.

7.2) Περιορισμοί της Μελέτης

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η πιθανή σταδιακή χαλάρωση της προσκόλλησης των εθελοντών στο πρωτόκολλο θα μπορούσε να έχει οδηγήσει σε αλλοίωση των αποτελεσμάτων, ιδιαίτερα αυτών του δεύτερου μήνα της παρέμβασης. Σε κάτι τέτοιο θα μπορούσε να οδηγήσει και πιθανή αλλαγή των διατροφικών συνθηκών. Επιπλέον, μεγαλύτερος αριθμός εθελοντών θα μπορούσε ίσως να οδηγήσει σε πιο σαφή συμπεράσματα, ιδιαίτερα αν ληφθεί υπ' όψιν το γεγονός ότι οι τιμές των EC50 μπορούν να εμφανίσουν σημαντικές διακυμάνσεις μεταξύ των εθελοντών. Ο τελευταίος αυτός περιορισμός θα μπορούσε να εξαιρεθεί αν ο σχεδιασμός του πρωτοκόλλου προέβλεπε διασταύρωση των ομάδων (crossover) με ενδιάμεσες περιόδους κάθαρσης (washout). Να σημειωθεί, βέβαια, πως η στατιστική ανάλυση δεν έδειξε σημαντικές διαφορές των τιμών EC50 μεταξύ των ομάδων στην έναρξη του πρωτοκόλλου.

7.3) Συμπεράσματα

Από τα αποτελέσματα της μελέτης φαίνεται πως η καθημερινή κατανάλωση τόσο κοινού, όσο και εμπλουτισμένου σε OPPLC γιαουρτιού μπορεί να οδηγήσει σε

μείωση της θρομβωτικής ικανότητας του οργανισμού, δηλαδή να εμφανίσει καρδιοπροστατευτική δράση.

Καθώς μόνο άλλη μια μελέτη¹⁹² βρέθηκε να έχει ασχοληθεί με την πιθανή αντιθρομβωτική δράση των συστατικών του (κοινού) γιαουρτιού, καθίσταται σαφής η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα επί του θέματος. Τα κύρια ερωτήματα που μένει να απαντηθούν είναι 3: (α) Το κατά πόσο ο εμπλουτισμός του γιαουρτιού σε OPPLC το καθιστά περισσότερο προστατευτικό έναντι του κοινού, μη εμπλουτισμένου γιαουρτιού, (β) Το πού οφείλεται η διαφορετική δράση των δυο ειδών γιαουρτιού (το μεν κοινό γιαούρτι μειώνει την ευαισθησία των αιμοπεταλίων πρωτίστως στο TRAP και δευτερευόντως στον PAF, το δε εμπλουτισμένο πρωτίστως στον PAF –κάτι το αναμενόμενο- και δευτερευόντως στο ADP) και αν παίζει κλινικά κάποιον σημαντικό ρόλο, και (γ) Το πού οφείλεται η μείωση των EC50 στη διάρκεια του δεύτερου μήνα της παρέμβασης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές που απαρτίζουν την τριμελή επιτροπή επίβλεψής μου, κ. Αντωνοπούλου Σμαραγδη, κ. Νομικό Τζώρτζη και κ. Φραγκοπούλου Ελισάβετ για το ενδιαφέρον, τη βοήθεια και τη στήριξή τους, καθώς και όσες και όσους υποψήφιους διδάκτορες με βοήθησαν στη διάρκεια της εκπόνησης της παρούσας εργασίας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Barbaro, J.F. and N.J. Zvaifler, *Antigen induced histamine release from platelets of rabbits producing homologous PCA antibody*. Proc Soc Exp Biol Med, 1966;**122**;1245-7.
2. Henson, P.M., *Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen*. J Exp Med, 1970;**131**;287-306.
3. Benveniste, J., P.M. Henson, and C.G. Cochrane, *Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and a platelet-activating factor*. J Exp Med, 1972;**136**;1356-77.
4. Demopoulos CA, P.R., 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)*. Journal of Biological Chemistry, 1979;**254**;5514-5516.
5. Hanahan DJ, D.C., Liehr J, Pinckard RN, *Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glycerol ether phosphorylcholine*. Journal of Biological Chemistry, 1980;**255**;5514-5516.
6. Snyder, F., *Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes*. Biochem J, 1995;**305**;689-705.

7. Winkler, J.D., et al., *Influence of arachidonic acid on indices of phospholipase A2 activity in the human neutrophil*. Biochem J, 1993;**291**;825-31.
8. Gora, S., et al., *The proinflammatory mediator Platelet Activating Factor is an effective substrate for human group X secreted phospholipase A2*. Biochim Biophys Acta, 2006;**9**;1093-9.
9. Lee, T.C., Y. Uemura, and F. Snyder, *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;**28**;1992-2001.
10. Fragopoulou, E., C. Iatrou, and C.A. Demopoulos, *Characterization of acetyl-CoA: lyso-PAF acetyltransferase of human mesangial cells*. Mediators Inflamm, 2005;**5**;263-72.
11. Nomikos, T.N., C. Iatrou, and C.A. Demopoulos, *Acetyl-CoA:1-O-alkyl-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase (lyso-PAF AT) activity in cortical and medullary human renal tissue*. Eur J Biochem, 2003;**270**;2992-3000.
12. Wykle, R.L., B. Malone, and F. Snyder, *Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid*. J Biol Chem, 1980;**21**;10256-60.
13. Baker, R.R., *Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor*. Neurochem Res, 2000;**5**;677-83.

14. Shindou, H., et al., *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;**9**;6532-9.
15. Faison, L.D. and H.L. White, *Sulfasalazine inhibits lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase.* Prostaglandins, 1992;**3**;245-9.
16. White, H.L. and L.D. Faison, *Inhibition of lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase by salicylates and other compounds.* Prostaglandins, 1988;**6**;939-44.
17. Shindou H, Hishikawa D, Nakanishi H, et al. *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;**282**;6532–9.
18. Snyder, F., *CDP-choline:alkylacetylgllycerol cholinephosphotransferase catalyzes the final step in the de novo synthesis of platelet-activating factor.* Biochim Biophys Acta, 1997;**1-2**;111-6.
19. Tsoupras, A.B., et al., *Characterization of the de novo biosynthetic enzyme of platelet activating factor, DDT-insensitive cholinephosphotransferase, of human mesangial cells.* Mediators Inflamm, 2007;**2007**;27683.

20. Karasawa, K., et al., *Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH)*. Prog Lipid Res, 2003;**2**;93-114.
21. Stafforini, D.M., et al., *Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases*. Biochim Biophys Acta, 1996;**3**;161-73.
22. Tselepis, A.D, Chapman, M. J. *Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase*. Atheroscler. Suppl, 2002;**3**;57.
23. Avramopoulou, V., et al., *Synthesis of a new phosphoglycolipid with biological activity towards platelets*. Int J Biochem Cell Biol, 1997;**5**;767-74.
24. Demopoulos, C.A. and S. Antonopoulou, *A discovery trip to compounds with PAF-like activity*. Adv Exp Med Biol, 1996;**416**;59-63.
25. McManus, L.M., et al., *PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications*. Lab Invest, 1993;**6**;639-50.
26. Marathe, G.K., et al., *Bioactive phospholipid oxidation products*. Free Radic Biol Med, 2000;**12**;1762-70.
27. Pegorier, S., et al., *Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2006;**2**;433-43.

28. Nakamura, M., Honda, Z., Waga, I., Matsumoto, T., Noma, M., and Shimizu, T. *Endotoxin transduces Ca^{2+} signaling via platelet-activating factor receptor*. FEBS Lett., 1992;**314**;125-9.
29. Cundell, D.R., et al., *Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor*. Nature, 1995;**377**;435-8.
30. Fillon, S., 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;**9**;6182-91.
31. Ishii, S. and T. Shimizu, *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice*. Prog Lipid Res, 2000;**39**;41-82.
32. Honda, Z., S. Ishii, and T. Shimizu, *Platelet-activating factor receptor*. J Biochem, 2002;**6**;773-9.
33. Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., Prescott, S.M., *Platelet-Activating Factor, a Pleiotrophic Mediator of Physiological and Pathological Processes*. Crit. Rev. Clin. Lab. Sci, 2003;**40**;643-72
34. Lacasse, C., et al., *Platelet-activating factor stimulates interleukin-6 production by human endothelial cells and synergizes with tumor necrosis*

- factor for enhanced production of granulocyte-macrophage colony stimulating factor*. Inflammation, 1997;**2**;145-58.
35. Salem, P., et al., *Immunoregulatory functions of paf-acether. IV. Enhancement of IL-1 production by muramyl dipeptide-stimulated monocytes*. J Immunol, 1990;**4**;1338-44.
 36. Venkatesha, R.T., et al., *Platelet-activating factor-induced chemokine gene expression requires NF-kappaB activation and Ca²⁺/calcineurin signaling pathways. Inhibition by receptor phosphorylation and beta-arrestin recruitment*. J Biol Chem, 2004;**43**;44606-12.
 37. Koltai, M. and P.G. Braquet, *Platelet-activating factor antagonists*. Clin Rev Allergy, 1994;**4**;361-80.
 38. Shen, T.Y., et al., *Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (Piper futokadsura): specific inhibition of in vitro and in vivo platelet-activating factor-induced effects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985;**3**;672-6.
 39. Summers, J.B., Albert, D.H. *Platelet activating factor antagonists*. Adv Pharmacol, 1995;**32**;67-168.
 40. Koltai, M., et al., *Platelet-activating factor antagonists: scientific background and possible clinical applications*. Adv Pharmacol, 1994;**28**;81-167.

41. Demopoulos, C.A., Karantonis, H.C., Antonopoulou, S. Platelet activating factor- a molecular link between atherosclerosis theories Eur. J. Lipid Sci. Technol., 2003;**150**;705.
42. Zimmerman, G.A., et al., *Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion.* J Cell Biol, 1990;**2**;529-40.
43. Shimizu, T., et al., *Platelet-activating factor receptor and signal transduction.* Biochem Pharmacol, 1992;**6**;1001-8.
44. Prescott, S.M., et al., *Platelet-activating factor and related lipid mediators.* Annu Rev Biochem, 2000;**69**;419-45.
45. Zimmerman, G.A., Elstad, M.R., Lorant, D.E., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Topham, M.K., Weyrich, A.S., Whatley, R.E. *Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions* Adv. Exp. Med. Biol., 1996;**416**;297.
46. Lorant, D.E., et al., *Inflammatory roles of P-selectin.* J Clin Invest, 1993;**2**;559-70.
47. Hirashima, Y., et al., *Transfection of the plasma-type platelet-activating factor acetylhydrolase gene attenuates glutamate-induced apoptosis in cultured rat cortical neurons.* Brain Res, 2000;**1**;128-32.

48. Liapikos, T.A., et al., *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated*. Biochim Biophys Acta, 1994;**3**;353-60.
49. Tsoukatos, D.C., et al., *Copper-catalyzed oxidation mediates PAF formation in human LDL subspecies. Protective role of PAF:acetylhydrolase in dense LDL*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997;**12**;3505-12.
50. Handley, D.A., et al., *Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules*. Immunopharmacology, 1984;**3-4**;137-42.
51. Weber, C., Springer, T.A. *Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to α IIb β 3 and stimulated by platelet-activating factor*. J Clin Invest, 1997;**8**;2085-93.
52. Lehr HA, Seemuller J., Hubner C, Menger MD, and Messmer K. *Oxidized LDL-induced leukocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor*. Arterioscler. Thromb., 1993;**13**;1013-18
53. Dentan, C., et al., *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, 1996;**1**;48-55.

54. Cirillo, P., et al., [*Effect of platelets and leukocytes on in vitro proliferation of muscle cells: role of platelet-derived chemical mediators*]. *Cardiologia*, 1996;**2**;141-7.

55. Mueller, H.W., et al., *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. **77**(1): p. 54-63.

56. Feliste, R., et al., *Protective effect of BN 52021, a specific antagonist of platelet-activating factor (PAF-acether) against diet-induced cholesteryl ester deposition in rabbit aorta*. *Atherosclerosis*, 1989;**2-3**;151-8.

57. Quarck, R., et al., *Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice*. *Circulation*, 2001;**20**;2495-500.

58. Miyaura, S., H. Eguchi, and J.M. Johnston, *Effect of a cigarette smoke extract on the metabolism of the proinflammatory autacoid, platelet-activating factor*. *Circ Res*, 1992. **70**(2): p. 341-7.

59. Tjoelker, L.W., et al., *Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase*. *Nature*, 1995;**6522**;549-53.

60. Bastyr, E.J., 3rd, et al., *Decreased platelet phosphoinositide turnover and enhanced platelet activation in IDDM*. *Diabetes*, 1989;**9**;1097-102.

61. Cavallo-Perin, P., et al., *Increased blood levels of platelet-activating factor in insulin-dependent diabetic patients with microalbuminuria*. Nephrol Dial Transplant, 2000;7;994-9.
62. Nathan, N., et al., *Elevated levels of paf-acether in blood of patients with type 1 diabetes mellitus*. Diabete Metab, 1992;1;59-62.
63. Beck, J.C., et al., *Effects of ginkgolide B, a platelet-activating factor inhibitor on insulinitis in the spontaneously diabetic BB rat*. Autoimmunity, 1991;3;225-35.
64. Jobe, L.W., et al., *Protection from BB rat diabetes by the platelet-activating factor inhibitor BN50730*. Autoimmunity, 1993;4;259-66.
65. Lee, E.S., et al., *Recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase reduces the frequency of diabetes in the diabetes-prone BB rat*. Diabetes, 1999;1;43-9.
66. Kudolo, G.B. and R.A. DeFronzo, *Urinary platelet-activating factor excretion is elevated in non-insulin dependent diabetes mellitus*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 1999;2-3;87-98.
67. Im, S.Y., et al., *Augmentation of tumor metastasis by platelet-activating factor*. Cancer Res, 1996;11;2662-5.

68. Montrucchio, G., et al., *Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer*. Am J Pathol, 1998;5;1589-96.
69. Mathonnet, M., et al., *Platelet-activating factor in cirrhotic liver and hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2006;17;2773-8.
70. Denizot, Y., et al., *Platelet-activating factor and liver metastasis of colorectal cancer*. Int J Cancer, 2005;3;503-5.
71. Denizot, Y., et al., *Platelet-activating factor and human meningiomas*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006;6;674-8.
72. Biancone, L., et al., *Motility induced by human immunodeficiency virus-1 Tat on Kaposi's sarcoma cells requires platelet-activating factor synthesis*. Am J Pathol, 1999;5;1731-9.
73. Maggi, M., et al., *Platelet-activating factor mediates an autocrine proliferative loop in the endometrial adenocarcinoma cell line HEC-1A*. Cancer Res, 1994;17;4777-84.
74. Tripathi, Y.B., et al., *Platelet activating factor induces expression of early response genes c-fos and TIS-1 in human epidermoid carcinoma A-431 cells*. Life Sci, 1991;23;1761-7.

75. Mannori, G., et al., *Interaction of tumor cells with vascular endothelia: role of platelet-activating factor*. Clin Exp Metastasis, 2000;**1**;89-96.
76. Camussi, G., et al., *Platelet-activating factor and angiogenesis*. Adv Exp Med Biol, 1996;**416**;231-4.
77. Montrucchio, G., et al., *Tumor necrosis factor alpha-induced angiogenesis depends on in situ platelet-activating factor biosynthesis*. J Exp Med, 1994;**1**;377-82.
78. Sirois, M.G. and E.R. Edelman, *VEGF effect on vascular permeability is mediated by synthesis of platelet-activating factor*. Am J Physiol, 1997;**6 (Pt 2)**;2746-56.
79. Karantonis, H.C., et al., *Effect of fast-food Mediterranean-type diet on type 2 diabetics and healthy human subjects' platelet aggregation*. Diabetes Res Clin Pract, 2006;**1**;33-41.
80. Kang, Y.H., et al., *Antimetastatic and antitumor effects of benzoquinonoid AC7-1 from Ardisia crispa*. Int J Cancer, 2001;**5**;736-40.
81. Camussi, G., et al., *Platelet-activating factor directly stimulates in vitro migration of endothelial cells and promotes in vivo angiogenesis by a heparin-dependent mechanism*. J Immunol, 1995;**12**;6492-501.

82. Ortiz, A., et al., *The role of platelet-activating factor (PAF) in experimental glomerular injury*. Lipids, 1991;**12**;1310-5.
83. Schlondorff, D. and R. Neuwirth, *Platelet-activating factor and the kidney*. Am J Physiol, 1986;**1 (Pt 2)**;1-11.
84. Camussi, G., et al., *Platelet-activating factor-induced loss of glomerular anionic charges*. Kidney Int, 1984;**1**;73-81.
85. Handa, R.K., et al., *Platelet-activating factor and solute transport processes in the kidney*. Am J Physiol Renal Physiol, 2003;**2**;F274-81.
86. Lopez-Novoa, J.M., *Potential role of platelet activating factor in acute renal failure*. Kidney Int, 1999;**5**;1672-82.
87. Kester, M., et al., *Platelet-activating factor stimulates multiple signaling pathways in cultured rat mesangial cells*. J Cell Physiol, 1992;**2**;244-55.
88. Ernest, S. and E. Bello-Reuss, *Secretion of platelet-activating factor is mediated by MDR1 P-glycoprotein in cultured human mesangial cells*. J Am Soc Nephrol, 1999;**11**;2306-13.
89. Fragopoulou, E., et al., *Platelet-activating factor (PAF) increase intracellular lipid accumulation by increasing both LDL and scavenger receptors in human mesangial cells*. J Lab Clin Med, 2006;**6**;281-9.

90. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index2.html>
91. http://www.who.int/nmh/countries/grc_en.pdf?ua=1
92. Rayer, P. Arch Gen de Med (Paris) 1823;**1**;313
93. Virchow, R. Wien Med Wochenschr 1856;**6**;825
94. Saphir, O. and Gore, I. Arch Pathol 1950;**49**;418
95. Rokitansky, C. *A manual of pathological anatomy*. Sydenham Society. 1852
96. Virchow, R. *Cellular pathology: Lecture VIII*. Blood and lymph. CA Cancer J Clin 1875;**25**;93-7
97. Ross, R., Glomset, J., Harker, L. *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol 1977;**86**;675-84
98. Ross, R., Glomset, J. A. *Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis*. Science 1973;**180**;1332-9
99. Ross, R., Glomset, J. A. *The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)*. N Engl J Med 1976;**295**;369-77
100. Nieswandt, B., Watson, S. P. *Platelet-collagen interaction: is GPVI the central receptor?* Blood 2003;**102**;449-461

- 101.** Rendu, F., Brohard-Bohn, B. *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets 2001;**12**;261– 273
- 102.** Stryer L, Tymoczko JL, Berg JM. *Βιοχημεία Τόμος I*, 5th edition, 2010
Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο
- 103.** Mackman, N., Tilley, R. E., Key, N. S. *Role of the Extrinsic Pathway of Blood Coagulation in Hemostasis and Thrombosis*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2007;**27**;1687-1693
- 104.** Maugeri N, Brambilla M, Camera M, Carbone A, Tremoli E, Donati MB, De Gaetano G, Cerletti C. *Human polymorphonuclear leukocytes produce and express functional tissue factor upon stimulation*. J Thromb Haemost. 2006;**4**;1323–1330
- 105.** Solovey, A., Gui, L., Key, N.S., Hebbel, R.P. *Tissue factor expression by endothelial cells in sickle cell anemia*. Journal of Clinical Investigation. 1998;**9**;1899-1904
- 106.** Parry, G. C. N., Mackman, N. *Transcriptional regulation of tissue factor expression in human endothelial cells*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995;**5**;612-621
- 107.** Renne T., Gailani D. *The role of factor XII in hemostasis and thrombosis: Clinical Implications*. Expert Rev Cardiovasc Therapy. 2007;**5**;733–741
- 108.** Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M. *Platelet-activating factor and related lipid mediators*. Annu Rev Biochem 2000;**69**;419-45

- 109.** Liapikow, T.A., Antonopoulou, S., Karabina, S.P., Tsoukatos D.C., Demopoulos, C. A., Tselepis, A. D. *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated.* Biochim Biophys Acta 1994;**1212**;353-60
- 110.** Keaney, J. F. Jr. *Atherosclerosis: from lesion formation to plaque activation and endothelial dysfunction.* Mol Aspects Med 2000;**21**;99-166
- 111.** Berliner, J. A., Heinecke J. W. *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis.* Free Radic Biol Med 1996;**20**;707-27
- 112.** Heinecke, J. W. *Is lipid peroxidation relevant to atherogenesis?* J Clin Invest 1999;**104**;135-6
- 113.** Lehr, H. A., Seemuller, J., Hubner, C., Menger, M. D., Messmer, K. *Oxidized LDL-induced leucocyte/endothelium interaction in vivo involves the receptor for platelet-activating factor.* Atheroscler Thromb 1993;**13**;1013-8
- 114.** Weyrich, A. S., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation.* J Clin Invest 1995;**95**;2297-303
- 115.** Cushing, S. D., Berliner J. A., Valente A. J., Territo, M. C., Navab, M., Parhami, F. *Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1990;**87**;5134-8
- 116.** Navab, M., Imes, S. S., Hama, S. Y., Hough, G. P., Ross, L. A., Bork, R. W. *Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in*

- cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. J Clin Invest* 1991;**6**;2039-46
- 117.** Camussi, G., Tetta, C., Baglioni, C. *The role of platelet-activating factor in inflammation. Clin. Immunol. Immunopathol.* 1990;**57**;331-8
- 118.** Labrakis-Lazanas, K., Lazanas, M., Koussissis, S., Tournis, S., Demopoulos, C. A. *PAF of biological fluids in disease: blood levels in allergic rhinitis. Haematologica* 1988;**73**;379-382
- 119.** Lazanas, M., Demopoulos, C. A., Tournis, S., Koussissis, S., Labrakis-Lazanas, K., Tsarouhas, X. *PAF of biological fluids in disease: IV. Levels in blood in allergic reactions induced by drugs. Arch. Dermatol. Res.* 1988;**280**;124-126
- 120.** Spina, D., Coyle, A. J., Page, C. P. *The role of platelet activating factor in allergic inflammation. Pulm. Pharmacol.* 1989;**2**;13-19
- 121.** Christie, P. E., Henderson, W. R. Jr. *Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. Clin. Allergy Immunol.* 2002;**16**;233-254
- 122.** Beer, J. H., Wuthrich, B., von Felten, A. *Allergen exposure in acute asthma causes the release of platelet-activating factor (PAF) as demonstrated by the desensitization of platelets to PAF. Int. Arch. Allergy Immunol.* 1995;**106**;291-296
- 123.** Ayala, A., Chaudry, I. H. *Platelet activating factor and its role in trauma, shock, and sepsis. New Horiz.* 1996;**4**;265-275

124. Johnson, C. D. *Platelet-activating factor and platelet-activating factor antagonists in acute pancreatitis*. Dig. Surg. 1999;16;93-101
125. Nassif, A., Longo, W. E., Mazuski, J. E., Vernava, A. M., Kaminski, D. L. *Role of cytokines and platelet-activating factor in inflammatory bowel disease. Implications for therapy*. Dis. Colon Rectum. 1996;39;217-223
126. Martin, T., Losa, J. E., Garcia-Salgado, M. J., Perez-Arellano, J. L. *The role of platelet-activating factor (PAF) in interstitial pulmonary disease*. J. Investig. Allergol. Clin. Immunol. 1994;4;149-157
127. Cavallo-Perin, P., Lupia, E., Gruden, G., Olivetti, C., DeMartino, A., Cassader, M., Furlani, D., Servillo, L., Quagliuolo, L., Iorio, E., Boccellino, M. R., Montrucchio, G., Camussi G. *Increased blood levels of platelet-activating factor in insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria*. Nephrol. Dial. Transplant. 2000;15;994-999
128. Kudolo, G. B., DeFronzo R. A. *Urinary platelet-activating factor excretion is elevated in non-insulin dependent diabetes mellitus*. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 1999;57;87-98
129. Imaizumi, T., Satoh, K., Yoshida, H., Kawamura, Y., Hiramoto, M., Takamatsu S. *Effect of cigarette smoking on the levels of platelet-activating factor-like lipid(s) in plasma lipoproteins*. Atherosclerosis 1991;87;47-55
130. Rouis, M., Nigon, F., Chapman M. J. *Platelet activating factor is a potent stimulant of the production of active oxygen species by human monocyte-derived macrophages*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988;156;1293-1301

131. Stewart, A. G., Dubbin, P. N., Harris, T., Dusting G. J. *Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of icosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990;**87**;3215-3219
132. Bautista, A. P., Spitzer J. J. *Platelet activating factor stimulates and primes the liver, Kupffer cells and neutrophils to release superoxide anion.* Free Radic. Res. Commun. 1992;**17**;195-209
133. Takahashi, S., Yoshikawa, T., Naito, Y., Tanigawa, T., Yoshida, N., Kondo M. *Role of platelet-activating factor (PAF) in superoxide production by human polymorphonuclear leukocytes.* Lipids 1991;**26**;1227-1230
134. Braquet, P., Hosford, D., Koltz, P., Guilbaud, J., Paubert-Braquet M. *Effect of platelet-activating factor on tumor necrosis factor-induced superoxide generation from human neutrophils. Possible involvement of G proteins.* Lipids 1991;**26**;1071-1075
135. Gaut, J. P., Heinecke J. W. *Mechanisms for oxidizing low density lipoprotein. Insights from patterns of oxidation products in the artery wall and from mouse models of atherosclerosis.* Trends Cardiovasc. Med. 2001;**11**;103-112
136. Liapikos, T. A., Antonopoulou, S., Karabina, S. P., Tsoukatos, D. C., Demopoulos, C. A., Tselepis A. D. *Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated.* Biochim. Biophys. Acta 1994;**1212**;353-360
137. Watson, A. D., Navab, M., Hama, S. Y., Sevanian, A., Prescott, S. M., Stafforini, D. M. *Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein.* J Clin Invest 1995;**95**;774-82

138. Tjoelker, L. W., Wilder, C., Eberhardt, C., Stafforini, D. M., Dietsch, G., Schimpf, B., Hooper, S., Le Trong, H., Cousens, L. S., Zimmerman G. A. *Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase*. Nature 1995;**374**;549-553
139. Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Carter, M. E., Prescott S. M. *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor*. J. Biol. Chem. 1987;**262**;4215-4222
140. Stremmler, K. E., Stafforini, D. M., Prescott, S. M., McIntyre T. M. *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates*. J. Biol. Chem. 1991;**266**;11095-11103
141. Stafforini, D. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott S. M. *The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein*. Trans. Assoc. Am. Physicians 1992;**105**;44-63
142. Dentan, C., Lesnik, P., Chapman, M. J., Ninio E. *PAF acether- degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation*. Arterioscler. Thromb. 1994;**14**;353-360
143. Ambrosio, G., Oriente, A., Napoli, C., Palumbo, G., Chiariello, P., Marone, G., Condorelli, M., Chiariello, M., Triggiani M. *Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor*. J. Clin. Invest. 1994;**93**;2408-2416

144. Quarck, R., De Geest, B., Stengel, D., Mertens, A., Lox, M., Theilmeier, G., Michiels, C., Raes, M., Bult, H., Collen, D., Van Veldhoven, P., Ninio, E., Holvoet P. *Adenovirus-mediated gene transfer of human platelet-activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice.* Circulation 2001;**103**;2495-500

145. Ishii, S., Shimizu T. *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice.* Prog. Lipid Res. 2000;**39**;41-82

146. Feliste, R., Perret, B., Braquet, P., Chap H. *Protective effect of BN 52021, a specific antagonist of platelet-activating factor (PAF-acether) against diet-induced cholesteryl ester deposition in rabbit aorta.* Atherosclerosis 1989;**78**;151-158

147. Subbanagounder, G., Leitinger, N., Shih, P. T., Faull, K. F., Berliner J. A. *Evidence that phospholipid oxidation products and/or platelet-activating factor play an important role in early atherogenesis : in vitro and in vivo inhibition by WEB 2086.* Circ. Res. 1999;**85**;311-318

148. Koussissis, S. G., Semidalas, C. E., Antonopoulou, S., Kapoulas, V. M., Demopoulos, C. A., Kalyvas V. *PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF in virgin olive oil.* Rev. Fr. Corp. Gras. 1993;**40**;323-327

149. Karantonis, H. C., Antonopoulou, S., Demopoulos C. A. *Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others.* J. Agric. Food Chem. 2002;**50**;1150-1160

150. Fragopoulou, E., Antonopoulou, S., Demopoulos C. A. *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must.* J. Agric. Food Chem. 2002;**50**;2684-2694

151. Fragopoulou, E., Nomikos, T., Tsantila, N., Mitropoulou, A., Zabetakis, I., Demopoulos C. A. *Biological activity of total lipids from red and white wine/must*, J. Agric. Food Chem. 2001;**49**;5186-5193

152. Fragopoulou, E., Nomikos, T., Antonopoulou, S., Mitsopoulou, C. A., Demopoulos C. A. *Separation of biologically active lipids from red wine*. J. Agric. Food Chem. 2000;**48**;1234-1238

153. Rementzis, J., Antonopoulou, S., Demopoulos C. A. *Identification and study of gangliosides from Scomber scombrus*. J. Agric. Food Chem. 1997;**45**;611-615

154. Panayiotou, A., Samartzis, D., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Karantonis, H. C., Demopoulos, C. A., Zabetakis, I. *Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod (Gadus morhua): correlation with platelet-activating factor and atherogenesis*. J. Agric. Food Chem. 2000;**48**;6372-6379

155. Rementzis, J., Antonopoulou, S., Argyropoulos, S., Demopoulos C. A. *Biologically active lipids from S. scombrus*. Adv. Exp. Med. Biol. 1996;**416**;65-72

156. Koussissis, S. G., Semidalas, C. E., Hadzistavrou, E. C., Kalyvas, V., Antonopoulou, S., Demopoulos C. A. *PAF antagonists in foods: Isolation and identification of PAF in honey and wax*. Rev. Fr. Corp Gras. 1994;**41**;127-132

157. Antonopoulou, S., Semidalas, C. E., Koussissis, S. G., Demopoulos C. A. *Platelet-Activating Factor (PAF) antagonists in foods. A study of lipids, with PAF or anti-PAF like-activity, in cow's milk and yoghurt*. J. Agric. Food Chem. 1996;**44**;3047-3051

158. Miwa, M., Hill, C., Kumar, R., Sugatani, J., Olson, M. S., Hanahan D. J. *Occurrence of an endogenous inhibitor of platelet-activating factor in rat liver.* J. Biol. Chem. 1987;**262**;527-530
159. Macpherson, J. L., Kemp, A., Rogers, M., Mallet, A. I., Toia, R. F., Spur, B., Earl, J. W., Chesterman, C. N., Krilis S. A. *Occurrence of platelet-activating factor (PAF) and an endogenous inhibitor of platelet aggregation in diffuse cutaneous mastocytosis.* Clin. Exp. Immunol. 1989;**77**;391-396
160. Antonopoulou, S., Demopoulos, C. A., Iatrou, C. *Blood cardiolipin in haemodialysis patients. Its implication in the biological action of platelet-activating factor.* Int. J. Biochem. Cell Biol. 1996;**28**;43-51
161. Tsoukatos, D., Demopoulos, C. A., Tselepis, A. D., Moschidis, M. C., Donos, A., Evangelou, A., Benveniste J. *Inhibition by cardiolipins of platelet-activating factor-induced rabbit platelet activation.* Lipids 1993;**28**;1119-1124
162. McManus, L. M., Hanahan, D. J., Pinckard R. N. *Human platelet stimulation by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine.* J. Clin. Invest. 1981;**67**;903-906
163. McManus, L. M., Hanahan, D. J., Demopoulos, C. A., Pinckard R. N. *Pathobiology of the intravenous infusion of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC), a synthetic platelet-activating factor (PAF), in the rabbit.* J. Immunol. 1980;**124**;2919-2924
164. Golino, P., Ambrosio, G., Ragni, M., Pascucci, I., Triggiani, M., Oriente, A., McNatt, J., Buja, L. M., Condorelli, M., Chiariello M. *Short-term and long-term role of platelet activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation.* Circulation 1993;**88**;1205-1214

165. Shattil, S. J., Kashiwagi, H., Pampori N. *Integrin signaling: the platelet paradigm*. Blood 1998;**91**;2645-2657
166. Barry, O. P., FitzGerald, G. A. *Mechanisms of cellular activation by platelet microparticles*. Thromb. Haemost. 1999;**82**;794-800
167. Klinger, M. H. *Platelets and inflammation*. Anat. Embryol. (Berl.) 1997;**196**;1-11
168. Lorant, D. E., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott S. M. *Platelet-activating factor mediates procoagulant activity on the surface of endothelial cells by promoting leukocyte adhesion*. Semin. Cell Biol. 1995;**6**;295-303
169. Lindemann, S., Tolley, N. D., Dixon, D. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Weyrich A. S. *Activated platelets mediate inflammatory signaling by regulated interleukin 1beta synthesis*. J. Cell Biol. 2001;**154**;485-490
170. Chuluyan, H. E., Schall, T. J., Yoshimura, T., Issekutz A. C. *IL-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1 alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1*. J. Leukoc. Biol. 1995;**58**;71-79
171. Mantovani, A., Bussolino, F., Introna M. *Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside*. Immunol. Today 1997;**18**;231-240

172. Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Stafforini, D. M. *The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis*. Crit. Care Med. 2002;**30**;S294-S301
173. Lorant, D. E., Topham, M. K., Whatley, R. E., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman G. A. *Inflammatory roles of P-selectin*. J. Clin. Invest. 1993;**92**;559-570
174. Weyrich, A. S., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. *Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-κ B translocation*. J. Clin. Invest. 1995;**95**;2297-2303
175. Weyrich, A. S., Elstad, M. R., McEver, R. P., McIntyre, T. M., Moore, K. L., Morrissey, J. H., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. *Activated platelets signal chemokine synthesis by human Monocytes*. J. Clin. Invest. 1996;**97**;1525-1534
176. Smith, B. R., Rinder, H. M. *Interactions of platelets and endothelial cells with erythrocytes and leukocytes in thrombotic thrombocytopenic purpura*. Semin. Hematol. 1997;**34**;90-97
177. Handley, D. A., Arbeeny, C. M., Lee, M. L., R. G. Van Valen, R. G., Saunders R. N. *Effect of platelet activating factor on endothelial permeability to plasma macromolecules*. Immunopharmacology 1984;**8**;137-142
178. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=131.200&SearchTerm=yogurt>
179. <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>
180. Belitz, H. D., Grosch, W., Schieberle, P. *Χημεία τροφίμων* (3η έκδοση) (Μεταφρ. Παπαγεωργίου, Μ. Δ., Βάρναλης, Α. Ι.). Θεσσαλονίκη: Εκδόσεις Τζιόλα. 2006

- 181.** Carrero, J.J., Baro, L., Fonolla, J., Gonzalez-Santiago, M., Martinez-Ferez, A., Castillo, R., Jimenez, J, Boza, J.J., Lopez-Huertas E. *Cardiovascular Effects of Milk Enriched With ω -3 Polyunsaturated Fatty Acids, Oleic Acid, Folic Acid, and Vitamins E and B6 in Volunteers With Mild Hyperlipidemia.* Nutrition, 2004;**20**;521-7
- 182.** Tricon, S., Burdge, G.C., Jones, E.L., Russell, J.J., El-Khazen, S., Moretti, E., Hall, W.L., Gerry, A.B., Leake, D.S., Grimble, R.F., Williams, C.M., Calder, P.C., Yaqoob P. *Effects of dairy products naturally enriched with cis-9,trans-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men.* Am J Clin Nutr, 2006;**83**;744-53
- 183.** Penedo, L.A., Nunes, J.C., Gama, M.A.S., Leite, P.E.C., Quirico-Santos, T.F., Torres, A.G. *Intake of butter naturally enriched with cis9,trans11 conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults.* Journal of Nutritional Biochemistry, 2013;**24**; 2144-51
- 184.** Estevez-Gonzalez, M.D., Saavedra-Santana, P., Lopez-Rios, L., Chirino, R., Cebrero-Garcia, E., Pena-Quintana, L., Betancor-Leon, P. *HDL Cholesterol Levels in Children with Mild Hypercholesterolemia: Effect of Consuming Skim Milk Enriched with Olive Oil and Modulation by the TAQ 1B Polymorphism in the CETP Gene.* Ann Nutr Metab 2010;**56**;288–293
- 185.** Andrade, S., Borges N. *Effect of fermented milk containing Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium longum on plasma lipids of women with normal or moderately elevated cholesterol.* Journal of Dairy Research, 2009;**76**;469-74
- 186.** Hernandez-Mijares, A., Banuls, C., Rocha, M., Morillas, C., Martinez-Triguero, M.L., Victor, V.M., Lacomba, R., Alegria, A., Barbera, R., Farre, R.,

- Lagarda, M.J. *Effects of phytosterol ester-enriched low-fat milk on serum lipoprotein profile in mildly hypercholesterolaemic patients are not related to dietary cholesterol or saturated fat intake*. British Journal of Nutrition 2010;**104**;1018-25
- 187.** Mannarino, E., Pirro, M., Cortese, C., Lupattelli, G., Siepi, D., Mezzetti, A., Bertolini, S., Parillo, M., Fellin, R., Pujia, A., Averna, M., Nicolle, C., Notarbartolo, A. *Effects of a phytosterol-enriched dairy product on lipids, sterols and 8-isoprostane in hypercholesterolemic patients: A multicenter Italian study*. Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases 2009;**19**;84-90
- 188.** Bañuls, C., Martínez-Triguero, M.L., López-Ruiz, A., Morillas, C., Lacomba, R., Víctor, V.M., Rocha, M., Hernández-Mijares, A. *Evaluation of cardiovascular risk and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic subjects on a standard healthy diet including low-fat milk enriched with plant sterols*. Journal of Nutritional Biochemistry 2010;**21**;881-6
- 189.** Goncalves, S., Maria, A.V., Silva-Herdade, A.S., e Silva, J.M., Saldanha, C. *Milk enriched with phytosterols reduces plasma cholesterol levels in healthy and hypercholesterolemic subjects*. Nutrition Research 2007;**27**;200-5
- 190.** Seppo, L., Jauhiainen, T., Nevala, R., Poussa, T., Korpela, R. *Plant stanol esters in low-fat milk products lower serum total and LDL cholesterol*. Eur J Nutr 2007;**46**;111–7
- 191.** Plana, N., Nicolle, C., Ferre, R., Camps, J., Cos, R., Villoria, J., Masana, L. *Plant sterol-enriched fermented milk enhances the attainment of LDL-cholesterol goal in hypercholesterolemic subjects*. Eur J Nutr 2008;**47**;32–9
- 192.** Antonopoulou, S., Semidalas, C.E., Koussisis, S., Demopoulos, C.A. *Platelet-Activating Factor (PAF) Antagonists in Foods: A Study of Lipids with PAF or Anti-PAF-like Activity in Cow's Milk and Yogurt*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1996;**44**;3047-51

- 193.**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;**283**;11097–106
- 194.**Paoletti, R., Poli, A., Cignarella, A. *The emerging link between nutrition, inflammation and atherosclerosis.* Expert Rev Cardiovasc Ther., 2006;**3**;385-93
- 195.**Antonopoulou, S., Karantonis, H.C., and Nomikos, T. *Antithrombotic and antiatherogenic lipid minor constituents from olive oil in “Olive oil – Minor constituents and health”*, 173-192, Editor: Boskou, D., CRC Press Taylor and Francis Group, 2008
- 196.**Karantonis, H.C, Antonopoulou, S., Perrea, D.N., Sokolis, D.P., Theocharis, S.E., Kavantzaz, N., Iliopoulos, D.G., Demopoulos CA. *In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits.* Nutr Metab Cardiovasc Dis. 2006;**3**;174-85
- 197.**Karantonis, H.C., et al. *Bioactive polar lipids in olive oil, pomace and waste byproducts.* Journal of Food Biochemistry, 2008;**4**;443-459