



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ:<<ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ>>

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τα λιπαρά οξέα των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρι και συσχέτιση με τα μεταβολικά ένζυμα του PAF.

ΣΑΡΙΚΛΟΓΛΟΥ ΦΙΛΙΠΠΗ

Αθήνα, 2019



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ: ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΜΣ:<<ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑ-ΔΙΑΤΡΟΦΗ>>

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΑΣΚΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (επιβλέπουσα καθηγήτρια)

Καθηγήτρια Βιοχημείας, Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής,
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Καλογερόπουλος Νίκος

Καθηγητής Τροφίμων και Περιβαλλοντικής Χημείας, Τμήμα επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο.

Φραγγοπούλου Ελισάβετ

Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο
Πανεπιστήμιο.

Η Σαρικλόγλου Φιλίππη

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

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

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

Πίνακας περιεχομένων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
SUMMARY	9
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	12
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	15
Κεφάλαιο 1: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων PAF.....	17
1.1 Δομή του PAF και των αναλόγων του	17
1.2 Τρόπος δράσης του PAF	18
1.3 Παθοφυσιολογία του PAF	18
1.4 Μεταβολισμός του PAF	19
1.4.1 Βιοσύνθεση του PAF.....	19
1.4.2 Καταβολισμός του PAF	20
1.5 Τα κυριότερα ένζυμα του μεταβολισμού του PAF	21
1.5.1 Φωσφολιπάσες A2 (PLA2)	21
1.5.2 CoA-ανεξάρτητη τρανσακυκλάση (CoA-IT)	22
1.5.3 Ακέτυλο- CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση(λυσο-PAF AT)	23
1.5.4 Μη ευαίσθητη σε DTT CDP-χολίνη: αλκυλακετυλγλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT)	24
1.5.5 PAF-ακετυλοϋδρολάση(PAF-AH)	24
1.6 Ρυθμιστικοί μηχανισμοί του μεταβολισμού του PAF.....	25
1.7 Υποδοχέας του PAF	27
1.8 Έκφραση, δομή και λειτουργία του υποδοχέα	27
1.9 Αναστολείς του PAF	29
1.10 Φυσιικοί ανταγωνιστές του PAF	29
1.11 Συνθετικοί ανταγωνιστές του PAF	30
1.12 Η επίδραση της διατροφής	30

Κεφάλαιο 2: Κατανάλωση ψαριών και καρδιαγγειακή υγεία.....	32
2.1 Αθροσκήρωση και PAF	32
2.2 Το ψάρι στην διατροφή και ω-3 PUFA.....	33
2.3 Το ψάρι στην διατροφή και δείκτες καρδιαγγειακής υγείας.....	35
Κεφάλαιο 3: Λιπαρά οξέα και δείκτες καρδιαγγειακής υγείας.....	38
3.1 Τα λιπαρά οξέα ως βιοδείκτες υγείας	38
3.2 Επιδημιολογικές μελέτες.....	40
3.3 Κλινικές μελέτες	42
Σκοπός	49
Κεφάλαιο 4: Μεθοδολογία	50
4.1 Πρωτόκολλο κλινικής παρέμβασης	50
4.2 Καθορισμός των λιπαρών οξέων των ερυθρών κυττάρων	51
4.3 Στατιστική ανάλυση	52
Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα Πειραμάτων	53
5.1 Προσκόλληση εθελοντών	53
5.2 Βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών:	54
5.3 Διατροφικές συνήθειες εθελοντών και Med Diet Score	55
5.4 Βιοχημικές μετρήσεις.....	56
5.5 Έλεγχος κανονικότητας λιπαρών οξέων	59
5.6 Έλεγχος επίδρασης της παρέμβασης στα λιπαρά οξέα	60
5.7 Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα του PAF.....	64
5.8 Έλεγχος συγχρητικών παραγόντων	71
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Συζήτηση.....	74
Βιβλιογραφία.....	78

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η έως τώρα βιβλιογραφία έχει αναδείξει την ευεργετική επίδραση της Μεσογειακής Διατροφής στην καρδιαγγειακή υγεία καθώς και την εμπλοκή του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (platelet activating factor, PAF) στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας. Πλήθος κλινικών μελετών, που αφορούν την διατροφική παρέμβαση με ψάρι, υποστηρίζει την συσχέτιση μεταξύ των ω -3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων και την βελτίωση δεικτών καρδιαγγειακής υγείας όπως, η αρτηριακή πίεση, τα επίπεδα φλεγμονής και το λιπιδαιμικό προφίλ.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εξετάσει την επίδραση κατανάλωσης απλής και εμπλουτισμένης, με βιολογικά δραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, τσιπούρας, όσον αφορά τη συσχέτιση μεταξύ των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF. Για το λόγο αυτό, 30 υγιείς εθελοντές (14 γυναίκες, 16 άντρες) ολοκλήρωσαν μια τυχαιοποιημένη διπλά τυφλή διασταυρούμενη μελέτη, όπου για 8 εβδομάδες κατανάλωναν εβδομαδιαίως 2 γεύματα τσιπούρα ιχθυοτροφείου είτε φυσιολογική είτε εμπλουτισμένη με αναστολείς του PAF, φυσικής προέλευσης. Στην συνέχεια, ακολούθησαν 6 εβδομάδες κάθαρσης (wash out) μετά το πέρας του οποίου το πρωτόκολλο επαναλήφθηκε με σκοπό όσοι έλαβαν τα εμπλουτισμένα γεύματα να λάβουν τα φυσιολογικά και ανάποδα. Πραγματοποιήθηκε αιμοληψία μετά από νηστεία, πριν και μετά από κάθε παρέμβαση.

Τα λιπαρά οξέα τα οποία συμπεριλήφθηκαν στην μελέτη, ήταν αυτά τα οποία εμφανίζονταν στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων των εθελοντών και τα ένζυμα του PAF που μελετήθηκαν ήταν, η ακετυλοϋδρολάση του PAF (PAF AH), η συνδεδεμένη σε λιποπρωτεΐνες φωσφολιπάση A_2 (LP PLA₂), η PAF ακετυλοτρανσφεράση (PAF AT) και η μη ευαίσθητη σε DTT CDP-χολίνη: αλκυλακετυλγλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση (PAF-CPT). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα STATA 12.0.

Τα αποτελέσματα της μελέτης, έδειξαν ότι, στο τέλος της κάθε παρέμβασης, τα μόνα λιπαρά οξέα που αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά, ήταν τα EPA και DHA, όπως ήταν και αναμενόμενο. Συνολικά, φάνηκε ότι, δεν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση

μεταξύ των ω -3PUFA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων των εθελοντών με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF, σε καμία από τις δύο παρεμβάσεις. Τα αποτελέσματα αυτά, υποδεικνύουν την ανάγκη για περαιτέρω μελέτη της σχέσης των ω -3 PUFA, με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF, ενδεχομένως σε μεγαλύτερο αριθμό εθελοντών με αύξηση των γευμάτων παρέμβασης.

Λέξεις κλειδιά: Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, ω -3 λιπαρά οξέα, ψάρια, EPA, DHA, βιοδείκτες.

SUMMARY

The literature so far has highlighted the beneficial effect of the Mediterranean diet on cardiovascular health as well as the involvement of platelet activating factor (PAF) in the development of atherosclerotic plaque. Numerous clinical studies on fish nutrition support the correlation between ω -3 highly unsaturated fatty acids (PUFAs) in red cell membranes and the improvement of cardiovascular health indicators such as blood pressure, inflammation levels and lipidemic Profile.

The aim of the present study was to examine the effect of the consumption of simple and enriched with biologically active olive-pomace lipids, sea bream in the correlation between the fatty acids of the red cell membranes with the PAF metabolizing enzymes. For this reason, 30 healthy volunteers (14 women, 16 men) completed a randomized, double-blind crossover study, where for 8 weeks they consumed 2 meals per day of either a native sea bream or enriched with naturally occurring PAF inhibitors.

Six weeks of washout followed, after which the protocol was repeated for those who received enriched meals to get the normal and the opposite. Blood samples were taken post-fasting before and after each intervention.

The fatty acids which included in the study were those that occurred at higher concentrations in the red cell membrane of the volunteers and the PAF enzymes studied were PAF acetylhydrolase (PAF AH), lipoprotein-linked phospholipase A2 (LP PLA2), PAF acetyltransferase (PAF AT), non-DTT sensitive CDP-choline: alkylacetyl glycerol cholinophosphatase (PAF-CPT). The statistical analysis of the results was carried out with the STATA statistical program.

The results of the study showed that at the end of each intervention, the only fatty acids that increased statistically significantly were EPA and DHA, as was expected. Overall, there appeared to be no statistically significant correlation between ω -3PUFA in the red cell membrane and PAF metabolic enzymes in either of the two interventions. These results indicate the need to further study the relationship of ω -3 PUFAs with PAF metabolic enzymes, possibly to a larger number of volunteers with increased intervention meals.

Keywords: PAF, n-3 fatty acids, EPA, DHA, fish consumption, biomarker.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1.1: Το μόριο του 1-Ο-αλκυλο-2-ακετυλο-ση-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη (PAF).

Εικ.1.2: Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης του PAF.

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

Εικ. 2.2 : Δομή των ω-3 PUFA λιπαρών οξέων.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 5.1: Η συχνότητα κατανάλωσης ψαριών πριν και μετά την παρέμβαση.

Πίνακας 5.2: Τα χαρακτηριστικά των εθελοντών κατά την έναρξη της παρέμβασης

Πίνακας 5.3: Η κατανάλωση ελαιολάδου και το MedDietScore

Πίνακας 5.4: Βιοχημικές παράμετροι, που ακολουθούν κανονική κατανομή

Πίνακας 5.5: Βιοχημικές παράμετροι, που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή

Πίνακας 5.6: Λιπαρά οξέα που ακολουθούν κανονική κατανομή, στις δύο παρεμβάσεις.

Πίνακας 5.7: Λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, στις δύο παρεμβάσεις.

Πίνακας 5.8: Στατιστική σημαντικότητα μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης για τα λιπαρά οξέα που ακολουθούν κανονική κατανομή.

Πίνακας 5.9: Στατιστική σημαντικότητα μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης για τα λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή

Πίνακας 5.10: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα πριν την παρέμβαση

Πίνακας 5.11: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα μετά την παρέμβαση.

Πίνακας 5.12: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα πριν την παρέμβαση με απλή τσιπούρα

Πίνακας 5.13: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα μετά την παρέμβαση με απλή τσιπούρα.

Πίνακας 5.14: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα πριν την παρέμβαση με εμπλουτισμένη τσιπούρα.

Πίνακας 5.15: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα μετά την παρέμβαση με εμπλουτισμένη τσιπούρα.

Πίνακας 5.16: Συσχέτιση λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, μετά το τέλος και των δύο παρεμβάσεων, συνολικά. Με συγχητικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία.

Πίνακας 5.17: Συσχέτιση λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, στο τέλος της παρέμβασης με την εμπλουτισμένη τσιπούρα. Με συγχητικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία.

Πίνακας 5.18: Συσχέτιση λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, στο τέλος της παρέμβασης με την απλή τσιπούρα. Με συγχητικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχ.1: Διαγράμματα Q-Q για το 22:6n-3 στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης, έλεγχος κανονικότητας λιπαρών οξέων.

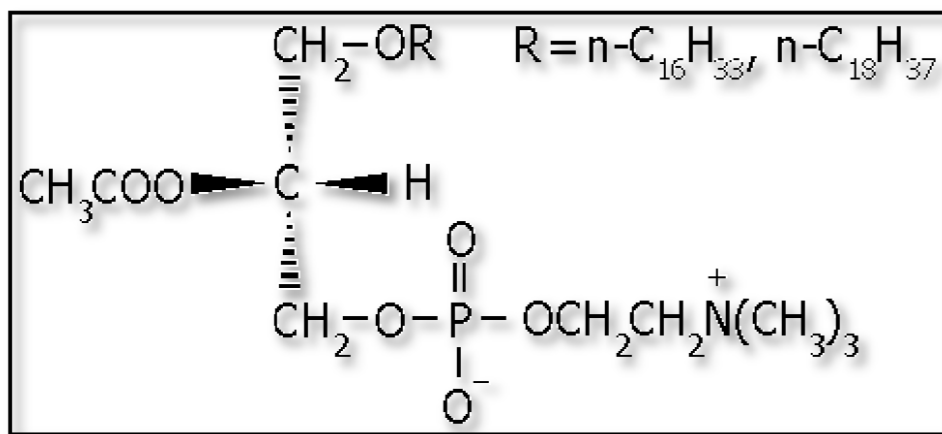
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

PAF	Platelet Activating Factor, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
lyso-PAF AT	Λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση
cPLA2	Φωσφολιπάση A2 του κυτοπλάσματος
AA	Αραχιδονικό οξύ
ALA	α-λινολεϊκό οξύ
PUFA	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SFA	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
MUFA	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
PAF AH	Ακετυλοϋδρολάση ειδική για το PAF
PAF-CPT	Αλκυλακετυλγλυκερόλη χολινοφωσφοτρανσφεράση
LP PLA2	Φωσφολιπάσες A2
EPA	Εικοσιπεντανοϊκό
DHA	Εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ
ADP	adenosine diphosphate, Διφωσφορική αδενοσίνη
TAG	Τριακυλογλυκερόλες
CRP	C-reactive protein, C- αντιδρώσα πρωτεΐνη
ΣΑΠ	Συστολική αρτηριακή πίεση
ΔΑΠ	Διαστολική αρτηριακή πίεση
IL-6	Ιντερλευκίνη-6
IL-8	Ιντερλευκίνη-8
apoE,	Απολιποπρωτεΐνη E
TNF-α	Παράγοντα νέκρωσης όγκων-α
ICAM	Ενδοκυτταρικό μόριο προσκόλλησης
VCAM	Αγγειακό μόριο προσκόλλησης

Κεφάλαιο 1: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων PAF.

1.1 Δομή του PAF και των αναλόγων του

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) είναι ένα βιοδραστικό φωσφολιποειδές με συστηματική ονομασία 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη. Το μόριο του PAF χαρακτηρίζεται ως γλυκερινικό φωσφολιποειδές, το οποίο στην πρώτη θέση έχει μια λιπαρή αλυσίδα που συνδέεται μέσω αιθερικού δεσμού με τον γλυκερινικό σκελετό. (εικόνα 1.1). Η λιπαρή αλυσίδα αποτελείται από 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι είτε κορεσμένη είτε ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς. Στην θέση 2 του γλυκερινικού σκελετού βρίσκεται εστερικά συνδεδεμένο ένα οξικό οξύ ενώ στην θέση 3 μια ομάδα φωσφοχολίνης.



Εικόνα 1.1: Το μόριο του 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη.

Λόγω του μεγάλου αριθμού των βιοσυνθετικών και αποικοδομητικών ενζύμων του PAF, στην πραγματικότητα, δημιουργείται ένα πλήθος μορίων με παρόμοια ή μικρότερη βιολογική δράση. Η δημιουργία των μορίων αυτών εξαρτάται από την σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης σε φωσφολιποειδή και αραχιδονικό οξύ καθώς και από την ταχύτητα βιοσύνθεσης και αποικοδόμησης αυτών.

Τα μοριακά ανάλογα του PAF μπορούν να ομαδοποιηθούν με βάση:

1. Το είδος του δεσμού σύνδεσης της λιπαρής αλυσίδας στην sn-1 θέση. Οι πιο δραστικές ενώσεις είναι αυτές με αιθερικό δεσμό και ακολουθούν με σειρά δραστικότητας ο βινυλαιθερικός και εστερικός δεσμός.

- II. Το είδος της λιπαρής αλυσίδας. Τα ανάλογα που αποτελούνται από κορεσμένο ή ακόρεστο λιπαρό οξύ με 16 ή 18 άτομα άνθρακα παρουσιάζουν την μέγιστη δραστικότητα.
- III. Το είδος του εστεροποιημένου λιπαρού οξέος στην sn-2 θέση. Μείωση της βιολογικής δραστικότητας του αναλόγου προκύπτει με αντικατάσταση του οξικού οξέος με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας.
- IV. Το είδος της βάσης στην sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Η δραστικότητα μειώνεται ως εξής: χολίνη > διμεθυλοαιθανολαμίνη > μονομεθυλοαιθανολαμίνη > αιθανολαμίνη.

Το σημαντικότερο δομικό χαρακτηριστικό του PAF και των αναλόγων του είναι η ακετυλομάδα της θέσης sn-2 καθώς η απομάκρυνσή της από το μόριο οδηγεί στο σχεδόν ανενεργό λυσο-PAF.

1.2 Τρόπος δράσης του PAF

Ο τρόπος δράσης του PAF μπορεί να γίνει με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

- I. Μπορεί να δράσει αυτοκρινώς ή παρακρινώς.
- II. Ως διακυτταρικός μεσολαβητής και να ενεργοποιήσει τα γειτονικά κύτταρα μέσω ενσωμάτωσης του στην πλασματική μεμβράνη (σε καταστάσεις φλεγμονής).
- III. Ακόμα να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ενδοκυτταρικά ως μεσολαβητής.

1.3 Παθοφυσιολογία του PAF

Τα μόρια του PAF αποτελούν έναν ισχυρό διαμεσολαβητή που λειτουργεί ποικιλοτρόπως και παράγεται από μια πληθώρα κυττάρων συμμετέχοντας τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων συμμετέχει σε πολλές διαφορετικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις έχοντας διαφορετική επίδραση στα κύτταρα και στους ιστούς. Ένας μεγάλος αριθμός φλεγμονωδών και θρομβογόνων ερεθισμάτων οδηγεί στην ενεργοποίηση της βιοσυνθετικής πορείας του παράγοντα, δημιουργώντας αυτή την πολυμορφία των δράσεων του PAF. Έτσι, ο PAF λειτουργεί ως μεσολαβητής ενώνοντας διαφορετικά μόρια μεταφοράς μηνυμάτων (upstream). Υπό

φυσιολογικές συνθήκες, ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων λειτουργεί ως διαμεσολαβητής στην φλεγμονή, στην αναπαραγωγή, στην απόπτωση, στην ρύθμιση του αγγειακού τόνου, στην αγγειογένεση και στην λειτουργία της μνήμης. Η ρύθμιση της δράσης του γίνεται μέσω της PAF-ακετυλοϋδρολάσης που τον απενεργοποιεί και των αναστολέων του. Σε παθολογικές καταστάσεις, παρατηρείται υπερβολική σηματοδότηση από τον παράγοντα, η οποία συνδέεται με ασθένειες στις οποίες κύριο χαρακτηριστικό είναι η φλεγμονή.

1.4 Μεταβολισμός του PAF

1.4.1 Βιοσύνθεση του PAF

Ο PAF παράγεται από μια πληθώρα κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια, τα ουδετερόφιλα, τα μονοκύτταρα /μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα, τα βασεόφιλα, τα ηωσινόφιλα, τα μαστοκύτταρα και τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Ο PAF βιοσυντίθεται με δύο διαφορετικές ενζυμικές οδούς, την εξ' υπαρχής (de novo) και την πορεία ανασχηματισμού (remodeling) [1].

Η πορεία ανασχηματισμού (remodeling) αναφέρεται σε συγκεκριμένα φωσφολιποειδή των μεμβρανών των κυττάρων. Τα μόρια αυτά διαθέτουν αιθερικό δεσμό και ομάδα χολίνης και υφίστανται αλλαγές στην δομή τους προκειμένου να μετατραπούν στον παράγοντα. Μετά από την κατάλληλη διέγερση των κυττάρων ενεργοποιείται η φωσφολιπάση A2 του κυτοπλάσματος (cPLA2) η οποία αποκόπτει από την sn-2 του φωσφολιποειδούς την εστεροποιημένη λιπαρή ακυλική αλυσίδα και δημιουργείται το αντίστοιχο 2-λυσο-φωσφολιποειδές. Σε αυτή την λύσο-μορφή έρχεται να δράσει η λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (lyso-PAF AT) , ένζυμο το οποίο χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το ακετυλο-CoA και μεταφέρει την ακετυλομάδα στην θέση sn-2 δημιουργώντας ένα μόριο PAF. Αναλόγως με τον χημικό δεσμό στον sn-1άνθρακα της λιπαρής αλυσίδας, τα δύο ένζυμα της πορείας ανασχηματισμού (cPLA2 και lyso-PAF AT) αναγνωρίζουν τρεις διαφορετικές υποκατηγορίες ενώσεων φωσφατιδυλοχολίνης (PC). Αυτές οι ενώσεις-υποστρώματα είναι οι ακυλο-PC (εστερικός δεσμός), αλκυλο-PC (αιθερικός δεσμός) και αλκενυλο-PC (βινυλαιθερικός δεσμός). Τα μόρια διαφοροποιούνται ως προς το μήκος και την ακορεστότητα της λιπαρής αλυσίδας. Επιπλέον, οι αρχικές μακριές λιπαρές αλυσίδες της sn-2 είναι πολυακόρεστες και συνήθως είναι αλυσίδες αραχιδονικού οξέος (AA). Ως επί

το πλείστον, κατά την διαδικασία ανασχηματισμού του PAF μπορεί να απελευθερωθούν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) τα οποία στην συνέχεια δρουν ως βιοδραστικά εικοσανοειδή. Εκτός από αυτή τη διαδικασία, υπάρχει και μια άλλη διαδικασία μέσω της οποίας παράγονται ταυτόχρονα PAF και αραχιδονικό οξύ. Αυτό το μονοπάτι αντιδράσεων είναι ανεξάρτητο του συνενζύμου A (CoA) οδηγώντας στην δημιουργία μιας lyso-PAF μέσω τρανσακυλίωσης [2, 3].

Στην πορεία εξ' υπαρχής (de novo) παραγωγής του PAF τα βήματα που πραγματοποιούνται είναι αρχικά η ακετυλίωση και στην συνέχεια η αποφωσφορυλίωση ενός μορίου 1-O-αλκυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφορικού. Οι αντιδράσεις καταλύονται με την βοήθεια της CoA εξαρτώμενης ακετυλοτρανσφεράσης (ALPA AT) και της φωσφουδρολάσης αντίστοιχα. Με αυτόν τον τρόπο παράγεται ένα μόριο 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-γλυκερόλης και μέσω μιας DTT-ανεξάρτητης φωσφοχολινωτρανσφεράσης (PAF-CPT) παράγεται PAF. Η φωσφοχολίνη που μεταφέρεται στην θέση sn-3 της γλυκερόλης, με την βοήθεια του ενζύμου βρίσκεται σε ενεργοποιημένη μορφή ως κυτιδυλο-διφωσφορικής χολίνης (CDP-χολίνης).

Η πορεία ανασχηματισμού των μορίων PAF συναντάται περισσότερο στις περιπτώσεις όπου υπάρχει φλεγμονή και υπερευαισθησία ενώ η de novo πορεία, σε φυσιολογικές συνθήκες όπου διατηρούνται τα φυσιολογικά επίπεδα PAF στο αίμα και στους ιστούς.

1.4.2 Καταβολισμός του PAF

Η κυριότερη ενζυμική αντίδραση που πραγματοποιείται κατά την διαδικασία αποικοδόμησης των μορίων του PAF είναι η απόσπαση της ακυλικής αλυσίδας της sn-2 από την ακετυλοϋδρολάση που είναι ειδική για το PAF (PAF AH) που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή του ανενεργού lyso-PAF. Η υδρόληση του PAF καταλύεται και από μια εκκρινόμενη PLA2 in vitro [4] ενώ μια τρανσακετυλάση μπορεί να μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-πλασμολογόνα ή άλλα λυσο-φωσφολιποειδή [5].

Επιπλέον, ένα άλλο ένζυμο που συσχετίζεται με την λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας (HDL) και έχει χαρακτηριστεί για την υδρολυτική δράση του για τον PAF είναι η LCAT (λεκιθίνη: χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράση) [6]. Ακόμη, η φωσφολιπάση C και οι λυσοφωσφολιπάσες I και II εμφανίζουν κάποια δράση στον καταβολισμό του PAF, μικρής σημασίας. (εικόνα 1.2)

αλυσίδα της θέσης sn-2. Επιπλέον τα Ca^{2+} φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην δράση αυτού του ενζύμου καθώς, όταν η περιεκτικότητα Ca^{2+} είναι κάτω από 10^{-6} mol αυξάνεται η δράση του ενζύμου λόγω μεταφοράς του σε κυστίδια φωσφολιποειδών [8].

Από την άλλη πλευρά, οι εκκριτικές φωσφολιπάσες έχουν στην δομή τους μία θέση πρόσδεσης ασβεστίου εκτός από το καταλυτικό τους κέντρο. Όταν τα επίπεδα ασβεστίου είναι της τάξεως των 10^{-3} mol τότε τα ένζυμα της υποοικογένειας αυτής καταλύουν την υδρόλυση του εστερικού δεσμού στην sn-2 θέση χωρίς επιλεκτικότητα στην λιπαρή αλυσίδα. Όσα φωσφολιποειδή περιέχουν φωσφατιδυλοχολίνη υδρολύονται αποτελεσματικά μόνο από 3 μέλη της κατηγορίας των εκκριτικών [10]. Έχει αποδειχθεί ότι ένα από αυτά τα μέλη καταλύει τον PAF in vitro με ή χωρίς την παρουσία λιποπρωτεϊνών [4].

Η τρίτη υποκατηγορία είναι διαφορετική από τις προηγούμενες καθώς τα ένζυμα που ανήκουν σε αυτήν δεν εξαρτώνται από τα ιόντα ασβεστίου. Οι φωσφολιπάσες αυτές ονομάζονται ασβέστιο-ανεξάρτητες και δεν εμφανίζουν εκλεκτικότητα στα χαρακτηριστικά της λιπαρής αλυσίδας της sn-2 θέσης.

Οι PAF-AH (ακετυλοϋδρολάσες) θα αναλυθούν αργότερα. Οι φωσφολιπάσες που συμμετέχουν στην πορεία ανασχηματισμού του PAF εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου και το ερέθισμα που προκάλεσε την αντίδραση.

1.5.2 CoA-ανεξάρτητη τρανσακυκλάση (CoA-IT)

Η λειτουργία αυτής της τρανσακυκλάσης είναι να μεταφέρει αλυσίδες λιπαρών οξέων από διακυλο-φωσφολιποειδή σε λυσοφωσφολιποειδή. Δεν απαιτείται η παρουσία του CoA ή κάποιου άλλου συμπαραγόντα όπως συμβαίνει με την CoA-εξαρτώμενη τρανσακυκλάση. Επιπλέον, όταν πραγματοποιείται η κατάλυση δεν απελευθερώνεται λιπαρή αλυσίδα όπως γίνεται κατά την δράση των PLA₂.

Έχει φανεί από μελέτες ότι αυτή η τρανσακυκλάση παρουσιάζεται σε ιστούς όπου υπάρχουν μεγάλες ποσότητες σε αιθερικά φωσφολιποειδή όπως στην καρδιά, στον εγκέφαλο, και στα κύτταρα της φλεγμονώδους αντίδρασης (μακροφάγα, αιμοπετάλια, ουδετερόφιλα και λεμφοκύτταρα). Αντίθετα, το ένζυμο απουσιάζει από ιστούς όπου δεν υπάρχουν και αιθερικά φωσφολιποειδή [11].

Κατά την αντίδραση της κατάλυσης, ο δότης ακυλίου είναι πάντοτε εστεροποιημένο λιπαρό οξύ στην sn-2 θέση ενός διάκυλο-φωσφολιποειδούς και δεν προέρχεται από ακυλο- CoA ή ελεύθερο λιπαρό οξύ. Επιπλέον, μεταξύ δότη και δέκτη μεταφέρονται αποκλειστικά 20-22 πολυακόρεστες αλυσίδες ανθράκων στις οποίες περιλαμβάνονται τα ω-6 και ω-3 λιπαρά οξέα. Όσον αφορά τα φωσφολιποειδή-δότες, προτιμώνται αυτά που έχουν χολίνη ενωμένη στην φωσφορική ομάδα, σε αντίθεση με την φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνης και της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης. Τα λυσοφωσφολιποειδή δέκτες χωρίζονται σε τρεις υποκατηγορίες ανάλογα με το είδος της αλυσίδας στην sn-1 θέση (1-ακλενυλο-PC, 1-αλκυλο-PC, 1-ακυλο-PC). Η πιο αποτελεσματική ακυλίωση πραγματοποιείται στην 1-αλκυλο-φωσφατιδυλοχολίνη [12].

Η δράση του ενζύμου είναι ανεξάρτητη από τα ιόντα ασβεστίου, μαγνησίου ή από την παρουσία CoA αν και είναι ευαίσθητο στην θερμοκρασία, στην παρουσία οξέων και στα απορρυπαντικά. Η ευαισθησία στα απορρυπαντικά κάνει αδύνατη την απομόνωση της τρανσακετυλάσης για την μελέτη της δομής της [13].

1.5.3 Ακέτυλο- CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση(λυσο-PAF AT)

Το ένζυμο αυτό είναι υπεύθυνο για την βιοσύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού παίρνοντας μέρος στο τελευταίο βήμα αυτής της πορείας ενώ είναι συνδεδεμένο στο ενδοπλασματικό δίκτυο διαφόρων κυττάρων. Στην πορεία του ανασχηματισμού, τα αιθερικά ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης μετατρέπονται σε λυσο-PAF μέσω της κυτοπλασματικής φωσφολιπάσης A₂. Στη συνέχεια, μέσω της δράσης δύο ισομορφών της ακέτυλο-CoA: λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράσης τις LPCAT1 και LPCAT2 γίνεται ακετυλίωση του λυσο-PAF [14, 15]. Έχει αποδειχθεί ότι, η LPCAT2 ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής ενώ η LPCAT1 είναι ασβέστιο-ανεξάρτητη και δεν συμμετέχει σε φλεγμονές.

Η ακετυλοτρανσφεράση έχει ως υποστρώματα λυσο-PC και λυσο-PE, ενώ οι λυσο-PI και λυσο-PS δεν συμμετέχουν στην ενζυμική αντίδραση [1, 16]. Επιπλέον, προτιμώνται λυσοφωσφολιποειδή με C-16 ανθρακική αλυσίδα στη sn-1 θέση έναντι των C-18 αναλόγων. Αναλόγως την κατάσταση στην οποία βρίσκεται το κύτταρο, η ακετυλοτρανσφεράση επιλέγει ως δότη για την sn-2 θέση διαφορετικό ακυλο- CoA. Συγκεκριμένα, σε κατάσταση ηρεμίας, προτιμάται αραχιδονυλο- CoA ενώ σε κατάσταση οξείας φλεγμονής λόγω των

λιποπολυσακχαριτών (LPS) χρησιμοποιείται το ακετυλο-CoA με σκοπό την παραγωγή PAF [15].

Αυτό το ένζυμο είναι ασβέστιο-εξαρτώμενο με ιδανικό pH γύρω στο 7.4. Όμως η δράση του ενζύμου αναστέλλεται με την παρουσία διάφορων χηλικών παραγόντων όπως του αιθυλενοδιαμινοτετραοξικού οξέως (EDTA) ή του αιθυλενογλυκερολοτετραοξικού οξέως (EGTA), κάποιων δισθενών ιόντων όπως του Mg^{2+} και του Mn^{2+} και κάποιων συγκεκριμένων σουλφυδρυλο-ενώσεων, όπως για παράδειγμα το N-αιθυλομαλεϊμίδιο. Όπως επίσης, αρκετές μελέτες *in vitro*, έχουν δείξει πως τα φλαφονοειδή λουτεΐνη και κερκετίνη και το αντιφλεγμονώδες σουλφασαλαζίνη ασκούν ανασταλτική δράση στο ένζυμο [17, 18]. Παρόμοια δράση έχει και η ασπιρίνη *in vitro*, η οποία μπορεί να προκαλέσει ακετυλίωση του lipo-PAF μη ενζυμικά [19, 20].

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

Η PAF-CPT αποτελεί απαραίτητο ένζυμο για το τελευταίο βήμα της *de novo* βιοσύνθεσης PAF, δεν αναστέλλεται από την παρουσία της διθειοθρεϊτόλης (DTT) και αυτός είναι ένας λόγος που διαφέρει από τις άλλες χολινοφωσφοτρανσφεράσες [1]. Μελέτες σε κύτταρα ιστών αποδεικνύουν ότι το ένζυμο βρίσκεται στην κυτταροπλασματική επιφάνεια του ενδοπλασματικού δικτύου. Ως υποστρώματα, προτιμώνται οι αλκυλικές αλυσίδες 16:0 και 18:1 σε σχέση με την 18:0 και μια ακετυλο- ή προπιονυλο-ομάδα στην sn-2 θέση ευνοεί την αντίδραση. Το ένζυμο είναι πιο δραστικό σε συνθήκες pH 8.0 και παρουσία ιόντος Mg^{2+} ενώ η παρουσία ιόντων ασβεστίου αναστέλλει την δράση της τρανσφεράσης. Το DTT αυξάνει ελαφρώς την δραστικότητα του ενζύμου, ενώ μελέτες *in vitro* με φάρμακα και βιοδραστικά συστατικά της Μεσογειακής Διατροφής εμφανίζουν ανασταλτική δράση.

1.5.5 PAF-ακετυλοϋδρολάση(PAF-AH)

Η PAF-AH διαθέτει πολλές ισομορφές τόσο στο πλάσμα όσο και στους ιστούς και είναι το κύριο ένζυμο αποικοδόμησης του PAF [21-23]. Εξωκυτταρικά, το ένζυμο είναι προσδεδεμένο στις λιποπρωτεΐνες LDL και HDL (I_hPLA₂). Ενδοκυτταρικά υπάρχουν επίσης,

αρκετές ισομορφές του ενζύμου, με χαρακτηρισμένες τις PAF AH Ib και PAF AH II. Το ένζυμο εμφανίζει μια περιοχή ομολογίας με τις εστεράσες και στις δύο περιπτώσεις.

Γενικά, οι ακετυλοϋδρολάσες έχουν την ικανότητα να υδρολύουν εστερικούς δεσμούς και σε δομικά ανάλογα φωσφολιποειδή πέραν του PAF. Επιπλέον, η επιλογή του υποστρώματος εξαρτάται από την εκάστοτε ισομορφή. Για παράδειγμα, ενώ οι ισομορφές που βρίσκονται στο πλάσμα αναγνωρίζουν έναν μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων, [24] η ενδοκυττάρια PAF AH II λειτουργεί αποτελεσματικά μόνο για την υδρόλυση του PAF.

Επίσης, η PAF AH II έχει τρεις διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες, ως τρανσακετυλαση PAF λυσοφωσφολιποειδών (TAL) και σφιγγοσίνης (TAS) και ως PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF AH) [25, 26]. Επιπλέον, η PAF AH του πλάσματος δρα ως τρανσακετυλάση καθώς έχει την ικανότητα να μεταφέρει την ακετυλομάδα του PAF σε διάφορους αποδέκτες.

1.6 Ρυθμιστικοί μηχανισμοί του μεταβολισμού του PAF

Η μελέτη της ρύθμισης του μεταβολισμού του PAF και των ενζύμων που συμμετέχουν σε αυτόν είναι ιδιαίτερης σημασίας για την κατανόηση της επίδρασης του παράγοντα στον οργανισμό καθώς ο παράγοντας εμπλέκεται σε πολλές φυσιολογικές και παθολογικές καταστάσεις. Οι μελέτες που έχουν γίνει σε ακέραια και ζωικά μοντέλα αποδεικνύουν την επίδραση και την μεταβολή που μπορεί να ασκήσουν διάφοροι φλεγμονώδεις διαμεσολαβητές όπως, οι κυτταροκίνες, οι νευροδιαβιβαστές και οι ορμόνες στον μεταβολισμό του PAF.

Όσον αφορά την πορεία βιοσύνθεσης του PAF μέσω του ανασχηματισμού, η δραστηριότητα των cPLA2α και lyso-PAF AT ρυθμίζεται μέσω διαφόρων μηχανισμών, ενώ η CoA-IT φαίνεται ότι είναι ένα συνεχώς ενεργό ένζυμο του οποίου η απόδοση σε PAF εξαρτάται από την ποσότητα φωσφολιποειδών-προερχόμενων από την δράση της PLA2.

Όσον αφορά την PLA2, η δραστηριότητα του ελέγχεται με διάφορους τρόπους [8]. Αρχικά, το πρώτο βήμα είναι η μεταφορά του από το κυτοσόλιο στις μεμβράνες, η οποία ευνοείται από τα αυξημένα επίπεδα ιόντων ασβεστίου ενδοκυτταρικά. Επιπλέον, το ένζυμο ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση σε σημαντικά σημεία στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Ακόμη, πολλές πρωτεΐνες επηρεάζουν την δραστηριότητα του ενζύμου θετικά ή

αρνητικά, με κύριο παράδειγμα την κασπάση-3 η οποία κατά την απόπτωση του κυττάρου προκαλεί την καταστροφή του καταλυτικού κέντρου της PLA₂ και έχει ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση της.

Όσον αφορά την λυσο-PAF AT, η ενεργοποίηση και η απενεργοποίηση της ρυθμίζεται με έναν κύκλο φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης καθώς μελέτες *in vitro* με διάφορες κινάσες έχουν δείξει πως αυτές ενεργοποιούν το ένζυμο [1].

Στα πολυμορφοπύρνα λευκοκύτταρα, το ερέθισμα για την σύνθεση PAF μπορεί να ξεκινήσει από τον φορέα ιόντων A23187 (calcimycin, μεταφορέας ιόντων ασβεστίου) και τον χημειοτακτικό παράγοντα fMLP οι οποίοι ενεργοποιούν τους καταρράκτες κινασών και συμβάλλουν στην ταυτόχρονη φωσφορυλίωση των ενζύμων cPLA₂ και λυσο-PAF AT από τις κινάσες ERK_{1,2} (μόνο τη cPLA₂) και p38 MAPK. Από την άλλη μεριά, η CoA-IT δεν φαίνεται να ενεργοποιείται από αυτά τα ένζυμα [7, 27].

Το ισοένζυμο της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης, το οποίο λειτουργεί ως υδροϋπεροξειδάση των φωσφολιποειδών (PHGPx) και έχει προστατευτική δράση κατά της υπεροξειδωσής των κυττάρων, δρα ως αρνητικός ρυθμιστής του PAF διότι μπορεί να αναστείλλει την φωσφορυλίωση και άρα την ενεργοποίηση των cPLA₂ και λυσο-PAF AT από το p38 MAPK. Αντιθέτως, ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF), οδηγεί στην ενεργοποίηση των cPLA₂ (από το p42/44 MAPK) και λυσο-PAF AT (από το p38 MAPK).

Σχετικά με την *de novo* βιοσύνθεση του PAF, αν και τα στοιχεία που υπάρχουν είναι περιορισμένα, θεωρείται πως η ρύθμιση ελέγχεται από το πρώτο ένζυμο της πορείας, την ALPA ακετυλοτρανσφεράση καθώς εμφανίζει τη μικρότερη ειδική δραστικότητα σε σχέση με τα 2 άλλα ένζυμα της πορείας. Επιπλέον, σημαντικό ρόλο στην ταχύτητα βιοσύνθεσης του PAF παίζει η κυτιδυλοτρανσφεράση, η οποία ευθύνεται για την παραγωγή της CDP-χολίνης που αποτελεί συνυπόστρωμα για την PAF-CPT.

Τέλος, η ρύθμιση της ακετυλοϋδρολάσης του PAF διαφέρει καθώς εξαρτάται από την ισομορφή του ενζύμου. Η ρύθμιση για την ισομορφή του πλάσματος γίνεται στο μεταγραφικό επίπεδο μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα από το p38 MAPK. Είναι απαραίτητη η θετική ρύθμιση για την απενεργοποίηση του PAF και των οξειδωμένων φωσφολιποειδών. Επιπλέον, η ρύθμιση της ενδοκυττάριας ισομορφής PAF AH II γίνεται με πολλούς διαφορετικούς τρόπους και οι μετατροπές που

πραγματοποιούνται είναι υπεύθυνες για την διαφορετική δράση του ενζύμου, ως ακετυλοϋδρολάση ή τρανσακετυλάση. Οι δομικές αλλαγές πραγματοποιούνται μέσω παραγόντων μετατροπής θειολών ή μεταγραφικών παραγόντων, ενώ παράλληλα είναι σημαντική και η ενδοκυττάρια μετακίνηση του ενζύμου.

1.7 Υποδοχέας του PAF

Ο υποδοχέας του PAF εντοπίζεται στην πλασματική μεμβράνη διαφόρων θηλαστικών κυττάρων και είναι ενωμένος με μια G πρωτεΐνη (GPCR) [28, 29].

Σε αυτόν τον υποδοχέα προσδένεται ο PAF και ασκεί παρακρινή και αυτοκρινή δράση. Στον ενδοκυττάριο χώρο ο PAF συνδέεται σε πυρηνικούς υποδοχείς. Η πρόσδεση αυτή, του παράγοντα με τον υποδοχέα του (PAFR), προκαλεί την έναρξη πολλών διαφορετικών σηματοδοτικών μονοπατιών που εξαρτώνται από το είδος του κυττάρου και του οργανισμού [30, 31]. Ο υποδοχέας, όπως επίσης και τα μονοπάτια που αυτός ενεργοποιεί, ρυθμίζεται ομοιοπολικά, με ενδοκύτωση του υποδοχέα και ρύθμιση της έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου.

1.8 Έκφραση, δομή και λειτουργία του υποδοχέα

Οι μελέτες, έχουν δείξει πως υποδοχείς του PAF υπάρχουν σε πολλά είδη κυττάρων, συμπεριλαμβανομένου των αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων, ηπατικών, νεφρικών, εγκεφαλικών και καρδιακών κυττάρων. Επιπλέον, μετά την κλωνοποίηση του υποδοχέα, πραγματοποιήθηκαν μελέτες με σκοπό τον καθορισμό του επιπέδου έκφρασης του mRNA του PAFR. Ακόμη, οι μελέτες αποδεικνύουν ότι, η έκφραση του υποδοχέα του παράγοντα εξαρτάται από το είδος και τον ιστό που μελετάται. Στους ανθρώπους, μεγαλύτερη έκφραση παρατηρήθηκε στα μονοκύτταρα, ουδετερόφιλα, κύτταρα του πλακούντα, πνευμονικά, δενδριτικά και ενδοθηλιακά κύτταρα.

Στα ανθρώπινα κύτταρα, εκφράζεται μόνο ένας υποδοχέας του παράγοντα PAF και το γονίδιο που είναι υπεύθυνο βρίσκεται στο χρωμόσωμα 1. Στην αρχή του γονιδίου δεν υπάρχουν ιντρόνια και αναλόγως το είδος του κυττάρου εκφράζονται δύο διαφορετικά

μεταγραφήματα. Το πρώτο εκφράζεται κυρίως στα περιφερειακά λευκοκύτταρα και στα κύτταρα του μυελού των οστών ενώ το δεύτερο στις καρδιακές, πνευμονικές, σπληνικές, νεφρικές, δερματικές, και καρκινικές κυτταρικές σειρές. Η ρύθμιση της έκφρασης των δύο μεταγραφημάτων ελέγχεται από διαφορετικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Όσον αφορά το μεταγράφημα 1, συμμετέχει ο πυρηνικός παράγοντας κB (NF- κB), ο μεταγραφικός παράγοντας Sp-1, και το στοιχείο απόκρισης του αυξητικού παράγοντα μετασχηματισμού β (TGF- β). Από την άλλη μεριά, για το μεταγράφημα 2, εμπλέκονται συναινετικές αλληλουχίες για τους μεταγραφικούς παράγοντες AP-2, ένα στοιχείο ανταποκρινόμενο για τα οιστρογόνα (ERE), ο Sp-1, ένα στοιχείο αναστολής του TGF- β (ΣΗΔ), και ένα στοιχείο ανταποκρινόμενο σε ορμόνες [30, 31].

Και στις δύο περιπτώσεις μεταγραφημάτων κωδικοποιείται μια συγκεκριμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα 342 αμινοξέων. Ο υποδοχέας του PAF, εμφανίζει την συνήθη δομή ενός υποδοχέα που είναι συνδεδεμένος με μια G-πρωτεΐνη (GPCR), με 7 υδρόφοβες έλικες που διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη. Στο καρβοξυ-τελικό άκρο του υποδοχέα, το οποίο βρίσκεται μέσα στο κυτταρόπλασμα, μία ομάδα καταλοίπων θρεονίνης και σερίνης λειτουργεί ως σημείο φωσφορυλίωσης των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνικών κινασών. Συγκεκριμένα, οι κινάσες αυτές ευθύνονται για την ενδοκύτωση και απευαισθητοποίηση του υποδοχέα.

Οι υπάρχουσες μελέτες έχουν δείξει πως, εκτός του PAF, υπάρχει ένα πλήθος μορίων που έχει την δυνατότητα να συνδέεται στον υποδοχέα PAFR. Η σύνδεση στον υποδοχέα ευνοείται όταν το μόριο έχει στην sn-1 θέση του σκελετού γλυκερόλης έναν αιθερικό δεσμό και στην sn-2 θέση μια μικρή ακυλική αλυσίδα [32]. Επιπλέον, εύκολα μπορούν να συνδεθούν στον PAFR φωσφολιποειδή με οξειδωμένη τουλάχιστον το μικρής αλύσου ακύλιο της sn-2 προκαλώντας έναν καταρράκτη μηνυμάτων που οδηγεί στην μετάφραση προφλεγμονωδών και προαθηρογόνων γονιδίων [33]. Ακόμη, οι μελέτες έχουν δείξει ότι, υπάρχει μια σχέση αλληλεπίδρασης μεταξύ του υποδοχέα και κάποιων συστατικών των βακτηριακών τοιχωμάτων όπως οι λιποπολυσακχαρίτες [34] και η φωσφορυλοχολίνη [35-37] με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος ως κομμάτι της φλεγμονώδους απάντησης.

1.9 Αναστολείς του PAF

Οι αναστολείς του PAF μπορεί να προκύπτουν είτε από φυσικές πηγές, μέσω απομόνωσης, είτε από συνθετικές πηγές, μέσω εργαστηριακής παρέμβασης. Τα μόρια αυτά μελετώνται προκειμένου να εξακριβωθεί ο τρόπος σύνδεσης του PAF με τον υποδοχέα του καθώς και ο μηχανισμός δράσης του συστήματος. Οι αναστολείς χωρίζονται σε δύο βασικές κατηγορίες, στους ειδικούς και μη ειδικούς αναστολείς, αναλόγως το σημείο δράσης τους. Οι μη ειδικοί αναστολείς είναι μόρια τα οποία παρεμβάλλονται και αναστέλλουν συγκεκριμένα σημεία του σηματοδοτικού μονοπατιού που προκαλεί ο PAF. Ένα τέτοιο παράδειγμα, αποτελούν κάποιοι αναστολείς των G-πρωτεϊνών, οι οποίοι μειώνουν την δράση του παράγοντα λόγω αλληλεπίδρασης με το σηματοδοτικό μονοπάτι του. Παρόλα αυτά, δεν αποτελούν καλή επιλογή για φαρμακευτική χρήση καθώς έχουν μικρή εξειδίκευση και δεν αλληλεπιδρούν άμεσα με τον PAF. Όσον αφορά τους ειδικούς αναστολείς, και αυτοί μπορούν να διαχωριστούν σε φυσικά και συνθετικά μόρια και δρούν ανταγωνιστικά ή μη ανταγωνιστικά.

1.10 Φυσικοί ανταγωνιστές του PAF

Στους φυσικούς ανταγωνιστές του PAF, βασικό ρόλο παίζουν τα γκινγκολίδια, τα οποία προέρχονται από ένα δέντρο που ευδοκιμεί στην Κίνα και ονομάζεται Ginkgo Biloba. Το εκχύλισμα των φύλλων του δέντρου αυτού είναι πολύ δημοφιλές ως ιατρικό σκεύασμα για την αντιμετώπιση ασθενειών που οφείλονται στην κακή λειτουργία των αγγείων και στο πρώτο στάδιο της νόσου του Alzheimer καθώς είναι πλούσιο σε γκινγκολίδια και флаβονοειδή. Η κύρια δραστική ουσία ονομάζεται BN52021 και έχει πολλές δράσεις καθώς δρα ως ανταγωνιστής του PAF για τον υποδοχέα και ως αναστολέας της συσώρευσης αιμοπεταλίων λόγω του PAF [38]. Ακόμη, ένας ισχυρός φυσικός ανταγωνιστής του PAF που προέρχεται και αυτός από την Κίνα είναι το kadsurenone (από το βότανο haifeteng) ο οποίος έχει χρησιμοποιηθεί και ως δείγμα για την παραγωγή συνθετικών ανταγωνιστών [39]. Αρκετοί άλλοι φυσικοί ανταγωνιστές, λιγότερο ισχυροί, έχουν απομονωθεί από φυτά της κινεζικής ιατρικής αλλά και από θαλάσσιους οργανισμούς.

1.11 Συνθετικοί ανταγωνιστές του PAF

Υπάρχει μία πληθώρα συνθετικών ανταγωνιστών του PAF, που έχουν κατασκευαστεί από ερευνητικές ομάδες και φαρμακευτικές εταιρίες με αρχικό σκοπό την σύνθεση μορίων που είναι δομικά ανάλογα του PAF. Σε αυτά ο κύριος σκελετός είναι είτε ένα μόριο γλυκερόλης όπως στην αρχική ένωση είτε έχει αντικατασταθεί από μια κυκλική ένωση. Από την άλλη μεριά υπάρχουν και μόρια ανταγωνιστές του PAF που δεν είναι δομικά ανάλογοι του παράγοντα, παρόλα αυτά υπερτερούν σε αριθμό και είναι ιδιαίτερα δημοφιλή. Οι πρώτοι, διαθέτουν, μοριακά, ετεροκυκλικές δομές με sp^2 άζωτο, το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα ως δέκτης δεσμών υδρογόνου.

Οι πιο πολλές κλινικές δοκιμές, με ειδικούς ανταγωνιστές του PAF, είχαν ως στόχο να δείξουν την αποτελεσματικότητα αυτών των μορίων σε ασθενείς που αντιμετώπιζαν κάποια φλεγμονώδη νόσο όπως αλλεργία και άσθμα χωρίς όμως να έχουν ιδιαίτερη επιτυχία. Με αυτά τα δεδομένα, η έρευνα έχει προσανατολιστεί σε μόρια που εμφανίζουν διττή δράση, δηλαδή ανταγωνιστές που ανταγωνίζονται τον PAF αλλά παράλληλα και κάποιον άλλο μεσολαβητή φλεγμονής. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η ρουπαταδίνη η οποία δρα αποτελεσματικά ως διπλός ανταγωνιστής, του PAF και της ισταμίνης H₁ (1) και χρησιμοποιείται επιτυχώς σε περιπτώσεις αλλεργικής ρινίτιδας και χρόνιας κνίδωσης [40].

1.12 Η επίδραση της διατροφής

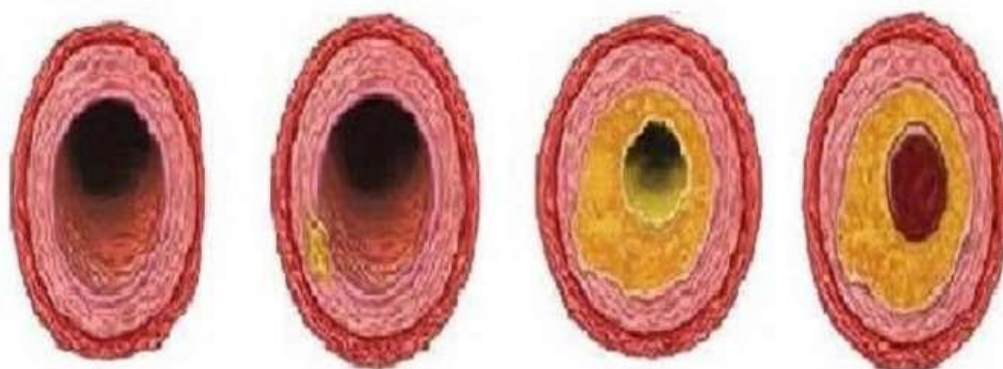
Είναι γεγονός, ότι, μπορεί να επιτευχθεί μια πιο φυσική αντί-PAF δράση μέσω των φυσικών ανταγωνιστών του PAF που υπάρχουν σε ένα μεγάλο αριθμό τροφίμων. Σε κάποια από τα κυριότερα τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής όπως στο ελαιόλαδο, [41-43] στο κρασί, [44-46] στο μέλι, [47] στο γιαούρτι και στο ψάρι [48-50] περιέχονται εκχυλίσματα λιποειδών τα οποία εμφανίζουν σημαντική *in vitro* δράση έναντι στην πρόκληση συσσώρευσης αιμοπεταλίων από τον PAF. Μέσω της απομόνωσης και του χαρακτηρισμού των φυσικών αναστολέων προέκυψαν άλλες ενώσεις όπως τα περίπλοκα γλυκολιποειδή, παράγωγα γαγγλιοζιτών, φαινολικών ενώσεων και γλυκοζιτών. Εκτός από τα παραπάνω, υπάρχουν ενδογενείς αναστολείς του PAF όπως η καρδιολιπίνη η οποία ρυθμίζει τον παράγοντα

ενεργοποίησης αιμοπεταλίων *in vivo*. Τα παραπάνω στοιχεία μας δείχνουν ότι υπάρχει η δυνατότητα μέσω της διατροφής αλλά και των ενδογενών ανταγωνιστών του PAF να ρυθμιστεί ο μεταβολισμός του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, χωρίς φαρμακευτική αγωγή. Όσον αφορά του ειδικούς αναστολείς του PAF, δρουν ανταγωνιστικά [51] ή μη ανταγωνιστικά και διαχωρίζονται σε φυσικά ή συνθετικά μόρια.

Κεφάλαιο 2: Κατανάλωση ψαριών και καρδιαγγειακή υγεία

2.1 Αθηροσκλήρωση και PAF

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας, τα καρδιαγγειακά νοσήματα αποτελούν την πρώτη αιτία θανάτου παγκοσμίως. Η κυριότερη αιτία εμφάνισης επεισοδίων καρδιαγγειακής νόσου αποτελεί η αθηροσκλήρωση. Η αθηροσκλήρωση οφείλεται στην συσσώρευση διαφόρων ουσιών και κυττάρων του αίματος στα τοιχώματα των αρτηριών. Πιο συγκεκριμένα, προσκολλώνται λιποειδή, μόρια χοληστερόλης(LDL), ασβέστιο, ινώδης ιστός, αιμοπετάλια και μονοκύτταρα με αποτέλεσμα να αυξάνεται το πάχος των τοιχωμάτων των αρτηριών και να γίνονται πιο στενές και άκαμπτες. (εικόνα 2.1)



Αρχικά φυσιολογική αρτηρία, στην οποία σταδιακά σχηματίζεται αθηρωματική πλάκα και στένωση με τελικό στάδιο την πλήρη απόφραξη της από σχηματισμό θρόμβου

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

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να υπάρχει δυσλειτουργία στην κυκλοφορία του αίματος. Εάν όμως, διαρραγεί η αθηρωματική πλάκα ενεργοποιείται η διαδικασία συσσώρευσης αιμοπεταλίων μέσω του ινωδογόνου ώστε να δημιουργηθεί ένα προστατευτικό ινώδες πλέγμα στο σημείο της ρήξης. Ουσιαστικά, προκαλείται θρόμβωση (blood clotting) καθώς συσσωρεύονται ερυθρά αιμοσφαίρια και άλλα μόρια στο ινώδες. Αυτή η διαδικασία μπορεί να είναι αρκετά επικίνδυνη για τον οργανισμό καθώς μπορεί να οδηγήσει ακόμα και στον θάνατο. Αναλόγως το σημείο της θρόμβωσης μπορεί να προκληθούν σοβαρές παθήσεις

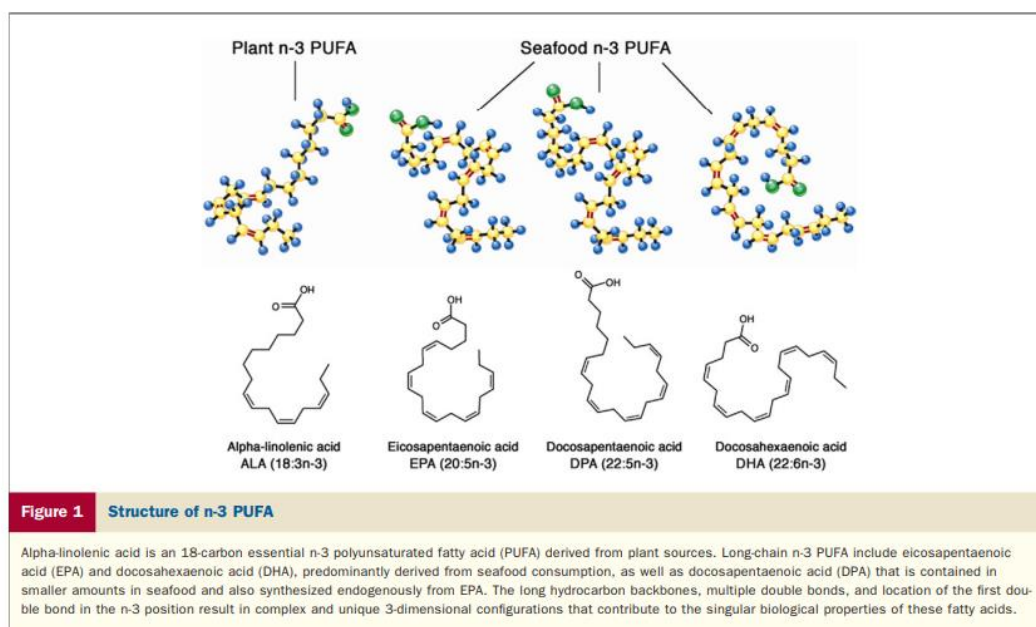
όπως: η στεφανιαία νόσος, η περιφερική αποφρακτική αρτηριοπάθεια, το ανεύρυσμα και η νόσος των καρωτίδων [51].

Στα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης υπάρχει ενδοθηλιακή δυσλειτουργία η οποία οφείλεται στην υπερέκφραση κάποιων μορίων προσκόλλησης λόγω της τυρβώδους ροής που δημιουργείται όταν το λιπιδαιμικό προφίλ στον ορό είναι δυσμενές. Η αυξημένη κυτταρική συσσώρευση παράλληλα με την ενδοθηλιακή δυσλειτουργία συμβάλλουν στην παραγωγή φλεγμονωδών ουσιών, κυτταροκινών καθώς και αύξηση της προσκόλλησης λιποειδών στην σχηματιζόμενη αθηρωματική πλάκα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου και επομένως τον σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Τα μόρια κλειδιά για την ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας είναι τα οξειδωμένα μόρια λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας ox-LDL. Όμως, μία άλλη νεώτερη θεωρία, χαρακτηρίζει το PAF, ως το μόριο-κλειδί στους μηχανισμούς που προκαλούν θρόμβωση, φλεγμονή και οξείδωση. Ο PAF ευνοεί την οξείδωση της LDL, μέσω ενεργοποίησης των μονοκυττάρων, των μακροφάγων και των ουδετερόφιλων προς παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Κατά την οξείδωση της LDL παράγεται εκ νέου PAF [52]. Τα φλεγμονώδη ενδοθηλιακά κύτταρα συνθέτουν PAF και στην συνέχεια εκτίθεται στην επιφάνειά τους προσελκύοντας λευκοκύτταρα ώστε να προσκολληθούν στο ενδοθήλιο [53]. Επιπλέον, στην ox-LDL σταδιακά απενεργοποιείται η PAF-AH [53-55] η οποία δρα προστατευτικά στην ανάπτυξη της αθηρωματικής πλάκας [56-58]. Ακόμη, έχει φανεί ότι, οι κυριότεροι παράγοντες κινδύνου δημιουργίας αθηρωματικής πλάκας και καρδιαγγειακής νόσου όπως, η χρόνια φλεγμονή, το κάπνισμα και η ox-LDL συνοδεύονται από αυξημένα επίπεδα PAF και αναλόγων του [52].

2.2 Το ψάρι στην διατροφή και ω-3 PUFA

Το ψάρι στην διατροφή και ιδιαίτερα στον μεσογειακό τύπο διατροφής παίζει σημαντικό ρόλο στην υγεία του ανθρώπου καθώς τα τελευταία χρόνια πλήθος μελετών έχει αναδείξει την κατανάλωση ψαριού, ως παράγοντα προστασίας από τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Η αξία της κατανάλωσης ψαριού στην υγεία του ανθρώπου, φάνηκε από πολύ νωρίς, από τις πρώτες κιόλας επιδημιολογικές μελέτες που αφορούσαν αυτό το θέμα. Λαοί που η διατροφή τους, παραδοσιακά, περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες ψαριού χαρακτηρίζονται

από μειωμένα ποσοστά εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου και θανάτου από αυτήν. Συγκεκριμένα, οι μελέτες που δημοσιεύτηκαν με τους Εσκιμώους [59] αλλά και η μελέτη των 7 χωρών κατέδειξαν ότι καλύτερη καρδιαγγειακή υγεία είχαν οι λαοί για τους οποίους το ψάρι αποτελεί βασικό στοιχείο της διατροφής τους (Ελλάδα, Ιαπωνία) [60]. Στους Εσκιμώους της Γροιλανδίας, η υψηλή κατανάλωση θαλασσινών συνδέεται με χαμηλά επεισόδια εμφράγματος του μυοκαρδίου, μειωμένο αριθμό αιμοπεταλίων, αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και παρατεταμένο χρόνο αιμορραγίας [61]. Έχει φανεί ότι, τα ευεργετικά οφέλη της συχνής κατανάλωσης ψαριών, οφείλονται κατά κύριο λόγο στην υψηλή περιεκτικότητα των ψαριών σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) και πιο συγκεκριμένα στο εικοσιπεντανοϊκό (EPA) και εικοσιδυοεξανοϊκό οξύ (DHA) χωρίς όμως να αποκλείουν την θετική επίδραση άλλων συστατικών του ψαριού, όπως ειδικές πρωτεΐνες, βιταμίνη D, σελήνιο και άλλα μέταλλα και στοιχεία [62].



Εικόνα 2.2 : Δομή των ω-3 PUFA λιπαρών οξέων

Αυτά τα στοιχεία οδήγησαν την Αμερικανική εταιρία καρδιολογίας (AHA) και την ευρωπαϊκή καρδιολογική εταιρία (ESC) να προτείνουν την κατανάλωση 2 μερίδων ψαριού την εβδομάδα, με το ένα γεύμα να είναι λιπαρό ψάρι, παρέχοντας με αυτόν τον τρόπο στον οργανισμό 1,5-2 gr EPA και DHA, ως πρόληψη για τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Πιο συγκεκριμένα, η Αμερικανική εταιρία καρδιολογίας (AHA) έχει χωρίσει τις συστάσεις της σε 3 διαφορετικές : Άτομα χωρίς γνωστή καρδιαγγειακή νόσο, άτομα με γνωστή καρδιαγγειακή νόσο και άτομα με αυξημένες συγκεντρώσεις TAG πλάσματος. Η

προτεινόμενη πρόσληψη για κάθε κατηγορία ατόμων από τις παραπάνω είναι οι εξής, αντίστοιχα: ≥ 2 μερίδες ψάρι/ εβδομάδα (προτιμώνται τα λιπαρά ψάρια), ≈ 1 γραμμάριο EPA και DHA/ημέρα (λιπαρά ψάρια ή κάψουλες), 2-4 γραμμάρια EPA και DHA (από κάψουλες). Ακόμη, τονίζεται ότι τα ευεργετικά αποτελέσματα της συχνής κατανάλωσης ψαριών, ενισχύονται ακόμη περισσότερο στα πλαίσια μιας μεσογειακού τύπου διατροφής [63].

2.3 Το ψάρι στην διατροφή και δείκτες καρδιαγγειακής υγείας

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την κατανάλωση ψαριών και τα οφέλη τους στην υγεία του ανθρώπου. Πλήθος επιδημιολογικών και κλινικών μελετών, τονίζουν την αρνητική συσχέτιση της διαιτητικής πρόσληψης ω -3 λιπαρών οξέων, μέσω της κατανάλωσης ψαριών, με την καρδιαγγειακή θνησιμότητα. Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι, η κατανάλωση ψαριών δεν σχετίζεται με τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου στις γυναίκες. Επιπλέον, σύμφωνα με μια συστηματική ανασκόπηση, η κατανάλωση μακράς αλύσου ω -3 λιπαρά οξέα όπως το EPA και DHA, είτε μέσω διαιτητικής πρόσληψης (λιπαρά ψάρια όπως ο σολομός, το σκουμπρί, οι σαρδέλες, η αντσούγια, η πέστροφα και ο τόνος) είτε μέσω κάψουλας, οδηγεί σε σημαντική μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου. Αυτό συμβαίνει λόγω της αντι-φλεγμονώδους, αντι-λιπιδαιμικής, αντι-αιμοπαιταλιακής και αντι-αρρυθμικής δράσης των ω -3 λιπαρών οξέων μακράς αλύσου [64]. Επιπλέον, μία πολύ πρόσφατη ανασκόπηση του 2018, που περιελάμβανε διατροφική παρέμβαση με ψάρι και τα αποτελέσματα τους σε δείκτες καρδιαγγειακής υγείας έδειξε ότι, όταν η πρόσληψη EPA και DHA ξεπερνάει το 1γρ. την ημέρα υπάρχει βελτίωση σε διάφορους δείκτες υγείας όπως, τα τριγλυκερίδια, η HDL χοληστερίνη, η συσσώρευση αιμοπεταλίων, ενώ δεν επηρεάζεται η CRP [65]. Οι κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι, η καθημερινή κατανάλωση ψαριού, παρέχοντας πάνω από 2,4 gr EPA και DHA, συμβάλλει στην μείωση της συστολικής (ΣΑΠ) και διαστολικής πίεσης (ΔΑΠ) [66, 67]. Έχει προταθεί ότι, τα ω -3 λιπαρά οξέα έχουν αντί-υπερτασική δράση σε σχέση με τα συμπληρώματα [68].

Πρόσφατες ανασκοπήσεις, έχουν συνδέσει την πρόσληψη ω -3 λιπαρών οξέων με την δράση τους κατά της φλεγμονής συνδέοντας την με την έναρξη και την εξέλιξη της αθηροσκλήρωσης [68, 69]. Παρόλα αυτά, οι περισσότερες κλινικές μελέτες δεν έχουν

καταφέρει να δείξουν κάποια στατιστικά σημαντική διαφορά στους δείκτες φλεγμονής μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρι. Είναι πιθανόν πως, οι δείκτες που αφορούν την φλεγμονή απαιτούν πολύ μεγάλες ποσότητες πρόσληψης ω-3 λιπαρών οξέων, προκειμένου να διαφοροποιηθούν στατιστικά σημαντικά, γεγονός που δεν μπορεί να επιτευχθεί μόνο μέσω διατροφικής πρόσληψης με ψάρι. Σχετικά με την κατανάλωση ψαριών και την επίδρασή τους σε δείκτες πήξης του αίματος, έχει φανεί ότι συμβάλλει σημαντικά στην βελτίωση αυτών των δεικτών. Συγκεκριμένα, φαίνεται ότι μέσω της κατανάλωσης ψαριών, σημειώνεται αύξηση του χρόνου αιμορραγίας και μείωση της συσσώρευσης αιμοπεταλίων προκαλούμενης είτε από κολλαγόνο είτε από ADP [70]. Έχει φανεί ότι η συσσώρευση αιμοπεταλίων, λόγω του κολλαγόνου, είναι η πρώτη που επηρεάζεται μετά την διατροφική παρέμβαση με ψάρι και ακολουθούν άλλοι παράγοντες όπως το ADP το PAF και το αραχιδονικό οξύ. Ακόμη, έχει φανεί ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα, EPA και DHA έχουν την τάση να ενισχύουν την παράγωγή αγγειοδιασταλτικών παραγόντων όπως η προστακυκλίνη PGI₃ που προέρχεται από το EPA [71, 72]. Σχετικά με την συσσώρευση αιμοπεταλίων που προκαλείται από τον PAF, μέσω της κατανάλωσης ψαριών μειώνεται σημαντικά η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αποτέλεσμα το οποίο είναι πιο ισχυρό μέσω της κατανάλωσης ιχθυελαίου [73]. Εκτός όμως από τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν αναφερθεί και άλλα λιπιδικά μικροστατικά των ψαριών τα οποία αναστέλλουν *in vitro* την συσσώρευση αιμοπεταλίων λόγω του PAF [41]. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι, όχι μόνο τα EPA και DHA είναι υπεύθυνα για το αντιθρομβωτικό αποτέλεσμα, αλλά και άλλα λιπίδια, είτε επηρεάζοντας τα αιμοπετάλια μέσω αγωνιστών υποδοχέων είτε τροποποιώντας την μεταγωγή σήματος των αιμοπεταλίων ή την πυκνότητα της μεμβράνης.

Όσον αφορά την κατανάλωση ψαριών και τους δείκτες λιπιδαιμικού προφίλ, οι περισσότερες μελέτες περιλαμβάνουν τις λιποπρωτεΐνες ως βασικό δείκτη ανεξαρτήτως των υπόλοιπων εξεταζόμενων δεικτών. Συνολικά, οι μελέτες δείχνουν ότι υπάρχει μια πτωτική τάση των επιπέδων TAG έστω και με την κατανάλωση δύο μερίδων ψαριού την εβδομάδα και με μέτρια πρόσληψη EPA και DHA (0,8 gr/d) [74, 75]. Ακόμα και αν δεν έχει δοθεί μια σαφής εξήγηση, έχει αποδειχθεί ότι τα EPA και DHA μπορούν να επηρεάσουν παράγοντες μεταγραφής που επηρεάζουν την έκφραση ενζύμων που συνδέονται με τον μεταβολισμό των TAG προκαλώντας έτσι την μειωμένη έκφραση πρωτεϊνών που ευνοούν την σύνθεση TAG [76]. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι τα EPA και DHA έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν την δράση της apoE, ένα μόριο το οποίο είναι απαραίτητο για την εκκαθάριση

των TAG. Επιπλέον, έχει αποδειχθεί ότι, τα ω-3 λιπαρά οξέα επηρεάζουν την δραστικότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και αλληλεπιδρούν με ενεργοποιημένους υποδοχείς (PPARs), οι οποίοι είναι παράγοντες μεταγραφής που λειτουργούν με πολλούς τρόπους [72]. Όσον αφορά την ολική χοληστερόλη (TC), φαίνεται ότι δεν επηρεάζεται από την αυξημένη κατανάλωση ψαριών [77]. Έχει αποδειχθεί ότι, τα επίπεδα TC επηρεάζονται από την συνολική ποσότητα λίπους στην διατροφή, καθώς έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα TC είναι χαμηλότερα σε σχέση με τα αρχικά επίπεδα όταν η πρόσληψη λίπους από την διατροφή είναι 30% ενώ αυξάνονται όταν είναι 40% [78]. Ακόμη, φαίνεται ότι, η κατανάλωση ψαριών προκαλεί αύξηση στην συγκέντρωση και στο μέγεθος των σωματιδίων της HDL [71]. Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί βελτίωση στο μέγεθος των σωματιδίων VLDL και LDL ακόμα και με πρόσληψη 0,9 γραμμάρια EPA και DHA καθημερινά και 0.32 γραμμάρια αντίστοιχα [79]. Παράλληλα, έχει φανεί ότι, τα ω-3 λιπαρά οξέα επηρεάζουν τα βασικά στάδια σύνθεσης της HDL, όπως την προώθηση της απολιποπρωτεΐνης A-I, με τον μηχανισμό να μένει ασαφής [80]. Όσον αφορά, τις απολιποπρωτεΐνες A και B (apoA και apoB) έχουν παρόμοια συμπεριφορά με την LDL [81].

Όσον αφορά την κατανάλωση ψαριών και τους δείκτες γλυκαιμικού προφίλ, όπως την γλυκόζη αίματος, την ινσουλίνη και τον HOMA-IR (δείκτης αντίστασης στην ινσουλίνη) δεν παρατηρήθηκε κάποιο στατιστικά σημαντική διαφορά [77]. Ακόμα και στην περίπτωση των υπέρβαρων ατόμων, το γλυκαιμικό προφίλ δεν επηρεάστηκε [82].

Κεφάλαιο 3: Λιπαρά οξέα και δείκτες καρδιαγγειακής υγείας

3.1 Τα λιπαρά οξέα ως βιοδείκτες υγείας

Τα λιπαρά οξέα αποτελούν μια από τις σημαντικότερες πηγές ενέργειας και συστατικά μεμβρανών, παίζοντας σημαντικό ρόλο στην μεταβολική ομοιόσταση μέσω των λειτουργικών ιδιοτήτων τους που εμπλέκονται σε οδούς σηματοδότησης. Οι κυτταρικές μεμβράνες αποτελούνται από διάφορα είδη λιπαρών οξέων, τα οποία σχηματίζουν την λιπιδική διπλοστοιβάδα. Επιπλέον, αλλαγές στις συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων μπορεί να επηρεάσουν την ρευστότητα, την συγγένεια των υποδοχέων στην κυτταρική μεμβράνη, την μεταφορά των ιόντων και συνεπώς να προκαλέσουν κυτταρική γήρανση, απόπτωση ή αυτοφαγία. Συνεπώς, οι αλλαγές στο περιεχόμενο των μεμβρανών σε λιπαρά οξέα ή στο αίμα σχετίζεται στενά με διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Η σύσταση των λιπαρών οξέων του αίματος, στους εστέρες χοληστερόλης, στα φωσφολιπίδια ή στα ερυθρά κύτταρα αντανακλούν την σύσταση της διαιτητικής πρόσληψης των λιπαρών οξέων κατά την διάρκεια των τελευταίων 1-3 μηνών όπως επίσης και την ενδογενή μετατροπή των απορροφούμενων λιπαρών οξέων. Είναι γνωστά ως μακροπρόθεσμοι βιοδείκτες των απαραίτητων λιπαρών οξέων [83].

Είναι γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια, έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην πρόληψη της εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Έχει φανεί ότι, ο ακρογωνιαίος λίθος για την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου είναι οι αλλαγές στον τρόπο ζωής, κυρίως με την υιοθέτηση ενός υγιεινού και ισορροπημένου τρόπου διατροφής όπως είναι, η Μεσογειακή διατροφή. Συγκεκριμένα, η περιεκτικότητα σε μακροθρεπτικά συστατικά και το είδος του λίπους που προσλαμβάνεται μέσω της διατροφής είναι μεγάλης σημασίας καθώς επηρεάζουν τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος και τον καρδιαγγειακό κίνδυνο [84]. Λόγω αυτών, για τον καθορισμό της πρόσληψης του λίπους, υπάρχει η αναγκαιότητα χρήσης διατροφικών βιοδεικτών και όχι εργαλείων αυτό-αναφοράς που μπορεί να οδηγήσουν σε λάθος εκτιμήσεις. Ένα καλό παράδειγμα τέτοιου διατροφικού βιοδείκτη, αποτελούν τα λιπαρά οξέα των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων, καθώς αντανακλούν τόσο τον ενδογενή μεταβολισμό όσο και την διαιτητική πρόσληψη λιπαρών οξέων για ένα χρονικό διάστημα 120 ημερών, όσο αντιστοιχεί στον χρόνο ζωής τους. Τα ερυθρά κύτταρα περιέχουν όλες τις βασικές κατηγορίες λιπαρών οξέων, δηλαδή SFA, MUFA και PUFA. Θεωρούνται πιο

μακροπρόθεσμοι βιοδείκτες από τα λιπαρά οξέα του πλάσματος, για τα οποία οι διαταραχές που συμβαίνουν είναι εμφανείς μόνο για μερικές μέρες ή εβδομάδες [85]. Επιπλέον, τα ερυθρά κύτταρα δεν είναι ικανά να συνθέσουν *de novo* φωσφολιπίδια, επιμήκη ή ακόρεστα λιπαρά οξέα [86]. Αυτό σημαίνει ότι τα λιπαρά οξέα ενσωματώνονται στα ερυθρά κύτταρα με άμεση ανταλλαγή φωσφολιπιδίων από λιποπρωτεΐνες πλάσματος [87] ή σχηματίζονται με ακυλίωση λυσοφωσφολιπιδίων στη μεμβράνη ή στο πλάσμα [88]. Συνεπώς, οι συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων αποτελούν έναν σημαντικό βιοδείκτη καρδιαγγειακού κινδύνου [89]. Η μακροχρόνια κατανάλωση ψαριών, οδηγεί στην αυξημένη ενσωμάτωση των ω -3 (PUFA) στα λιπίδια του πλάσματος, στα ερυθρά κύτταρα και στα αιμοπετάλια. Μετά την κατανάλωση συμπληρωμάτων ιχθυελαίου αυξημένες συγκεντρώσεις EPA και DHA έχουν μετρηθεί στα λιπίδια του πλάσματος, στα αιμοπετάλια και στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων με ταυτόχρονη μείωση του αραχιδονικού οξέος [90]. Επιπλέον, έχει φανεί ότι μετά την κατανάλωση ιχθυελαίου, σημειώνονται μεγαλύτερες αυξήσεις EPA και DHA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος καθώς και πιο γρήγορες μειώσεις την περίοδο της εκκαθάρισης (wash out) σε σχέση με τις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων [91].

Ιδιαίτερη έμφαση, έχει δοθεί στην περιεκτικότητα των ερυθρών κυττάρων σε EPA και DHA ω -3 λιπαρά οξέα, ή και στο άθροισμα αυτών (% EPA + DHA), το οποίο είναι γνωστό και ως ω -3 δείκτης (Omega-3 Index) και έχει χαρακτηριστεί ως παράγοντας καρδιαγγειακού κινδύνου [88]. Μελέτες έχουν δείξει ότι ο δείκτης αυτός σχετίζεται στενά, με τις συγκεντρώσεις EPA και DHA στον καρδιακό ιστό και με τα φωσφολιπίδια του αίματος [92].

3.2 Επιδημιολογικές μελέτες

Η συσχέτιση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων με δείκτες καρδιαγγειακής υγείας αναδεικνύονται μέσα από αρκετές επιδημιολογικές μελέτες χωρίς όμως να γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στην συσχέτιση αυτήν μετά από την κατανάλωση ψαριών ή ιχθυελαίου. Επιπλέον, οι περισσότερες αποτελούν στην πραγματικότητα τα επιδημιολογικά δεδομένα της έναρξης κάποιας προοπτικής μελέτης. Ακόμη, αρκετές από αυτές χρησιμοποίησαν ως στοιχείο τα λιπαρά οξέα του πλάσματος. Παρόλα αυτά αξίζει να αναφερθούν ενδεικτικά μερικές από αυτές.

Λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων και δείκτες φλεγμονής

Λαμβάνοντας δεδομένα από την έναρξη της επιδημιολογικής προοπτικής μελέτης Framingham Heart Study, οι Joao D. Fontes et al. πραγματοποίησαν μια συγχρονική μελέτη, συσχετίζοντας τα λιπαρά οξέα των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων, με 10 ενεργούς βιοδείκτες σε πολλαπλές φλεγμονώδεις οδούς, σε 2724 συμμετέχοντες. Παρατηρήθηκε ότι, το εικοσαπεντανοϊκό (EPA) και το εικοσιδυαενοϊκό οξύ (DHA) στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων συσχετίστηκε αντίστροφα ($P \leq 0.001$) με 8 δείκτες, υποδοχείς και μονοπάτια φλεγμονής: ισοπροστανία ούρων ($r=-0.16$), διαλυτή IL-6 ($r=-0.10$), CRP ($r=-0.08$), υποδοχέας του TNF- α ($r=-0.08$), ICAM -1 ($r=-0.08$), P- σελεκτίνη ($r=-0.06$), μάζα της LP-PLA₂ ($r=-0.11$) και η δραστηριότητά της ($r=-0.08$). Αυτά τα δεδομένα, είναι σύμφωνα με την υπόθεση ότι τα ω -3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα προάγουν αντιφλεγμονώδεις διαδικασίες κάτι το οποίο ίσως οδηγεί στην μείωση των καρδιαγγειακών συμβάντων [93].

Λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων και πάχος καρωτιδικής αρτηρίας

Μία άλλη πρόσφατη επιδημιολογική, συγχρονική μελέτη εξέτασε την σχέση μεταξύ των συγκεντρώσεων ω -3 λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων με την αθηροσκλήρωση σε έναν πληθυσμό μέσης και μεγαλύτερης ηλικίας στην Κίνα. Στην μελέτη συμμετείχαν 847 άτομα άντρες και γυναίκες, ηλικίας 40-65 ετών. Τα αποτελέσματα έδειξαν, ότι υπάρχει αρνητική δόσο-εξαρτώμενη συσχέτιση μεταξύ των ω -3 PUFA στην μεμβράνη

των ερυθρών κυττάρων και τον επιπολασμό της πάχυνσης του καρωτιδικού αρτηριακού τοιχώματος και της αθηρωματικής πλάκας. Επιπλέον, φάνηκε ότι τα υψηλότερα επίπεδα DHA και ALA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων σχετίζεται με χαμηλότερα επίπεδα αθηροσκλήρωσης [94].

Λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων και μεταβολικό σύνδρομο

Λίγο αργότερα, η ίδια ερευνητική ομάδα δημοσίευσε τα αποτελέσματα από μια συγχρονική μελέτη στην Κίνα, σε 3072 συμμετέχοντες ηλικίας 30-75 ετών, που ήθελε να εξετάσει την σχέση μεταξύ των ω-3 PUFA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων και την εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου. Τα αποτελέσματα από την μελέτη έδειξαν ότι, τα υψηλότερα επίπεδα συνολικά ω-3 PUFA (EPA, DPA, DHA αλλά όχι και ALA) στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων, σχετίζονται με χαμηλότερη εμφάνιση μεταβολικού συνδρόμου, σε ενήλικες Κινέζους [95].

Λιπαρά οξέα πλάσματος και διαβήτη

Οι Luc Djousse et al. πραγματοποίησαν μια προοπτική μελέτη με δεδομένα από την Cardiovascular Health Study, με στόχο να εξετάσουν την σχέση μεταξύ των ω-3 λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια του πλάσματος και την επίπτωση στον διαβήτη. Αναλύθηκαν δεδομένα από 3088 άνδρες και γυναίκες (μέσης ηλικίας 75 ετών). Τα αποτελέσματα από την ανάλυση έδειξαν ότι, δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων EPA και DHA και ALA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος με τον κίνδυνο εμφάνισης του διαβήτη σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας. Τα άτομα με υψηλότερες συγκεντρώσεις EPA και DHA ή ALA στα φωσφολιπίδια του πλάσματος έχουν μικρότερο κίνδυνο εμφάνισης διαβήτη [96].

3.3 Κλινικές μελέτες

Μετά τις υποσχόμενες θετικές συσχετίσεις, που φάνηκαν στις επιδημιολογικές μελέτες, μεταξύ των ω -3 PUFA λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων ή του πλάσματος και την βελτίωση δεικτών υγείας σε υγιείς εθελοντές, η επιστημονική κοινότητα, σχεδίασε κλινικές μελέτες προκειμένου να εξετάσει την επίδραση της κατανάλωσης ψαριού ή ιχθυελαίου στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων ή στο πλάσμα και την συσχέτιση αυτών με την βελτίωση σε δείκτες υγείας, σε υγιείς εθελοντές. Κατά την βιβλιογραφική ανασκόπηση για τις εν λόγω μελέτες, έγινε αναζήτηση στην βάση δεδομένων Pubmed με λέξεις κλειδιά όπως fish, fish oil, fish consumption, red blood cell fatty acids, erythrocyte fatty acids, plasma fatty acids, lipids, biomarkers, inflammation, markers. Λόγω της εξειδίκευσης της αναζήτησης, δεν υπήρξε περιορισμός στο έτος δημοσίευσης αλλά δόθηκε έμφαση στις μελέτες που περιείχαν διατροφική παρέμβαση με ψάρι ή ιχθυέλαιο και μέτρηση λιπαρών οξέων μεμβρανών ερυθρών κυττάρων ή πλάσματος σε υγιή πληθυσμό.

Λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων και δείκτες φλεγμονής

Οι Flock et al. πραγματοποίησαν μια τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη κλινική μελέτη, με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της πρόσληψης συμπληρώματος ιχθυελαίου και της συγκέντρωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων σε φλεγμονώδεις δείκτες. Το δείγμα της μελέτης αποτελούνταν από 116 υγιείς εθελοντές, ο καθένας από αυτούς προσλάμβανε μία από τις παρακάτω δοσολογίες: 0, 300, 600, 900, 1800 mg/ημέρα EPA και DHA, ως συμπλήρωμα ιχθυελαίου. Χρησιμοποιήθηκε έλαιο σόγιας ως placebo. Τα αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση έδειξαν ότι, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μετά τις παρεμβάσεις στους CRP ή IL-6. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι, ο παράγοντας TNF- α στην ομάδα που κατανάλωνε 1800 mg/ημέρα EPA και DHA, μειώθηκε στατιστικά σημαντικά κατά 10%. Δεν φάνηκε να υπάρχουν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, μεταξύ των αλλαγών στις συγκεντρώσεις των ω -3 ή ω -6 PUFA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων και των αλλαγών σε δείκτες φλεγμονής. Παρόλα αυτά φάνηκε ότι, οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις των λεμφοκυττάρων συσχετίστηκαν θετικά με

τις αλλαγές στις συγκεντρώσεις EPA και DPA, στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων, μετά την πρόσληψη ιχθυελαίου ($p = 0.001$ και $p = 0.008$, αντίστοιχα) [97].

Λιπαρά οξέα μεμβρανών ερυθρών κυττάρων και αρτηριακή πίεση

Οι Jesper Hallund et al. πραγματοποίησαν μια τυχαιοποιημένη, παράλληλη, κλινική μελέτη παρέμβασης 8 εβδομάδων, με 68 υγιείς ενήλικες άντρες. Το δείγμα χωρίστηκε τυχαία σε 3 ομάδες, καταναλώνοντας είτε 150 gr. πέστροφας εκτροφείου βασισμένη σε θαλάσσια τροφή είτε 150 gr. πέστροφας εκτροφείου βασισμένη σε φυτική ή τέλος ένα γεύμα με 150 gr. κοτόπουλο. Για την αξιολόγηση της προσκόλλησης των συμμετεχόντων με το πρωτόκολλο της μελέτης, έγινε μέτρηση της σύστασης των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων σε λιπαρά οξέα τόσο πριν όσο και μετά την παρέμβαση. Τα αποτελέσματα από την μελέτη έδειξαν ότι, οι άντρες που κατανάλωναν την πέστροφα θαλάσσιας εκτροφής είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερες συγκεντρώσεις, συνολικά ω -3 PUFA λιπαρών οξέων, EPA και DHA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων σε σχέση με την ομάδα κατανάλωσης πέστροφας φυτικής εκτροφής. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι, η ενσωμάτωση των ω -3 PUFA μακράς αλύσου στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων είχε την τάση να συσχετιστεί με την μείωση στην διαστολική πίεση, κυρίως όταν εκφράστηκε ως λόγος ω -3/ ω 6 (Pearson r 0.225) και ως EPA αντίστοιχα (r 0.289). Η συσχέτιση αυτή βελτιώθηκε, όταν το μοντέλο προσαρμόστηκε για αλλαγές στην δίαιτα (MUFA, πρωτεΐνη, φυτικές ίνες) [98].

Λιπαρά οξέα πλάσματος και δείκτες φλεγμονής

Οι Hayati M. Yusof et al. πραγματοποίησαν μια διπλά τυφλή και τυχαιοποιημένη κλινική μελέτη, στην οποία εξέτασαν την επίδραση της πρόσληψης κάψουλας με ιχθυέλαιο σε φλεγμονώδεις δείκτες του πλάσματος. Στην μελέτη συμμετείχαν 21 υγιείς άντρες εθελοντές οι οποίοι χωρίστηκαν στην ομάδα πρόσληψης ιχθυελαίου και στην ομάδα placebo. Μετά από 8 εβδομάδες τα αποτελέσματα έδειξαν ότι, υπάρχει μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση ($r=-0.675$; $P=0.001$) μεταξύ των αλλαγών στα επίπεδα DHA πλάσματος και στα επίπεδα sICAM-1 πλάσματος και μία παρόμοια συσχέτιση ($r=-0.406$; $P=0.076$) μεταξύ των επιπέδων EPA του πλάσματος και της IL-6 πλάσματος [99].

Μια άλλη πρόσφατη κλινική μελέτη, εξέτασε την επίδραση της πρόσληψης παρόμοιων δόσεων EPA και DHA μέσω της κατανάλωσης ψαριού ή ιχθυελαίου, στο λιπιδαιμικό προφίλ, σε δείκτες φλεγμονής και σε δείκτες οξειδωτικού στρες σε 33 υγιείς άντρες και γυναίκες. Η μελέτη ήταν διασταυρούμενη και το δείγμα χωρίστηκε τυχαία σε δύο ομάδες λαμβάνοντας 274 mg EPA + 671 mg DHA/ημέρα σολομό ή 396 mg EPA + 250 mg DHA/ημέρα ιχθυέλαιο, για χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων το οποίο χωρίστηκε από ένα διάστημα 6 μηνών εκκαθάρισης (wash-out). Τα αποτελέσματα από την μελέτη έδειξαν ότι, μετά τις 8 εβδομάδες διατροφικής παρέμβασης, σημειώθηκε αύξηση στο πλάσμα των επιπέδων EPA και DHA και για τις δύο ομάδες. Ακόμα, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι, τόσο πριν όσο και μετά την διατροφική παρέμβαση των 8 εβδομάδων, υπήρχε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συνολικής συγκέντρωσης ω-3 λιπαρών οξέων και των sICAM-1 και CRP ($p < 0.05$). Από την άλλη μεριά, φάνηκε να υπάρχει στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση της συνολικής συγκέντρωσης ω-3 λιπαρών οξέων και του O_2^- [100].

Λιπαρά οξέα πλάσματος και δείκτες θρόμβωσης

Οι Jehangir N.Din et al. είχαν ως στόχο να εξετάσουν την επίδραση της κατανάλωσης λιπαρού ψαριού στην συσσώρευση μονοκύτταρων αιμοπεταλίων. Σε αυτήν την κλινική μελέτη συμμετείχαν 28 υγιείς άντρες, ηλικίας μεταξύ 21-28 ετών, οι οποίοι χωρίστηκαν σε 2 ομάδες. Η ομάδα παρέμβασης αποτελούνταν από 14 άτομα, τα οποία κατανάλωναν 500 γραμμάρια σκουμπρί την εβδομάδα για 4 εβδομάδες και η ομάδα ελέγχου η οποία δεν έλαβε κάποια διατροφική παρέμβαση. Τα αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση έδειξαν ότι, η ομάδα με την διατροφική παρέμβαση με ψάρι αύξησε τα επίπεδα ω-3 λιπαρών οξέων στο πλάσμα ($14.2 \pm 3.4\%$ έναντι $5.8 \pm 1.3\%$, $P < 0.001$) και μείωσε την συσσώρευση μονοκύτταρων αιμοπεταλίων κατά 35% σε σχέση με την ομάδα ελέγχου ($16.0 \pm 9.0\%$ έναντι $24.8 \pm 10.9\%$, $P < 0.01$). Επιπλέον, φάνηκε ότι υπήρχε, αρνητική συσχέτιση μεταξύ της συσσώρευσης μονοκύτταρων αιμοπεταλίων και της συγκέντρωσης ω-3 λιπαρών οξέων πλάσματος ($r = -0.421$, $P = 0.006$) [73].

Λιπαρά οξέα πλάσματος και ευαισθησία στην ινσουλίνη

Μια άλλη πολυκεντρική, τυχαιοποιημένη και ελεγχόμενη μελέτη εξέτασε εάν μία μέτρια κατανάλωση συμπληρώματος ιχθυελαίου μακράς αλύσου ω-3 PUFA, μπορεί να αλλάξει την ευαισθησία στην ινσουλίνη, την έκκριση ινσουλίνης, την λειτουργία των β-κυττάρων και την αντίσταση στην ινσουλίνη σε υγιείς εθελοντές, οι οποίοι κατανάλωναν είτε μια δίαιτα πλούσια σε κορεσμένο λίπος είτε σε ακόρεστο. Το δείγμα αποτελούνταν από 162 υγιείς άντρες και γυναίκες, οι οποίοι τυχαία ορίστηκε να ακολουθήσουν μια δίαιτα υψηλή σε κορεσμένο ή μονοακόρεστο λίπος για 3 μήνες. Μέσα σε αυτές τις 2 ομάδες έγινε μία δεύτερη τυχαιοποίηση μεταξύ των ατόμων που θα κατανάλωναν ιχθυέλαιο (3,6 γρ./ημέρα) ή placebo. Τα αποτελέσματα από την στατιστική ανάλυση έδειξαν ότι, ο υψηλότερος λόγος ω-6/ω-3 στα φωσφολιπίδια του πλάσματος συνδέεται με στατιστικά σημαντική μείωση της ευαισθησίας στην ινσουλίνη ($p=0,007$). Επίσης, παρατηρήθηκε μια στατιστικά σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του λόγου ω-6/ω-3 στα φωσφολιπίδια του πλάσματος και τις αλλαγές που σημειώθηκαν στην ευαισθησία της ινσουλίνης από την αρχική αξιολόγηση (ΔSI) ($r = -0,193$, $p=0,02$) [102].

Φωσφολιπίδια αιμοπεταλίων και αρτηριακή πίεση

Μία κλινική μελέτη των Robert Vandongen et al. εξέτασε την επίδραση των ω-3 λιπαρών οξέων, μέσω της κατανάλωσης ψαριού ή ιχθυελαίου, στην αρτηριακή πίεση και την καρδιακή συχνότητα σε 120 υγιείς άντρες. Το δείγμα χωρίστηκε τυχαία σε 5 ομάδες υψηλής κατανάλωσης λίπους (40% της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης) και σε 2 ομάδες χαμηλής κατανάλωσης λίπους (30% ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης). Η διατροφική παρέμβαση διήρκεσε 12 εβδομάδες και περιελάμβανε ψάρι, ιχθυέλαιο ή συνδυασμό αυτών. Τα αποτελέσματα από την μελέτη έδειξαν ότι, για όλες τις ομάδες, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ της μείωσης των ω-6 λιπαρών οξέων στα φωσφολιπίδια των αιμοπεταλίων και στις αλλαγές στην συστολική πίεση σε ύπτια ($r=0,23$, $P=0,00$) και όρθια θέση ($r=0,26$, $P=0,00$ καθώς και στην διαστολική πίεση σε ύπτια ($r=0,19$, $P=0,01$) και όρθια θέση ($r=0,24$, $P=0,00$). Επιπλέον, σημειώθηκε στατιστικά αρνητική συσχέτιση μεταξύ των ω-3 λιπαρών οξέων και της συστολικής ($r=-.16$, $P=.044$) και διαστολικής πίεσης ($r=-.16$, $P=.038$) σε όρθια θέση [103].

Μελέτη Παρέμβασης

Οι Keiko Kondo et al. είχαν ως στόχο να ανακαλύψουν την σχέση μεταξύ της κατανάλωσης ψαριών, της συγκέντρωσης ω-3 λιπαρών οξέων στο πλάσμα και συγκεκριμένα των επιπέδων EPA, με τα επίπεδα αντιπονεκτίνης στο πλάσμα. Σε αυτή την μελέτη παρέμβασης, συμμετείχαν 17 υγιείς γιαπωνέζοι εθελοντές, άντρες και γυναίκες προκειμένου να πραγματοποιήσουν μια διατροφική παρέμβαση 8 εβδομάδων με ψάρι (ω-3 PUFA 0,3 γραμμάρια/ημέρα), διατηρώντας σταθερή την συνολική ενεργειακή τους πρόσληψη. Τα αποτελέσματα από την αρχική αξιολόγηση των εθελοντών έδειξαν ότι, υπήρχε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ των συγκεντρώσεων αντιπονεκτίνης του πλάσματος και των ω-3 PUFA του πλάσματος ($r=-0,535$, $P=0,027$), αλλά όχι και κατά την διάρκεια των 8 εβδομάδων της διατροφικής παρέμβασης καθώς και των 4 εβδομάδων του follow-up. Όταν όμως, οι αλλαγές στις συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν ως Δ τιμές, η Δαντιπονεκτίνη συσχετίστηκε θετικά με τα Δω-3 PUFA ($r=0,551$, $P=0,022$) [101].

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

**ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΠΑΡΕΜΒΑΣΗΣ
ΜΕ ΨΑΡΙ Ή ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑ ΙΧΘΥΕΛΑΙΟΥ**

Μελέτη	Σχεδιασμός	Ομάδες παρέμβασης	Λιπαρά οξέα	Δείκτες	Σημαντικά αποτελέσματα
(Flock et al. 2014)	Τυχαιοποιημένη ελεγχόμενη, 5 μήνες, 116 υγιείς ενήλικες, κάψουλα ιχθυελαίου.	O ₁ . 0 mg/ημ (EPA+DHA)=placebo O ₂ . 300 mg/ημ. (EPA+DHA) O ₃ . 600 mg/ημ. (EPA+DHA) O ₄ 900 mg/ημ. (EPA+DHA) O ₅ . 1800 mg/ημ. (EPA+DHA).	PUFA μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων.	TNF-α, IL-6, CRP.	Καμία συσχέτιση μεταξύ ω-3 ή ω-6 με CRP, IL-6 ή TNF-α.
(Hallund et al. 2010)	Παράλληλη, τυχαιοποιημένη, 8 εβδ., 68 υγιείς άντρες, πέστροφα εκτροφείου.	O ₁ . 150 gr. πέστροφα (θαλάσσια τροφή), O ₂ , 150 gr. πέστροφα (φυτική τροφή), O ₃ . 150 gr. κοτόπουλο.	ω-3 LC PUFA μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων.	A.Π, TAG, HDL, LDL, γλυκόζη, ινσουλίνη, CRP.	Τάση για συσχέτιση των ω-3 PUFA με την μείωση στην Δ.Α.Π(κυρίως των EPA).
(Yusof et al. 2008)	Διπλά τυφλή, ελεγχόμενη-placebo τυχαιοποιημένη, 8 εβδ., 21 υγιείς άντρες, κάψουλα ιχθυελαίου.	O ₁ . Ιχθυέλαιο (2,1 gr./ημ. EPA+DHA) O ₂ placebo.	ω-3 PUFA στο πλάσμα.	IL-6, sE-selectin, sICAM-1, sVCAM-1, CRP	(-) συσχέτιση DHA με sICAM-1, (-) συσχέτιση EPA με IL-6.
(Đuričić et al. 2015)	Διασταυρούμενη, τυχαιοποιημένη, 8εβδ, 6 μήνες (wash out), 33 υγιείς άντρες-γυναίκες, σολομός-κάψουλα ιχθυελαίου.	O ₁ . 274+671 mg EPA + DHA/ημ. σολομό O ₂ 396+250 mg EPA + DHA/ημ. ιχθυέλαιο	ω-3 PUFA στο πλάσμα.	ICAM-1, VCAM-1, CRP στο πλάσμα, TC, LDL-C, HDL-C, TAG, MDA, TAS, O ₂ ⁻ .	(-) συσχέτιση ω-3 με sICAM-1 και CRP.
(Din et al. 2008)	Τυχαιοποιημένη, 4 εβδ., 4 εβδ. (wash out), 28 υγιείς άντρες, ψάρι.	O ₁ . 500 gr. σκουμπρί (~ 1gr./ημ. EPA+DHA) O ₂ . Δεν είχε κάποια διατροφική παρέμβαση.	ω-3 PUFA στο πλάσμα.	CD40, P-selectin, συσσώρευση μονο-κύτταρων αιμοπεταλίων.	(-) συσχέτιση ω-3 με συσσώρευση μονοκύτταρων αιμοπεταλίων.
(Giacco et al. 2006)	Πολυκεντρική, ελεγχόμενη, 3μήνες, 2 εβδ. (wash out), 162 υγιείς άντρες-γυναίκες, ιχθυέλαιο.	O ₁ . δίαιτα υψηλή σε SAFA, O ₂ . δίαιτα υψηλή σε MUFA, Η κάθε ομάδα χωρίστηκε τυχαία σε άλλες 2. Α. κάψουλες ιχθυελαίου (2,1 EPA+1,5 DHA), Β. placebo, (ελαιόλαδο)	Λιπαρά οξέα φωσφο-λιπιδίων πλάσματος.	Γλυκόζη, ευαισθησία ινσουλίνης, ανοχή στην γλυκόζη,	↑ ω-6/ω-3 σχετίζεται με ↓ ευαισθησίας στην ινσουλίνη,
(Vandongen et al. 1993)	Τυχαιοποιημένη, 12 εβδ., 120 υγιείς άντρες, ψάρι ή κάψουλα ιχθυελαίου.	O ₁ , O ₂ , O ₃ , O ₄ , O ₅ (40% λίπος), O ₆ , O ₇ (30% λίπος) Οι ομάδες με 40% λίπος- > 6 ή 12 κάψουλες ιχθυελαίου ή ψάρι ή συνδυασμό αυτών ή placebo/ημ., οι ομάδες με 30% λίπος-> ψάρι ή placebo	Φωσφο-λιπίδια αιμοπεταλίων	Κ..Σ, Α.Π, γλυκόζη και ινσουλίνη πλάσματος,	(+) συσχέτιση της μείωσης των ω-6 με τις αλλαγές στην Σ.Α.Π και Δ.Α.Π, (-) συσχέτιση ω-3 με Σ.Α.Π και Δ.Α.Π.

Σκοπός

Μετά την ευρέως αποδεδειγμένη ευεργετική σχέση της κατανάλωσης ψαριών με την καρδιαγγειακή υγεία και των θετικών συσχετίσεων των ω-3 PUFA με την βελτίωση δεικτών υγείας όπως η φλεγμονή, οι δείκτες θρόμβωσης, η αρτηριακή πίεση και η ινσουλίνη μετά την κατανάλωση ψαριού ή ιχθυελαίου οφείλουμε να εξετάσουμε την σχέση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων, που αποτελούν μακροπρόθεσμους βιοδείκτες των απαραίτητων λιπαρών οξέων στον οργανισμό, με δείκτες καρδιαγγειακής υγείας όπως τον παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, PAF που αποτελεί μεσολαβητή της φλεγμονής και μόριο-κλειδί για την δημιουργία της αθηροσκλήρωσης, μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρι. Για αυτόν τον λόγο η εργασία αυτή, είχε ως στόχο να εξετάσει την συσχέτιση μεταξύ των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων, σε φαινομενικά υγιή πληθυσμό, μετά από διατροφική παρέμβαση με απλή και εμπλουτισμένη με βιολογικά δραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα τσιπούρα, με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF.

Κεφάλαιο 4: Μεθοδολογία

4.1 Πρωτόκολλο κλινικής παρέμβασης

Το πείραμα που πραγματοποιήθηκε είναι στα πλαίσια του χρηματοδοτούμενου προγράμματος «Μελέτη της επίδρασης κατανάλωσης ψαριών, εμπλουτισμένων με βιολογικά δραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, σε δείκτες καρδιαγγειακού κινδύνου σε υγιείς εθελοντές.»

Συμμετέχοντες

Στην μελέτη στρατολογήθηκαν 38 φαινομενικά υγιείς εθελοντές άντρες και γυναίκες. Ως κριτήρια αποκλεισμού είχαν τεθεί (1) η λήψη οποιασδήποτε φαρμακευτικής αγωγής καθώς και (2) ότι η συνήθης διατροφική κατανάλωση ψαριού δεν έπρεπε να ξεπερνά την 1μερίδα ψάρι ανά 15 ημέρες. Ολοκλήρωσαν την παρέμβαση 34 εθελοντές.

Σχεδιασμός της μελέτης

Η μελέτη διατροφικής παρέμβασης ήταν τυφλή (double blinded), διασταυρούμενη (crossover), και τυχαιοποιημένη (randomized controlled trial) ως προς τη σειρά με την οποία κατανάλωναν οι εθελοντές τα δύο ψάρια. 38 φαινομενικά υγιείς άντρες και γυναίκες τυχαιοποιήθηκαν και ξεκίνησαν την διασταυρούμενη μελέτη όπου ακολούθησαν δύο διατροφικές παρεμβάσεις, η διάρκεια της κάθε παρέμβασης ήταν 8 εβδομάδες για κάθε τύπο ψαριού (απλή ή εμπλουτισμένη τσιπούρα) και μεσολάβησε ανάμεσα στις δύο παρεμβάσεις μία περίοδος 6 εβδομάδων (washed out period). Οι εθελοντές κατανάλωναν 2 μερίδες ψάρι την εβδομάδα.

Αξιολόγηση

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

4.2 Καθορισμός των λιπαρών οξέων των ερυθρών κυττάρων

Η ακριβής διαδικασία απομόνωσης, εκχύλισης και μεθυλίωσης των λιπαρών οξέων των ερυθρών κυττάρων περιγράφεται παρακάτω.

Μετά από μία ολονύκτια νηστεία συλλέχθηκαν 6 ml φλεβικού αίματος σε σωλήνες EDTA κενού. Το πλάσμα και τα ερυθρά κύτταρα διαχωρίστηκαν με φυγοκέντρηση (1500x g, 10 λεπτά). Τα ερυθρά κύτταρα πλύθηκαν 3 φορές με αλατούχο διάλυμα (0,9% NaCl), προστέθηκε BHT (τελική συγκέντρωση 0,11 mg/ml) και τα δείγματα στην συνέχεια αποθηκεύτηκαν στο -80°C . Για την εκχύλιση των λιπιδίων, 300 ml ερυθρών κυττάρων αιμολύθηκαν με ίσο όγκο αποσταγμένου νερού και suspended σε 3,1 ml ισοπροπανόλης. Μετά από έντονη ανάδευση και επώαση για μία ώρα, προστέθηκαν 2 ml χλωροφόρμιο. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε έντονη ανακίνηση και επώαση για 1 ώρα και τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 500x g για 30 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε σωλήνα με βιδωτό πώμα και επένδυση Teflon και διατηρήθηκε στους -20°C μέχρι την μεθυλίωση [104].

Για την παρασκευή μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME), ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό ρεύμα αζώτου και προστέθηκαν βραδέως 500 ml ακετυλοχλωριδίου υπο συνεχή ανάδευση. Οι σωλήνες κλείστηκαν ερμητικά με καπάκια- Teflon και τα εκχυλίσματα των ερυθρών κυττάρων υποβλήθηκαν σε μεθανόλη για 1,5 ώρα στους 90°C . Το FAME εκχυλίστηκε με εσωτερικό πρότυπο που περιείχε εξάνιο (εννεανοϊκός μεθυλεστέρας, με τελική συγκέντρωση 0,24 mg/ml) και BHT (τελική συγκέντρωση 0,11 mg/ml).

Το προφίλ των λιπαρών οξέων των λιπιδίων των ερυθρών κυττάρων προσδιορίστηκε με αέρια χρωματογραφία μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων (FAME) με την βοήθεια αέριου χρωματογράφου Agilent HP-6890 (Avondale, PA, USA), εφοδιασμένου με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας, εγχυτήρα χωριστής διάσπασης και αυτόματος δειγματολήπτης HP 6890, με έγχυση ενός κλάσματος (1 μL) ερυθρού κυττάρου FAME στον αέριο χρωματογράφο σε αναλογία διαχωρισμού 1:10. Ο διαχωρισμός του FAME επιτεύχθηκε σε τριχοειδή στήλη SGE (Μελβούρνη, Αυστραλία) BPX70 (μήκους 60 m και εσωτερική διάμετρος 0,25 mm) επικαλυμμένη με μια παχιά μεμβράνη κυανοπροπυλικής σιλικόνης 0,25 μm . Χρησιμοποιήθηκε ήλιο ως φέρον αέριο με ρυθμό ροής 0,8 ml/min, ο εγχυτήρας και ο ανιχνευτής διατηρήθηκαν στους 230 και 290°C , αντίστοιχα.

Το πρόγραμμα θερμοκρασίας του φούρνου ήταν: 130-220° C στους 2° C/ λεπτό, διατηρήθηκε για 7 λεπτά και τέλος 220-250° C στους 20° C/ λεπτό όπου διατηρήθηκε για 6,5 λεπτά. Η ταυτοποίηση των κορυφών πραγματοποιήθηκε με ένα πρότυπο μείγμα 37 FAME (Sigma L9405, St Louis, MO, USA). Το πρότυπο FAME εγχύθηκε περιοδικά για να καταγραφούν μικρές αλλαγές στους χρόνους κατακράτησης, ενώ επιπλέον χρησίμευσε για τον υπολογισμό των συντελεστών απόκρισης, οι οποίοι εφαρμόστηκαν στις περιοχές που προέρχονται από τα χρωματογραφικά ίχνη. Από 46 αναγνωρισμένα λιπαρά οξέα, αναφέρθηκαν τα 34 που περιείχαν περισσότερο από 0,01% των συνολικών λιπαρών οξέων [144]. Στην τρέχουσα εργασία τα trans ισομερή δεν περιλαμβάνονται. Ο δείκτης ω-3 υπολογίστηκε ως το άθροισμα των ερυθρών κυττάρων EPA και DHA [105].

4.3 Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πρόγραμμα STATA 12.0. Αρχικά πραγματοποιήθηκε ο έλεγχος κανονικότητας των λιπαρών οξέων μέσω του Kolmogorov-smirnov test προκειμένου να ελεγχθεί εάν οι μεταβλητές των λιπαρών οξέων ακολουθούν κανονική κατανομή και καθορισμός των περιγραφικών στοιχείων για την απλή και εμπλουτισμένη τσιπούρα αντίστοιχα. Έγινε σύγκριση στις τιμές των παραμέτρων ανάμεσα στους αρχικούς χρόνους κάθε παρέμβασης και στο τέλος αυτής με paired-t-test όταν οι τιμές ακολουθούσαν κανονική κατανομή και με Wilcoxon όταν οι τιμές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Επιπλέον, για τον έλεγχο των συσχετίσεων μεταξύ των λιπαρών οξέων και των ενζύμων του μεταβολισμού του PAF τόσο πριν όσο και στο τέλος της κάθε παρέμβασης πραγματοποιήθηκε το pearson test, όταν οι μεταβλητές ακολουθούσαν κανονική κατανομή και το spearman test στην περίπτωση που οι μεταβλητές δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή. Τέλος, πραγματοποιήθηκαν partial correlations για τις μεταβλητές που ακολουθούσαν κανονική κατανομή και linear regressions για τις μεταβλητές που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή για να διαπιστωθεί εάν οι συγχητικοί παράγοντες του φύλου και της ηλικίας επιδρούν στα αποτελέσματα.

Κεφάλαιο 5: Αποτελέσματα Πειραμάτων

5.1 Προσκόλληση εθελοντών

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της παρέμβασης, οι εθελοντές που επιλέχθηκαν να συμμετέχουν, έπρεπε να παρουσιάζουν μικρή κατανάλωση ψαριών, 1 μερίδα ανά 15 ημέρες. Επιπλέον για την επιτυχημένη πραγματοποίηση της μελέτης ήταν απαραίτητη η καλή προσκόλληση των συμμετεχόντων στο πρωτόκολλο της παρέμβασης. Συνεπώς, έπρεπε να καταναλώνουν 2 μερίδες ψάρι την εβδομάδα.

Πίνακας 5.1: Η συχνότητα κατανάλωσης ψαριών πριν και μετά την παρέμβαση.

	Αριθμός εθελοντών	Διάμεσος	Τεταρτημόρια (25-75)
Απλή τσιπούρα			
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στην έναρξη	30	0,18	0,3-0,18
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στη λήξη	30	0,53	0,53-0,61
Εμπλουτισμένη τσιπούρα			
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στην έναρξη	30	0,18	0,18-0,35
Ημερήσια πρόσληψη ψαριού (μερίδες) στη λήξη	30	0,53	0,53-0,61

Στον πίνακα 5.1 φαίνεται η στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα κατανάλωσης ψαριών (η οποία ήταν αναμενόμενο να είναι στατιστικώς σημαντική, $p < 0,000$), και για τις 2 ομάδες παρέμβασης όπως προέκυψε από την καταγραφή των διατροφικών συνηθειών των συμμετεχόντων. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνουν το γεγονός ότι υπήρξε καλή

προσκόλληση στο πρωτόκολλο και για τις δύο ομάδες παρέμβασης. Λόγω του γεγονότος ότι, έγινε λήψη φαρμακευτικού σκευάσματος κατά τη διάρκεια της παρέμβασης από 4 εθελοντές, τελικά στα αποτελέσματα παρουσιάζονται 30 εθελοντές (14 γυναίκες, 16 άνδρες).

5.2 Βασικά χαρακτηριστικά των εθελοντών:

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται αφορούν τους 30 εθελοντές που ολοκλήρωσαν την μελέτη, 16 άντρες και 14 γυναίκες.

Πίνακας 5.2: Τα χαρακτηριστικά των εθελοντών (ηλικία, κάπνισμα, βάρος, Δείκτης μάζας σώματος, περιφέρεια μέσης, συστολική και διαστολική πίεση) κατά την έναρξη της παρέμβασης.

Χαρακτηριστικά εθελοντών	Αριθμός εθελοντών	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
Απλή τσιπούρα					
Ηλικία εθελοντών	30	33	65	43,33	7,443
Έτη καπνίσματος	12	4	40	22,00	11,809
Βάρος (Kg)	30	60,10	123,10	84,5433	15,19922
Δείκτης Μάζας σώματος (kg/m ²)	30	24,32	38,25	29,6133	3,54748
Περιφέρεια μέσης (cm)	30	84,35	128,25	98,6383	10,97807
Συστολική πίεση (mmHg)	30	101,00	139,00	125,8167	11,37866
Διαστολική πίεση (mmHg)	30	65,00	93,00	79,1333	7,76479
Εμπλουτισμένη τσιπούρα					
Ηλικία εθελοντών	30	33	65	43,33	7,443
Έτη καπνίσματος	12	4	40	22,00	11,809
Βάρος (Kg)	30	58,70	127,00	85,0333	16,00970
Δείκτης Μάζας σώματος (kg/m ²)	30	23,84	39,15	29,7393	3,64461
Περιφέρεια μέσης (cm)	30	83,90	129,00	99,4300	11,00120
Συστολική πίεση (mmHg)	30	103,00	151,00	126,4000	12,96108
Διαστολική πίεση (mmHg)	30	56,00	95,00	78,4833	8,76168

Στον πίνακα 5.2 βλέπουμε την μέση τιμή του βάρους, Δείκτη Μάζας Σώματος, της περιφέρειας μέσης, της συστολικής και διαστολικής πίεσης της αυτή καταγράφηκε στην έναρξη της κάθε παρέμβασης. Μεταξύ των τιμών των δεικτών αυτών δεν υπήρξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά για της 2 παρεμβάσεις. Δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά των παραμέτρων αυτών κατά τη διάρκεια και την ολοκλήρωση της παρέμβασης.

5.3 Διατροφικές συνήθειες εθελοντών και Med Diet Score

Πίνακας 5.3: Κατανάλωση ελαιολάδου και το MedDietScore.

	Αριθμός εθελοντών	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση
Απλή τσιπούρα			
Ημερήσια πρόσληψη ελαιολάδου (μερίδες) στην έναρξη	30	1,02	0,50
Ημερήσια πρόσληψη ελαιολάδου (μερίδες) στη λήξη	30	1,02	0,50
MedDietScore (0-55) στην έναρξη	30	26,00	5,24
MedDietScore (0-55) στη λήξη	30	26,82	4,10
Εμπλουτισμένη τσιπούρα			
Ημερήσια πρόσληψη ελαιολάδου (μερίδες) στην έναρξη	30	0,98	0,52
Ημερήσια πρόσληψη ελαιολάδου (μερίδες) στη λήξη	30	0,97	0,40

MedDietScore (0-55) στην έναρξη	30	25,03	4,20
MedDietScore (0-55) στη λήξη	30	27,73	3,56

Δεν παρατηρήθηκε καμία διαφοροποίηση στις διατροφικές συνήθειες των εθελοντών, μετά το τέλος της παρέμβασης (με εξαίρεση την κατανάλωση ψαριού) (Πίνακας 5.1). Ενδεικτικά, στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από την κατανάλωση ελαιολάδου καθώς και το MedDietScore (δείκτης υιοθέτησης της Μεσογειακής Δίαιτας).

5.4 Βιοχημικές μετρήσεις

Μετρήθηκαν βασικοί βιοχημικοί δείκτες, τα αποτελέσματα των οποίων παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.4 και 5.5. Ο χρόνος 0 αντιστοιχεί στην έναρξη της κάθε παρέμβασης και ο χρόνος 1 στην λήξη αυτής. Οι βιοχημικοί δείκτες που μετρήθηκαν πριν και μετά την παρέμβαση ήταν : Τριγλυκερίδια, LDL, γλυκόζη, λευκοκύτταρα, μέσος όγκος αιμοπεταλίων, HOMA IR, HDL, ολική χοληστερόλη.

Πίνακας 5.4: Βιοχημικές παράμετροι, που ακολουθούν κανονική κατανομή. Η χρονική στιγμή (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή (1) το τέλος. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική διαφορά($p<0,05$). Οι τιμές δίνονται σε mg/dl.

Βιοχημικές παράμετροι	Αριθμός εθελοντών	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση	Ελάχιστη τιμή	Μέγιστη τιμή	Sig. (2-tailed)
Εμπλουτισμένη τσιπούρα						
LDL (mg/dL) (χρόνος 0)	30	126,37	33,30	72,72	196,21	0,02*
LDL (mg/dL) (χρόνος 1)	30	137,17	38,40	61,65	210,70	

Στην περίπτωση, που οι τιμές ακολουθούν κανονική κατανομή, οι τιμές των δεικτών δίνονται ως μέσοι όροι (μέση τιμή) με την τυπική απόκλιση και ελέγχεται η διαφοροποίηση ανάμεσα στους χρόνους 0 και 1, τέλος της παρέμβασης, με την πραγματοποίηση του Paired t-test.

Μετά το πέρας της παρέμβασης προέκυψε ότι, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα τριγλυκεριδίων, HDL-χοληστερόλης και γλυκόζης, σε κανένα από τα δύο ψάρια ($p>0,05$). Από την άλλη μεριά, η κατανάλωση εμπλουτισμένης τσιπούρας οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων LDL-χοληστερόλης ($p=0,02$).

Πίνακας 5.5: Βιοχημικές παράμετροι, που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Η χρονική στιγμή (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή (1) το τέλος. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική διαφορά($p<0,05$). Οι τιμές δίνονται σε mg/dl εκτός και αν αναφέρονται σε διαφορετικές μονάδες.

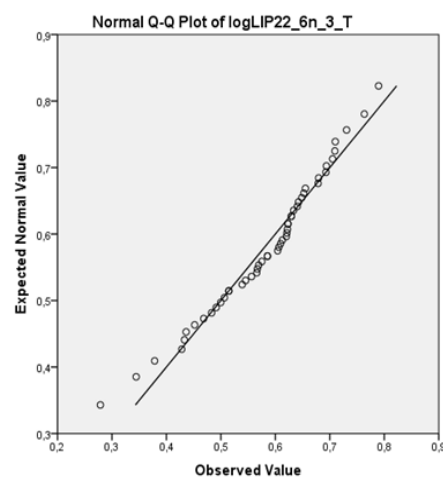
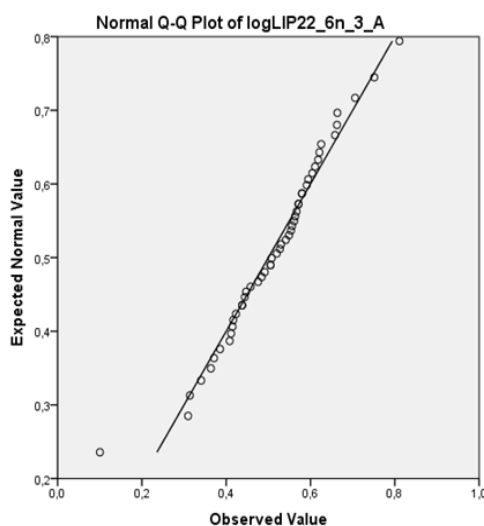
Βιοχημικές παράμετροι	Αριθμός εθελοντών	Διάμεσος	Τεταρτημόρια (25-75)	Sig.(2-tailed)
Απλή τσιπούρα				
Ινσουλίνη (μU/mL) (χρόνος 0)	30	10,84	7,20-19,49	0,03*
Ινσουλίνη(μU/mL) (χρόνος 1)	30	14,56	8,75-17,41	
HOMA IR(χρόνος 0)	30	2,16	1,60-3,93	0,05*
HOMA IR(χρόνος 1)	30	3,00	1,52-3,80	
Εμπλουτισμένη τσιπούρα				
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL) (χρόνος 0)	30	191,52	161,63-214,48	0,04*
Ολική Χοληστερόλη (mg/dL) (χρόνος 1)	30	192,36	167,70-240,65	
Ινσουλίνη(μU/mL) (χρόνος 0)	30	10,46	6,28-17,98	0,00*
Ινσουλίνη (μU/mL) (χρόνος 1)	30	11,75	8,08-23,47	
HOMA IR(χρόνος 0)	30	2,15	1,28-3,67	0,00*
HOMA IR (χρόνος 1)	30	2,40	1,71-4,60	

Στην περίπτωση, που οι τιμές δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, οι τιμές των δεικτών δίνονται ως διάμεσοι με τα τεταρτημόρια 25-75 και ελέγχεται η διαφοροποίηση ανάμεσα στους χρόνους 0 και 1, τέλος της παρέμβασης με την πραγματοποίηση του Wilcoxon test. Η κατανάλωση τόσο της απλής όσο και της εμπλουτισμένη τσιπούρας, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων ινσουλίνης, $p=0,03$ και $p=0,00$ αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά με μεγαλύτερη βαρύτητα εκείνων της ινσουλίνης οδηγούν σε σημαντικές διαφορές στο δείκτη HOMA-IR (δείκτης ινσουλινοαντίστασης) μετά την κατανάλωση και των δύο ψαριών. Συγκεκριμένα, παρατηρείται αύξηση του HOMA-IR (δείκτης ινσουλινοαντίστασης) τόσο στην περίπτωση της απλής ($p=0,05$) όσο και στην περίπτωση της εμπλουτισμένης τσιπούρας ($p=0,00$). Επιπλέον, στην περίπτωση της εμπλουτισμένης τσιπούρας, παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων ολικής χοληστερόλης ($p=0,04$).

5.5 Έλεγχος κανονικότητας λιπαρών οξέων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε έλεγχος κανονικότητας μέσω του Kolmogorov-Smirnov test, όλων των λιπαρών οξέων, ώστε να φανεί εάν ακολουθούν κανονική κατανομή. Φάνηκε ότι, τα λιπαρά οξέα που ακολουθούν κανονική κατανομή είναι τα εξής: 18:1n-9c, 18:2cc, 22:6n-3, 22:5n-3. Ενδεικτικά, παρουσιάζονται παρακάτω τα Q-Q διαγράμματα για το 22:6n-3 στην αρχή και στο τέλος της παρέμβασης.

Διαγράμματα Q-Q για το 22:6n-3, t=0 και t=1.



Από την άλλη μεριά, τα λιπαρά οξέα που φάνηκε ότι δεν ακολουθούν κανονική κατανομή είναι τα επόμενα: 16:00, 18:00, 21:00, 20:4n-6, 20:5n-3, 24:00, 24:1.

5.6 Έλεγχος επίδρασης της παρέμβασης στα λιπαρά οξέα

Πίνακας 5.6: Λιπαρά οξέα που ακολουθούν κανονική κατανομή, στις δύο παρεμβάσεις. Η χρονική στιγμή (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή (1) το τέλος. Οι τιμές δίνονται σε % συγκέντρωση.

Λιπαρά οξέα	N	Χρονική στιγμή	Μέση τιμή	Τυπική απόκλιση (SD)
Απλή τσιπούρα				
18:1n-9c	27	0	12,43	1,22
	25	1	12,13	1,32
18:2cc	27	0	8,84	1,02
	25	1	8,84	0,87
22:6n-3	27	0	3,29	0,63
	25	1	3,94	0,94
22:5n-3	27	0	1,65	0,23
	25	1	1,72	0,24
Εμπλουτισμένη τσιπούρα				
18:1n-9c	25	0	12,34	1,67
	25	1	12,06	1,41

18:2cc	25	0	8,96	1,16
	25	1	8,67	0,90
22:6n-3	23	0	3,53	1,22
	25	1	3,92	0,89
22:5n-3	24	0	1,70	0,36
	25	1	1,74	0,24

Πίνακας 5.7: Λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή, στις δύο παρεμβάσεις . Η χρονική στιγμή (0) αφορά την έναρξη της παρέμβασης και η χρονική στιγμή (1) το τέλος. Οι τιμές δίνονται σε % συγκέντρωση.

Λιπαρά οξέα	N	Χρονική στιγμή	Διάμεσος	Τεταρτημόρια (25-75)
Απλή τσιπούρα				
16:00	23	0	22,74	20,75-23,99
	23	1	22,32	21,13-23,64
18:00	27	0	16,69	16,30-17,31
	25	1	16,59	16,12-17,23
21:00	20	0	1,69	1,46-2,02
	21	1	1,45	1,19-1,78
20:4n-6	27	0	12,31	11,36-13,81
	25	1	11,70	11,03-12,87
20:5n-3	24	0	0,48	0,41-0,54
	25	1	0,65	0,47-0,78
24:00	27	0	2,50	1,73-2,89
	25	1	2,54	1,87-2,98
24:1	27	0	2,42	1,91-2,67
	25	1	2,44	2,17-2,84
Εμπλουτισμένη τσιπούρα				
16:00	23	0	22,28	20,96-23,31
	22	1	22,32	21,25-23,18
18:00	24	0	16,46	15,70-16,78
	25	1	16,08	15,67-17,01

21:00	20	0	1,61	1,29-1,93
	21	1	1,45	1,19-1,78
20:4n-6	25	0	12,48	11,33-13,48
	24	1	11,73	11,09-12,57
20:5n-3	24	0	0,49	0,36-0,60
	23	1	0,72	0,57-0,93
24:00	25	0	2,53	1,98-2,92
	25	1	2,46	1,92-2,95
24:1	25	0	2,44	1,89-2,72
	25	1	2,5	1,15-2,7

Στον πίνακα 5.6 παρουσιάζονται, η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση των λιπαρών οξέων που ακολουθούν κανονική κατανομή και στον πίνακα 5.7 παρουσιάζονται, η διάμεσος και τα τεταρτημόρια (25-75) των λιπαρών οξέων που εμφανίζουν μη κανονική κατανομή για κάθε παρέμβαση.

Πίνακας 5.8: Στατιστική σημαντικότητα μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης για τα λιπαρά οξέα που ακολουθούν κανονική κατανομή. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0,05$).

Λιπαρά οξέα	18:1n-9c	18:2cc	22:6n-3	22:5n-3
Sig.(2-tailed) Απλή τσιπούρα	0,03*	0,77	0,00*	0,13
Sig.(2-tailed) Εμπλουτισμένη τσιπούρα	0,32	0,38	0,03*	0,49

Για τα αποτελέσματα του πίνακα 5.8 πραγματοποιήθηκε το paired t-test, για τα λιπαρά οξέα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή, ώστε να ελεγχθεί αν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των λιπαρών οξέων πριν και μετά τις δύο παρεμβάσεις. Στην περίπτωση της απλής τσιπούρας φάνηκε ότι, υπήρξε μια στατιστικά σημαντική μείωση στην συγκέντρωση του ελαϊκού οξέος (18:1n-9c) μετά την παρέμβαση ($p = 0,03$). Ενώ, τόσο στην

απλή όσο και στην εμπλουτισμένη τσιπούρα, φάνηκε ότι αυξήθηκε στατιστικά σημαντικά το 22:6n-3, $p=0,00$ και $p=0,033$ αντίστοιχα.

Πίνακας 5.9: Στατιστική σημαντικότητα μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης για τα λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούν κανονική κατανομή. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική διαφορά ($p<0,05$).

Λιπαρά οξέα	16:00	18:00	21:00	20:4n-6	20:5n-3	24:00	24:1
Sig. (2-tailed) Απλή τσιπούρα	0,87	0,10	0,00*	0,01*	0,00*	0,07	0,05
Sig. (2-tailed) Εμπλουτισμένη τσιπούρα	0,49	0,23	0,72	0,08	0,00*	0,87	0,90

Στον πίνακα 5.9 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, από το wilcoxon test, μεταξύ αρχής και τέλους της παρέμβασης για τα λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, προκειμένου να ελεγχθεί αν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά των λιπαρών οξέων πριν και μετά την παρέμβαση με την απλή και την εμπλουτισμένη τσιπούρα. Στην περίπτωση της απλής τσιπούρας αποτυπώθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των 21:00 ($p=0,00$) και 20:4n-6 ($p=0,01$) ενώ σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των 20:5n-3 και στις δύο παρεμβάσεις (απλή τσιπούρα, $p=0,00$ και εμπλουτισμένη τσιπούρα $p=0,00$).

5.7 Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα του PAF

Πραγματοποιήθηκε το Pearson correlation test για τα λιπαρά οξέα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή και το Spearman correlation test για τα λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, αφού πρώτα λήφθηκε υπόψη η παραμετροποίηση των PAF AH και PAF AT.

Πίνακας 5.10: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα πριν την παρέμβαση. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$).

Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα πριν την έναρξη της παρέμβασης												
Ένζυμα		16:0 0	18:0 0	18:1n -9c	18:2cc	21:0 0	20:4n- 6	20:5n- 3	24:0 0	22:5n- 3	24:1	22:6 n-3
PAF CPT	Correlation	-0,03	0,14	0,01	-0,06	0,12	0,08	-0,02	0,00	0,18	0,01	0,11
	Sig.(2-tailed)	0,85	0,33	0,90	0,65	0,47	0,58	0,89	0,95	0,2	0,92	0,44
LP PLA2	Correlation	0,06	0,12	-0,11	0,30	- 0,03	0,13	-0,12	0,48	0,04	0,41	0,03
	Sig.(2-tailed)	0,68	0,38	0,43	0,02*	0,84	0,35	0,40	0,00*	0,73	0,00*	0,81
PAF AH	Correlation	- 0,05	0,17			- 0,24	0,18	0,13	- 0,16		- 0,03	
	Sig.(2-tailed)	0,72	0,23			0,12	0,19	0,35	0,23		0,79	
PAF AT	Correlation	- 0,33	0,19			- 0,22	0,17	0,00	0,11		0,22	
	Sig.(2-tailed)	0,03*	0,90			0,19	0,26	0,90	0,45		0,13	
PAF AH ranked	Correlation			0,00	-0,16					0,13		0,08
	Sig.(2-tailed)			0,99	0,24					0,34		0,55
PAF AT ranked	Correlation			-0,09	-0,05					0,17		0,12
	Sig.(2-tailed)			0,55	0,72					0,26		0,44

Συνολικά, στην αρχή της παρέμβασης παρατηρήθηκε, στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του λιπαρού οξέος 18:2cc και του ενζύμου LP-PLA₂ ($p=0,02$). Ακόμη, φάνηκε ότι υπήρχε θετική συσχέτιση μεταξύ του 24:00 με το LP PLA₂ ($p=0,00$) και του 24:1 με το LP PLA₂ ($p=0,00$).

Πίνακας 5.11: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα μετά το τέλος της παρέμβασης. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0,05$).

Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα μετά το τέλος της παρέμβασης												
Ένζυμα		16:0 0	18:0 0	18:1n -9c	18:2cc	21:0 0	20:4n- 6	20:5n -3	24:0 0	22:5n- 3	24:1	22:6 n-3
PAF CPT	Correlation	-0,07	0,14	-0,00	-0,28	-	-0,03	0,22	0,02	0,12	0,10	0,02
	Sig.(2-tailed)	0,61	0,33	0,98	0,04*	0,17 0,26	0,81	0,13	0,85	0,38	0,45	0,86
LP PLA2	Correlation	-	-	-0,23	0,22	-	0,13	-0,24	0,46	-0,18	0,31	-
	Sig.(2-tailed)	0,07	0,21			0,17						0,03
		0,61	0,12	0,10	0,11	0,26	0,35	0,09	0,00*	0,21	0,02*	0,80
PAF AH	Correlation	-	0,08			0,03	0,05	0,07	-		-	
	Sig.(2-tailed)	0,03							0,30		0,04	
		0,83	0,56			0,80	0,70	0,63	0,03*		0,74	
PAF AT	Correlation	-	-			-	-0,38*	0,22	-		0,09	
	Sig.(2-tailed)	0,19	0,12			0,38			0,05			
		0,22	0,42			0,01*	0,01*	0,14	0,71		0,54	
PAF AH ranked	Correlation			-0,01	-0,22					-0,43		0,04
	Sig.(2-tailed)			0,90	0,11					0,76		0,75
PAF AT ranked	Correlation			0,08	-0,14					0,15		0,23
	Sig.(2-tailed)			0,56	0,33					0,29		0,12

Στον πίνακα 5.11 φαίνονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων των ενζύμων μεταβολισμού του PAF και των λιπαρών οξέων, συνολικά ,μετά την παρέμβαση. Στο τέλος της

παρέμβασης, συνολικά και για τις δύο ομάδες, παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 18:2cc και του PAF CPT ($p=0,04$) όπως επίσης του αραχιδονικού οξέος (20:4n-6) και του PAF AT ($p=0,01$). Επιπλέον, φάνηκε ότι υπήρχε, στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 21:00 και του PAF AT ($p=0,01$), θετική συσχέτιση μεταξύ του 24:00 και του LP PLA₂ ($p=0,00$) , αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 24:00 και του PAF AH ($p=0,03$) και τέλος θετική συσχέτιση μεταξύ του 24:1 και του LP PLA₂ ($p=0,02$).

Προκειμένου να εξετάσουμε εάν υπήρχε κάποια στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων και των ενζύμων του PAF, στην περίπτωση της κατανάλωσης απλής και εμπλουτισμένης τσιπούρας, πριν όπως και μετά την κάθε παρέμβαση, πραγματοποιήθηκε και πάλι το Pearson correlation test για τα λιπαρά οξέα που ακολουθούσαν κανονική κατανομή και το Spearman test για αυτά που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή.

Πίνακας 5.12: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα πριν την παρέμβαση με απλή τσιπούρα. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0,05$).

Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα πριν την παρέμβαση με απλή τσιπούρα												
Ένζυμα		18:1n-9c	18:2c c	22:6n-3	22:5n-3	16:00	18:00	21:00	20:4n-6	20-5n-3	24:1	24:00
PAF CPT	Correlation	-0,19	-0,31	0,04	-0,02							
	Sig.(2-tailed)	0,36	0,14	0,84	0,89							
LP PLA2	Correlation	-0,12	0,32	0,12	0,23							
	Sig.(2-tailed)	0,53	0,10	0,52	0,24							
PAF AH (ranked)	Correlation	-0,25	-0,20	0,26	0,14							
	Sig.(2-tailed)	0,19	0,30	0,18	0,48							

PAF AT (ranked)	Correlation	0,05	0,13	0,53	0,31							
	Sig.(2-tailed)	0,79	0,54	0,01*	0,15							
PAF AH	Correlation					-0,33	0,28	-0,30	0,31	0,09	-0,15	-0,09
	Sig. (2-tailed)					0,12	0,14	0,19	0,11	0,64	0,44	0,63
PAF AT	Correlation					-0,46	-0,07	0,05	0,11	0,21	0,24	0,19
	Sig. (2-tailed)					0,04*	0,75	0,84	0,62	0,38	0,27	0,39

Φάνηκε ότι στην περίπτωση της κατανάλωσης απλής τσιπούρας, πριν την παρέμβαση, υπήρχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του 22:6n-3 και του PAF AT (ranked) ($p=0,01$) όπως επίσης σημειώθηκε αρνητική συσχέτιση και μεταξύ του 16:00 με το PAF AT ($p=0,04$).

Πίνακας 5.13: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα μετά την παρέμβαση με απλή τσιπούρα. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0,05$).

Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα μετά την παρέμβαση με απλή τσιπούρα												
Ένζυμα		18:1 n-9c	18:2 cc	22:6n- 3	22:5n- 3	16:00	18:00	21:00	20:4n- 6	20- 5n-3	24:1	24:0 0
PAF CPT	Correlation	0,06	-0,27	0,07	0,09							
	Sig.(2-tailed)	0,75	0,18	0,72	0,65							
LP PLA2	Correlation	-0,30	0,44	-0,08	-0,19							
	Sig(2-tailed)	0,13	0,02*	0,70	0,31							
PAF AH (ranked)	Correlation	-0,00	-0,17	-0,03	-0,21							
	Sig.(2-tailed)	0,97	0,41	0,86	0,31							

PAF AT (ranked)	Correlation	0,15	-0,08	0,31	0,23							
	Sig.(2-tailed)	0,47	0,71	0,14	0,27							
PAF AH	Correlation					-0,10	0,13	0,33	0,26	0,06	0,05	-0,09
	Sig. (2-tailed)					0,64	0,53	0,88	0,20	0,76	0,80	0,64
PAF AT	Correlation					-0,18	-0,11	-0,32	-0,08	0,21	0,10	0,00
	Sig. (2-tailed)					0,42	0,59	0,16	0,69	0,33	0,62	0,96

Στο τέλος της παρέμβασης με απλή τσιπούρα, φάνηκε ότι, υπήρχε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του 18:2cc με το LP PLA₂ (p=0,02).

Πίνακας 5.14: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα πριν την παρέμβαση με εμπλουτισμένη τσιπούρα. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση (p<0,05).

Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα πριν την παρέμβαση με εμπλουτισμένη τσιπούρα												
Ένζυμα		18:1n-9c	18:2cc	22:6n-3	22:5n-3	16:00	18:00	21:00	20:4n-6	20-5n-3	24:1	24:00
PAF CPT	Correlation	0,13	0,11	-0,17	0,34							
	Sig.(2-tailed)	0,53	0,61	0,44	0,10							
LP PLA2	Correlation	-0,10	0,29	-0,01	-0,06							
	Sig. (2-tailed)	0,63	0,15	0,95	0,75							
PAF AH (ranked)	Correlation	0,18	-0,12	0,00	0,15							
	Sig. (2-tailed)	0,36	0,56	0,97	0,47							

PAF AT (ranked)	Correlation	-0,22	-0,24	-0,14	0,06							
	Sig. (2-tailed)	0,31	0,26	0,55	0,77							
PAF AH	Correlation					0,13	0,02	-0,25	0,07	0,24	0,13	-0,23
	Sig. (2-tailed)					0,53	0,92	0,27	0,73	0,23	0,52	0,24
PAF AT	Correlation					-0,24	0,21	-0,48	0,25	-0,11	0,18	-0,02
	Sig. (2-tailed)					0,30	0,34	0,03*	0,25	0,62	0,39	0,91

Όσον αφορά την εμπλουτισμένη τσιπούρα, φάνηκε ότι στην αρχή της παρέμβασης υπήρχε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 21:00 λιπαρού οξέος και του PAF AT ($p=0,03$).

Πίνακας 5.15: Συσχέτιση ενζύμων μεταβολισμού του PAF με λιπαρά οξέα μετά την παρέμβαση με εμπλουτισμένη τσιπούρα. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p<0,05$).

Συσχέτιση λιπαρών οξέων με ένζυμα μετά την παρέμβαση με εμπλουτισμένη τσιπούρα												
Ένζυμα		18:1n-9c	18:2cc	22:6n-3	22:5n-3	16:00	18:00	21:00	20:4n-6	20-5n-3	24:1	24:00
PAF CPT	Correlation	-0,06	-0,27	-0,02	0,14							
	Sig.(2-tailed)	0,76	0,19	0,89	0,48							
LP PLA2	Correlation	-0,16	-0,01	0,01	-0,15							
	Sig. (2-tailed)	0,42	0,92	0,95	0,45							
PAF AH (ranked)	Correlation	-0,03	-0,30	0,12	0,11							
	Sig. (2-tailed)	0,88	0,14	0,56	0,57							

PAF AT (ranked)	Correlation	0,03	-0,19	0,15	0,08							
	Sig. (2-tailed)	0,89	0,37	0,49	0,72							
PAF AH	Correlation					-0,00	0,04	0,02	-0,14	0,11	-0,05	-0,44
	Sig. (2-tailed)					0,99	0,84	0,89	0,48	0,59	0,79	0,02*
PAF AT	Correlation					-0,15	-0,19	-0,41	0,12	0,18	-0,00	-0,10
	Sig. (2-tailed)					0,52	0,37	0,06	0,59	0,41	0,98	0,64

Ενώ, στο τέλος της παρέμβασης, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 24:00 λιπαρού οξέος και του PAF AH ($p=0,02$).

5.8 Έλεγχος συγχητικών παραγόντων

Στην συνέχεια, λήφθηκαν υπόψη οι συγχητικοί παράγοντες του φύλου και της ηλικίας των συμμετεχόντων, με σκοπό να εξεταστεί εάν αυτοί επιδρούν στα αποτελέσματα των συσχέτισεων μεταξύ των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων και των ενζύμων μεταβολισμού του PAF. Για αυτόν τον λόγο, εξετάστηκε η επίδραση αυτών των παραγόντων, τόσο συνολικά όσο και ξεχωριστά στο τέλος της κάθε παρέμβασης.

Πίνακας 5.16: Συσχέτιση λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, μετά το τέλος και των δύο παρεμβάσεων, συνολικά. Με συγχητικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$).

Ένζυμα	Συγχητικοί παράγοντες φύλο και ηλικία	18:1n-9c	18:2cc	22:6n-3	22:5n-3	20:5n-3
PAF CPT	Correlation	-0,01	-0,23	0,05	0,19	0,23
	Sig. (2-tailed)	0,92	0,10	0,72	0,19	0,11
LP PLA2	Correlation	-0,17	0,20	0,06	-0,17	-0,08
	Sig. (2-tailed)	0,23	0,16	0,67	0,23	0,54
PAF AH (ranked)	Correlation	-0,02	-0,26	0,02	-0,08	
	Sig. (2-tailed)	0,87	0,07	0,89	0,57	
PAF AT (ranked)	Correlation	0,10	-0,18	0,23	0,12	
	Sig. (2-tailed)	0,51	0,22	0,12	0,44	
PAF AH	Correlation					0,02
	Sig. (2-tailed)					0,87
PAF AT	Correlation					0,10
	Sig. (2-tailed)					0,50

Για τα λιπαρά οξέα που ακολουθούν κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκαν partial correlation, λαμβάνοντας υπόψη τους συγχητικούς παράγοντες του φύλου και της ηλικίας και για τα ένζυμα που δεν ακολουθούσαν κανονική κατανομή, χρησιμοποιήθηκαν οι τιμές ranked (PAF AH ranked και PAF AT ranked). Για τα λιπαρά οξέα που δεν ακολουθούν

κανονική κατανομή, πραγματοποιήθηκαν linear regressions, λαμβάνοντας υπόψη τους συγχετικούς παράγοντες του φύλου και της ηλικίας και ορίζοντας ως εξαρτημένες μεταβλητές τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF. Στον πίνακα 5.16, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων συνολικά, στο τέλος των παρεμβάσεων. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι, δεν σημειώθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις, μετά την επίδραση του φύλου και της ηλικίας.

Πίνακας 5.17: Συσχέτιση λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, στο τέλος της παρέμβασης με την εμπλουτισμένη τσιπούρα. Με συγχετικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$).

Ένζυμα	Συγχετικοί παράγοντες φύλο και ηλικία	18:1n-9c	18:2cc	22:6n-3	22:5n-3	20:5n-3
PAF CPT	Correlation	-0,09	-0,21	0,00	0,20	0,23
	Sig.(2-tailed)	0,67	0,31	0,99	0,35	0,29
LP PLA2	Correlation	-0,07	-0,06	0,09	-0,08	-0,08
	Sig. (2-tailed)	0,73	0,78	0,65	0,66	0,66
PAF AH (ranked)	Correlation	-0,07	0,32	0,08	0,07	
	Sig. (2-tailed)	0,74	0,12	0,70	0,74	
PAF AT (ranked)	Correlation	0,05	0,20	0,14	0,05	
	Sig. (2-tailed)	0,80	0,37	0,53	0,81	
PAF AH	Correlation					0,07
	Sig. (2-tailed)					0,73
PAF AT	Correlation					0,05
	Sig. (2-tailed)					0,83

Επιπλέον, στον πίνακα 5.17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων των λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, μετά την παρέμβαση με την εμπλουτισμένη τσιπούρα, λαμβάνοντας ως συγχετικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Πίνακας 5.18: Συσχέτιση λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του PAF, στο τέλος της παρέμβασης με την απλή τσιπούρα. Με συγχητικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία. Το (*) συμβολίζει την στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p < 0,05$).

Ένζυμα	Συγχητικοί παράγοντες φύλο και ηλικία	18:1n-9c	18:2cc	22:6n-3	22:5n-3	20:5n-3
PAF CPT	Correlation	0,006	-0,25	0,10	0,14	0,18
	Sig. (2-tailed)	0,76	0,25	0,64	0,49	0,44
LP PLA2	Correlation	-0,28	0,44	0,02	-0,26	-0,02
	Sig. (2-tailed)	0,18	0,03*	0,91	0,23	0,90
PAF AH (ranked)	Correlation	0,01	0,24	0,04	0,29	
	Sig. (2-tailed)	0,96	0,26	0,85	0,18	
PAF AT (ranked)	Correlation	0,15	0,12	0,31	0,20	
	Sig. (2-tailed)	0,49	0,57	0,17	0,36	
PAF AH	Correlation					0,05
	Sig. (2-tailed)					0,82
PAF AT	Correlation					0,18
	Sig. (2-tailed)					0,45

Στον πίνακα 5.18, εμφανίζονται τα αποτελέσματα των συσχετίσεων των λιπαρών με τα ένζυμα του PAF, μετά την παρέμβαση με την απλή τσιπούρα, λαμβάνοντας ως συγχητικούς παράγοντες το φύλο και την ηλικία. Η μόνη στατιστικά σημαντική συσχέτιση που παρατηρήθηκε ήταν αυτή μεταξύ του 18:2cc και του LP PLA₂ ($p=0,03$), η οποία ήταν θετική.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: Συζήτηση

Είναι γεγονός ότι, τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο αυξάνονται τα ποσοστά θανάτου λόγω κάποιας καρδιαγγειακής νόσου και για αυτόν τον λόγο έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην πρόληψη της εμφάνισης της. Έχει φανεί ότι, ο ακρογωνιαίος λίθος για την μείωση του καρδιαγγειακού κινδύνου είναι οι αλλαγές στον τρόπο ζωής, κυρίως με την υιοθέτηση ενός υγιεινού τρόπου διατροφής όπως είναι, η Μεσογειακή διατροφή. Πιο συγκεκριμένα, πλήθος μελετών έχει αναδείξει την κατανάλωση ψαριών ως ιδιαίτερα ωφέλιμη, στην πρόληψη της εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου, κυρίως λόγω των ω-3 λιπαρών οξέων που περιέχουν, ιδίως τα λιπαρότερα ψάρια. Από την άλλη μεριά, έχει αποδειχθεί ότι ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων, διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην πρόκληση της αθηροσκλήρωσης. Έτσι λοιπόν, η αναζήτηση συστατικών της μεσογειακής διατροφής, με αποδεδειγμένες αντί-PAF ιδιότητες, οδήγησε στον εμπλουτισμό ψαριών με βιολογικά δραστικά έναντι του PAF με στόχο την αύξηση της βιολογικής αξίας των ψαριών.

Με αυτό το σκεπτικό, η συγκεκριμένη μελέτη επιχείρησε να εξάγει συμπεράσματα ως προς την συσχέτιση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων, τα οποία αποτελούν μακροπρόθεσμους δείκτες καρδιαγγειακής υγείας, με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF, μετά από κατανάλωση εμπλουτισμένης με βιολογικά δραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, τσιπούρας σε υγιείς εθελοντές.

Αρχικά, μέσω της διαδικασία απομόνωσης, εκχύλισης και μεθυλίωσης υπολογίστηκε η % συγκέντρωση των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων, τόσο στην αρχή όσο και στο τέλος της κάθε παρέμβασης, σε όλους του συμμετέχοντες της μελέτης με σκοπό την εκτίμηση της συσχέτισης των λιπαρών οξέων με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF. Από τα αποτελέσματα της μελέτης στην αρχή της παρέμβασης φάνηκε ότι, τα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων των συμμετεχόντων είναι: το ελαϊκό οξύ (18:1n-9c) , το παλμιτικό (16:00), το στεατικό οξύ (18:00) και το αραχιδονικό οξύ (20:4n-6). Τα δεδομένα αυτά δεν παρεκκλίνουν από τις μέσες τιμές των συγκεντρώσεων των λιπαρών οξέων των μεμβρανών των ερυθρών κυττάρων που υπολογίστηκαν στην αρχή μελετών παρέμβασης με ψάρι. Συγκεκριμένα, στην μελέτη των Agren et al. [106] φάνηκε ότι οι συμμετέχοντες, πριν την έναρξη της παρέμβασης, στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων τους παρουσίαζαν τις εξής

συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων: 16:00 (19,2 mol %), 18:00 (16,5 mol%), 20:4n-6 (19,1mol%) και 18:1n-9c (14,9%mol). Αυτές οι συγκεντρώσεις είναι παρόμοιες με τις συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων σε αυτή την μελέτη. Εκτός από τα λιπαρά οξέα που εμφανίστηκαν σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις, υπήρχαν και κάποια ακόμη όπως: το 18:2cc, το 21:00, το 24:00 και το 24:1 τα οποία εμφανίστηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις και τα οποία, δεν εντοπίστηκαν στην μελέτη των Agren et al. Επιπλέον, φάνηκε ότι στην αρχή της παρέμβασης, οι συγκεντρώσεις DHA στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων ήταν κοντά στο 3 wt% ενώ οι συγκεντρώσεις EPA ήταν κοντά στο 0,5 wt%, τόσο στην περίπτωση της απλής όσο και στην περίπτωση της εμπλουτισμένης τσιπούρας. Αυτή η παρατήρηση, συμφωνεί με προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν, σχετικά με τις συγκεντρώσεις EPA και DHA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων, χωρίς παρέμβαση με ψάρι ή ιχθυέλαιο [91].

Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων μετά την παρέμβαση, φάνηκε ότι τόσο στην απλή όσο και στην εμπλουτισμένη τσιπούρα, η μόνη στατιστικά σημαντική αύξηση που σημειώθηκε ήταν στα επίπεδα των 22:6n-3 (DHA) και των 20:5n-3 (EPA), όπως ήταν και αναμενόμενο. Δεν φάνηκε να υπάρχει κάποια άλλη στατιστικά σημαντική αύξηση στα επίπεδα λιπαρών οξέων μετά τις δύο παρεμβάσεις. Εξαίρεση αποτελούν οι μελέτες που χρησιμοποιούν ως παρέμβαση το ιχθυέλαιο και η μέτρηση των λιπαρών οξέων γίνεται στο πλάσμα. Μία τέτοια μελέτη ήταν αυτή των Yusof et al. η οποία έδειξε ότι πέρα από την αύξηση των EPA και DHA στο πλάσμα σε υγιείς εθελοντές, φάνηκε να αυξάνεται στατιστικά σημαντικά και το 22:5n-3 (DPA, 22:5n-3) [99]. Επιπλέον, στην περίπτωση της απλής τσιπούρας, σημειώθηκε ταυτόχρονη μείωση του αραχιδονικού οξέος. Αυτό συμφωνεί με την έως τώρα βιβλιογραφία, στις μελέτες παρέμβασης με ψάρι. Συγκεκριμένα, στην κλινική μελέτη των Vidgren et al., μετά την παρέμβαση με ψάρι, ιχθυέλαιο ή έλαιο πλούσιο σε DHA, σημειώθηκε στατιστικά σημαντική αύξηση των ω-3 λιπαρών οξέων στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων, ενώ ταυτόχρονα μειώθηκε στατιστικά σημαντικά η συγκέντρωση του αραχιδονικού οξέος και συνολικά των ω-6 λιπαρών οξέων [90]. Όσον αφορά τα επίπεδα EPA και DHA μεταξύ των δύο παρεμβάσεων, φάνηκε ότι, τα επίπεδα EPA αυξήθηκαν λίγο περισσότερο στην περίπτωση της εμπλουτισμένης τσιπούρας, ενώ τα επίπεδα DHA αυξήθηκαν πολύ περισσότερο στην απλή τσιπούρα. Προηγούμενες μελέτες, υποστηρίζουν ότι τα επίπεδα DHA μετά από διατροφική παρέμβαση με ψάρι ή ιχθυέλαιο αποτελούν πιο ισχυρό αντί-

φλεγμονώδη παράγοντα σε σχέση με τα επίπεδα EPA. Συγκεκριμένα, οι Yusof et al. έδειξαν ότι, μετά από διατροφική παρέμβαση με ιχθυέλαιο εμφανίστηκε ισχυρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων DHA στο πλάσμα και του SICAM-1 [99]. Επιπλέον, οι Hallund et al. παρατήρησαν ότι, στην διατροφική παρέμβαση με πέστροφα ιχθυοτροφείου της οποίας η τροφή είχε εμπλουτιστεί με φυτικά έλαια, η ενσωμάτωση των EPA και DHA στην μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων των εθελοντών ήταν πολύ μικρότερη σε σχέση με αυτή της ομάδας με την πέστροφα που είχε τραφεί με την συμβατική ιχθυοτροφή [98]. Γενικά στην μελέτη φάνηκε ότι, η αύξηση των ω -3 PUFA (EPA και DHA) ήταν μεγαλύτερη μετά την παρέμβαση με απλή τσιπούρα σε σχέση με την εμπλουτισμένη. Αυτό εξηγείται ενδεχομένως, από τα αποτελέσματα των nasorouliou et al., στα οποία ο εμπλουτισμός της τσιπούρας με λιποειδή ελαιοπυρήνα οδήγησε σε μειωμένη ενσωμάτωση EPA και DHA στους ιστούς του ψαριού [107]. Επιπλέον, σχετικά με τα επίπεδα ελαϊκού οξέος (18:1n-9c), φάνηκε ότι μειώθηκαν στατιστικά σημαντικά, στην περίπτωση της απλής τσιπούρας, ενώ δεν φάνηκε να διαφοροποιούνται στην περίπτωση της εμπλουτισμένης με βιολογικά δραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, κάτι το οποίο ήταν αναμενόμενο καθώς λόγω του εμπλουτισμού με ελαιοπυρήνα υπήρξε αυξημένη περιεκτικότητα ελαϊκού οξέος στην τσιπούρα.

Όσον αφορά τις συσχετίσεις των λιπαρών οξέων με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF, φάνηκε ότι στο τέλος και των δύο παρεμβάσεων υπήρχε μία στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 18:2cc και του PAF CPT, του 21:00 με το PAF AT και του 24:00 με το PAF AH. Από την άλλη μεριά, φάνηκε να υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του 24:00 και του LP PLA₂ όπως επίσης μεταξύ του 24:1 και του LP PLA₂. Όμως, λόγω του γεγονότος ότι, δεν σημειώθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μετά το τέλος της παρέμβασης, στα πιο πάνω λιπαρά οξέα, οι συσχετίσεις αυτές που προέκυψαν δεν οφείλονται στην παρέμβαση. Ακόμη, στο τέλος της παρέμβασης με την εμπλουτισμένη τσιπούρα φάνηκε να υπάρχει μια στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του 24:00 λιπαρού οξέος και του PAF AH. Όμως και πάλι, η συγκέντρωση του 24:00 λιπαρού οξέος, δεν άλλαξε στατιστικά σημαντικά μετά την παρέμβαση με την εμπλουτισμένη τσιπούρα. Επομένως, η συσχέτιση αυτή δεν ήταν αποτέλεσμα της παρέμβασης. Από αυτά τα δεδομένα, φαίνεται ότι κανένα από τα ω -3 ή ω -6 PUFA δεν συσχετίστηκαν με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF σε φαινομενικά υγιείς εθελοντές μετά από κατανάλωση απλής ή εμπλουτισμένης τσιπούρας. Όταν λήφθηκαν υπόψη οι συγχρητικοί παράγοντες του φύλου

και της ηλικίας, στα αποτελέσματα των συσχετίσεων των ω -3 λιπαρών οξέων με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF, φάνηκε ότι οι παράγοντες αυτοί δεν διαφοροποίησαν τα αποτελέσματα. Συγκεκριμένα, φάνηκε ότι οι παράγοντες του φύλου και της ηλικίας δεν επηρεάζουν την συσχέτιση των ω -3 λιπαρών οξέων στις μεμβράνες των ερυθρών κυττάρων με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF, τόσο μετά την κατανάλωση απλής όσο και μετά την κατανάλωση εμπλουτισμένης, με βιολογικά δραστικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, τσιπούρας.

Όσον αφορά την μη στατιστικά σημαντική συσχέτιση των ω -3 ή ω -6 λιπαρών οξέων με τα ένζυμα μεταβολισμού του PAF πιθανόν να υποδηλώνει πως η ποσότητα πρόσληψης των λιποειδών ελαιοπυρήνα και συνεπώς η ποσότητα των ψαριών να μην ήταν επαρκής ώστε να φανούν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις.

Συνολικά, στην μελέτη φάνηκε ότι τα μόνα λιπαρά οξέα που αυξήθηκαν στατιστικά σημαντικά μετά την παρέμβαση με την τσιπούρα και την εμπλουτισμένη τσιπούρα ήταν τα 22:6n-3 (DHA) και τα 20:5n-3 (EPA) όπως ήταν και αναμενόμενο. Όσον αφορά τις συσχετίσεις των λιπαρών οξέων με τα ένζυμα του μεταβολισμού του PAF, δεν σημειώθηκαν συσχετίσεις που μπορούν να αποδοθούν στην κατανάλωση της απλής ή εμπλουτισμένης τσιπούρας. Μια μεγαλύτερη μελέτη με περισσότερους εθελοντές και μεγαλύτερη κατανάλωση ψαριών και συνεπώς μεγαλύτερες συγκεντρώσεις πρόσληψης βιολογικά δραστικών λιποειδών ελαιοπυρήνα, πιθανόν να βοηθήσει στην ανάδειξη στατιστικά σημαντικών συσχετίσεων μεταξύ ενζύμων του PAF και των λιπαρών οξέων.

Βιβλιογραφία

1. Snyder, F., *Platelet-activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes*. Biochem J, 1995. 305 (Pt 3): p. 689-705.
2. Ninio, E., et al., *Biosynthesis of paf-acether. XVII. Regulation by the CoA-independent transacylase in human neutrophils*. FEBS Lett, 1991. 289(2): p. 138-40.
3. Snyder, F., T.C. Lee, and M.L. Blank, *The role of transacylases in the metabolism of arachidonate and platelet activating factor*. Prog Lipid Res, 1992. 31(1): p. 65-86.
4. 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. 1761(9): p. 1093-9.
5. 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. 267(28): p. 19992-20001.
6. Liu, M. and P.V. Subbaiah, *Hydrolysis and transesterification of platelet-activating factor by lecithin-cholesterol acyltransferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(13): p. 6035-9.
7. Gijon, M.A., D.M. Spencer, and C.C. Leslie, *Recent advances in the regulation of cytosolic phospholipase A(2)*. Adv Enzyme Regul, 2000. 40: p. 255-68.
8. Kudo, I. and M. Murakami, *Phospholipase A2 enzymes*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2002. 68-69: p. 3-58.
9. Six, D.A. and E.A. Dennis, *The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization*. Biochim Biophys Acta, 2000. 1488(1-2): p. 1-19.
10. Murakami, M. and I. Kudo, *Phospholipase A2*. J Biochem, 2002. 131(3): p. 285-92.
11. Yamashita, A., T. Sugiura, and K. Waku, *Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells*. J Biochem, 1997. 122(1): p. 1-16.
12. 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: p. 27683.

13. Nixon, A.B., D.G. Greene, and R.L. Wykle, *Comparison of acceptor and donor substrates in the CoA-independent transacylase reaction in human neutrophils*. Biochim Biophys Acta, 1996. 1300(3): p. 187-96.
14. Harayama, T., et al., *Identification of a novel noninflammatory biosynthetic pathway of platelet-activating factor*. J Biol Chem, 2008. 283(17): p. 11097-106.
15. 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. 282(9): p. 6532-9.
16. Baker, R.R., *Lipid acetylation reactions and the metabolism of platelet-activating factor*. Neurochem Res, 2000. 25(5): p. 677-83.
17. Faison, L.D. and H.L. White, *Sulfasalazine inhibits lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase*. Prostaglandins, 1992. 44(3): p. 245-9.
18. Yanoshita, R., et al., *Inhibition of lysoPAF acetyltransferase activity by flavonoids*. Inflamm Res, 1996. 45(11): p. 546-9.
19. Mabuchi-Itoh, K., et al., *Aspirin induces non-enzymatic formation of platelet-activating factor from lyso platelet-activating factor*. FEBS Lett, 1993. 332(3): p. 233-6.
20. White, H.L. and L.D. Faison, *Inhibition of lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase by salicylates and other compounds*. Prostaglandins, 1988. 35(6): p. 939-44.
21. Karasawa, K., et al., *Plasma platelet activating factor-acetylhydrolase (PAF-AH)*. Prog Lipid Res, 2003. 42(2): p. 93-114.
22. Stafforini, D.M., et al., *Mammalian platelet-activating factor acetylhydrolases*. Biochim Biophys Acta, 1996. 1301(3): p. 161-73.
23. Tselepis, A.D. and M. John Chapman, *Inflammation, bioactive lipids and atherosclerosis: potential roles of a lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet activating factor-acetylhydrolase*. Atheroscler Suppl, 2002. 3(4): p. 57-68.
24. Avramopoulou, V., et al., *Synthesis of a new phosphoglycolipid with biological activity towards platelets*. Int J Biochem Cell Biol, 1997. 29(5): p. 767-74.
25. Bae, K., et al., *Platelet-activating factor (PAF)-dependent transacetylase and its relationship with PAF acetylhydrolases*. J Biol Chem, 2000. 275(35): p. 26704-9.
26. Servillo, L., et al., *Lysophospholipid transacetylase in the regulation of PAF levels in human monocytes and macrophages*. FASEB J, 2006. 20(7): p. 1015-7.

27. Nixon, A.B., et al., *Acetyl-CoA:1-O-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine acetyltransferase is directly activated by p38 kinase*. J Biol Chem, 1999. 274(9): p. 5469-73.
28. Chao, W. and M.S. Olson, *Platelet-activating factor: receptors and signal transduction*. Biochem J, 1993. 292 (Pt 3): p. 617-29.
29. Hwang, S.B., *Specific receptors of platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanisms*. J Lipid Mediat, 1990. 2(3-4): p. 123-58.
30. Honda, Z., S. Ishii, and T. Shimizu, *Platelet-activating factor receptor*. J Biochem, 2002. 131(6): p. 773-9.
31. Ishii, S. and T. Shimizu, *Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice*. Prog Lipid Res, 2000. 39(1): p. 41-82.
32. McManus, L.M., et al., *PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications*. Lab Invest, 1993. 69(6): p. 639-50.
33. Pegorier, S., et al., *Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis*. Atherosclerosis, 2006. 188(2): p. 433-43.
34. Nakamura, M., et al., *Endotoxin transduces Ca²⁺ signaling via platelet-activating factor receptor*. FEBS Lett, 1992. 314(2): p. 125-9.
35. Cundell, D.R., et al., *Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor*. Nature, 1995. 377(6548): p. 435-8.
36. 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. 177(9): p. 6182-91.
37. Swords, W.E., et al., *Non-typeable Haemophilus influenzae adhere to and invade human bronchial epithelial cells via an interaction of lipooligosaccharide with the PAF receptor*. Mol Microbiol, 2000. 37(1): p. 13-27.
38. 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. 78(2-3): p. 151-8.
39. Singh, P., et al., *Platelet-activating factor (PAF)-antagonists of natural origin*. Fitoterapia, 2013. 84: p. 180-201.
40. Mullol, J., et al., *Update on rupatadine in the management of allergic disorders*. Allergy, 2015. 70 Suppl 100: p. 1-24.

41. Karantonis, H.C., S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others*. J Agric Food Chem, 2002. 50(5): p. 1150-60.
42. Karantonis, H.C., et al., *In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2006. 16(3): p. 174-85.
43. Tsantila, N., et al., *Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits*. Mediators Inflamm, 2007. 2007: p. 36204.
44. Fragopoulou, E., S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must*. J Agric Food Chem, 2002. 50(9): p. 2684-94.
45. Fragopoulou, E., et al., *Biological activity of total lipids from red and white wine/must*. J Agric Food Chem, 2001. 49(11): p. 5186-93.
46. Xanthopoulou, M.N., et al., *Effect of Robola and Cabernet Sauvignon extracts on platelet activating factor enzymes activity on U937 cells*. Food Chem, 2014. 165: p. 50-9.
47. Papakonstantinou, V.D., et al., *A Review on Platelet Activating Factor Inhibitors: Could a New Class of Potent Metal-Based Anti-Inflammatory Drugs Induce Anticancer Properties?* Bioinorg Chem Appl, 2017. 2017: p. 6947034.
48. Mori, T.A., et al., *Interactions between dietary fat, fish, and fish oils and their effects on platelet function in men at risk of cardiovascular disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. 17(2): p. 279-86.
49. Nasopoulou, C., et al., *Antibacterial and anti-PAF activity of lipid extracts from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*)*. Food Chem, 2008. 111(2): p. 433-8.
50. Nasopoulou, C., et al., *Fish polar lipids retard atherosclerosis in rabbits by down-regulating PAF biosynthesis and up-regulating PAF catabolism*. Lipids Health Dis, 2011. 10: p. 213.
51. Ross, R., J. Glomset, and L. Harker, *Response to injury and atherogenesis*. Am J Pathol, 1977. 86(3): p. 675-84.
52. Rouis, M., F. Nigon, and M.J. Chapman, *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(3): p. 1293-301.

53. Prescott, S.M., et al., *Platelet-activating factor and related lipid mediators*. Annu Rev Biochem, 2000. 69: p. 419-45.
54. Dentan, C., et al., *PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper- and cell-mediated oxidation*. Arterioscler Thromb, 1994. 14(3): p. 353-60.
55. 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. 1212(3): p. 353-60.
56. Stafforini, D.M., et al., *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor*. J Biol Chem, 1987. 262(9): p. 4215-22.
57. Stafforini, D.M., et al., *The platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma prevents oxidative modification of low-density lipoprotein*. Trans Assoc Am Physicians, 1992. 105: p. 44-63.
58. Tjoelker, L.W., et al., *Anti-inflammatory properties of a platelet-activating factor acetylhydrolase*. Nature, 1995. 374(6522): p. 549-53.
59. Kromann, N. and A. Green, *Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974*. Acta Med Scand, 1980. 208(5): p. 401-6.
60. Keys, A., *Coronary heart disease in seven countries*. 1970. Nutrition, 1997. 13(3): p. 250-2; discussion 249, 253.
61. Dyerberg, J., *Coronary heart disease in Greenland Inuit: a paradox. Implications for western diet patterns*. Arctic Med Res, 1989. 48(2): p. 47-54.
62. Mozaffarian, D. and J.H. Wu, *Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events*. J Am Coll Cardiol, 2011. 58(20): p. 2047-67.
63. Widmer, R.J., et al., *The Mediterranean diet, its components, and cardiovascular disease*. Am J Med, 2015. 128(3): p. 229-38.
64. Delgado-Lista, J., et al., *Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review*. Br J Nutr, 2012. 107 Suppl 2: p. S201-13.
65. Petsini, F., E. Fragopoulou, and S. Antonopoulou, *Fish consumption and cardiovascular disease related biomarkers: A review of clinical trials*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2018: p. 1-11.

66. Beilin, L.J., et al., *The effects of omega-3 fatty acids on blood pressure and serum lipids in men at increased risk of cardiovascular disease*. J Hypertens Suppl, 1993. 11(5): p. S318-9.
67. Lara, J.J., et al., *Benefits of salmon eating on traditional and novel vascular risk factors in young, non-obese healthy subjects*. Atherosclerosis, 2007. 193(1): p. 213-21.
68. He, K., *Fish, long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids and prevention of cardiovascular disease--eat fish or take fish oil supplement?* Prog Cardiovasc Dis, 2009. 52(2): p. 95-114.
69. Calder, P.C., *The role of marine omega-3 (n-3) fatty acids in inflammatory processes, atherosclerosis and plaque stability*. Mol Nutr Food Res, 2012. 56(7): p. 1073-80.
70. Thorngren, M. and A. Gustafson, *Effects of 11-week increases in dietary eicosapentaenoic acid on bleeding time, lipids, and platelet aggregation*. Lancet, 1981. 2(8257): p. 1190-3.
71. Maehre, H.K., et al., *omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Diseases: Effects, Mechanisms and Dietary Relevance*. Int J Mol Sci, 2015. 16(9): p. 22636-61.
72. Poudyal, H., et al., *Omega-3 fatty acids and metabolic syndrome: effects and emerging mechanisms of action*. Prog Lipid Res, 2011. 50(4): p. 372-87.
73. Din, J.N., et al., *Dietary intervention with oil rich fish reduces platelet-monocyte aggregation in man*. Atherosclerosis, 2008. 197(1): p. 290-6.
74. Grieger, J.A., M.D. Miller, and L. Cobiac, *Investigation of the effects of a high fish diet on inflammatory cytokines, blood pressure, and lipids in healthy older Australians*. Food Nutr Res, 2014. 58.
75. Lindqvist, H.M., et al., *Herring (Clupea harengus) intake influences lipoproteins but not inflammatory and oxidation markers in overweight men*. Br J Nutr, 2009. 101(3): p. 383-90.
76. Harris, W.S., et al., *Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: clinical and mechanistic perspectives*. Atherosclerosis, 2008. 197(1): p. 12-24.
77. Hagen, I.V., et al., *High intake of fatty fish, but not of lean fish, affects serum concentrations of TAG and HDL-cholesterol in healthy, normal-weight adults: a randomised trial*. Br J Nutr, 2016. 116(4): p. 648-57.

78. Mori, T.A., et al., *Effects of varying dietary fat, fish, and fish oils on blood lipids in a randomized controlled trial in men at risk of heart disease*. Am J Clin Nutr, 1994. 59(5): p. 1060-8.
79. Raatz, S.K., et al., *Twice weekly intake of farmed Atlantic salmon (Salmo salar) positively influences lipoprotein concentration and particle size in overweight men and women*. Nutr Res, 2016. 36(9): p. 899-906.
80. Pizzini, A., et al., *The Role of Omega-3 Fatty Acids in Reverse Cholesterol Transport: A Review*. Nutrients, 2017. 9(10).
81. Gerhard, G.T., et al., *Comparison of three species of dietary fish: effects on serum concentrations of low-density-lipoprotein cholesterol and apolipoprotein in normotriglyceridemic subjects*. Am J Clin Nutr, 1991. 54(2): p. 334-9.
82. Raatz, S.K., et al., *Dose-dependent consumption of farmed Atlantic salmon (Salmo salar) increases plasma phospholipid n-3 fatty acids differentially*. J Acad Nutr Diet, 2013. 113(2): p. 282-7.
83. Kim, O.Y., S.M. Lee, and W.S. An, *Impact of Blood or Erythrocyte Membrane Fatty Acids for Disease Risk Prediction: Focusing on Cardiovascular Disease and Chronic Kidney Disease*. Nutrients, 2018. 10(10).
84. Eckel, R.H., et al., *2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines*. J Am Coll Cardiol, 2014. 63(25 Pt B): p. 2960-84.
85. Hodson, L., C.M. Skeaff, and B.A. Fielding, *Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake*. Prog Lipid Res, 2008. 47(5): p. 348-80.
86. Marks, P.A., A. Gellhorn, and C. Kidson, *Lipid synthesis in human leukocytes, platelets, and erythrocytes*. J Biol Chem, 1960. 235: p. 2579-83.
87. Reed, C.F., *Phospholipid exchange between plasma and erythrocytes in man and the dog*. J Clin Invest, 1968. 47(4): p. 749-60.
88. Soupene, E., H. Fyrst, and F.A. Kuypers, *Mammalian acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(1): p. 88-93.
89. Fenton, J.I., et al., *Red blood cell PUFAs reflect the phospholipid PUFA composition of major organs*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2016. 112: p. 12-23.

90. Vidgren, H.M., et al., *Incorporation of n-3 fatty acids into plasma lipid fractions, and erythrocyte membranes and platelets during dietary supplementation with fish, fish oil, and docosahexaenoic acid-rich oil among healthy young men*. *Lipids*, 1997. 32(7): p. 697-705.
91. Cao, J., et al., *Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids*. *Clin Chem*, 2006. 52(12): p. 2265-72.
92. Harris, W.S., et al., *Omega-3 fatty acids in cardiac biopsies from heart transplantation patients: correlation with erythrocytes and response to supplementation*. *Circulation*, 2004. 110(12): p. 1645-9.
93. Fontes, J.D., et al., *Red blood cell fatty acids and biomarkers of inflammation: a cross-sectional study in a community-based cohort*. *Atherosclerosis*, 2015. 240(2): p. 431-6.
94. Dai, X.W., et al., *Erythrocyte membrane n-3 fatty acid levels and carotid atherosclerosis in Chinese men and women*. *Atherosclerosis*, 2014. 232(1): p. 79-85.
95. Dai, X.W., et al., *Association between n-3 polyunsaturated fatty acids in erythrocytes and metabolic syndrome in Chinese men and women*. *Eur J Nutr*, 2016. 55(3): p. 981-9.
96. Djousse, L., et al., *Plasma omega-3 fatty acids and incident diabetes in older adults*. *Am J Clin Nutr*, 2011. 94(2): p. 527-33.
97. Flock, M.R., et al., *Effects of supplemental long-chain omega-3 fatty acids and erythrocyte membrane fatty acid content on circulating inflammatory markers in a randomized controlled trial of healthy adults*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2014. 91(4): p. 161-8.
98. Hallund, J., et al., *The effect of farmed trout on cardiovascular risk markers in healthy men*. *Br J Nutr*, 2010. 104(10): p. 1528-36.
99. Yusof, H.M., E.A. Miles, and P. Calder, *Influence of very long-chain n-3 fatty acids on plasma markers of inflammation in middle-aged men*. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2008. 78(3): p. 219-28.
100. Duricic, I., et al., *Effect of Nutritionally Relevant Doses of Long-Chain N-3 Pufa on Lipid Status, Oxidative Stress and Inflammatory Markers in an Average Middle-Aged Serbian Population*. *J Med Biochem*, 2015. 34(3): p. 304-313.
101. Kondo, K., et al., *Effects of a fish-based diet on the serum adiponectin concentration in young, non-obese, healthy Japanese subjects*. *J Atheroscler Thromb*, 2010. 17(6): p. 628-37.

102. Giacco, R., et al., *Fish oil, insulin sensitivity, insulin secretion and glucose tolerance in healthy people: is there any effect of fish oil supplementation in relation to the type of background diet and habitual dietary intake of n-6 and n-3 fatty acids?* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2007. 17(8): p. 572-80.
103. Vandongen, R., et al., *Effects on blood pressure of omega 3 fats in subjects at increased risk of cardiovascular disease.* Hypertension, 1993. 22(3): p. 371-9.
104. Petrogianni, M., et al., *Additional benefit in CVD risk indices derived from the consumption of fortified milk when combined with a lifestyle intervention.* Public Health Nutr, 2014. 17(2): p. 440-9.
105. von Schacky, C., *The Omega-3 Index as a risk factor for cardiovascular diseases.* Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011. 96(1-4): p. 94-8.
106. Agren, J.J., et al., *Boreal freshwater fish diet modifies the plasma lipids and prostanoids and membrane fatty acids in man.* Lipids, 1988. 23(10): p. 924-9.
107. Nasopoulou, C., et al., *Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*).* Food Chem, 2011. 129(3): p. 1108-13.