ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « Χημεία Τροφίμων »

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη ως προς την Αθηροσκλήρωση των Βιολογικά Δραστικών Λιποειδών Συμβατικής Ιχθυοτροφής, Εμπλουτισμένης με Ελαιοπυρήνα Ιχθυοτροφής και Τσιπούρας Ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata)*

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΚΟΓΚΑΚΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ

ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Μελέτη ως προς την Αθηροσκλήρωση των Βιολογικά Δραστικών Λιποειδών Συμβατικής Ιχθυοτροφής, Εμπλουτισμένης με Ελαιοπυρήνα Ιχθυοτροφής και Τσιπούρας Ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata)*

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΓΚΟΓΚΑΚΗ

Α.Μ.: 0000052904

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ.Α.Δημόπουλος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Χ. Προεστός, Λέκτορας, ΕΚΠΑ

Ι. Ζαμπετάκης, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 30/11/2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας στο πλαίσιο του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης χωρίζεται σε δύο μέρη. Στο πρώτο μέρος απομονώθηκαν, με κατάλληλες μεθόδους εκχύλισης, τα ολικά πολικά λιποειδή από τον ιστό φιλέτου τσιπούρας ιχθυοτροφείου *(Sparus aurata),* που ελήφθησαν από τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε., τα οποία εν συνεχεία διαχωρίστηκαν με τη μέθοδο της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) κανονικής φάσης (NP-HPLC) και με ανιχνευτή υπεριώδους (UV) σε επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα. Τα κλάσματα αυτά μελετήθηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν ή να προκαλούν την συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού μέσω της δράσης του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), ένα δραστικό μεσολαβητή της φλεγμονής που θεωρείται ότι παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην πρόκληση των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, εντοπίστηκε ισχυρή συσσωρευτική δράση των τελευταίων κλασμάτων όπως αυτά συνεκλούστηκαν από την HPLC, γι'αυτό κρίθηκε απαραίτητος ο περαιτέρω καθαρισμός τους με HPLC αντίστροφης φάσης. Τα περαιτέρω καθαρισμένα λιποειδικά κλάσματα εξετάστηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να εκδηλώνουν ανασταλτική ή ανταγωνιστική δράση ως προς τον PAF, ενώ στο μέλλον μπορεί να επιτευχθεί ο προσδιορισμός της δομής τους με ESMS (Electro Spray Mass Spectometry) και χημικούς προσδιορισμούς (προσδιορισμός φωσφόρου/σακχάρων στα λιποειδή.)

Το δεύτερο μέρος της εργασίας ερευνά το κατά πόσο η τροφή με την οποία τρέφονται τα ψάρια ιχθυοτροφείου, μπορεί να αποκτήσει ενισχυμένη δράση μέσω του μερικού εμπλουτισμού της με δραστικά πολικά λιποειδή ελαιοπυρήνα. Για το λόγο αυτό, απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν με τις ίδιες μεθόδους, τα ολικά πολικά λιποειδή τόσο της εμπλουτισμένης όσο και της συμβατικής ιχθυοτροφής καθώς και του ελαιοπυρήνα και έγινε *in vitro* έλεγχος της ικανότητάς τους να προκαλούν ή να αναστέλλουν τη συσσώρευση αιμοπεταλίων σε μοντέλο πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έδειξαν σημαντικό βαθμό ενίσχυσης της καρδιοπροστατευτικής δράσης της ιχθυοτροφής μέσω της παρεμπόδισης του PAF, όταν εμπλουτίζεται με ελαιοπυρήνα κατά την παρασκευή της. Επιπλέον, τα πολικά λιποειδή της τσιπούρας που κατανάλωσε την ενισχυμένη με ελαιοπυρήνα ιχθυοτροφή, παρουσίασε σημαντικώς βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα έναντι της δράσης του PAF στη συσσώρευση αιμοπεταλίων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι βιολογικά

δραστικές ενώσεις του ελαιοπυρήνα μεταφέρθηκαν επιτυχώς στην τροφή και μετέπειτα στα ψάρια ύστερα από την κατανάλωσή της.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βελτίωση της Καρδιοπροστατευτικής Δράσης της Τσιπούρας Ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata).*

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ιχθυέλαια, ιχθυοτροφή, ελαιοπυρήνας, PAF, καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, τσιπούρα ιχθυοτροφείου.

ABSTRACT

Study of Biologically Active Lipids obtained from Conventional Fish Feed, Enriched with Pomace Oil Fish Feed and Gilthead Sea bream (*Sparus aurata)* against Atheroschlerosis

The purpose of this study consists of two parts: The first one is the isolation of total lipids of farmed Sea Bream (*Sparus aurata)* by the appropriate extraction methods and their separation to total polar and total neutral lipid fractions. Subsequently, the total polar lipid fractions were further separated by normal-phase High-performance Liquid Chromatography (HPLC) and then were tested *in vitro* for their ability to either induce platelet aggregation or inhibit the PAF induced washed rabbit platelet aggregation, who is considered to be the main cause of atherogenesis, in order to specify compounds with interesting biological activity. The fractions which showed the strongest aggregatoty activity were further separated by reverse-phase HPLC, so that be obtained potentially more highly purified polar lipid fractions. The biological property of these polar fractions was exanimated as above. The polar lipid fractions which showed the most remarkable aggragatory activity are able to be tested by chemical specifications and the application of Mass Spectrometry (MS) in order to determine their conceivable chemical structure.

The second part of this study comprises the effort of enrichment of fish feed which is used at aquacultures, by replace the fish oil with plant oil and especially with biological active polar lipids of olive pomace oil. The aim is to produce fish feed and consequently fishes with improved cardio-protective properties. For this reason, total polar lipids of both enriched and conventional fish feed were extracted and isolated by the same methods, as happened with the fish, and their biological activity to induce the PAF platelet aggregation was tested and compared. In this study, the enrichment of conventional aquaculture fish feed by replacing fish oils with OP was achieved and evaluates the notable improved bioactive properties of polar lipid fractions of enriched fish feed to induce the platelet aggregation which is caused by PAF-agonists, which indicates the successful transport of biological components of pomace olive oil to fish feed and consequently to fish flesh.

SUBJECT AREA: The Improvement of Cardioprotective properties of farmed Sea Bream (*Sparus aurata).*

KEYWORDS: Fish oil, fish feed, olive pomace, PAF, cardioprotective properties, sea bream.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης εκπονήθηκε την περίοδο 2009-2011 στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την περάτωσή της, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω ολόψυχα τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα, αντάλλαξα απόψεις και αγάπησα και με βοήθησαν να φτάσω ως εδώ. Πρώτα απ΄ όλα, ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιωάννη Ζαμπετάκη που στήριξε με υπομονή, δύναμη και θέληση την προσπάθειά μου στο δύσκολο και επίπονο δρόμο για την πραγματοποίηση και τη συγγραφή του έργου αυτού και με καθοδήγησε με σκοπό να φτάσουμε έως εδώ, δείχνοντας μου αστείρευτη εμπιστοσύνη. Παράλληλα, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο, που και αυτός με τη σειρά του αφιέρωσε πολύτιμο χρόνο στη διετή προσπάθειά μου, τις γνώσεις που μου μετέδωσε, το αμείωτο ενδιαφέρον και τη συμπαράσταση σε οποιαδήποτε δυσκολία συνάντησα στο δρόμο μου. Τους ευχαριστώ όμως και για το ανθρώπινο ενδιαφέρον που μου έδειξαν αφού με την ελπίδα και με το κουράγιο που μου μετέδιδαν καθημερινά, καταφέραμε όλοι μαζί να ξεπεράσουμε κάθε φύσης εμπόδια.

Επιθυμώ να εκφράσω επίσης τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Κωνσταντίνα Νασοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της, τις συμβουλές της και το αμείωτο ενδιαφέρον της κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης του περαματικού έργου της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τον Υποψήφιο Διδάσκορα Γεώργιο Σταματάκη για την συνεχή παρουσία του στην περάτωση της πειραματικής εργασίας, την μετάδοση γνώσεων και εμπειρίας αλλά και στην αντόχη που τον δίεκρινε το διάστημα αυτό που συνεργάστηκα μαζί του.

Πάνω απ΄όλα όμως ευχαριστώ την οικογένειά μου τόσο για την ηθική όσο και για την οικονομική υποστήριξή της, δίοτι χωρίς αυτούς τους μοναδικούς ανθρώπους στη ζωή μου δε θα είχα πάρει την απόφαση να κάνω ένα βήμα παραπέρα και να φτάσω ως εδώ.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η κύρια αιτία θανάτου στις χώρες του δυτικού κόσμου σήμερα αποτελούν τα καρδιαγγειακά νοσήματα, με το βαθμό θνησιμότητας να αυξάνεται ολοένα και περισσότερο. Είναι γεγονός ότι τα αυξημένα επίπεδα λιπιδίων στο αίμα, η παχυσαρκία και ο σακχαρώδης διαβήτης αποτελούν τους κύριους επιβαρυντικούς παράγοντοντες για την εμφάνιση των νοσημάτων αυτών, ενώ έχει επιστημονικά πλέον τεκμηριωθεί, πως σχετίζονται άμεσα με τις διατροφικές συνήθειες. Από τα παραπάνω, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η διατροφή παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην έναρξη, την εξέλιξη αλλά και την κλινική επιβάρυνση ή βελτίωση των νόσων που προσβάλλουν την καρδιά και τα συγγενή αιμοφόρα αγγεία, οι οποίες εμφανίζονται με διάφορες μορφές όπως το εγκεφαλικό επεισόδιο, η στεφανιαία νόσος, η καρδιακή ανεπάρκεια, η υπέρταση και η αθηροσκλήρωση. Συνεπώς, η διατροφή αποτελεί αδιαφιλονίκητα τον ακρογωνιαίο λίθο για την πρόληψη της εμφάνισής τους.

Πολλές μελέτες έχουν αναδείξει την προστατευτική δράση της μεσογειακής δίαιτας στην εμφάνιση στεφανιαίας νόσου και άλλων νοσημάτων, όπως για παράδειγμα ο καρκίνος. Αυτού του τύπου η διατροφή είναι πλούσια σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια, δημητριακά, ψάρι και γαλακτοκομικά προϊόντα, ενώ χαρακτηρίζεται από τη μέτρια κατανάλωση κρέατος. Επιπλέον, σαν κύρια πηγή λίπους χρησιμοποιείται το ελαιόλαδο. Μελέτες που έγιναν στον ελληνικό πληθυσμό, έδειξαν ότι η υιοθέτηση του μεσογειακού τύπου διατροφής μπορεί να μειώσει έως και 27% τον κίνδυνο εμφάνισης στεφανιαίας νόσου. Το διατροφικό αυτό πρότυπο κερδίζει τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο έδαφος καθώς αυξάνεται συνεχώς το πλήθος των μελετών που δείχνουν ότι οι κάτοικοι της Μεσογείου παρουσιάζουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής, ενώ ταυτόχρονα τα κρούσματα καρκίνου καθώς και καρδιακών παθήσεων εμφανίζονται σε πολύ μικρότερα ποσοστά ανθρώπων.

Αν και η κλινική εκδήλωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων συμβαίνει στη μέση ηλικία, οι βλάβες στο εσωτερικό τμήμα των αρτηριών κάνουν την εμφάνισή τους ήδη από την παιδική και εφηβική ηλικία, ενώ οι πρώτες αθηρωματικές βλάβες είναι δυνατόν να σχηματιστούν ακόμα και από την εμβρϋική ηλικία. Τα παιδιά που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν αθηροσκλήρωση κατά την ενήλικη ζωή τους, είναι εκείνα που εμφανίζουν μη φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων, και ιδιαίτερα όσα πάσχουν από παχυσαρκία, ένα φαινόμενο που γίνεται όλο και πιο συχνό.

Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας στρέφεται συνεχώς στην εύρεση, τη μελέτη και την ανάπτυξη των τροφίμων εκείνων που έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες καθώς και στη μελέτη του τρόπου δράσης τους. Όπως αναφέρεται στο μεγαλύτερο μέρος της βιβλιογραφίας, τα ψάρια, κύριο συστατικό της μεσογειακής δίαιτας κατέχουν υψηλή θέση ως προς την ιδιότητα τους να προστατεύουν έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον έχει διαπιστωθεί ότι η ισχυρή αυτή καρδιοπραστατευτική δράση οφείλεται στα λιποειδή που περιέχονται στον ιστό τους. Οι τελευταίες έρευνες έχουν ερμηνεύσει την αντιφλεγμονώδη και προστατευτική δράση μέσα από την εξής προσέγγιση σε δύο επίπεδα: α) Με έμμεσο τρόπο. Δηλαδή, η κατανάλωση ω-3 λιπαρων οξέων μεταβάλλει τη σύσταση των λιποειδών των μεμβρανών των κυττάρων που αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF), τον κύριο προφλεγμονώδη παράγοντα σε διάφορες παθήσεις, αναστέλλοντας δηλαδή τη παραγωγή του από τα κύτταρα, προστατεύοντας κατά συνέπεια τον οργανισμό από φλεγμονές που προκαλούν φθορά στο καρδιαγγειακό σύστημα. β) Με άμεσο τρόπο. Δηλαδή, επειδή περιέχει λιποειδή που αναστέλλουν την δράση αλλά και την βιοσύνθεση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).

Τα παραπάνω, αποτέλεσαν το επίκεντρο του ενδιαφέροντος της ερευνητικής μας ομάδας και το έναυσμα για να εργαστούμε πάνω στις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των λιπαρών ψαριών, και συγκεκριμένα της τσιπούρας ιχθυοτροφείου, κάνοντας ένα βήμα επιπλέον για την κατανόηση και διαλεύκανση του τρόπου δράσης των συστατικών τους, που τα καθιστά τόσο σημαντικά και ισχυρά όπλα για την προστασία της καρδιάς και γενικότερα της υγείας του ανθρώπινου οργανισμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ

1.1. Εισαγωγή

Ολοένα και περισσότερες μελέτες ανά τον κόσμο, έρχονται να επιβεβαιώσουν πως οι άνθρωποι που ακολουθούν τη μεσογειακή δίαιτα ζουν περισσότερο από άλλους λαούς[1]. Η μεσογειακή δίαιτα δεν είναι ένα ειδικό διαιτητικό σχήμα ή πρόγραμμα, αλλά ένα σύνολο διατροφικών συνηθειών που ακολουθούνται παραδοσιακά από τους ανθρώπους της περιοχής της Μεσογείου. Υπάρχουν τουλάχιστον 16 χώρες που οριοθετούν τη Μεσόγειο και οι διατροφικές συνήθειες ποικίλλουν μεταξύ αυτών των χωρών, ανάλογα με τον πολιτισμό, την εθνικότητα και τη θρησκεία. Υπάρχουν, όμως, ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά για όλους αυτούς τους λαούς[2].

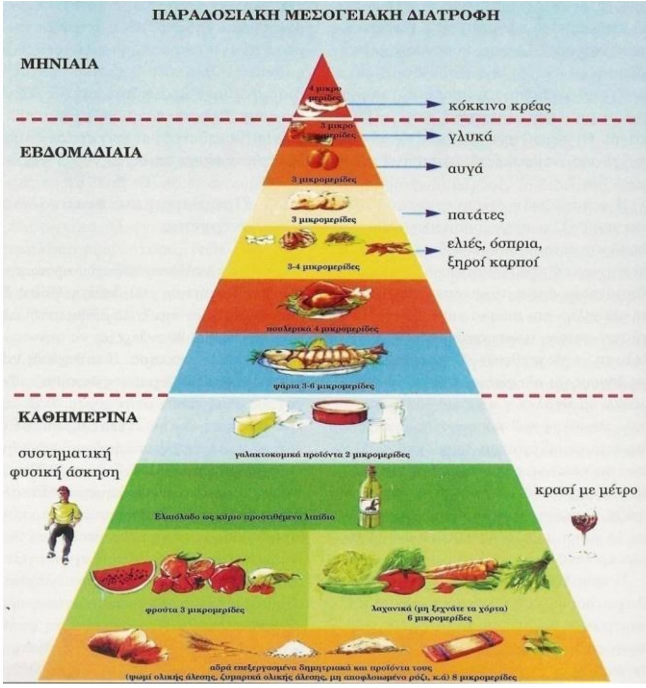
- Ο υψηλός λόγος μονοακόρεστου / κορεσμένου λίπους
- Μέτρια κατανάλωση αλκοόλ
- Υψηλή κατανάλωση οσπρίων
- Υψηλή κατανάλωση δημητριακών (συμπεριλαμβάνοντας το ψωμί)
- Κατανάλωση ψαριών σε εβδομαδιαία βάση
- Υψηλή κατανάλωση φρούτων και λαχανικών
- Χαμηλή κατανάλωση κρέατος και των προϊόντων του
- Μέτρια κατανάλωση γάλακτος και των προϊόντων του

Η μεσογειακή δίαιτα έχει πλέον καθιερωθεί ως πρότυπο υγείας και διατροφής σε όλες τις χώρες, αφού αποδεδειγμένα ασκεί σημαντική επίδραση στη βελτίωση και διατήρηση της υγείας, δίνοντας έμφαση κυρίως στο ρόλο της στην πρόληψη διάφορων εκφυλιστικών και καρδιαγγειακών νοσημάτων[3] .

Έρευνες που έχουν γίνει διεθνώς, χαρακτηρίζουν την Κρήτη ως το καλύτερο και πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα μεσογειακής διατροφής. Αφού διαπίστωσαν πως οι κάτοικοι του νησιού έχουν το μικρότερο σε παγκόσμια κλίμακα ποσοστό θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα, οι επιστήμονες άρχισαν να αναζητούν την ταυτότητα της διατροφής που χάριζε και χαρίζει στους Κρητικούς αυτά τα εξαιρετικά ποσοστά καλής υγείας.

Σε μια πρόσφατη έρευνα[1] βαθμολογήθηκαν οι δίαιτες περισσότερων των 22.000 ανθρώπων που ζουν στην Ελλάδα, σύμφωνα με το κατά πόσο ακολουθούν την παραδοσιακή ελληνική μεσογειακή διατροφή. Κατά τη διάρκεια των 4 ετών της μελέτης διαπιστώθηκε το εξής: όσο πιο πιστά ακολουθούσαν οι άνθρωποι την παραδοσιακή μεσογειακή δίαιτα, τόσο λιγότερες πιθανότητες είχαν να πεθάνουν από καρδιακές παθήσεις ή καρκίνο, με ελαφρώς μεγαλύτερη προστασία απέναντι στις καρδιακές παθήσεις απ' ότι στον καρκίνο. Συνολικά, οι άνθρωποι που ακολουθούσαν τη μεσογειακή δίαιτα ήταν κατά 25% λιγότερο πιθανό να πεθάνουν κατά τη διάρκεια της μελέτης σε σχέση με εκείνους που δεν την ακολουθούσαν, γεγονός που υποδεικνύει ότι αυτοί που ακολουθούν στενά το μεσογειακό πρότυπο διατροφής έχουν μεγαλύτερο προσδόκιμο ζωής σε σχέση με εκείνους που δεν το ακολουθούν .

Δεδομένου ότι οι στατιστικές θνησιμότητας έδειξαν ότι οι μεσογειακοί πληθυσμοί ζούσαν περισσότερο από τους άλλους Ευρωπαίους, οι επιστήμονες έχουν προσπαθήσει να ανακαλύψουν σε ποιά συστατικά της μεσογειακής δίαιτας οφείλονται τα ιδιαίτερα πλεονεκτήματά της. Παρακάτω, παρατίθενται μερικά από τα συστατικά της μεσογειακής δίαιτας (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1. Πυραμίδα της μεσογειακής δίαιτας. Αναπτύχθηκε από τον οργανισμό “Oldways Preservation and Exchange Trust” και τη σχολή δημόσιας υγείας του Παν/μιου Harvard, με βάση την παραδοσιακή μεσογειακή δίαιτα. Παρουσιάστηκε στα πλαίσια του Διεθνούς συνεδρίου δίαιτες της Μεσογείου (International Conference on the Diet of the Mediterranean), 1993.

1.2. Ο Ρόλος της Μεσογειακής Δίαιτας στην Πρόληψη Καρδιαγγειακών Ασθενειών

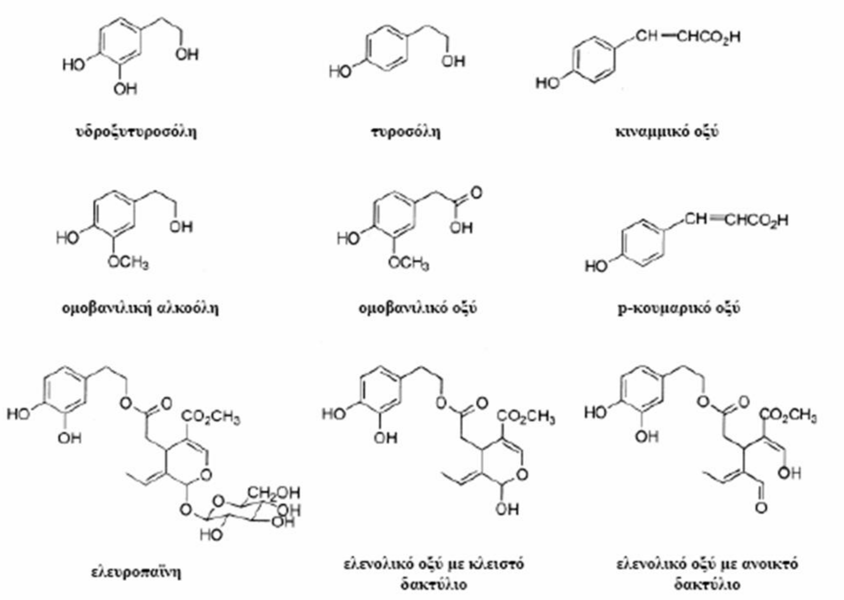
Τα καρδιαγγειακά νοσήματα και τα εγκεφαλικά επεισόδια αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου και αναπηρίας στις Ηνωμένες Πολιτείες και η επικράτηση των ασθενειών αυτών συνεχίζει να αυξάνεται σε παγκόσμια βάση. Από τότε που οι ερευνητές, Brown και Goldstein[4] είχαν αναφέρει την επίδραση των επιπέδων της χοληστερόλης στο πλάσμα για την αθηρωματική διαδικασία, υπήρξε παγκόσμιο ενδιαφέρον για τα επίπεδα της χοληστερόλης που μεταβάλλονται από τη δίαιτα και άλλες συμπεριφορές στον τρόπο ζωής και στη συνέχεια πώς αυτό επιδρά στην εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Πειραματική μελέτη απέδειξε πως οι διατροφικές συνήθειες μπορεί να έχουν επιπτώσεις στους μηχανισμούς δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας και στην εξέλιξη της θρόμβωσης[5] . Και οι δύο επιδημιολογικές μελέτες καθώς και άλλες κλινικές μελέτες, έχουν δείξει ότι ένας σημαντικός αριθμός των περιπτώσεων της στεφανιαίας νόσου μπορεί να προληφθεί με κατάλληλες παρεμβάσεις. Αν και η ευεργετική επίδραση της μείωσης της χοληστερόλης της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL-C) και των τριγλυκεριδίων (TG) με φαρμακευτική θεραπεία[6] έχει τεκμηριωθεί, ωστόσο κάποιες τροποποιήσεις στον τρόπο ζωής, διατροφικές παρεμβάσεις, καθώς και ο έλεγχος των άλλων γνωστών παραγόντων κινδύνου, αποτελούν βασικές συνιστώσες της θεραπείας και της πρόληψης.

Η Αμερικάνικη Ένωση Καρδιάς (AHA-American Heart Association) έχει προτείνει τη μεσογειακή δίαιτα, ως συστατικό της θεραπείας για ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο στεφανιαίων καρδιαγγειακών παθήσεων[7]. Κυριότερες συνιστώσες της δίαιτας αυτής είναι η μείωση του ποσοστού των διατροφικών θερμίδων προερχόμενες από λίπος και ιδιαίτερα μείωση σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη. Υπάρχουν επίσης ειδικές συστάσεις για την αύξηση της πρόσληψης φρούτων, λαχανικών, καθώς και δημητριακών.

Σήμερα, επειδή όλο και περισσότερο γίνεται αποδεκτή η άποψη ότι η γενεσιουργός αιτία της αθηρωμάτωσης είναι ο φλεγμονώδης Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF-Platelet Activating Factor), αναζητούνται συνεχώς αναστολείς του PAF σε τρόφιμα που συμπεριλαμβάνονται στη μεσογειακή δίαιτα, αφού αυτή παίζει προστατευτικό ρόλο στη δημιουργία της αθηρωμάτωσης.

1.3. Ο Ρόλος του Ελαιολάδου στην Αθηροσκλήρωση

Το τρόφιμο που έχει μελετηθεί και συνεχίζει να προσελκύει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας επιστημονικής κοινότητας, σαν κύριο συστατικό της μεσογειακής δίαιτας, είναι το **ελαιόλαδο[8].** Η κατανάλωσή του ως κύρια πηγή λιπαρής ύλης στις Μεσογειακές χώρες έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα καρδιαγγειακών παθήσεων**.** Σε *in vivo* πρότυπα πρώιμης αθηροσκλήρωσης που βασίζονται στην ενεργοποίηση ενδοθηλιακών κυττάρων μέσω κυτταροκινών, έχει παρατηρηθεί ότι η ενσωμάτωση του ελαϊκού οξέος στα ολικά λιποειδή των κυττάρων, συνοδεύεται με μειωμένη έκφραση μορίων προσκόλλησης στα ενδοθηλιακά κύτταρα, τα οποία εμπλέκονται στα αρχικά στάδια της αθηροσκλήρωσης[9]. Ωστόσο, πολλοί ερευνητές αμφισβήτησαν την άποψη πως η ευεργετική δράση του ελαιολάδου οφείλεται στο ελαϊκό οξύ αφού είναι ένα από τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα στα πουλερικά και στο χοιρινό κρέας, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα, να μην αποτελεί αυτό την ειδοποιό διαφορά μεταξύ του μεσογειακού και του δυτικού διατροφικού προτύπου, ενώ διάφορα είδη σπορελαίων είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA's) και είναι διαθέσιμα στην αγορά, όπως σογιέλαιο, ηλιέλαιο και σιναπέλαιο. Έτσι, η αρχική γνώμη ότι το ελαϊκό οξύ είναι το ευεργετικό συστατικό του ελαιολάδου αναθεωρείται και αυτή τη στιγμή τα περισσότερα στοιχεία προσδίδουν την θετική του επίδραση σε άλλες βιολογικά δραστικές ουσίες που περιέχονται σε πολύ μικρές ποσότητες στο ελαιόλαδο, όπως οι φαινολικές ενώσεις



Εικόνα 1.2. Τα κυριότερα φαινολικά συστατικά του ελαιολάδου.

(Εικόνα 1.2). Πράγματι έχουν βρεθεί λιποειδικής φύσης ενώσεις που εμφανίζουν *in vitro* (σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού) σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του PAF (σαν αναστολείς ή ανταγωνιστές). Ίδιες ενώσεις έχουν πιστοποιηθεί και στον ελαιοπυρήνα. Παρουσία παρόμοιων ενώσεων διαπιστώθηκαν και στα σπορέλαια, αλλά σε ελάχιστες ποσότητες σε σχέση με το ελαιόλαδο[10]. Επιπλέον, η δομή των κυριοτέρων από τις βιολογικά δραστικές αυτές ενώσεις από τις παραπάνω πηγές έχουν μελετηθεί και διαλευκανθεί. Όμοια βιολογική δραστικότητα με αυτή του ελαιολάδου ανιχνεύτηκε στην τάξη των ολικών πολικών λιποειδών του ελαιολάδου όπου ανιχνεύτηκε βιολογική δραστικότητα μέσω αναστολή του PAF, στο μοντέλο των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. Τα κυριότερα φαινολικά παράγωγα του ελαιολάδου είναι η τυροσόλη, η υδροξυτυροσόλη (HT), η ελευροπαΐνη (OE), το καφεϊκό οξύ (CA), το βανιλικό οξύ (VA), το συριγκικό οξύ (SA), το p-κουμαρικό οξύ (p-CuA), το o-κουμαρικό οξύ (o-CuA), το προτοκατεχικό οξύ, το 4-υδροξυβενζοϊκό οξύ, το 4-υδροξυφαινυλοξικό οξύ και 3,4 διυδροξυφαινυλοξικό οξύ[11]. Από τα φαινολικά παράγωγα, η απλή φαινόλη HT και το πολύπλοκο παράγωγο OE (που προκύπτει από εστεροποίηση HT με ελενολικό οξύ) φαίνονται να είναι τα πιο σημαντικά συστατικά, όσον αφορά τη δραστικότητα και τη φαρμακολογική τους δράση[12].

Συνοψίζοντας, η ευεργετική επίδραση του ελαιολάδου στην υγεία οφείλεται και στην περιεκτικότητά του σε μικροσυστατικά, τα οποία επιδεικνύουν σημαντική βιολογική δράση, παρά το γεγονός ότι απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες[13]. Η σημασία των βιοδραστικών μικροσυστατικών του ελαιολάδου στην αθηροσκλήρωση έχει επισημανθεί από μελέτες που δείχνουν ότι άλλα συστατικά εκτός των MUFA's μπορεί να επιδεικνύουν αντιαθηρογενετικές ιδιότητες. Αυτές οι ιδιότητες οφείλονται στις αντιοξειδωτικές τους δράσεις που προστατεύουν την LDL-C από την οξείδωση ή από τις απευθείας αντιφλεγμονώδεις δράσεις τους στο ενδοθήλιο ή ακόμα στην υπολιπιδαιμική ή υποτασική τους δράση. Στον όρο «βιοδραστικά μικροσυστατικά» συμπεριλαμβάνονται τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά, οι βιταμίνες, τα φαινολικά συστατικά, και άλλα λιποειδικά μικροσυστατικά. Για να αποδειχτεί η συνεισφορά αυτών των μικροσυστατικών στον ευεργετικό ρόλο της μεσογειακής δίαιτας, πρέπει να εξεταστεί περαιτέρω η εμπλοκή τους σε κάθε παθολογική κατάσταση[20] .

Τα μικροσυστατικά του ελαιολάδου αποτελούν περίπου το 1–2% του συνολικού περιεχομένου του παρθένου ελαιολάδου[20]. Μετά τη σαπωνοποίηση του ελαιολάδου το μη-σαπωνοποιημένο κλάσμα που απομένει περιέχει μικροσυστατικά συμπεριλαμβανομένων υδρογονανθράκων (όπως το σκουαλένιο και το β-καροτένιο), τοκοφερόλες (όπως η α-τοκοφερόλη), λιπαρές αλκοόλες, τριπενικές αλκοόλες (όπως η ερυθροδιόλη και η ουβαόλη), τριπενικά οξέα (όπως το ελαϊνολικό και το μασλινικό οξύ), άλλα τερπενικά συστατικά, στερόλες (όπως η β-σιτοστερόλη, η καμπερστερόλη και οι 4-μεθυλεστερόλες) και χρωστικές ουσίες (όπως οι χλωροφύλλες και οι φαιοφυτίνες). Άλλα μικροσυστατικά του ελαιολάδου είναι τα πολύ καλώς μελετημένα φαινολικά συστατικά, όπως οι ελεύθερες γλυκανών ελευρωπαΐνη, τα σεκοϊριδοειδή της τυροσόλης και υδροξυ-τυροσόλης, άλλες φαινόλες, κηροί, στερολικοί εστέρες, μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, φωσφατίδια, ασυνήθιστα γλυκερο-γλυκολιποειδή, και άλλα μη ταυτοποιημένα συστατικά. Πράγματι μετά από μελέτες, διαπιστώθηκε ότι το ελαιόλαδο περιέχει ενώσεις, λιποειδικής φύσης, που εμφανίζουν *in vitro* (σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού) σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του PAF (σαν αναστολείς ή ανταγωνιστές)[14] . Αυτές οι βιολογικά δραστικές ενώσεις περιέχονται στο ελαιόλαδο σε πολύ μικρές ποσότητες και ο ισχυρότερος αναστολέας του PAF που απαντάται στο ελαιόλαδο απομονώθηκε, μελετήθηκε και βρέθηκε η χημική του δομή[22]. Παρόμοιες βιολογικά δραστικές ενώσεις διαπιστώθηκαν και στα σπορέλαια, αλλά σε ελάχιστες ποσότητες σε σχέση με το ελαιόλαδο, λόγω της διαδικασίας εξευγενισμού που υφίστανται σε σχέση με το ελαιόλαδο[10]. Συγκεκριμένα κατά τον εξευγενισμό απομακρύνονται αντιοξειδωτικά και βιολογικά δραστικά λιποειδή, πολλά από τα οποία δρουν ως αναστολείς του PAF, με αποτέλεσμα να χάνεται η ευεργετική δράση αυτών των ελαίων.

Σε επιδημιολογική μελέτη που έγινε σε υγιείς εθελοντές για να καθοριστεί η επίδραση του ελαιολάδου στην ολική χοληστερόλη του πλάσματος και στη χοληστερόλη της λιποπρωτείνης υψηλής πυκνότητας (HDL-C), διαπιστώθηκε ότι το ελαιόλαδο όταν αντικαταστήσει κορεσμένα λιπαρά που καλύπτουν ποσοστό ενέργειας ίσο με 12% δεν επηρεάζει τα επίπεδα της HDL-C ενώ μειώνει την ολική χοληστερόλη του πλάσματος[15].

1.4. Ψάρια και Ιχθυέλαια

Τα ψάρια και τα ιχθυέλαια, βασικά συστατικά της μεσογειακής διατροφής, αποτελούν βασική πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και κυρίως του εικοσιδιεξαενοϊκού (DHA, C22:6) και του εικοσιπενταενοϊκού οξέος (EPA, C20:5) τα οποία περιέχονται στα λιποειδή θαλασσινών σε συγκεντρώσεις 10-100 φορές μεγαλύτερη από κάποια φρούτα, λαχανικά, καρύδια, λιναρόσπορο κ.α.[16] .

Σύμφωνα με μελέτες, τα λιποειδή των ψαριών έχουν προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων[17], της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του καρκίνου, του διαβήτη τύπου II, της κατάθλιψης και της σχιζοφρένειας.

Το λίπος των ψαριών αποτελείται από τριακυλογλυκερόλη, ελεύθερα λιπαρά οξέα (f-FA), χοληστερόλη καθώς και από φωσφολιποειδή, όπως φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη (PI), φωσφατιδυλοσερίνη (PS), σφιγγομυελίνη (SM), φωσφατιδικό οξύ και καρδιολιπίνη (CARD)[18].

Σημαντικός αριθμός μελετών, επιδημιολογικών και κλινικών, έχουν γίνει όσον αφορά στο ρόλο που παίζουν τα ψάρια και τα ιχθυέλαια, ως συστατικά της διατροφής του ανθρώπου, στην αθηρογένεση. Μια αντιπροσωπευτική επιδημιολογική μελέτη είναι αυτή που διεξήγαγαν οι Δανοί ερευνητές Bang και Dyerberg[19], οι οποίοι τη δεκαετία του 70 διαπίστωσαν ότι οι Εσκιμώοι της Γροιλανδίας εμφάνισαν μειωμένη θνησιμότητα από καρδιαγγειακές παθήσεις, παρά το γεγονός ότι η διατροφή τους ήταν πλούσια σε λίπη, αφού αποτελούνταν κυρίως από ψάρια, φώκιες και φάλαινες. Η μειωμένη εμφάνιση καρδιαγγειακών παθήσεων, η περιορισμένη συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και ο παρατεταμένος χρόνος πήξης του αίματος των Εσκιμώων της Γροιλανδίας, αποδίδονται στην υψηλή κατανάλωση ιχθυελαίων, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι τα ιχθυέλαια έχουν υπολιπιδαιμικές επιδράσεις, δηλαδή έχουν την ικανότητα να ελαττώνουν τα λιποειδή, καθώς και αντιαθηρογενετικές επιδράσεις.

Μια επίσης σημαντική μελέτη διεξήχθη από την ερευνήτρια Cristine Albert[20] σε άντρες γιατρούς ηλικίας 40-48 ετών, χωρίς να έχουν ιστορικό καρδιαγγειακών παθήσεων και καρκίνου και συμμετείχαν στην Psysician's Health Study. Η μελέτη διήρκησε 17 χρόνια συσχετίζοντας τη συχνότητα κατανάλωσης ψαριού με τον κίνδυνο αιφνίδιου θανάτου από καρδιακή πάθηση. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι μετρώντας τα επίπεδα των ω-3 λιπαρών οξέων των ψαριών, δηλαδή του EPA και του DHA, στο αίμα των συμμετεχόντων, τα αυξημένα επίπεδα τους σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο αιφνίδιου θανάτου από καρδιαγγειακές παθήσεις.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η διατροφή του ανθρώπου με ιχθυέλαια έχει υποτριγλυκεριδαιμική δράση, δηλαδή έχει την ικανότητα να ελαττώνει τις τριακυλογλυκερόλες στο αίμα, να μειώνει την πίεση του αίματος σε υπερτασικούς καθώς και το ιξώδες του αίματος, προτείνοντας ότι τα ιχθυέλαια έχουν αντιαθηρογενετικές ιδιότητες[21].

Μια σημαντική κλινική μελέτη, που διήρκησε δύο χρόνια, είναι η μελέτη DART[22] (Diet And Reinfraction Trial) στην οποία πήραν μέρος 2033 άντρες με πρόσφατο έμφραγμα του μυοκαρδίου, έδειξε ότι οι ασθενείς που κατανάλωναν δύο γεύματα ψαριού την εβδομάδα ή κάψουλες ιχθυελαίου, που αντιστοιχούν σε 1,5 g ψαριού/ ημέρα, εμφάνισαν σχετική μείωση της ολικής θνησιμότητας κατά 29%, η οποία οφειλόταν κυρίως στη μείωση των θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις.

Άλλη *in vivo* μελέτη που βρίσκεται σε συμφωνία με τις προηγουμένες κλινικές μελέτες για τα οφέλη των ιχθυελαίων στην αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων, είναι της Nasopoulouu et al[23]. Ειδικότερα, κουνέλια τα οποία τρέφονταν για 45 μέρες με αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη με πολικά λιποειδή τσιπούρας, εμφάνισαν σε σημαντικό βαθμό μειωμένο πάχος και έκταση της αθηρωματικής πλάκας, σε σχέση με τα ζωικά πρότυπα που τρέφονταν μόνο με αθηρογόνο δίαιτα, καθώς και αναστολή της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας κατά 75% ως προς το πάχος της βλάβης και 73% ως προς την έκταση της βλάβης.

Τέλος, τα ψάρια και τα θαλασσινά, δίνουν στον οργανισμό πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, πιο εύπεπτες από αυτές των θηλαστικών. Ενδεικτικά, 100 g από οποιοδήποτε σχεδόν ψάρι, προσφέρει περίπου το 1/3 της συνιστώμενης ημερήσιας ποσότητας πρωτεϊνών για έναν υγιή ενήλικα. Αποτελούν σημαντική πηγή λυποδιαλυτών βιταμινών, κυρίως βιταμίνης A, που έχει άμεση σχέση με την όραση αφού συμβάλλει στη φυσιολογική λειτουργία των ματιών, βιταμίνης D, υπεύθυνη για την αύξηση και τον εμπλουτισμό των οστών και των δοντιών αλλά και της απορρόφησης ασβεστίου, φωσφόρου και βιταμίνης E. Παρέχουν επίσης βιταμίνες του συμπλέγματος B (B1, B2, νιασίνη, B12), σημαντικές για το μεταβολισμό των υδατανθρακών, την υγεία των ερυθρών αιμοσφαιρίων και τη σωστή λειτουργία του νευρικού συστήματος. Όσον αφορά στα μεταλλικά στοιχεία, τα ψάρια αποτελούν μια καλή πηγή Ca, P, ιωδίου, απαραίτητο για την ομαλή λειτουργία του θυρεοειδούς αδένα, σιδήρου απαραίτητο για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης, μαγνησίου, ψευδαργύρου που είναι συστατικό πολλών ενζύμων, μαγγανίου, που συμμετέχει σε πολλές μεταβολικές αντιδράσεις, καλίου που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του μυϊκού και νευρικού συστήματος καθώς και σεληνίου που έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση .

Όπως φαίνεται από τις παραπάνω επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες, τα ψάρια είναι τροφή πολύτιμη σε βιολογική και διατροφική αξία και κατέχουν σημαντική θέση στη διατροφική πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής, με μέτρια κατανάλωση εβδομαδιαίως.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Η ΕΛΙΑ

2.1. Εισαγωγή

Η ελιά ή ελαιόδενδρο (επιστ. *Ελαία*, *Olea*) είναι γένος καρποφόρων δέντρων των Ελαιοειδών (Oleaceae), το οποίο καρποφορεί στην Ελλάδα και γενικότερα στις χώρες της Μεσογείου. Από τον καρπό της, πολύ βασικός για τη μεσογειακή διατροφή, παράγεται το ελαιόλαδο. Η ελιά είναι γνωστή από τους αρχαιότατους χρόνους, και πιθανότατα κατάγεται από το χώρο της ανατολικής Μεσογείου. Ευδοκιμεί σε κλίματα εύκρατα, που δεν επικρατούν ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας (με μέση ετήσια θερμοκρασία 16^oC) και υγρασίας, γι'αυτό είναι ευρύτατα διαδεδομένη στη μεσογειακή ζώνη.

2.2. Χημική Σύνθεση Ελαιοκαρπού

Ο καρπός της ελιάς είναι δρύπη, σφαιρικού ή ελλειψοειδούς σχήματος και χωρίζεται σε δύο κύρια μέρη: στο περικάρπιο και στο ενδοκάρπιο (πυρήνας). Το περικάρπιο αποτελείται από το εξωκάρπιο ή μεμβράνη, που καλύπτει το 1,5 - 3,5% του βάρους του καρπού και το μεσοκάρπιο ή σάρκα, που περιέχει ιστούς πλούσιους σε λάδι και νερό και καλύπτει το 70-90% του βάρους του καρπού, αντίστοιχα. Το ενδοκάρπιο ή πυρήνας αποτελείται από σκληρό ξυλώδες περίβλημα και το ενδοσπέρμιο. Το περίβλημα φέρει επιπόλαιες ή βαθιές γλυφές, που αποτελούν κριτήριο για τον χαρακτηρισμό των διαφόρων ποικιλιών. Το ενδοσπέρμιο περιβάλλεται από λεπτή και ελαστική μεμβράνη και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνη και λάδι.

2.3. Η Καλλιέργεια της Ελιάς

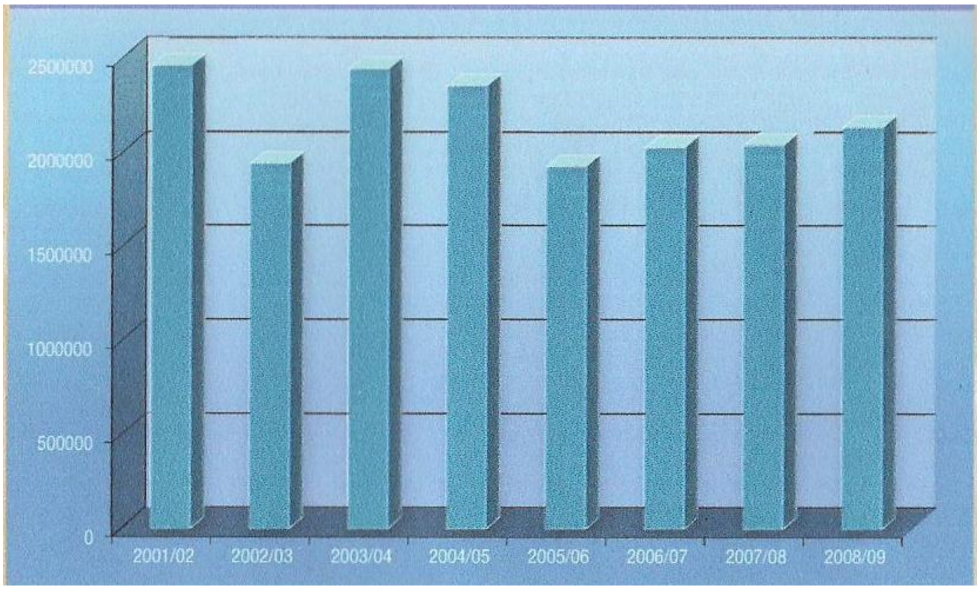
Η φύτευση της ελιάς δεν θα πρέπει να γίνεται σε περιοχές στις οποίες η θερμοκρασία πέφτει συχνά κάτω από –5^oC. Η ζημιά στα δένδρα είναι σοβαρή και οφείλεται τόσο σε χειμωνιάτικους όσο και ανοιξιάτικους παγετούς. Η ελιά παθαίνει επίσης ζημιά όταν επικρατεί ξηρός αέρας, κατά την περίοδο της ανθοφορίας και της καρπόδεσης. Επίσης σε περιοχές κλειστές, μη αεριζόμενες, με υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία, ευνοούνται οι ασθένειες όπως π.χ. το κυκλοκόν. Ένα ακόμη στοιχείο για την επιλογή της περιοχής, θα πρέπει να είναι η ύπαρξη ελαιοτριβείων ή εργοστασίων επεξεργασίας της επιτραπέζιας ελιάς. Η επιλογή της τοποθεσίας θα πρέπει να λαμβάνει υπόψη και το ύψος των ετησίων βροχοπτώσεων. Έτσι, σε περιοχές με λίγες βροχοπτώσεις (200-300 χιλιοστά), η απόδοση της ελιάς είναι ικανοποιητική μόνο σε εδάφη με καλή ικανότητα συγκράτησης του νερού, εκτός αν υπάρχει δυνατότητα άρδευσης. Σε περιοχές με αρκετές βροχοπτώσεις (400-600 χιλιοστά) η απόδοση είναι ικανοποιητική σε όλα σχεδόν τα εδάφη, με την προϋπόθεση ότι εξασφαλίζεται καλή στράγγιση του εδάφους, γιατί η ελιά είναι ευαίσθητη στην υπερβολική εδαφική υγρασία.

Πριν την εγκατάσταση του νέου ελαιώνα θα πρέπει να γίνεται δειγματοληψία και ανάλυση του εδάφους. Με βάση τα αποτελέσματα, γίνεται φωσφορική και καλιούχος λίπανση σε όλη την έκταση πριν τη φύτευση. Το άζωτο αποτελεί για την ελιά το σπουδαιότερο στοιχείο και επηρεάζει άμεσα τόσο τη βλάστηση όσο και την καρποφορία της. Έμμεσα, μπορεί να επηρεάσει και το βαθμό παρενιαυτοφορίας των δένδρων. Η αντίδραση των ελαιόδενδρων στη χορήγηση αζώτου είναι ιδιαίτερα εμφανής σε εδάφη χαμηλής γονιμότητας και όταν η εδαφική υγρασία δεν αποτελεί έντονο περιοριστικό παράγοντα. Όσον αφορά στο κάλιο, η ελιά είναι ιδιαίτερα απαιτητική στο στοιχείο αυτό. Είναι γνωστό ότι σε χρονιές υψηλής παραγωγής μεγάλες ποσότητες καλίου απομακρύνονται με το συγκομιζόμενο ελαιόκαρπο και το κλάδεμα. Η φύτευση των δενδρυλλίων στις ήπιες περιοχές γίνεται το Νοέμβριο-Δεκέμβριο και στις ψυχρότερες περιοχές το Φεβρουάριο-Μάρτιο, αφού παρέλθει ο κίνδυνος παγετού και οπωσδήποτε πριν αρχίσει η νέα βλάστηση των δενδρυλλίων.

Η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιείται συνήθως με το χέρι ή μηχανικά. Το παραδοσιακό σύστημα συγκομιδής γίνεται με ραβδισμό. Αυτή η μέθοδος έχει καλή απόδοση, αλλά μαζί με τον καρπό ρίχνει και πολλά φύλλα, σπάζει τους τρυφερούς βλαστούς και τραυματίζει το δένδρο. Μια άλλη μέθοδος είναι η "φυσική πτώση", στην οποία οι καρποί συγκομίζονται άμεσα από το έδαφος, μετά τη φυσική πτώση τους στα δίχτυα. Αυτή η μέθοδος προτιμάται όταν τα δένδρα είναι μεγάλου ύψους και υπάρχει μικρό εργατικό δυναμικό διαθέσιμο. Η συγκομιδή με το χέρι μπορεί να βελτιωθεί χρησιμοποιώντας μηχανοκίνητα ελαιοραβδιστικά μηχανήματα. Αποτελούνται από έναν τηλεσκοπικό άξονα (μήκους 2,50–3 m) στην άκρη του οποίου υπάρχει περιστρεφόμενος κύλινδρος με πλαστικά μαστίγια ή εξάρτημα με πλαστικά δάκτυλα σε διάταξη παλάμης[24-26].

Η παγκόσμια παραγωγή της ελιάς αυξάνεται κατά μέσο όρο 11% ετησίως από το 1995. Οι διακυμάνσεις στην παραγωγή οφείλεται τόσο σε διακυμάνσεις του κλίματος στις εκάστοτε χώρες παραγωγής, όσο και στο φαινόμενο παρενιαυτοφορία, ένα χαρακτηριστικό του ελαιοδέντρου όπου η παραγωγή του επόμενου έτους είναι χαμηλότερη από εκείνη του προηγούμενου. Παρόλα αυτά, τα ποσοστά παραγωγής αυξάνονται και το Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου είχε προτείνει να μειωθεί το ποσοστό των νέων καλλιεργούμενων εκτάσεων μετά το έτος 2005, διαφορετικά θα υπάρξει παγκόσμιο πλεόνασμα ελαιολάδου.

Σχήμα 2.1. Συνολική ετήσια παραγωγή ελαιολάδου στην Ε.Ε. σε τόνους. (Διεθνές Συμβούλιο Ελαιολάδου).



Η βιομηχανία ελαιολάδου είναι σημαντικής σπουδαιότητας για την οικονομία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και αποτελεί έναν από τους μεγαλύτερους μεταποιητικούς τομείς[66].

2.4. Ελαιοτρίβιση

2.4.1. Τόπος Εγκατάστασης του Ελαιοτριβείου

Τα ελαιοτριβεία πρέπει να είναι εγκατεστημένα μακριά από περιβαλλοντικά μολυσμένες περιοχές ή περιοχές όπου πραγματοποιούνται βιομηχανικές δραστηριότητες, οι οποίες δημιουργούν σοβαρό κίνδυνο επιμόλυνσης του ελαιοκάρπου και του ελαιολάδου καθώς επίσης και μακριά από περιοχές που κινδυνεύουν από πλημμύρες, εκτός εάν λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα προφύλαξης. Πρέπει να είναι εγκατεστημένα σε περιοχή η οποία είναι αρκετά μεγάλη σε έκταση και βρίσκεται σε κατάλληλο μέρος, ώστε να διασφαλίζεται η κατάλληλη αποθήκευση και διαχείριση των υγρών αποβλήτων και του ελαιοπυρήνα, προκειμένου να αποφεύγεται η μόλυνση του εδάφους και η εναπόθεση των εν λόγω υποπροϊόντων σε υδάτινους χώρους.

2.4.2. Καθαρισμός της Ελιάς

Έχει τεράστια σημασία η καλή διοργάνωση της ροής των αποθηκευμένων παρτίδων του προϊόντος στο ελαιοτριβείο, η οποία πρέπει να εξασφαλίζει την μικρότερη διάρκεια χρόνου που περνάει από την στιγμή που η ελιά συλλέγεται μέχρι την άφιξή της εμπρός στη μηχανή ή εγκατάσταση πλύσης. Τα όρια της διάρκειας αυτού του χρόνου για τα προϊόντα ΠΟΠ (Προστατευόμενο Όνομα Προέλευσης) και ΠΓΕ (Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη) είναι καθορισμένα από τις προδιαγραφές για καθένα από αυτά, ανάλογα με τον τρόπο συλλογής των ελιών γιατί επιδρά σημαντικά στην ποιότητα του λαδιού. Οι ελιές με οποιονδήποτε τρόπο και αν έχουν μαζευτεί, περιέχουν φύλλα, ξένα σώματα, χώματα, πέτρες, ξύλα, κ.ά. γι αυτό μεταφέρονται σε μία μηχανή, εισάγεται σ' αυτή πιεσμένος αέρας και έτσι επιτυγχάνεται η αποφύλλωση και η αφαίρεση κάθε ελαφρού αντικειμένου αναμιγμένου με τον καρπό.

2.4.3. Πλύσιμο της Ελιάς

Το πλύσιμο του ελαιοκάρπου γίνεται σε πλυντήρια που αποτελούν μέρος του μηχανολογικού εξοπλισμού του ελαιοτριβείου. Σ' αυτά, ο καρπός υποβάλλεται σε πλύση κάτω από την δύναμη του τρεχούμενου νερού το οποίο αναδεύει τις ελιές στέλνοντας τα βαριά σώματα στον πάτο της δεξαμενής και τα ελαφρά στην επιφάνεια απ' όπου αποβάλλονται. Για την καλύτερη απομάκρυνση των ακαθαρσιών χρησιμοποιούνται νερό χλιαρό και ειδικά απορρυπαντικά.

2.4.4. Άλεση

Η άλεση του ελαιόκαρπου λαμβάνει χώρα σε σύγχρονους μεταλλικούς σπαστήρες με αντίθετα περιστρεφόμενους δίσκους, οι οποίοι περιστρέφουν τον καρπό με μεγάλη ταχύτητα μέσα σε ένα διάτρητο τύμπανο. Στους παραδοσιακούς πέτρινους ελαιόμυλους, οι καρποί συνθλίβονταν χωρίς υπερβολική μηχανική πίεση και χωρίς τον κίνδυνο υπερθέρμανσης της ελαιόπαστας και επιμόλυνσης της από ίχνη μετάλλων. Τα πλεονεκτήματα των μεταλλικών σπαστήρων είναι η συνεχής λειτουργία, η μεγάλη απόδοση, το μικρό κόστος και μέγεθος, ενώ η γρήγορη φθορά των εξαρτημάτων άλεσης αποτελεί σοβαρό μειονέκτημά τους.

Η άλεση του ελαιοκάρπου στοχεύει στη διάρρηξη των κυττάρων του μεσοκαρπίου, ώστε να διευκολυνθεί η εξαγωγή του ελαίου και να σχηματιστούν μεγαλύτερες σταγόνες, οι οποίες μπορούν να διαχωριστούν ευκολότερα στα επόμενα στάδια επεξεργασίας. Ωστόσο, κατά την άλεση του ελαιόκαρπου οι σταγόνες ελαίου που ελευθερώνονται, σχηματίζουν με τις πρωτεΐνες γαλάκτωμα. Επίσης, απαιτείται προσοχή ώστε η θερμοκρασία της ελαιόπαστας να μην αυξηθεί πάρα πολύ και ο θρυμματισμός του καρπού να μην είναι υπερβολικός, γιατί τότε μπορεί να γίνει αιτία για πικρή γεύση στο ελαιόλαδο.

2.4.5. Μάλαξη

Μετά την άλεση του ελαιοκάρπου ακολουθεί η μάλαξη της ελαιόπαστας, σε ειδικές ημι-κυλινδρικές ή ημισφαιρικές δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα με διπλά τοιχώματα, μέσα στα οποία κυκλοφορεί θερμό νερό (30-35ºC) για τη θέρμανση της ελαιόπαστας, διευκολύνοντας την εξαγωγή του ελαιολάδου. Η ανάμειξη επιτυγχάνεται με περιστρεφόμενο έλικα, ο οποίος φέρει μικρό αριθμό πτερυγίων και περιστρέφεται με αργό ρυθμό. Η θέρμανση σε υψηλότερες θερμοκρασίες (άνω των 35ºC) μπορεί να οδηγεί στην εξαγωγή μεγαλύτερης ποσότητας ελαιόλαδου, καθώς μειώνεται το ιξώδες της ελαιόπαστας, έχει όμως δυσμενή επίπτωση στην ποιότητα του (απώλεια πτητικών ουσιών, αύξηση οξύτητας, υποβάθμιση χρώματος). Τέλος, ο χρόνος μάλαξης δε θα πρέπει να υπερβαίνει τα 20-30 min. Στόχος του σταδίου μάλαξης είναι η διάσπαση του γαλακτώματος που σχηματίστηκε κατά την άλεση και η συνένωση των μικρών ελαιοσταγονιδίων σε μεγαλύτερες σταγόνες, ώστε να διευκολυνθεί ο διαχωρισμός τους από τα υπόλοιπα συστατικά της ελαιόπαστας.

2.4.6. Εξαγωγή Ελαιολάδου

Η εξαγωγή του ελαιολάδου από την ελαιόπαστα μπορεί να λάβει χώρα είτε με πίεση είτε με φυγοκέντρηση της ελαιόπαστας. Τα φυγοκεντρικά συστήματα διακρίνονται σε δύο και τριών φάσεων (Εικ. 4)[27]. Από τα πανάρχαια χρόνια μέχρι πρόσφατα, η πίεση της ελαιόπαστας υπήρξε ο μοναδικός τρόπος για την εξαγωγή του ελαιόλαδου. Στα παραδοσιακά ελαιοτριβεία η ελαιόπαστα, μετά τη μάλαξη, τοποθετείται σε ελαιοδιαφράγματα όπου συμπιέζεται και τελικά διαχωρίζεται στη χυμώδη φάση (ελαιόλαδο, φυτικά υγρά και στερεά που διαφεύγουν από τα ελαιοδιαφράγματα) και στη στερεή φάση (ελαιοπυρήνας). Η χρήση παλινδρομικού κόσκινου συγκρατεί τα στερεά που βρίσκονται στη χυμώδη φάση, ενώ ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά ολοκληρώνεται με τη χρήση κάθετου φυγοκεντρικού ελαιοδιαχωριστήρα. Η τριφασική φυγοκεντρική διαδικασία, που αντικατέστησε την παραδοσιακή διαδικασία από τη δεκαετία του 1970, χρησιμοποιείται σήμερα ευρέως για την εξαγωγή του ελαιόλαδου. Στα ελαιοτριβεία τριών φάσεων η ελαιόπαστα, αφού αραιωθεί με την απαραίτητη ποσότητα θερμού νερού, οδηγείται σε έναν οριζόντιο φυγοκεντρικό διαχωριστήρα τριών φάσεων όπου λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός της σε τρία κλάσματα: ένα στερεό κλάσμα (περιεκτικότητα σε υγρασία 40-45%), ένα υγρό κλάσμα, που αποτελείται κυρίως από το ελαιόλαδο και μέρος των φυτικών υγρών και ένα δεύτερο υγρό κλάσμα, που αποτελείται κυρίως από φυτικά υγρά και μέρος ελαιόλαδου. Στη συνέχεια,ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά και πιθανότητα από πολύ μικρα τεμαχίδια στερεών λαμβάνει χώρα σε κάθετους φυγοκεντρικούς ελαιοδιαχωριστήρες. Ένα σημαντικό μειονέκτημα της τριφασικής διαδικασίας παραγωγή ελαιόλαδου είναι η αύξηση των ποσοτήτων των υγρών αποβλήτων που παράγονται, λόγω της αυξημένης κατανάλωσης νερού συγκριτικά με την παραδοσιακή διαδικασία (1.25-1.75 φορές μεγαλύτερη κατανάλωση νερού)[28].

Στις αρχές της δεκαετίας του 1990 αρκετές εταιρείες προώθησαν νέους τύπους οριζόντιων φυγοκεντρικών διαχωριστήρων, οι οποίοι μπορούν να διαχωρίσουν την ελαιούχο φάση από την ελαιόπαστα χωρίς την προσθήκη νερού, κατά τη διαδικασία εξαγωγής του ελαιόλαδου (Εικόνα 2.1). Αυτό το σύστημα εξαγωγής ελαιόλαδου χαρακτηρίστηκε ως οικολογικό, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης νερού και ενέργειας και ως ‘δυο φάσεων’ καθώς παράγονται δυο κλάσματα: ένα στερεό κλάσμα με αυξημένη υγρασία (55-70%) και ένα υγρό κλάσμα (ελαιόλαδο). Ωστόσο, μία μικρή ποσότητα υγρών αποβλήτων παράγεται από το νερό που προστίθεται στο φυγοκεντρικό ελαιοδιαχωριστήρα για το διαχωρισμό του ελαιόλαδου από τα φυτικά υγρά καθώς και από το νερό που χρησιμοποιήθηκε για το πλύσιμο του ελαιόκαρπου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, στα διφασικά συστήματα οι ποσότητες των υγρών αποβλήτων που παράγονται έχουν μειωθεί περίπου κατά 75% συγκριτικά με τα τριφασικά συστήματα[29].

Στην Ισπανία το νέο διφασικό σύστημα εξαγωγής ελαιόλαδου αντικατέστησε πάρα πολύ γρήγορα το τριφασικό σύστημα. Αυτό όμως δε συνέβη και στις άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες, πιθανότατα λόγω αδυναμίας διαχείρισης του νέου ημι-στερεού αποβλήτου που παράγεται σε τεράστιες ποσότητες. Στην Ευρώπη, εκτός από την Ισπανία, μόνο η Κροατία χρησιμοποιεί σε μεγάλο ποσοστό τα διφασικά συστήματα για την εξαγωγή του ελαιόλαδου[29].

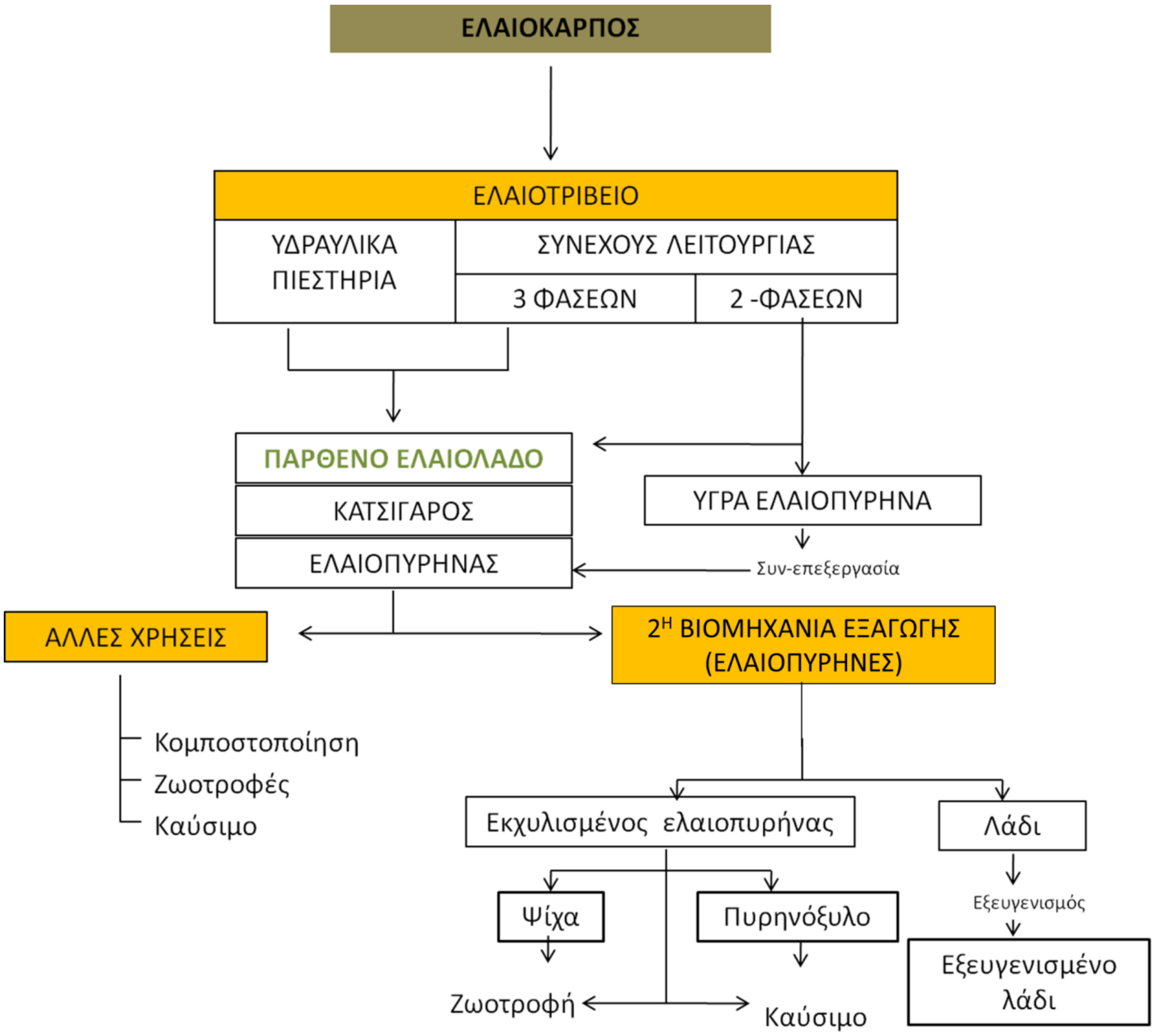
Τα διφασικά συστήματα εξαγωγής ελαιόλαδου πλεονεκτούν έναντι των τριφασικών συστημάτων στα εξής σημεία:

(α) η ποσότητα του ελαιόλαδου που παράγεται είναι μεγαλύτερη, καθώς δεν προστίθεται νερό για την αραίωση της ελαιόπαστας, οπότε αποφεύγεται ο σχηματισμός γαλακτώματος ελαίου/ύδατος.

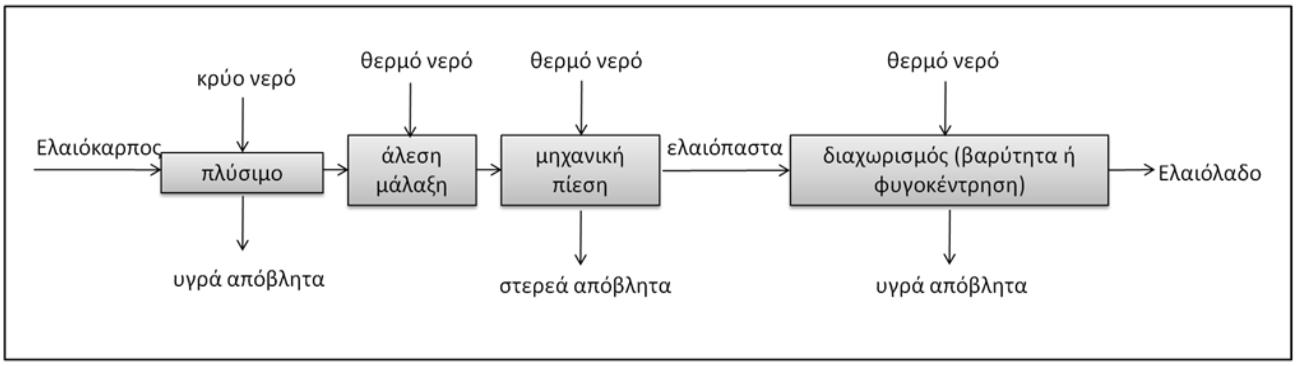
(β) η ποιότητα του ελαιόλαδου είναι καλύτερη λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης του σε φυσικά αντιοξειδωτικά (πολυφαινόλες), που το καθιστούν σταθερότερο κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης του.

(γ) η μειωμένη κατανάλωση νερού και η παραγωγή μίας μικρής ποσότητας υγρών αποβλήτων.

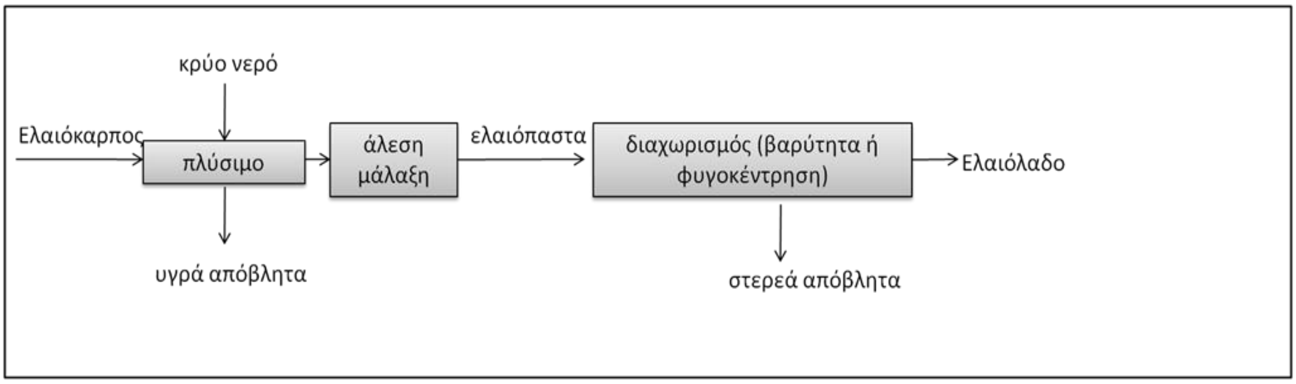
(δ) το χαμηλό κόστος κατασκευής και λειτουργίας τους καθώς και οι μειωμένες απαιτήσεις σε ενέργεια. Το σοβαρότερο μειονέκτημα της διφασικής διαδικασίας είναι ότι ο ελαιοπυρήνας που προκύπτει, έχει αυξημένη υγρασία, υψηλές συγκεντρώσεις σε σάκχαρα και στερεά, οπότε καθίσταται δύσκολος ο χειρισμός, η μεταφορά και η επεξεργασία του.



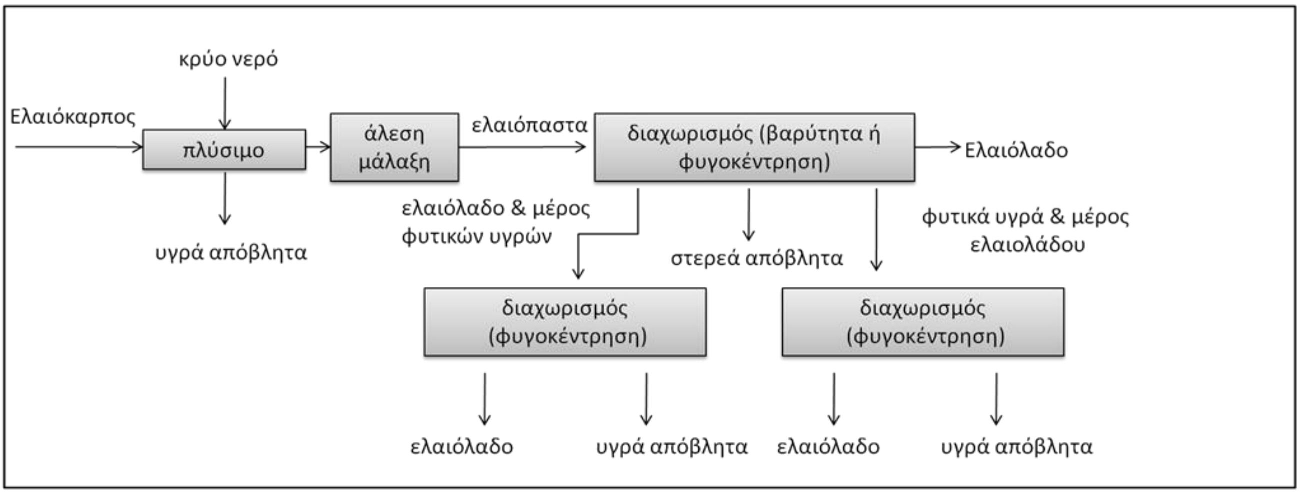
Εικόνα 2.1. Συνοπτική παρουσίαση της διεργασίας παραγωγής του ελαιολάδου, οι κυριότερες μέθοδοι παραγωγής και τα παραγόμενα προϊόντα, υποπροϊόντα και απόβλητα με τις κυριότερες χρήσεις τους.



Παραδοσιακά ελαιοτριβεία



Διφασικά ελαιοτριβεία



Τριφασικά ελαιοτριβεία

Εικόνα 2.2. Διάγραμμα ροής για παραδοσιακά, διφασικά και τριφασικά ελαιοτριβεία.

2.5. Απόβλητα Ελαιοτριβείων

Από την παραγωγική διαδικασία των ελαιοτριβείων τριών φάσεων λειτουργίας προκύπτουν οι εξής τύποι αποβλήτων:

α) Υγρό απόβλητο από το ξέπλυμμα των ελιών με νερό που γίνεται στο πλυντήριο.

β) Υγρό απόβλητο (κοινώς κατσίγαρος) που προέρχεται από τους φυγόκεντρους διαχωριστήρες της υγρής φάσης της παραγωγικής διαδικασίας (όπου γίνεται διαχωρισμός των φυτικών υγρών του ελαιοκάρπου από το ελαιόλαδο).

γ) Στερεό απόβλητο (ελαιοπυρήνας) που προέρχεται από το διαχωριστήρα που διαχωρίζει τα υγρά από τα στερεά μέρη του ελαιοκάρπου.

Τα φυτικά υγρά του ελαιόκαρπου, το νερό που προστίθεται στα διάφορα στάδια επεξεργασίας του, τα αδιάλυτα οργανικά τεμαχίδια υπό μορφή αιωρήματος καθώς και γαλακτοποιημένα σταγονίδια ελαίου, συνθέτουν τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων, που λόγω της ιδιότυπης χημικής τους σύστασης, θεωρούνται από τα πλέον βεβαρημένα αγροτοβιομηχανικά απόβλητα με δυσμενείς επιπτώσεις για το περιβάλλον. Τα χαρακτηριστικά των υγρών αποβλήτων (ποσοτικά και ποιοτικά) ποικίλουν και εξαρτώνται άμεσα από την ποικιλία του ελαιόδενδρου, τις κλιματικές συνθήκες της περιοχής, το στάδιο ωρίμανσης του ελαιόκαρπου, την εποχή συγκομιδής, το χρόνο παραμονής του ελαιόκαρπου στο ελαιοτριβείο και τη διαδικασία παραλαβής του ελαιόλαδου[30]. Χαρακτηρίζονται από σκούρο χρώμα (κόκκινο προς καφέ-μαύρο) είναι όξινα (pH=3-6), θολά, χαρακτηριστικής οσμής, υψηλού οργανικού ρυπαντικού φορτίου, χαμηλής βιοαποδομησιμότητας, υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας, πλούσια σε οργανικά και ανόργανα συστατικά[31].

Το πιο σημαντικό μέρος του οργανικού κλάσματος των υγρών αποβλήτων καταλαμβάνουν τα σάκχαρα (μέχρι και 60% επί του συνολικού ξηρού βάρους) με κυριότερα τη φρουκτόζη, τη μαννόζη, τη γλυκόζη, τη σακχαρόζη και μερικές πεντόζες[73]. Οι φαινολικές ενώσεις που περιέχονται στα υγρά απόβλητα, στις οποίες οφείλονται κυρίως οι χαρακτηριστικές φυτοτοξικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες τους, μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο ομάδες. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από απλές φαινολικές ενώσεις, όπως οι ταννίνες και τα φλαβονοειδή[32] και η δεύτερη από πολυφαινόλες, πολυμερείς ενώσεις καστανόμαυρου χρώματος, οι οποίες έχουν προκύψει από τον πολυμερισμό και την αυτοοξείδωση των φαινολικών ενώσεων της πρώτης ομάδας. Το χρώμα των υγρών αποβλήτων εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ των φαινολικών ενώσεων των δυο ομάδων. Τα μη φαινολικά οργανικά οξέα (τρυγικό οξύ, οξαλικό οξύ, μηλικό οξύ, γαλακτικό οξύ, φουμαρικό οξύ, κιτρικό οξύ κ.ά.) καθώς και τα λιπαρά οξέα μακριάς αλυσίδας (λινελαϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ, λινολενικό οξύ κ.ά.) αποτελούν ένα σημαντικό μέρος του οργανικού κλάσματος των υγρών αποβλήτων, ιδιαίτερα από πλευράς φυτοτοξικότητας και αντιμικροβιακής δράσης.

Κανείς δεν μπορεί να αμφισβητήσει ότι τα υγρά απόβλητα των ελαιοτριβείων είναι ένα υδατικό φυτικό εκχύλισμα υψηλού οργανικού ρυπαντικού φορτίου, η άκριτη διάθεση του οποίου μπορεί να έχει σοβαρές περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Η επεξεργασία των υγρών αποβλήτων μπορεί να θεωρηθεί αποδοτική όταν λαμβάνει χώρα η μείωση του οργανικού και ανόργανου περιεχομένου καθώς και του όγκου των αποβλήτων, με ταυτόχρονη οικονομική λειτουργία των μονάδων επεξεργασίας. Αρκετές τεχνολογίες έχουν αναπτυχθεί λόγω της ποικιλομορφίας των συστατικών των υγρών αποβλήτων των ελαιοτριβείων, με σκοπό την εξάλειψη ή την ελαχιστοποίηση των δυσμενών επιδράσεων στο περιβάλλον. Η πιο συνηθισμένη πρακτική που εφαρμόζεται για τα απόβλητα αυτά είναι η ανεξέλεγκτη διάθεσή τους στο έδαφος, σε ποτάμια, σε θάλασσες κ.α. Αυτοί οι τρόποι διάθεσης, εκτός από τα προφανή σοβαρά περιβαλλοντικά προβλήματα, δημιουργούν και προβλήματα στη διαβίωση των κατοίκων των γύρω περιοχών λόγω των δυσάρεστων οσμών που αναδύονται και των εντόμων που συγκεντρώνονται στις συγκεκριμένες περιοχές. Πιο συγκεκριμένα, η διάθεση στο έδαφος ανεπεξέργαστων υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων προκαλεί μεταβολή στις φυσικοχημικές του ιδιότητες, όπως αύξηση της αγωγιμότητας, αύξηση της περιεκτικότητας σε K, Mg, Na, αύξηση του οργανικού άνθρακα και του ολικού αζώτου ενώ το pH παραμένει πρακτικά αμετάβλητο[33]. Επίσης, ασκούν μια επιλεκτική δράση στους μικροοργανισμούς του εδάφους ευνοώντας την ανάπτυξη εκείνων των ειδών ή στελεχών που έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν τα συστατικά του. Τέλος, σχετικά με την επίδραση των υγρών αποβλήτων ελαιοτριβείων στα φυτά, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά και οργανικά συστατικά αποκτούν υψηλή λιπαντική αξία ενώ η αυξημένη αλατότητα, ο υψηλός λόγος C/N και η παρουσία συστατικών με φυτοτοξική δράση, όπως πολυφαινόλες και λιπαρά οξέα, έχουν δυσμενή επίπτωση στη βλάστηση των φυτών.

Τέλος, η αναζήτηση των αναστολέων του PAF στα διάφορα στάδια της παραγωγής του ελαιολάδου έδειξε ότι τα δραστικά αυτά συστατικά με αντιαθηρογόνο δράση, υπάρχουν κυρίως στο υγρό απόβλητο των ελαιοτριβίων, τον κατσίγαρο[34]. Ο κατσίγαρος αποτελεί ένα υδατικό παραπροϊόν της ελαιουργίας που λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς του σε φαινολικά συστατικά είναι τοξικός για το περιβάλλον και η διαχείρισή του αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα της ελαιουργίας, αφού δε διατίθενται τα απαραίτητα χρηματικά ποσά για την ασφαλή διαχείρισή του από περιβαλλοντικής άποψης.

Στην κατηγορία των στερεών απόβλητων κατατάσσονται:

- Τα κλαδέματα
- Τα φύλλα ελιάς
- Ο ελαιοπυρήνας μαζί με το πυρηνόξυλο (κουκούτσια)

Τα στερεά απόβλητα ελαιοτριβείων χαρακτηρίζονται από υψηλό οργανικό και ανόργανο περιεχόμενο το οποίο είναι δύσκολο στη διαχείριση, όπως ακριβώς και τα υγρά απόβλητα από την επεξεργασία των ελιών. Τα στερεά απόβλητα έχουν υψηλό περιεχόμενο COD και BOD5, πολυφαινόλες που εμποδίζουν τη δραστηριότητα βακτηρίων και μυκήτων, υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα κλπ. Η απόρριψη των αποβλήτων στο περιβάλλον ή η διάθεση τους στο έδαφος χωρίς προηγούμενη επεξεργασία, δεν αποτελεί λύση του προβλήματος αλλά καθιστά την κατάσταση χειρότερη, δεδομένου ότι υπάρχει κίνδυνος μόλυνσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα. Η μεγάλη μολυσματική δύναμη του ελαιοπυρήνα και οι μεγάλοι όγκοι που παράγονται μπορούν να προκαλέσουν μεγάλης έκτασης περιβαλλοντικά προβλήματα[35]. Κεντρικές μονάδες επεξεργασίας στερεών αποβλήτων ελαιοτριβείων είναι τα πυρηνελαιουργεία και οι μονάδες διαχείρισης διφασικής ελαιοπυρήνας. Στην Ελλάδα υπάρχουν 35 πυρηνελαιουργεία, όπως καταγράφονται για το έτος 2002/03 από την Αυτοτελή Υπηρεσιακή Μονάδα Ελέγχου Ενισχύσεων Ελαιολάδου (Α.Υ.Μ.Ε.Ε.Ε.), ενώ υπάρχει 1 μονάδα διαχείρισης διφασικής ελαιοπυρήνας στο Νομό Μεσσηνίας της Πελοποννήσου, η οποία λειτούργησε για πρώτη φορά την ελαιοκομική περίοδο2009/2010.

Τμήμα του παραγόμενου πυρηνόξυλου καταναλώνεται σαν καύσιμο στα πυρηνελαιουργεία για την κάλυψη των θερμικών αναγκών των εργοστασίων αυτών και το υπόλοιπο διατίθεται στην αγορά και χρησιμοποιείται σαν καύσιμο σε βιοτεχνίες (ελαιουργεία, φούρνους κλπ.), σε θερμοκήπια και σε κτίρια. Η χαμηλή τιμή του (η τιμή του ήταν 0,05 ευρώ το κιλό το 2005 στα Χανιά) σε σχέση με την ενεργειακή του αξία, συγκρινόμενο με το πετρέλαιο, το κάνει πολύ ελκυστικό καύσιμο. Ορισμένες φορές μικρές ποσότητες πυρηνόξυλου εξάγονται σε Ευρωπαϊκές χώρες, όπου μετά τη μπρικετοποίησή τους χρησιμοποιούνται σα στερεό καύσιμο με διάφορες εφαρμογές[36.]

Πίνακας 2.1. Δυνατότητες χρησιμοποίησης των προϊόντων της ελιάς και των παραπροϊόντων και αποβλήτων της επεξεργασίας της για παραγωγή ενέργειας.

ΠΡΩΤΗ ΥΛΗ	ΤΕΛΙΚΟ ΠΡΟΪΟΝ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ	ΧΡΗΣΗ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ	ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΗΜΕΡΑ	ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ
Ελαιοκλαδέματα	Πολτός	Θερμοτητα	Όχι	Άλεση, πολτοποίηση, καύση
Συμπαγές ξύλο ελιάς	Ως έχει	Θερμοτητα	Ναι	Καύση
Πυρηνόξυλο	Ως έχει	Θερμοτητα	Ναι	Καύση
Πυρηνόξυλο	Ως έχει	Ηλεκτρική ενέργεια	Όχι	Καύση
Υγρά απόβλητα ελαιουργείου	Εναπομείναντα υπολοίπα ελαίων	Μηχανική Ενέργεια-καύσιμο οχημάτων	Όχι	Διαχωρισμός, διεστεροποίηση, καύση
Υγρά απόβλητα ελαιουργείου	Ως έχουν	Θερμοτητα & ηλεκτρική ενέργεια	Μόνο πειραματικά	Αναερόβια χώνευση, καύση του βιοαερίου
Αέρια απόβλητα πυρηνελαιουργείου	Ως έχουν	Θερμοτητα	Όχι	Ανάκτηση θερμότητας με εναλλάκτες
*Οι εναλλακτικές τεχνολογίες της καύσης , της αεριοποίησης και της πυρόλυσης της στερεάς βιομάζας δεν ενδείκνυνται για εμπορική χρήση σήμερα.				

Πίνακας 2.2. Κόστος και θερμογόνος δύναμη ορισμένων προϊόντων και παραπροϊόντων ελιάς.

ΠΡΟΪΟΝ	ΘΕΡΜΟΓΟΝΟΣ ΔΥΝΑΜΗ	ΚΟΣΤΟΣ
Ελαιοκλαδέματα	3200 kcal/kg	-
Συμπαγές ξύλο ελιάς	3500-4000 kcal/kg	0.08-0.12 €/kg
Πυρηνόξυλο	3500-4000 kcal/kg	0.05 €/kg

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

3.1. Εισαγωγή

Παγκοσμίως, η κατανάλωση ψαριών έχει αυξηθεί σημαντικά τις τελευταίες δεκαετίες. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η διαθέσιμη ποσότητα ψαριών από την αλιεία έχει μειωθεί, αλλά η κατανάλωση έχει αυξηθεί τουλάχιστον κατά 10% την τελευταία δεκαετία, με την αύξηση αυτή να καλύπτεται από τα ψάρια ιχθυοτροφείου. Σήμερα υπολογίζεται ότι περίπου τα 2/3 των ψαριών στην ΕΕ πιάνονται απευθείας από τη θάλασσα. Παραδείγματα ψαριών που προέρχονται κυρίως από ιχθυοτροφεία είναι η τσιπούρα, ο σολομός, η ιριδίζουσα πέστροφα και ο κυπρίνος, ενώ στα ψάρια ανοιχτής θάλασσας περιλαμβάνονται η τσιπούρα, η ρέγγα, ο τόνος, ο κολιός, και οι σαρδέλες. Για τα ψάρια ανοιχτής θάλασσας, το θρεπτικό περιεχόμενο και τα επίπεδα επιμόλυνσης εξαρτώνται από ποικιλία παραγόντων, οι οποίοι δεν είναι δυνατό να ελεγχθούν εύκολα. Συγκεκριμένα, στους παράγοντες περιλαμβάνονται το είδος του ψαριού, η εποχή, η διατροφή του, η τοποθεσία, το στάδιο ζωής και η ηλικία[37]. Τα ψάρια που βρίσκονται σε υψηλότερη θέση στην τροφική αλυσίδα (π.χ. σολομός, τόνος, ξιφίας) μπορεί να συγκεντρώσουν μολυσματικά υλικά όπως και βαρέα μέταλλα κυρίως στο υποδόριο λίπος τους. Στα ψάρια που μεγαλώνουν με μεθόδους υδατοκαλλιέργειας ή άλλες μεθόδους καλλιέργειας, είναι δυνατόν να επιτευχθεί πολύ στενότερος έλεγχος της διατροφής τους. Επιπλέον, στην Ε.Ε ισχύουν αυστηρές νομοθετικές ρυθμίσεις σε σχέση με την επιμόλυνση στα ψάρια ιχθυοτροφείου.

Εικόνα 3.1. Πλωτοί ιχθυοκλωβοί εκτροφής.

Ο ρόλος των υδατοκαλλιεργειών είναι σημαντικός, καθώς η συμβολή τους στη μείωση του αλιευτικού ελλείμματος, στην τόνωση των τοπικών οικονομιών, στη δημιουργία θέσεων εργασίας, καθώς και στην προσφορά πρόσθετων αλιευτικών προϊόντων στην κατανάλωση, είναι καθοριστική. Ο ήδη σημαντικός ρόλος τους ενισχύεται από το γεγονός, ότι η συλλεκτική αλιεία αντιμετωπίζει έντονα προβλήματα παραγωγής, τα οποία προέρχονται από την εντατική εκμετάλλευση των αποθεμάτων, καθώς και τους κοινοτικούς περιορισμούς. Παρόλα αυτά προβλήματα όπως, ο έντονος ανταγωνισμός, η κυμαινόμενη ζήτηση, καθώς και η ποιότητα και η υγιεινή των προϊόντων μαστίζουν τον κλάδο των υδατοκαλλιεργειών στην Ευρωπαϊκή Ένωση και κρίνεται απαραίτητη η χάραξη πολιτικής και η οικονομική ενίσχυσή τους, τόσο σε κοινοτικό όσο και σε εθνικό επίπεδο.

3.2. Ιχθυοκαλλιέργεια Τσιπούρας

Η τσιπούρα είναι κατάλληλο είδος για εκτεταμένη εκτροφή στη Μεσόγειο, λόγω της καλής τιμής που έχει στην αγορά, του υψηλού ποσοστού επιβίωσης και των διατροφικών συνηθειών (βρίσκεται σχετικά χαμηλά στη διατροφική αλυσίδα). Το 1981-82 πραγματοποιήθηκε η τεχνική αναπαραγωγή της τσιπούρας στην Ιταλία και το 1988-89 επιτεύχθηκε η παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα νεαρών τσιπούρων σε Ελλάδα, Ιταλία και Ισπανία. Το συγκεκριμένο είδος αναπτύσσει γρήγορα υψηλή προσαρμοστικότητα στις εντατικές συνθήκες εκτροφής, τόσο σε κλωβούς όσο και σε λίμνες, ενώ η ετήσια παραγωγή αυξάνεται ολοένα, φτάνοντας το υψηλότερο σημείο των 87.000 τόνων[38]. Οι κυριότερες χώρες παραγωγής της τσιπούρας είναι η Ελλάδα, η Κροατία, η Σλοβενία, η Αλβανία, η Μάλτα, η Ιταλία, η Γαλλία, το Μαρόκο, η Πορτογαλία, η Τουρκία, η Αίγυπτος και η Ισπανία, ενώ το μεγαλύτερο μέρος παραγωγής πραγματοποιείται στην περιοχή της Μεσογείου (Σχήμα 3.1).

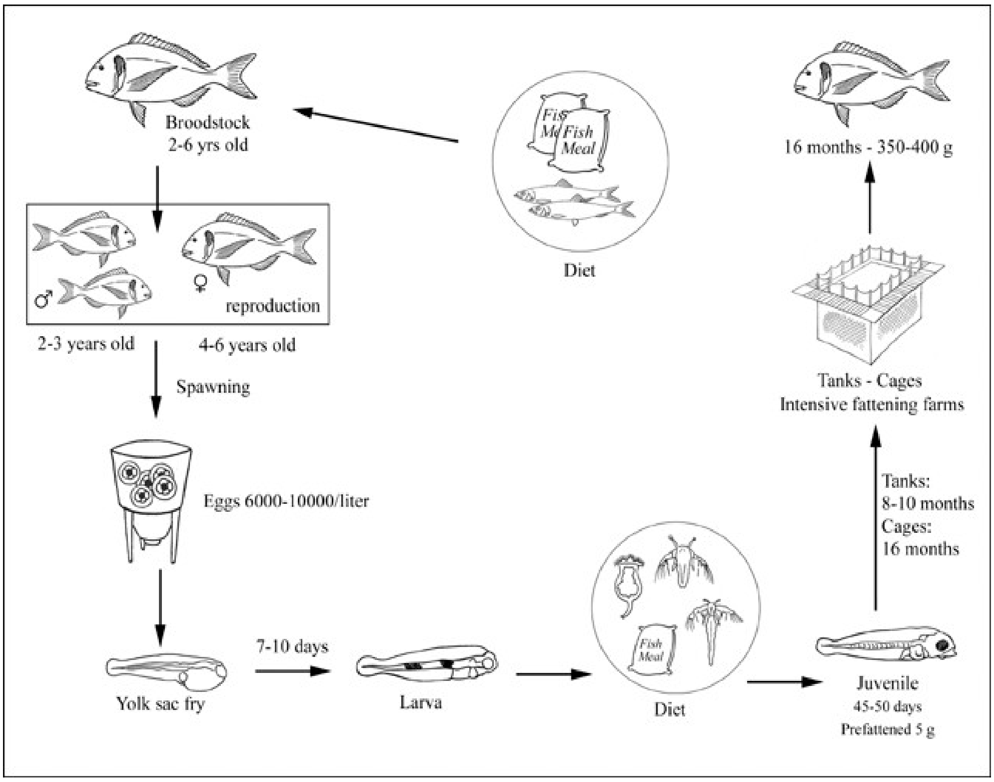
Σχήμα 3.1. Ελληνική Ιχθυοκαλλιέργεια: Πρωταθλήτρια Μεσογείου 2007.

Πίνακας 3.1. Παραγωγή τσιπούρας/λαβρακιωτών μεσογειακών χωρών (τόνοι).

ΧΩΡΑ	2003	2004	2005	2006	2007	Μερίδιο 2007
Ελλάδα	**97.000**	**82.000**	**85.000**	**100.000**	**120.000**	**48%**
Τουρκία	27.000	31.000	38.000	46.000	64.000	26%
Ισπανία	17.000	17.700	21.000	29.100	33.000	13%
Ιταλία	16.700	17.500	17.100	18.000	18.300	7%
Γαλλία	4.800	5.600	6.200	7.800	6.200	2%
Πορτογαλία	4.000	4.000	4.000	3.000	3.000	1%
Κροατία	2.500	2.400	3.000	2.600	3.000	1%
Κύπρος	2.000	2.000	2.000	2.200	2.500	1%
Μάλτα	1.000	900	900	900	900	0%
Σύνολο	**172.000**	**163.100**	**177.900**	**209.600**	**250.900**	**100%**

3.2.1. Κύκλος Παραγωγής Τσιπούρας

Ο κύκλος παραγωγής της τσιπούρας ιχθυοτροφείου φαίνεται στην Εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2. Ο κύκλος παραγωγής της τσιπούρας ιχθυοτροφείου.

Σύμφωνα με το παραπάνω σχήμα, τα ψάρια ιχθυοτροφείου τα οποία τρέφονται με ιχθυοτροφή εμπορίου ή με άλλα ψάρια, όταν φτάσουν στην αναπαραγωγική ηλικία που είναι 2-3 ετών για τα αρσενικά και 4-6 για τα θηλυκά, ζευγαρώνουν και στη συνέχεια γεννιούνται τα αυγά τα οποία τοποθεντούνται σε δεξαμενές και το πλήθος των αυγών αυτών κυμαίνεται από 6.000-10.000/λίτρο. Στις δεξαμενές αυτές γεννιούνται οι νύμφες που μετά από 7-10 μέρες μετατρέπονται στους λεγόμενους γόνους που τρέφονται με ιχθυοτροφή εμπορίου και μετά από 45-50 μέρες μετατρέπονται στα νεαρά ψάρια τα οποία μένουν σε κλωβούς για 16 μήνες ή σε δεξαμενές για 8-10 μήνες που μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος ζυγίζουν 350-400 gr [38].

3.2.2. Ασθένειες και Μέτρα Ελέγχου

Η τσιπούρα παρουσιάζει χαμηλή έως μέτρια ευπάθεια[39] , υπάρχουν όμως ασθένειες που προσβάλλουν τα ψάρια αυτά και οφείλονται κυρίως σε βακτήρια, ιούς και παράσιτα ενώ η εμφάνισή τους ευνοείται ακόμη περισσότερο από την υπερβολική συσσώρευση ψαριών στον κλωβό (καταπόνηση ψαριών-stress)[40]. Το βασικότερο μέλημα για την αντιμετώπισή τους είναι η τήρηση των συνθηκών υγιεινής και η απολύμανση των υδάτων, η αποφυγή της χρήσης ζωοτροφών με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος, ο εμβολιασμός των γόνων και των νεαρών ψαριών με αντιβιοτικά και η χρήση βιταμινών[41].

3.3. Ψάρια Ιχθυοτροφείου/Ελεύθερης Αλιείας – Επίδραση στον Ιστό

3.3.1. Σύσταση Ιχθυοτροφής Ιχθυοκαλλιεργειών

Σε γενικές γραμμές, η τροφή των ψαριών περιέχει πρωτεΐνες (55%), λίπη (11%), ίνες (3%), μεταλλικά στοιχεία (13%) και νερό (10%). Η σύσταση της διαφέρει σε σχέση με το μέγεθος των ψαριών και το ίδιο ισχύει για τη μορφή με την οποία παρέχεται. Μέχρι και το μέγεθος των 8 gr η τροφή παρέχεται στα ιχθύδια σε μικρούς κόκκους ενώ όσο τα ψάρια μεγαλώνουν έχει τη μορφή κροκέτας διαφόρων μεγεθών που ξεκινούν από τα 1,5 χιλιοστά και φθάνει τα 4,5 χιλιοστά, όταν τα ψάρια ξεπεράσουν το μέγεθος των 100 gr. Τα υλικά από τα οποία κατασκευάζεται η τροφή είναι βιολογικής προέλευσης και η πρώτη ύλη είναι ψάρια (ιχθυάλευρα 50%, λίπη ψαριών 7%), φυτά με βάση τη σόγια (μέχρι 25%), το σιτάρι (μέχρι και 20%) και μικροοργανισμούς όπως σακχαρομύκητες με τη μορφή μαγιάς για την παροχή των απαραίτητων βιταμινών (Πίνακας 3.2).

Τα ψάρια ιχθυοτροφείου σιτίζονται με ελεγχόμενη δίαιτα, η οποία βασίζεται σε ιχθυέλαια και ιχθυάλευρα. Μια τέτοια διατροφή δεν υπόκειται σε εποχιακές μεταβολές σαν αυτές που παρατηρούνται στα ψάρια ανοιχτής θάλασσας. Συνεπώς, η έρευνα έχει πλέον αποδείξει ότι τα επίπεδα λίπους στα ψάρια ιχθυοτροφείου είναι περισσότερο σταθερά σε σύγκριση με τα επίπεδα εκείνων στα ψάρια ανοιχτής θάλασσας. Τα ιχθυάλευρα που χρησιμοποιούνται για τα σαρκοφάγα ψάρια ιχθυοτροφείου παράγονται κυρίως από ψάρια που δεν προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση, όπως η σαρδελόρεγγα (Clupea sprattus) και το καπελάν (Mallotus Villosus). Αυξανόμενη είναι επίσης η χρήση φυτικών πηγών λίπους στις ιχθυοτροφές.

Πίνακας 3.2. Συνήθης σύσταση ξηρών ιχθυοτροφών για την τσιπούρα σε σχέση με τη διάμετρο του κόκκου της τροφής.

Μέγεθος κόκκων τροφής (mm)	*Υγρασία %*	*Πρωτεΐνες %*	*Λίπη %*	*Υδατάνθρακες %*	*Στερεά*
0,3-0,5	10	55	11	2	13
0,5-0,8	10	55	11	2	13
0,8-1,2	10	55	11	2	13
1,2-2	10	55	11	2	13
1,5	10	52	12	2	13
2,0	10	49	15	2	13

Πίνακας 3.3. Παράδειγμα πίνακα διατροφής για ιχθύδια τσιπούρας. Ημερήσιοι ρυθμοί διατροφής σε σχέση με το βάρος και τη θερμοκρασία.

<table>
<tr><th rowspan="2">Βάρος(g)</th><th colspan="6">Θερμοκρασία νερού εκτροφής</th></tr>
<tr><th><15 °C</th><th>15-19 °C</th><th>19-23 °C</th><th>23-26 °C</th><th>26-28 °C</th><th>>28 °C</th></tr>
<tr><td>>0,6</td><td rowspan="6">Τάϊσμα ανάλογα με την όρεξη του ψαριού</td><td colspan="4">Διανομή σύμφωνα με την όρεξη του ψαριού (συνήθως >5% του ζωντανού βάρους)</td><td rowspan="6">Τάϊσμα ανάλογα με την όρεξη του ψαριού με τάση μείωσης</td></tr>
<tr><td>0,6-1,0</td><td>3,0</td><td>3.0</td><td>3.2</td><td>3,0</td></tr>
<tr><td>1,0-3,0</td><td>2,8</td><td>3,0</td><td>3,2</td><td>3,0</td></tr>
<tr><td>3,0-8,0</td><td>2,4</td><td>2,7</td><td>2,9</td><td>2,7</td></tr>
<tr><td>8,0-15,0</td><td>2,2</td><td>2,5</td><td>2,7</td><td>2,5</td></tr>
<tr><td>15,0-35,0</td><td>1,8</td><td>2,0</td><td>2,2</td><td>2,0</td></tr>
</table>

Για κάθε μέγεθος, αυξανομένης της θερμοκρασίας, ο ημερήσιος ρυθμός διατροφής αυξάνεται ως εκείνη που αντιστοιχεί στη βέλτιστη δυνατότητα αύξησης. Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες μειώνεται εξαιτίας μεταβολικής αποδιοργάνωσης του οργανισμού και πολύ περισσότερο όταν σε αυτές τις θερμοκρασίες ο παράγοντας οξυγόνο μπορεί να είναι περιοριστικός. Αυξανομένου του μέσου μεγέθους των εκτρεφόμενων ψαριών, ο ημερήσιος ρυθμός διατροφής μειώνεται σταδιακά.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, διάφορα είδη ψαριών ιχθυοτροφείου είναι πιο πλούσια σε λίπος από ότι τα αντίστοιχα ψάρια ελεύθερης αλιείας[42], γεγονός που οφείλεται στη μειωμένη κατανάλωση ενέργειας από τα ψάρια ιχθυοτροφείου και στις διατροφικές διαφορές, αφού η τροφή με την οποία τρέφονται τα ψάρια ιχθυοτροφείου έχει μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος (~20%) και σταθερά στη σύσταση τους. Επιπρόσθετα, όπως έχει αναφερθεί από πολλές μελέτες, τα ψάρια ιχθυοτροφείου και ελεύθερης αλιείας εμφανίζουν κάποιες διαφορές και ως προς τα επίπεδα ορισμένων λιπαρών οξέων, οι οποίες αποδίδονται κυρίως στη διαφορετική διατροφή των ψαριών αλλά και της εποχής[87,94,95]. Ειδικότερα, μια από τις μελέτες αυτές δείχνει ότι τα επίπεδα λιπαρών οξέων τσιπούρας ιχθυοτροφείου είναι παραπλήσια με τα επίπεδα των λιπαρών οξέων της τροφής που κατανάλωσε το συγκεκριμένο ψάρι[94]. (Πίνακας 3.4).

Πίνακας 3.4. Σύσταση των λιπαρών οξέων τροφής τσιπούρας ιχθυοτροφείου και ελεύθερης αλιείας, εκφρασμένη σε εκατοστιαίο ποσοστό ολικών λιποειδών.

Λιπαρό οξύ	Τροφή ψαριών	Τσιπούρα ιχθυοτροφείου	Τσιπούρα ελεύθερης αλιείας
(C14:0)	4,91	4,35	2,89
(C15:0)	0,76	0,37	0,41
(C16:0)	18,82	19,05	23,62
(C16:1 ω-7)	4,58	4,24	6,91
(C18:0)	5,19	4,05	7,21
(C18:1 ω-3)	19,72	25,21	16,06
(C18:1 ω-7)	2,47	2,62	3,54
(C18:2 ω-6)	8,50	9,00	1,03
(C18:3 ω-6)	0,14	1,74	ΜΑ
(C18:3 ω-3)	2,04	1,39	0,27
(C20:0)	0,47	0,31	0,33
(C20:1 ω-9)	3,09	2,74	0,75
(C20:2 ω-6)	0,21	0,19	0,13
(C20:4 ω-6)	0,11	0,59	5,85
(C20:4 ω-3)	0,50	0,78	0,17
(C20:5 ω-3)	6,40	5,71	6,96
(C22:1 ω-11)	3,62	2,34	0,24
(C22:3 ω-6)	0	0,19	0,60
(C22:4 ω-6)	0,13	ΜΑ	0,32
(C22:5 ω-6)	0,37	0,15	1,36
(C22:5 ω-3)	1,23	2,30	3,67
(C22:6 ω-3)	12,40	12,67	17,61
Κορεσμένα	**31,02**	**28,15**	**34,49**
Μονοακόρεστα	**33,48**	**37,15**	**27,51**
ω-9	**22,81**	**27,95**	**16,82**
ω-6	**9,46**	**11,86**	**9,3**
ω-3	**23,99**	**22,84**	**28,68**
ω-3/ω-6	**2,54**	**1,92**	**3,09**

α,β : υποδηλώνουν στατιστική διαφορά $p<0,05$

ΜΑ:Μη Ανιχνεύσιμο

Από τα παραπάνω δεδομένα του πίνακα, φαίνεται πως μεταξύ τσιπούρας ιχθυοτροφείου και ελεύθερης αλιείας, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση ορισμένων λιπαρών οξέων. Ειδικότερα, το ψάρι ιχθυοτροφείου έχει αρκετά υψηλότερα επίπεδα μονοακόρεστων και ω-9 μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία οφείλονται στην αυξημένη παρουσία του ελαϊκού οξέος (C18:1) στους ιστούς του ψαριού. Αντίθετα, το ψάρι ελεύθερης αλιείας έχει υψηλότερα ποσοστά κορεσμένων λιπαρών οξέων, τα οποία οφείλονται κυρίως στο παλμιτικό (C16:0) και στο στεατικό οξύ (C18:0)[43].

Το μονοακόρεστο λιπαρό οξύ 22:1, το οποίο ανιχνεύεται στο ψάρι ιχθυοτροφείου ενώ στο ψάρι ελεύθερης αλιείας υπάρχει μόνο σε ιχνοποσότητες, προέρχονται από τα ιχθυέλαια που περίεχονται στην τροφή που καταναλώνουν τα ψάρια ιχθυοτροφείου, τα οποία ιχθυέλαια παράγονται από άλλα ψάρια ελεύθερης αλιείας και κυρίως ψάρια που ζουν στα βάθη ωκεανών. Το συγκεκριμένο λιπαρό οξύ δεν είναι συστατικό των λιποειδών των ψαριών που ζουν σε θερμά ύδατα, όπως η τσιπούρα, αλλά αποθηκεύεται στους ιστούς τους όταν αυτά τρέφονται με έλαια που το περιέχουν.

Τέλος, η αναλογία ω-3/ω-6 είναι μεγαλύτερη στην τσιπούρα ελεύθερης αλιείας από ότι σε εκείνη του ιχθυοτροφείου[44]. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη λήψη ω-6 λιπαρών οξέων έχει μη επιθυμητή επίδραση στην υγεία του ανθρώπου, γι’αυτό η αναλογία ω-3/ω-6 στη τροφή των ψαριών θα πρέπει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ή τουλάχιστον παρόμοια με εκείνη των ψαριών ανοιχτής θαλάσσης[45].

Στον πίνακα 3.5. φαίνεται ενδεικτικά η χημική σύσταση τσιπούρας ιχθυοκαλλιέργειας ενώ οι τιμές έχουν προκύψει από το μέσο όρο των μετρήσεων που πραγματοποιήθηκαν από διάφορες ερευνητικές ομάδες.

Πίνακας 3.5. Χημική σύσταση ιστού από τσιπούρα ελεύθερης αλιείας και ιχθυοκαλλιέργειας ως προς τα βασικά συστατικα.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (%)	ΛΙΠΟΣ (%)	ΥΓΡΑΣΙΑ (%)	ΤΕΦΡΑ (%)
Τσιπούρα Ιχθυοκαλλιέργειας	20,2±1,4	6,4±0,8$^{\alpha}$	77,2±1,5$^{\beta}$	1,4±0,1
Τσιπούρα Ελεύθερης αλιείας	20,5±1,3	6,0±2,6$^{\alpha}$	71,8±1,8$^{\beta}$	1,4±0,1

Από τα παραπάνω δεδομένα του πίνακα προκύπτει ότι η τσιπούρα ιχθυοτροφείου βρέθηκε ότι περιέχει σημαντικά μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λίπος και σημαντικά μικρότερη υγρασία από ότι η τσιπούρα ελεύθερης αλιείας.

Υπολογίζεται ότι αν διατηρηθούν οι σημερινές πρακτικές αλιείας, τα αποθέματα ψαριών θα εξαντληθούν μέσα στα επόμενα 40 χρόνια. Όσον αφορά τη ναυτική περιοχή της ΕΕ, μόνο το 10% των κοπαδιών ψαριών είναι διατηρήσιμα. Είναι ξεκάθαρο, λοιπόν, ότι τα ψάρια ιχθυοτροφείου θα μπορούσαν να προσφέρουν μια μακροπρόθεσμη λύση στις αυξημένες ανάγκες της αγοράς[46].

Παρόλ'αυτά, οι καταναλωτές θεωρούν τα ψάρια ανοικτής θάλασσας ως πιο υγιεινά και πιο νόστιμα από τα ψάρια ιχθυοτροφείου. Ωστόσο, τα ψάρια ιχθυοτροφείου διαθέτουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως:

- Σταθερά αποθέματα
- Θρεπτικό περιεχόμενο σύμφωνα με προδιαγραφές
- Αυστηρός έλεγχος της γραμμής παραγωγής
- Χαμηλότερες και σταθερότερες τιμές
- Ιχνηλασιμότητα

Επιπλέον, η άρνηση της κατανάλωσης ψαριών ανοικτής θάλασσας έχει συσχετιστεί με ηθικά διλήμματα, ενώ η άρνηση για κατανάλωση ψαριών ιχθυοτροφείου σχετίζεται με την πεποίθηση για χαμηλότερη ποιότητα τροφίμων. Η υδατοκαλλιέργεια έχει φυσικά και αρνητικές περιβαλλοντικές συνέπειες: ανεξέλεγκτο ψάρεμα για την παραγωγή ιχθυοτροφών, αλλαγές φυσικού περιβάλλοντος, δημιουργία παραποτάμων και επιδράσεις στη βιοποικιλότητα όταν τα ψάρια δραπετεύουν από τα σημεία εκτροφής. Ως λύση στα παραπάνω αποτελεί η χρηματοδότηση αρκετών προγραμμάτων στην ΕΕ, τα οποία στοχεύουν στη βελτίωση των υδατοκαλλιεργειών, έτσι ώστε να καλύπτονται οι καταναλωτικές ανάγκες με υπεύθυνο και διατηρήσιμο τρόπο. Επιπρόσθετα, υπάρχει η πεποίθηση ότι τα ψάρια ιχθυοτροφείου είναι λιγότερο υγιεινά. Ωστόσο, λόγω του ελεγχόμενου περιβάλλοντος, οι ασθένειες σε μια υδατοκαλλιέργεια είναι περιορισμένες, βελτιώνοντας έτσι την ευημερία των ψαριών. Ένας σημαντικός στόχος των υδατοκαλλιεργειών είναι η εξασφάλιση ενός επιθυμητού επιπέδου ευημερίας, έτσι ώστε τα ψάρια ιχθυοτροφείου να μπορούν να συγκριθούν με τα ψάρια ανοικτής θάλασσας[47].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

4.1. Εισαγωγή

Τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι η σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας κυρίως στο δυτικό κόσμο. Ευθύνονται για 2 εκατομμύρια θανάτους (το 40% περίπου) κάθε χρόνο, προσβάλλουν την καρδιά και τα συγγενή αιμοφόρα αγγεία και εμφανίζονται με διάφορες μορφές, όπως η υπέρταση, η στεφανιαία νόσος, η καρδιοπάθεια και το εγκεφαλικό επεισόδιο. Έχουν μάλιστα στενή σχέση με τις κοινωνικές συνθήκες, καθώς οι αποκλίσεις των ποσοστών των νοσημάτων αυτών είναι η σπουδαιότερη αιτία για τις ανισότητες που παρατηρούνται στον τομέα της υγείας τόσο εντός όσο και μεταξύ των κρατών μελών[48]. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ετησίως, το 1/6 των ανθρώπων χάνουν τη ζωή τους πριν την ηλικία των 65 ετών. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στους άνδρες, το ποσοστό αυτών που πεθαίνουν κάθε χρόνο φτάνει το 30%, ενώ για τις γυναίκες το 24%. Υψηλά χρηματικά ποσά επενδύονται και στις χώρες της Αμερικής, αφού σύμφωνα με τις οικονομικές δαπάνες των Ηνωμένων Πολιτειών, ξοδεύονται παραπάνω από 20 δισεκατομμύρια δολάρια για την υγειονομική περίθαλψη από καρδιαγγειακές παθήσεις.

Η καρδιακή υγεία έχει άμεση σχέση με τον τρόπο ζωής και τις συνήθειές μας. Για να είναι αποτελεσματικές οι στρατηγικές πρόληψης θα πρέπει, συνεπώς, να στραφούμε γύρω από σημαντικούς παράγοντες όπως το κάπνισμα, η διατροφή και η σωματική άσκηση, η κατανάλωση οινοπνεύματος και το ψυχοκοινωνικό άγχος. Η καρδιαγγειακή προσβολή και η εγκεφαλική συμφόρηση αντιπροσωπεύουν την κλινική έκβαση μιας συστηματικής αγγειακής διαδικασίας, την αθηροσκλήρωση, μία προοδευτική πολυπαραγοντική φθορά των αιμοφόρων αγγείων που αρχίζει κατά την παιδική ηλικία και καταλήγει σε ένα φάσμα σοβαρών αγγειακών παθήσεων που, όπως προαναφέρθηκε, αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου και αναπηρίας στις βιομηχανικά αναπτυγμένες χώρες. Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν πως τα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης μπορούν να επιταχυνθούν από διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως τα αυξημένα επίπεδα της LDL χοληστερόλης, το σακχαρώδη διαβήτη, την υπέρταση και το κάπνισμα[49].

Σε μελέτη που έγινε με σκοπό την αξιολόγηση της συχνότητας πολλαπλών προδιαθετικών παραγόντων σε παιδιά ηλικίας 11-12 στην Κύπρο, συμπεριλήφθηκαν

7054 παιδιά (αγόρια 51,9%) μέσης ηλικίας 11 ετών, αξιολογήθηκε η παρουσία υπερχοληστερολαιμίας (ολική χοληστερόλη>200 mg/dL), υψηλή τιμή αρτηριακής πίεσης (συστολική αρτηριακή πίεση>125 mm Hg), παχυσαρκίας και μειωμένο επίπεδο φυσικής κατάστασης (Παλίνδρομο τρέξιμο αντοχής 2,5 min για αγόρια, 2,0 min για κορίτσια). Τα αποτελέσματα ήταν ότι μεγάλο ποσοστό, τόσο στα αγόρια όσο και στα κορίτσια, παρουσίαζε υπερχοληστερολαιμία (21,1% και 15,2% αντίστοιχα), μειωμένο επίπεδο φυσικής κατάστασης (24,2% και 26,4% αντίστοιχα) και αυξημένο σωματικό βάρος (20,3% και 18,1% αντίστοιχα), ενώ μικρό ποσοστό παρουσίαζε υψηλες τίμες αρτηριακής πίεσης (4,8% και 6,4% αντίστοιχα). Το συμπέρασμα είναι πως τα μισά σχεδόν παιδιά που συμμετείχαν στην έρευνα, είχαν τουλάχιστον ένα προδιαθετικό παράγοντα, 1 στα 6 παιδιά είχαν 2 παράγοντες και 1 στα 20 παιδιά είχαν 3 παράγοντες. Με δεδομένη την τάση για παραμονή των προδιαθετικών παραγόντων καρδιαγγειακών νοσημάτων στην ενήλικη ζωή, τα ποσοστά αυτά κρίνονται ιδιαίτερα ανησυχητικά και ενισχύουν την ανάγκη παρέμβασης στην παιδική ηλικία με στόχο την ανατροπή των δεδομένων αυτών[50].

Πολλοί συγχέουν την αρτηριοσκλήρυνση με την αθηροσκλήρωση. Η αρτηριοσκλήρυνση δεν είναι τίποτα άλλο παρά η απώλεια της ελαστικότητας των αρτηριών, με αποτέλεσμα να αυξάνει η αρτηριακή πίεση. Η αθηροσκλήρωση αφορά ανάπτυξη βλαβών στο τοίχωμα των αρτηριών που ονομάζονται αθηρώματα. Δηλαδή εμφανίζονται στο τοίχωμα των αρτηριών αθηρωματικές πλάκες που ο πυρήνας τους αποτελείται κυρίως από οξειδωμένη LDL (ox-LDL) με εναπόθεση ασβεστίου[110].

4.2. Επιδημιολογία και Παράγοντες Κινδύνου της Αθηρογένεσης

Η αθηρογένεση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία, γεγονός που την καθιστά πολύπλοκο φαινόμενο, ενώ κάνει δύσκολο τον σαφή καθορισμό του κινδύνου εμφάνισής της, λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόντων κινδύνου που συνδέονται με αυτή. Παρακάτω αναφέρονται μερικοί από τους σημαντικότερους αυτούς παράγοντες.

4.2.1. Ηλικία

Είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κινδύνου για την πρόβλεψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων και απεικονίζεται με σαφή και εύστοχο τρόπο από τη Μελέτη Καρδίας Framingham (Framingham Heart Study), η οποία διαθέτει ένα σύστημα βαθμολόγησης 14 σημείων για την πρόβλεψη να εμφανιστούν καρδιαγγειακά προβλήματα μέσα σε μία δεκαετία. Όσο αυξάνεται ο κίνδυνος αυξάνεται και η βαθμολογία και μέχρι τους 7 βαθμούς μπορεί να αποδοθεί στην ηλικία και μόνο[51].

4.2.2. Υπέρταση

Επιδημιολογικά δεδομένα, μελέτες και πειράματα σε ζώα συνδέουν την υπέρταση με την αθηρογένεση. *In vivo* πειράματα δείχνουν ότι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης από μόνη της δεν οδηγεί σε αθηρωμάτωση αλλά μόνο σε συνδυασμό με αύξηση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Επιδημιολογικές επίσης μελέτες έχουν δείξει ότι σε υπερτασικούς πληθυσμούς με πολύ χαμηλά επίπεδα χοληστερόλης στο αίμα, όπως πληθυσμοί της Ιαπωνίας και άλλων Ασιατικών χωρών, οι αθηροσκληρωτικές επιπλοκές δεν είναι συνήθεις. Στις περισσότερες όμως δυτικές κοινωνίες το επίπεδο λιποπρωτεϊνών του πλάσματος είναι αρκετό για να επιτρέπει στην υπέρταση να προάγει την αθηρογένεση.

4.2.3. Φύλο

Οι θάνατοι από στεφανιαία νόσο πριν από την ηλικία των 60 ετών είναι περισσότερο συχνοί στους άντρες παρά στις γυναίκες: στις ηλικίες από 45 έως 50, οι άντρες έχουν πιθανότητα να πεθάνουν 4 φορές περισσότερο απ' ό,τι οι γυναίκες. Οι διαφορές αυτές σχετίζονται με τον προστατευτικό ρόλο των οιστρογόνων και προγεστερόνης (ορμόνες φύλου). Μετά την εμμηνόπαυση, οι γυναίκες γίνονται περισσότερο ευάλωτες στη στεφανιαία νόσο στην ηλικία δε των 70, οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων έχουν εξαφανιστεί[52]. Στην αθηροσκλήρωση, οι διαφορές ανδρών και γυναικών δεν περιορίζονται μόνο από τις ορμόνες των γονάδων (γοναδοτρόπες ορμόνες), αλλά έχουν δειχθεί ουσιώδεις αποκλίσεις στους μηχανισμούς της νόσου. Μελέτη 71 SNPs (Single Nucleatide Polymorphisms), μιας νέας γενεάς γενετικών δεικτών που άνοιξαν καινούργιους δρόμους στον εντοπισμό γενετικών δεικτών και στη διερεύνηση συμμετοχής των κωδικοποιούμενων προϊόντων τους στην παθογένεια και εκδήλωση της αθηροθρομβωτικής νόσου, σε μεγάλο αριθμό ασθενών[53], έδειξε ότι δύο γονίδια συσχετίζονται με τη νόσο στους άνδρες, ενώ δύο διαφορετικά γονίδια (plasminogen activator inhibitor 1 και stromelysin 1) συσχετίζονται με τη νόσο στις γυναίκες, υποδηλώνοντας τη διαφορά φύλου στην εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης. Τέτοιες γενετικές διαφορές είναι εμφανείς και στη φυσιολογία της αθηροσκλήρωσης, όπως στα συστατικά της αθηρωματικής πλάκας (περισσότερα κυτταρικά στοιχεία και ινώδης ιστός στις γυναίκες), στη λειτουργία του ενδοθηλίου (επίδραση των οιστρογόνων στην αγγειοδιαστολή των στεφανιαίων) και στην αιμόσταση (υψηλότερα επίπεδα ινοδογώνου και παράγοντα VII στις γυναίκες).

4.2.4. Κάπνισμα

Η συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, έκανε την εμφάνισή του ήδη από τη δεκαετία του ‘40 και του ‘50. Ειδικότερα, έχει αποδειχθεί ότι το κάπνισμα αυξάνει την αθηρωμάτωση περισσότερο από 50% με συνέπεια να διπλασιάζονται τα περιστατικά καρδιαγγειακών παθήσεων. Παράλληλα, διαπιστώθηκε πως ο κίνδυνος στους πρώην καπνιστές μειώνεται βαθμιαία και σε διάρκεια 2 ετών ο κίνδυνος είναι στα επίπεδα των μη καπνιστών[54].

4.2.5. Παχυσαρκία

Η συσχέτιση της παχυσαρκίας με διάφορους προδιαθετικούς παράγοντες καρδιαγγειακών νοσημάτων αλλά και η επίπτωση των νοσημάτων φθοράς όπως η στεφανιαία νόσος, τα εγκεφαλικά επεισόδια και ο μη ινσουλινοεξαρτώμενος σακχαρώδης διαβήτης έχει διερευνηθεί εκτεταμένα[55]. Η συμπερασματολογία αυτή στηρίχθηκε στον υπολογισμό του σχετικού κινδύνου στα άτομα που βρίσκονταν στο ανώτερο τριτημόριο των τιμών του Δείκτη Μάζας Σώματος (ΔΜΣ). Η παχυσαρκία, συνοδεύεται με μεγαλύτερη τιμή συστολικής πίεσης και ολικής χοληστερόλης και μικρότερη τιμή HDL-χοληστερόλης. Η παχυσαρκία τέλος συσχετίζεται με την έκταση των αθηροσκληρωτικών αλλοιώσεων τόσο σε ενήλικες, όσο και σε μικρά παιδιά, έφηβους και νέους.

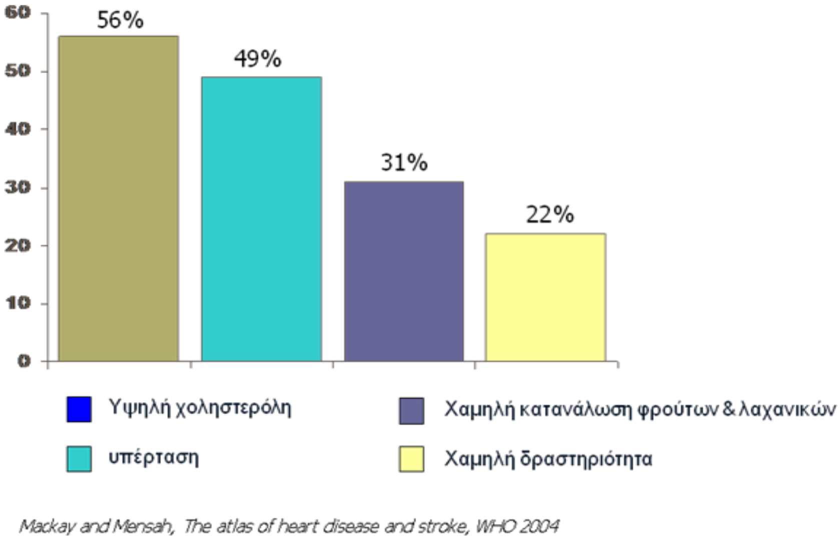
4.2.6. Σακχαρώδης Διαβήτης

Δεν είναι λίγες οι έρευνες που έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα πως η στεφανιαία νόσος σχετίζεται άμεσα με το σακχαρώδη διαβήτη. Πιο συγκεκριμένα, ασθενείς που πάσχουν απο διαβήτη κινδυνεύουν 3-5 φορές περισσότερο να εμφανίσουν συμπτώματα καρδιαγγειακών παθήσεων. Σε προχωρημένου σταδίου διαβήτη, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα LDL-C στο πλάσμα και μειωμένα επίπεδα HDL-C. Συλλογικά, αυτές οι ανωμαλίες των ενδοθηλιακών κυττάρων, των αιμοπεταλίων, των λείων μυϊκών κυττάρων, των λιποπρωτεϊνών και η διαδικασία πήξης μπορεί να θεωρηθεί ως συμβολή στο πρόβλημα της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρωσης στο διαβήτη[56].

4.2.7. Χοληστερόλη Ορού

Με βάση τις πολυάριθμες μελέτες που έγιναν σχετικά με την επίδραση της χοληστερόλης ορού στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών, είναι αδιαμφισβήτητη πλέον η σχέση μεταξύ της χοληστερόλης και της αθηροσκλήρωσης. Η οικογενειακή υπερχοληστερολαιμία (FH) είναι μια αυτοσωματική επικρατούσα διαταραχή με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης (1 στους 500 ανθρώπους). Οι ετεροζυγώτες για αυτή την ασθένεια εκδηλώνουν μία αύξηση στη χοληστερόλη του πλάσματος κατά 2-3 φορές, που σχετίζεται άμεσα με τα αυξημενα επίπεδα LDL. Σε αυτό το σημείο εμπλέκεται και ο υποδοχέας της LDL. Στους ομοζυγώτες έχει παρατηρηθεί αύξηση της χοληστερόλης 4-6 φορές περισσότερο[57].

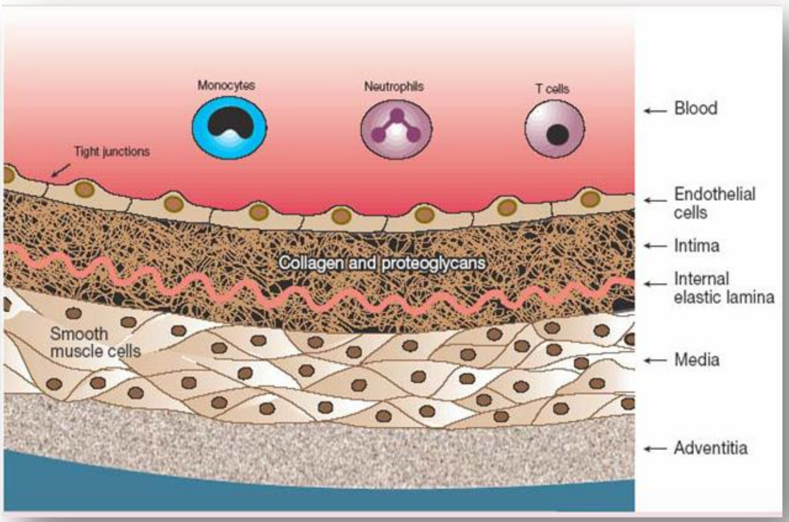
Ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά νοσήματα από την αυξημένη LDL-C βασίζεται στα πειραματικά δεδομένα ότι η θεραπεία με στόχο την μείωση της χοληστερόλης, έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει σημαντικά και τα κλινικά συμπτώματα της αθηροσκλήρωσης, ειδικότερα ύστερα από χορήγηση αναστολεων ρεδουκτάσης του 3-υδροξυμεθυλογλουταρυλο-CoA (HMG-CoA), δηλαδή των στατινών που έχουν την ικανότητα να μειώνουν σημαντικά την LDL χοληστερόλη[58]. Αντίστροφη όμως είναι η δράση της HDL χοληστερόλησσε σύγκριση με την LDL, όπως αποδεικνύεται από τη νόσο Tangier[59]. Αυτή η αυτοσωμική κατάσταση χαρακτηρίζεται από την απουσία HDL, αφού αυτή δεν εκκρίνεται από τα κύτταρα, λόγω βλάβης στον δεσμευόμενο με ATP μεταφορέα-1. Σε αυτή τη περίπτωση, οι ασθενείς διαθέτουν ιστούς στους οποίου έχει συσσωρευτεί χοληστερόλη, καθώς και πρησμένες αμυγδαλές, νεφροπάθεια και πρόωρη στεφανιαία νόσο.



Σχήμα 4.1. Η συνεισφορά επιλεγμένων παραγόντων στον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα.

4.3. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά Γνωρίσματα της Νόσου

4.3.1 Η Φυσιολογία της αρτηρίας



Εικόνα 4.1. Η δομή μιας φυσιολογικής μεγάλου μεγέθους αρτηρίας. Διακρίνονται: ο έσω χιτώνας (intima), ο μέσος χιτώνας (media) και ο έξω χιτώνας. Ο έσω χιτώνας είναι λεπτός και αποτελείται από μια μονή στοιβάδα ενδοθηλιακών κυττάρων προς την πλευρά του αυλού που υποστηρίζεται από μια στοιβάδα κολλαγόνου και πρωτεϊγλυκανών, η οποία αφορίζεται περιφερικά από τον έσω ελαστικό υμένα (internal elastic lamina) αποτελούμενο από ελαστικές ίνες. Ο μέσος χιτώνας αποτελείται από λεία μυικά κύτταρα (smooth muscle cells, SMCs), ενώ ο έξω χιτώνας από συνδετικό ιστό, λίγα διάσπαρτα SMCs και ινοβλάστες.

Το αρτηριακό τοίχωμα αποτελείται από τρεις στιβάδες: α) τον έσω χιτώνα (intima), που αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα και τον υποστηρικτικό υπενδοθηλιακό ιστό. Ο υπενδοθηλιακός ιστός είναι πλούσιος σε κολλαγόνο και κύτταρα, όπως ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα του έσω χιτώνα, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην πορεία της αθηροσκλήρωσης, β) το μέσο χιτώνα (media), που αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα και πυκνό, ισχυρό κολλαγονικό ιστοι και πρωτεογλυκάνες και γ) τον έξω χιτώνα (adventitia), επίσης αποτελούμενο από ισχυρό κολλαγονικό ιστό (Εικόνα 4.1). Αυτά τα τρία στρώματα οριοθετούνται από τα ομόκεντρα στρώματα της ελαστίνης, γνωστά ως έσω ελαστικό πέταλο (internal elastic lamina) το οποίο χωρίζει τον έσω από τον μέσο χιτώνα, και έξω ελαστικό πέταλο (external elastic lamina) το οποίο χωρίζει τον μέσο από τον έξω χιτώνα. Η επιφάνεια του αυλού, που αποτελεί την εσωτερική κοιλότητα των αρτηριών, καλύπτεται από ένα ενιαίο στρώμα ενδοθηλιακών κυττάρων που συνδέονται το ένα με το άλλο με μια σειρά κυτταρικών συνδέσμων (juctional complexes). Τα ενδοθηλιακά κύτταρα δημιουργούν ένα εμπόδιο μεταξύ της εσωτερικής επιφάνειας του αυλού της αρτηρίας και του υποενδοθηλιακού χώρου του αρτηριακού τοιχώματος.

Ο έξω χιτώνας (εξωτερικό στρώμα της αρτηρίας), αποτελείται από μια χαλαρή ύλη με μικρό ποσό ινών ελαστίνης, λεία μυικά κύτταρα, ινοβλάστες και κολλαγόνο. Το μεγαλύτερο μέρος των αγγειοκινητικών νευρικών ινών του αυτόνομου νευρικού συστήματος στα αγγεία του αίματος διαπερνά αυτόν τον χιτώνα. Όπως και με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο έξω χιτώνας είχε και αυτός θεωρηθεί ότι έχει παθητικό ρόλο και είναι ανενεργός.

4.3.2 Παράγοντες που Επηρρεάζουν τις Ελαστικές Ιδιότητες των Αρτηριών

4.3.2.1. Ηλικία

Η μείωση της ελαστικότητας των αρτηριών με τη πάροδο των χρόνων, είναι ένα απολύτως φυσιολογικό φαινόμενο. Πληθυσμιακές επιδημιολογικές μελέτες, που έγιναν στην Κίνα σε άτομα χωρίς καρδιαγγειακές επιπλοκές, έδειξαν αύξηση της ταχύτητας του κύματος σφυγμού, και συνεπώς μείωση της ελάστικότητας με την αύξηση της ηλικίας. Οι Avolio et al[60], σε μελέτη 480 υγιών ατόμων, ηλικίας 3-89 ετών, απέδειξαν την πολύ σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ της ταχύτητας του κύματος σφυγμού (PWV) και της ηλικίας.

4.3.2.2. Κάπνισμα

Οι Stefanidis et al[62] έδειξαν ότι τόσο το ενεργητικό όσο και το παθητικό κάπνισμα προκαλεί μείωση της ελαστικότητας της αορτής που διαρκεί τουλάχιστον 20 λεπτά και το οποίο οφείλεται σε αλλαγές του ενδοθηλίου, ενώ φαίνεται ότι οι γυναίκες είναι πιο ευάλωτες στην επίδραση του καπνίσματος από τους άνδρες παρά το γεγονός ότι έχουν καλύτερη αορτική δραστηριότητα μέχρι την εμμηνόπαυση.

4.3.2.3. Φύλο

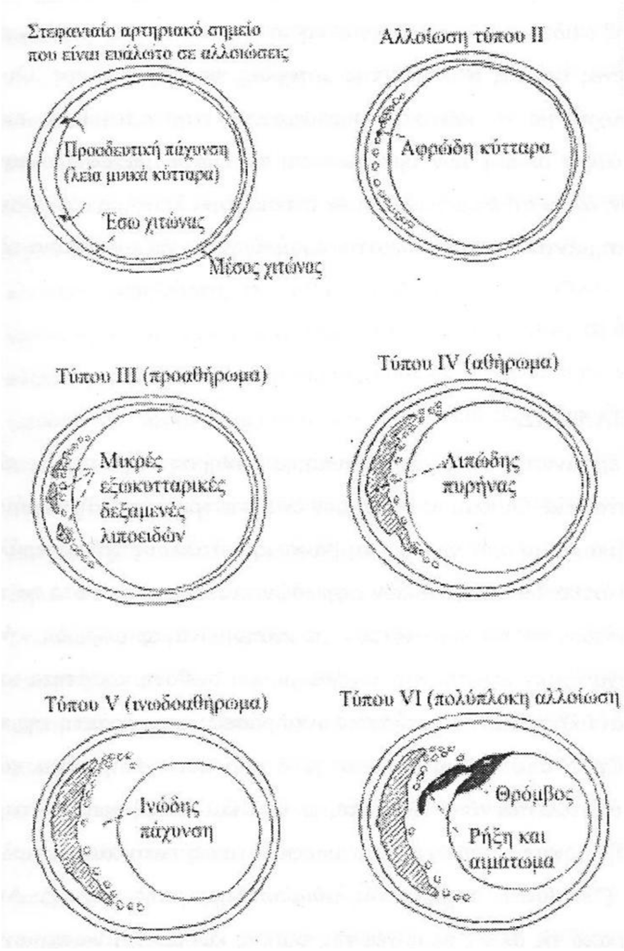
Σε μελέτη 12 ανδρών με καρκίνο του προστάτη, που βρίσκονταν σε θεραπεία με αντιανδρογόνα, η ελαστικότητα της αορτής ήταν σημαντικά μειωμένη. Ορισμένες μελέτες έδειξαν ότι οι γυναίκες στην εμμηνόπαυση που ακολουθούν θεραπεία ορμονικής υποκατάστασης, παρουσιάζουν μεγαλύτερη ελαστικότητα των αγγείων σε σχέση με εκείνες που δεν λάμβαναν τέτοια θεραπεία.

4.3.2.4. Αρτηριακή Υπέρταση

Τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι η ύπαρξη αυξημένης συστολικής πίεσης σχετίζεται με μειωμένη αορτική δραστηριότητα. Οι Dart et al[63] έδειξαν ότι η μειωμένη συστολική υπέρταση προκαλεί δυσκαμψία της αορτής, με αποτέλεσμα την υπερτροφία της αριστερής κοιλίας. Αυτή η παρατήρηση ενισχύεται από μελέτες που έδειξαν ότι η μεμονωμένη συστολική υπέρταση σχετίζεται σημαντικά με τη μάζα της αριστερής κοιλίας, τόσο σε άτομα με φυσιολογική πίεση όσο και σε υπερτασικά άτομα. Οι Beltran et al[64] ανέφεραν μείωση της ελαστικότητας των κεντρικών αρτηριών σε 19 ασθενείς με μεμονωμένη συστολική υπέρταση, σε έρευνα που συμμετείχαν 29 ασθενείς με αυξημένη διαστολική αρτηριακή και με 47 άτομα με φυσιολογική πίεση.

4.3.3 Φυσιολογία της Αθηροσκλήρωσης

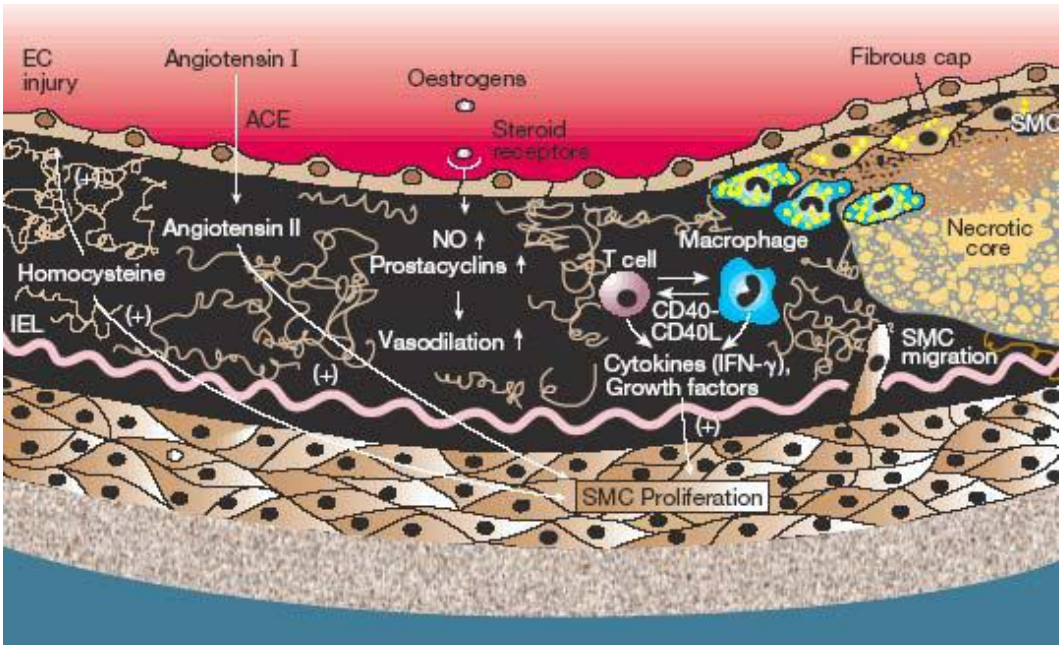
Η αθηροσκλήρωση εμφανίζεται υπό τη μορφή αρτηριακών αλλοιώσεων, γνωστές ως πλάκες οι οποίες έχουν χαρακτηριστεί σε έξι κύριους τύπους αλλοιώσεων και που αντικατοπτρίζουν τα πρώιμα, αναπτυσσόμενα και ώριμα στάδια της νόσου (Εικόνα 4.2). Η προοδευτική πάχυνση του έσω χιτώνα είναι μία από τις πρώτες αλλαγές που γίνονται στην αρτηρία. Καθώς τα μακροφάγα συσσωρεύουν λίπος, αλλοιώσεις τύπου II σχηματίζονται ως κονδυλώδεις περιοχές της εναπόθεσης λιποειδών γνωστές ως «λιπαρές ραβδώσεις» (fatty streaks) και αντιπροσωπεύουν τα μακροφάγα γεμάτα λιποειδή (αφρώδη κύτταρα). Οι αναπτυσσόμενες αλλοιώσεις προκαλούν τους δύο επόμενους τύπους αλλοιώσεων και, όπως φαίνονται στο σχήμα, δημιουργούνται σημαντικές περιοχές εξωκυττάριου λίπους που αντιπροσωπεύει τον «πυρήνα» (core) της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Οι τύπου IV αλλοιώσεις καθορίζονται από το ότι ο λιπώδης πυρήνας διαχωρίζεται από τον αρτηριακό αυλό με ένα σχετικά λεπτό στρώμα ιστού, ενώ οι τύπου V επιδεικνύουν μια ινώδη (fibrous) πάχυνση αυτής της δομής, που είναι επίσης γνωστή ως κάλυμμα (cap). Αυτές οι αλλοιώσεις τύπου IV και V μπορούν να βρεθούν αρχικώς σε περιοχές των στεφανιαίων αρτηριών, της κοιλιακής αορτής, και σε μερικές πλευρές των καρωτιδικών αρτηριών κατά την τρίτη προς την τέταρτη δεκαετία της ζωής. Οι ώριμου τύπου VI αλλοιώσεις επιδεικνύουν αρχιτεκτονική η οποία είναι πιο περίπλοκη και χαρακτηρίζεται από ασβεστοποιημένες ινώδεις περιοχές της αρτηρίας, με ορατό έλκος. Οι τύποι αυτών των βλαβών συνδέονται συχνά με τα κλινικά συμπτώματα ή την αρτηριακή εμβολή.



Εικόνα 4.2. Οι 6 κύριοι τύποι αρτηριακών αλλοιώσεων όπως διατυπώθηκαν από τους Stary et al. Η πρόοδος της αρτηριοσκλήρωσης, απεικονίζεται από τα πρώιμα στάδια (πάνω αριστερά) έως τα πιο προχωρημένα (κάτω δεξιά), όπου και καταλήγει στη ρήξη πλάκας και στη θρόμβωση.

4.3.4 Μορφολογία της Αθηρωματικής Πλάκας

Η μορφολογία της αθηρωματικής πλάκας αναπαριστάται στην εικόνα 4.3. Οι βλάβες, που ιστολογικά ορίζονται ως σοβαρές, δεν είναι απαραίτητο να συνοδεύονται από σημαντικές στενώσεις, να φαίνονται με την αγγειογραφία ή να συνοδεύονται από κλινικές εκδηλώσεις, μπορεί όμως να είναι σημαντικές. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, οι ενδιάμεσες αλλοιώσεις της πλάκας, ταξινομούνται σε 3 τύπους, ανάλογα με το στάδιο βλάβης στο οποίο βρίσκονται: τύποι Ι, ΙΙ και ΙΙΙ. Οι εξελιγμένες αθηρωματικές πλάκες κατατάσσονται στις κατηγορίες IV,V και VI, οι οποίες περιγράφονται παρακάτω[147,148,149] και έχουν τη μεγαλύτερη κλινική σημασία.



Εικόνα 4.3. Ινώδεις πλάκες. Διάφοροι παράγοντες κινδύνου, όπως τα αυξημένα επίπεδα ομοκυστεϊνης και αγγειοτενσίνης II (AT II), που παράγεται με τη δράση του μετατρεπτικού ενζύμου της αγγειοτενσίνης (Angiotensin Converting Enzyme, ACE), προκαλούν τη μετανάστευση και την υπερπλασία των λείων μυικών κυττάρων (Smooth Muscle Cells, SMC). Τα οιστρογόνα ασκούν ευεργετικές δράσεις στα επίπεδα των λιπιδίων στο πλάσμα και ίσως να διεγείρουν την παραγωγή NO και προστακυκλινών από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Η διαντίδραση μεταξύ του αντιγόνου επιφανείας CD40 (Cluster Designation, CD) και του προσδέτη του (ligand) CD40L διεγείρει τα Τ-λεμφοκύτταρα (T-cells) και τα μακροφάγα να εκφράσουν κυτταροκίνες, όπως η ιντερφερόνη-γ (IFN-γ) και να επάγουν τη φλεγμονή, την αύξηση των λείων μυικών κυττάρων και τη συσσώρευση θεμέλιας ουσίας. Στον έσω χιτώνα τα λεία μυικά κύτταρα εκκρίνουν εξωκυττάρια θεμέλια ουσία με συνέπεια το σχηματισμό ινώδους καλύπτρας (fibrous cap).

- **Τύπος IV**

Στον τύπο IV, που συχνά αναφέρεται και ως αθήρωμα, παρατηρείται μεγάλη συγκέντρωση εξωκυττάριων ουσιών, συσσώρευση μακροφάγων, λείων μυϊκών κυττάρων, λεμφοκυττάρων και μαστοκυττάρων μεταξύ λιπώδους πυρήνα και ενδοθηλίου, τα οποία καταλαμβάνουν μεγάλη περιοχή (λιπώδης πυρήνας) του έσω χιτώνα. Ο ινώδης ιστός δεν έχει ακόμα σχηματιστεί και απουσιάζουν οι επιπλοκές, όπως ο διαχωρισμός του τοιχώματος ή ο σχηματισμός θρόμβου. Το αθήρωμα φαίνεται να είναι η πρώτη βλάβη στον έσω χιτώνα του ενδοθηλίου. Η κλινική σημασία του σχηματισμού της βλάβης αυτού του τύπου είναι πολύ σπουδαία. Η συσσώρευση μακροφάγων και λείων μυϊκών κυττάρων, με την ταυτόχρονη απουσία ινώδους ιστού, που σταθεροποιεί τις βλάβες, δημιουργεί ευάλωτες περιοχές[65].

- **Τύπος V**

Οι βλάβες αυτές περιέχουν κυρίως ινώδη συνδετικό ιστό, ο οποίος αναπτύσσεται με την ταυτόχρονη παρουσία του λιπώδους πυρήνα και ονομάζεται ινοαθήρωμα. Στον τύπο αυτό ανιχνεύονται σημαντικές στενώσεις στις αρτηρίες, που είναι αρκετά μεγαλύτερες από αυτές του τύπου IV. Και εδώ μπορούν να αναπτυχθούν διαβρώσεις. Σε βλάβες που περιέχουν μεγάλη ποσότητα ασβεστίου, υπάρχει επίσης ινώδης χιτώνας και συχνά η υποκείμενη μορφολογία μοιάζει με αυτή της ινοαθηρωματικής πλάκας[66].

- **ΤΥΠΟΣ VI**

Σε αυτόν τον τύπο, ανήκουν βλάβες των δύο προηγούμενων τύπων που παρουσιάζουν όμως επιπλοκές. Η θνησιμότητα της αθηροσκλήρωσης οφείλεται κυρίως στις βλάβες τύπου IV και V, στις οποίες παρατηρείται ρήξη, αιμάτωμα ή αιμορραγία και εναπόθεση θρόμβου. Οι πιο κοινές μορφές ευπαθών πλακών είναι αυτές που έχουν λεπτή ινώδη κάψα (συσσώρευση λείων μυϊκών κυττάρων και κολλαγόνου στην ινώδη κάψα), εκτεταμένη διείσδυση μακροφάγων, πυρήνα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και μεγάλη πυκνότητα αφρωδών κυττάρων. Η ρήξη αυτών των πλακών (ανεξάρτητα του μεγέθους τους) μπορεί να προκαλέσει στεφανιαία σύνδρομα. Ένας άλλος παράγοντας που ευθύνεται για την εξασθένιση της ινώδους κάψας είναι και οι οξειδωμένες LDL μορφές, ως κυτταροτοξικές. Όσο μεγαλύτερη είναι η περιεκτικότητα του πυρήνα της πλάκας σε λιπίδια τόσο αυξάνει η πιθανότητα για ρήξη[67].

Πίνακας 4.1. Χαρακτηριστικά ευάλωτης πλάκας

❖Αυξημένος αριθμός μακροφάγων
❖ Αυξημένη έκφραση TF
❖Μείωση αριθμού λείων μυϊκών κυττάρων
❖Μεγάλος λιπώδης πυρήνας
❖Λεπτή ινώσης κάψα

4.4. Θεωρίες Ανάπτυξης της Αθηροσκλήρωσης

4.4.1. Θεωρία της Φλεγμονής (Απόκριση στον Τραυματισμό, Response to Ingury)

Η πρώτη θεωρία βασίζεται στο ότι η δημιουργία πλακών αποτελεί απάντηση στην ενδοθηλιακή βλάβη, όπου η υπερλιπιδαιμία έχει κυρίαρχο ρόλο. Η θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό δημοσιεύτηκε το 1977 από τον Russell Ross[68]. Στο μοντέλο αυτό, το στάδιο έναρξης είναι η φλεγμονή που προκαλείται από βλάβη του ενδοθηλίου από τραυματισμό ή από άλλους παράγοντες όπως, η LDL-C, ιδιαίτερα οι οξειδωμένες LDL μορφές, προϊόντα καπνίσματος, ανοσολογικοί και λοιμώδεις παράγοντες, ενδοτοξίνες, ιοί, κ.α, έχουν ως αποτέλεσμα την δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και τη διαταραχή των ομοιοστατικών μηχανισμών. Αυτό οδηγεί σε: α) αύξηση της έκφρασης των μορίων προσκόλλησης και αύξηση της προσκόλλησης των λευκοκυττάρων και των αιμοπεταλίων στο ενδοθήλιο, β) προσέλκυση των μονοκυττάρων/μακροφάγων και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων που μεταναστεύουν στην περιοχή της φλεγμονής, γ) αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου για τις τροποποιημένες μορφές LDL, πρόσληψη των σωματιδίων αυτών από τα μακροφάγα μέσω των υποδοχέων εκκαθαριστών και σχηματισμός αφρωδών κυττάρων. Η θεωρία της απόκρισης στον τραυματισμό βασίστηκε αρχικά στην απογύμνωση του ενδοθηλίου ως κύριο στάδιο για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Σε μια πρόσφατη βελτίωση της αρχικής υπόθεσής του, ο Ross πρότεινε ότι η δυσλειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι επαρκής για την έναρξη της αθηρογένεσης μέσω της αυξημένης διαπερατότητας του ενδοθηλίου από τις αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες’. Οι κύριοι κυτταρικοί μεσολαβητές αυτής της πρώιμης φλεγμονώδους απόκρισης είναι τα αιμοπετάλια, τα μακροφάγα κύτταρα, τα Τ-λεμφοκύτταρα και τα λεία μυικά κύτταρα. Μέσα στο εντοπισμένο αυτό τραύμα η φλεγμονή, που συνεχίζεται, μπορεί να οδηγήσει στη νέκρωση των κυττάρων και την περαιτέρω προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λεμφοκυττάρων με μια συνακόλουθη απελευθέρωση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεολυτικών ενζύμων. Αυτό μπορεί να αποτελέσει την έναρξη για νέκρωση μέσα στο τραύμα, και μπορεί να προκαλέσει την αυτοκαταλυτική επέκταση του τραύματος.

4.4.2. Θεωρία Οξειδωτικής Τροποποίησης

Στην έρευνά τους για εναλλακτικούς υποδοχείς των LDL, οι Brown και Goldstein[69] παρατήρησαν ότι η χημική τροποποίηση των LDL με ακετυλίωση οδηγεί στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων όταν επωάζεται με τα μακροφάγα. Η πρόσληψη αυτής της χημικά τροποποιημένης LDL αποδείχθηκε ότι γινόταν μέσω ενός ειδικού υποδοχέα που αργότερα ονομάστηκε «ακετυλο-LDL υποδοχέας». Αυτός ο υποδοχέας αποτελεί σήμερα έναν από τους πολλούς υποδοχείς, οι οποίοι ονομάζονται «εκκαθαριστές υποδοχείς» (“scavenger receptors”, SR) οι οποίοι υπάρχουν στα μακροφάγα και σε άλλους τύπους κυττάρων. Οι εκκαθαριστές υποδοχείς, επομένως, φαίνεται να διαδραματίζουν έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης στο στάδιο του σχηματισμού των αφρωδών κυττάρων.

4.4.2.1. Μηχανισμοί Οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης

Πίνακας 4. 2. Σύσταση φωσφολιποειδών των ανθρώπινων LDL.

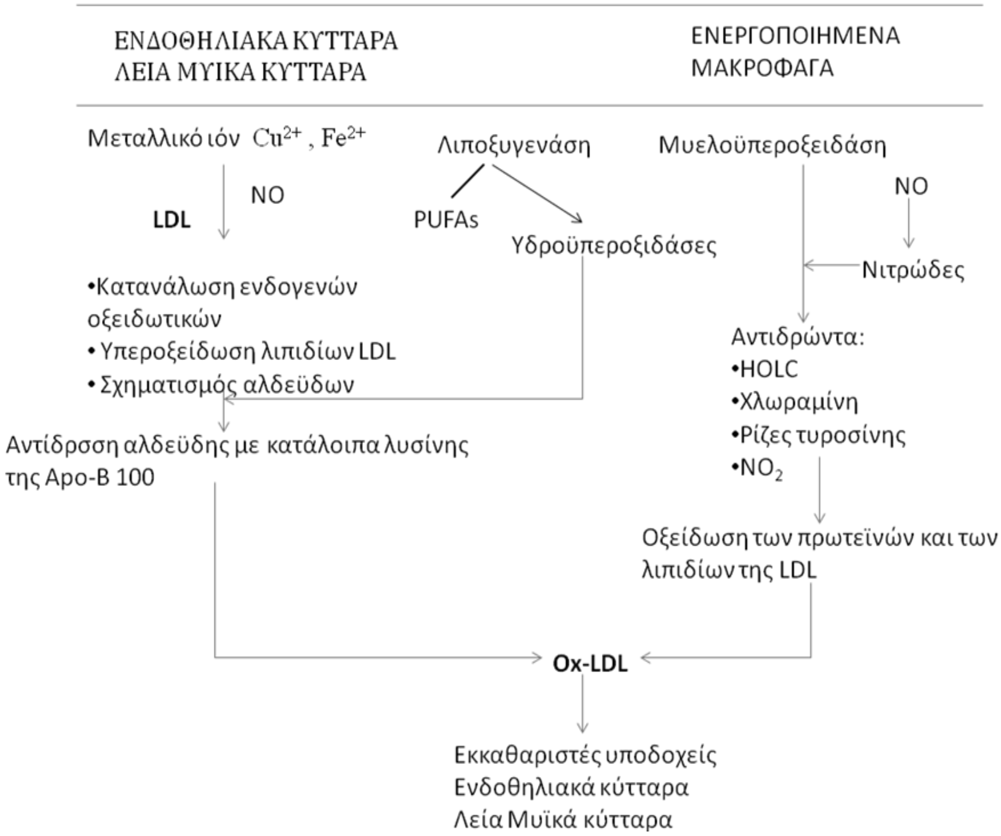
Φωσφολιποειδή	mmol/mg πρωτεΐνης Μέσος όρος + SD
Ολικά φωσφολιποειδή	1300 + 227
Φωσφατιδυλοχολίνη	818 + 143
Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη	145 + 25
Σφιγγομυελίνη	336+59

Οι ανθρώπινες LDL είναι σωματίδια που περιέχουν τόσο λιποειδή όσο και πρωτεΐνες (Πίνακα 4.2).

Με βάση τις λιποειδικές τάξεις που απαντούν στα σωματίδια των LDL, ένα σωματίδιο LDL περιέχει 2700 μόρια λιπαρών οξέων. Το περιεχόμενο των PUFAs στις LDL μπορεί να ποικίλει αρκετά από άτομο σε άτομο. Κάποιες αναφορές δείχνουν ότι το περιεχόμενο του λινελαϊκού οξέος μπορεί να ποικίλει έως και 100%[158]. Η σημασία αυτού του γεγονότος υπογραμμίζεται από το γεγονός ότι η υπεροξείδωση των λιποειδών των LDL αναστέλλεται από τα PUFAs και επομένως, τα δείγματα των LDL μπορούν να ποικίλουν αρκετά όσον αφορά την ευαισθησία τους για την οξειδωτική τροποποίηση.

4.4.2.2. Στάδια Οξείδωσης της LDL-χοληστερόλης

Προκειμένου να μελετηθεί η οξειδωτική τροποποίηση των LDL, αυτή διαχωρίζεται αυθαίρετα σε τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι γνωστό ως έναρξη της υπεροξείδωσης των λιποειδών και περιλαμβάνει τον αρχικό σχηματισμό ελευθέρων ριζών μέσα στο σωματίδιο των LDL. Το δεύτερο στάδιο είναι γνωστό ως στάδιο διάδοσης της οξείδωσης και αντιπροσωπεύει το τμήμα της οξείδωσης των LDL που περιλαμβάνει αλυσιδωτή αντίδραση, κατά την οποία κάθε ελεύθερη ρίζα που παράγεται μέσα στο σωματίδιο των LDL οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων της μιας ελεύθερης ρίζας. Το τελικό στάδιο της οξείδωσης των LDL είναι γνωστό ως αποσύνθεση, κυρίως επειδή τα υδρουπεροξείδια των λιποειδών που σχηματίζονται μέσα στο σωματίδιο των LDL αποσυντίθενται προς δραστικές αλδεΰδες και κετόνες[70]. (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4. Μηχανισμοί οξείδωσης της LDL.

Η οξείδωση της LDL πραγματοποιείται σε τρεις φάσεις: μια αρχική φάση ‘’καθυστέρησης’’ (κατανάλωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών), μία φάση πολλαπλασιασμού (ταχεία οξείδωση των ακόρεστων λιπαρών οξέων σε λιπουδροϋπεροξείδια), και την τελική φάση (σχηματισμός αντιδραστικών αλδεϋδων που αντιδρούν με τα κατάλοιπα λυσίνης σε ApoB-100, και δίνουν οξειδωμένη LDL (Ox-LDL). Το NO αναστέλλει την οξείδωση του χαλκού. Τα ιόντα μετάλλων που εξαρτώνται από το ένζυμο λιποξυγενάση μετατρέπει τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σε υδροϋπεροξείδια και ως εκ τούτου οξεδωμένη LDL. Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα εκκρίνουν την μυελοϋπεροξειδάση, η οποία παράγει δραστικά προϊόντα, όπως οξειδωτικές πρωτεΐνες και LDL. Το NO μετατρέπεται υπό αερόβιες συνθήκες σε νιτρώδη, τα οποία αναστέλλουν την οξείδωση της μυελοϋπεροξειδάσης της LDL. Τέλος, η οξειδωμένη LDL αλληλεπιδρά με τους ΄΄εκκαθαριστές΄΄΄υποδοχείς που υπάρχουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα, στα μακροφάγα, και στα λεία μυϊκά κύτταρα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

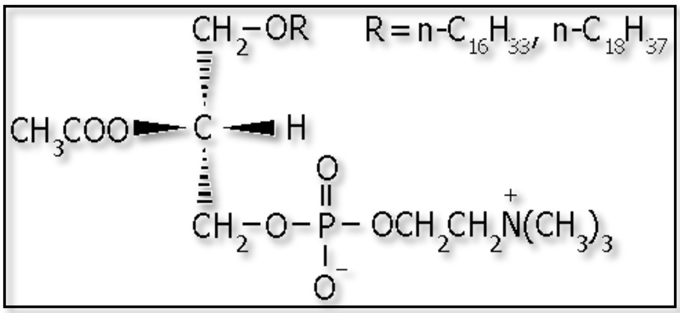
Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PAF ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ

5.1. Εισαγωγή

Σήμερα έχει αναπτυχθεί μια νέα παγκοσμίως θεωρία για τον τρόπο σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών, μέσα από μια νέα προσέγγιση στο θέμα. Η θεωρία αυτή ενοποιεί τις υπάρχουσες θεωρίες που δέχονται τη φλεγμονή σαν αίτιο για την αθηρωμάτωση και την αρτηριοσκλήρυνση, υποδεικνύει το φλεγμονώδη Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF, Platelet-Activating Factor) που είναι υπεύθυνος για την πρόκληση της αθηρωμάτωσης και συμπληρώνει τις γνώσεις μας, ώστε να είναι δυνατή η εξήγηση των σχετικών πειραματικών δεδομένων που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία, χωρίς τα κενά που παρουσίαζαν οι μέχρι σήμερα αποδεκτές θεωρίες. Η γενικευμένη αυτή θεωρία, εξηγεί επίσης– με βιοχημικό τρόπο – τη γνωστή στατιστική και επιδημιολογική παρατήρηση ότι η μεσογειακή δίαιτα προστατεύει από το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών, την αρτηριοσκλήρωση και τις καρδιαγγειακές παθήσεις. Με βάση τη θεωρία αυτή, πιστεύεται ότι δεν είναι η χοληστερόλη και τα κορεσμένα λιποειδή το γενεσιουργό αίτιο του σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών, αλλά ο PAF. Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και κορεσμένων λιποειδών στο αίμα εντείνουν την οξείδωση της LDL και κατά συνέπεια την παραγωγή PAF με τα αποτελέσματα που αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο. Η προστασία μας από τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και κορεσμένων λιποειδών μπορεί να γίνεται με αναστολείς του PAF από τη μεσογειακή δίαιτα.

5.2. Χημική Δομή

Το μόριο του PAF ανακαλύφθηκε και διαλευκάνθηκε η δομή του το 1979 από τον



Κ.Α.Δημόπουλο[71]. (Εικόνα 5.1).

Εικόνα 5.1. Η χημική δομή του PAF. Πρόκειται για ένα φωσφολιποειδές (πολικό λιποειδές) με σκελετό γλυκερόλης. Η ανθρακική αλυσίδα στη θέση sn-1 ενώνεται με το σκελετό γλυκερόλης με αιθερικό δεσμό, αντί εστερικού δεσμού, όπως συμβαίνει στα φωσφολιποειδή. Στη θέση sn-2 υπάρχει εστεροποιημένο οξικό οξύ (ακετυλομάδα), που προσδίδει στο μόριο τη βιολογική δραστικότητά του. Στη θέση sn-3 βρίσκεται η ομάδα της φωσφοχολίνης.

Η ανθρακική αλυσίδα μπορεί να είναι 16:0, 18:1 ή 18:0, προσδίδοντας διαφορετική δραστικότητα στο μόριο·

5.3. Φυσιολογική Λειτουργία του PAF

Ο PAF διαδραματίζει κεντρικό ρόλο αφού εμπλέκεται σε μια σειρά παθοφυσιολογικών καταστάσεων, όπως στην αναπαραγωγή[72], στον καρκίνος και στην υπατική λειτουργία (αυξάνει την ηπατική γλυκογονόλυση και ηπατική βλάβη). Επιπλέον, είναι υπεύθυνος για τις αλλεργικού τύπου ανοσολογικές αποκρίσεις όπως είναι η κατακράτηση υγρών, ο ερεθισμός του δέρματος, η δυσκολία στην αναπνοή, η αναφυλαξία, η ισχαιμία και άλλες σοβαρές φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Τα υψηλά επίπεδα PAF σχετίζονται επίσης με καταστροφή των νευρικών κυττάρων και μειωμένη κυκλοφορία του αίματος στο κεντρικό νευρικό σύστημα. Πληθώρα ισχυρών ενδείξεων έχουν ενισχύσει την άποψη ότι ο PAF έχει προαθηρογόνο δράση στο μικροπεριβάλλον του αρτηριακού έσω χιτώνα, καθώς και σημαντική συμμετοχή στις επιπλοκές που επακολουθούν και στο σχηματισμό θρόμβων[73].

5.4. Κυτταρικές Πηγές PAF

Ο PAF συντίθεται και εκκρίνεται από ένα πλήθος κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις (βασικά επίπεδα) όσο και σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων. Η βιοσύνθεση του PAF διαπιστώθηκε αρχικά σε κύτταρα θηλαστικών που συμμετέχουν σε φλεγμονώδεις και αλλεργικές διεργασίες, όπως ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, εωσινόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Στην συνέχεια βρέθηκε ότι τα κύτταρα των περισσοτέρων ιστών έχουν την ικανότητα να συνθέτουν PAF σε φυσιολογικές καταστάσεις αλλά και μετά από διέγερση. Ακόμα, ο PAF έχει βρεθεί και σε φυτικά κύτταρα, σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Επίσης, έχει πιστοποιηθεί η ικανότητα πολλών προκαρυωτικών οργανισμών να συνθέτουν PAF μετά από χορήγηση της πρόδρομης ένωσης του PAF, του λυσο-PAF (Πίνακας 5.1). Η ευρεία παρουσία του PAF σε οργανισμούς όλης της εξελικτικής βαθμίδας υποδηλώνει τον ευρύτερο ρόλο του ως αρχέγονου βιολογικού ρυθμιστή.

Πίνακας 5.1. Κύτταρα που παράγουν PAF.

Κύτταρο	Είδος
Βακτήρια	Escherichia coli, Helicobacter pylori, Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis, Proteus mirabilis
Πρωτόζωα	Tetrahymena pyriformis,Dictyostelium discoideum
Φυτικά κύτταρα	Φράουλα, Τσουκνίδα
Ζυμομύκητες	Saccharomyces cerevisiae
Κύτταρα ασπόνδυλων οργανισμών	Incilaria bilineata (σαλιγκάρι), Eisenia foetida
Κύτταρα κατώτερων σπονδυλωτών	Salmo gairdneri (σολομός)

Κύτταρο θηλαστικών	Είδος
αιμοπετάλια, λευκοκύτταρα, μαστοκύτταρα, λεμφοκύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού, ινδικού χοιριδίου κ.α.
Ενδοθηλιακά κύτταρα	Ανθρώπου, ποντικού, κουνελιού κ.α.
Νευρώνες, εγκεφαλικά κύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος, κουνελιού
Μυοκύτταρα καρδιάς	Επίμυος
Ηπατικά κύτταρα Kupffer	Επίμυος
Σπερματοζωάρια	Ανθρώπου, κουνελιού, βοδιού
Εμβρυϊκά κύτταρα	Ανθρώπου, ποντικού, κουνελιού
HaCaT κυτταρική σειρά κερατινοκυττάρων	Ανθρώπου
Νεφρικά κύτταρα	Ανθρώπου, επίμυος κ.α.

5.5. Δράσεις του PAF

Ο PAF που παράγεται από τα κύτταρα μπορεί[74] **:**

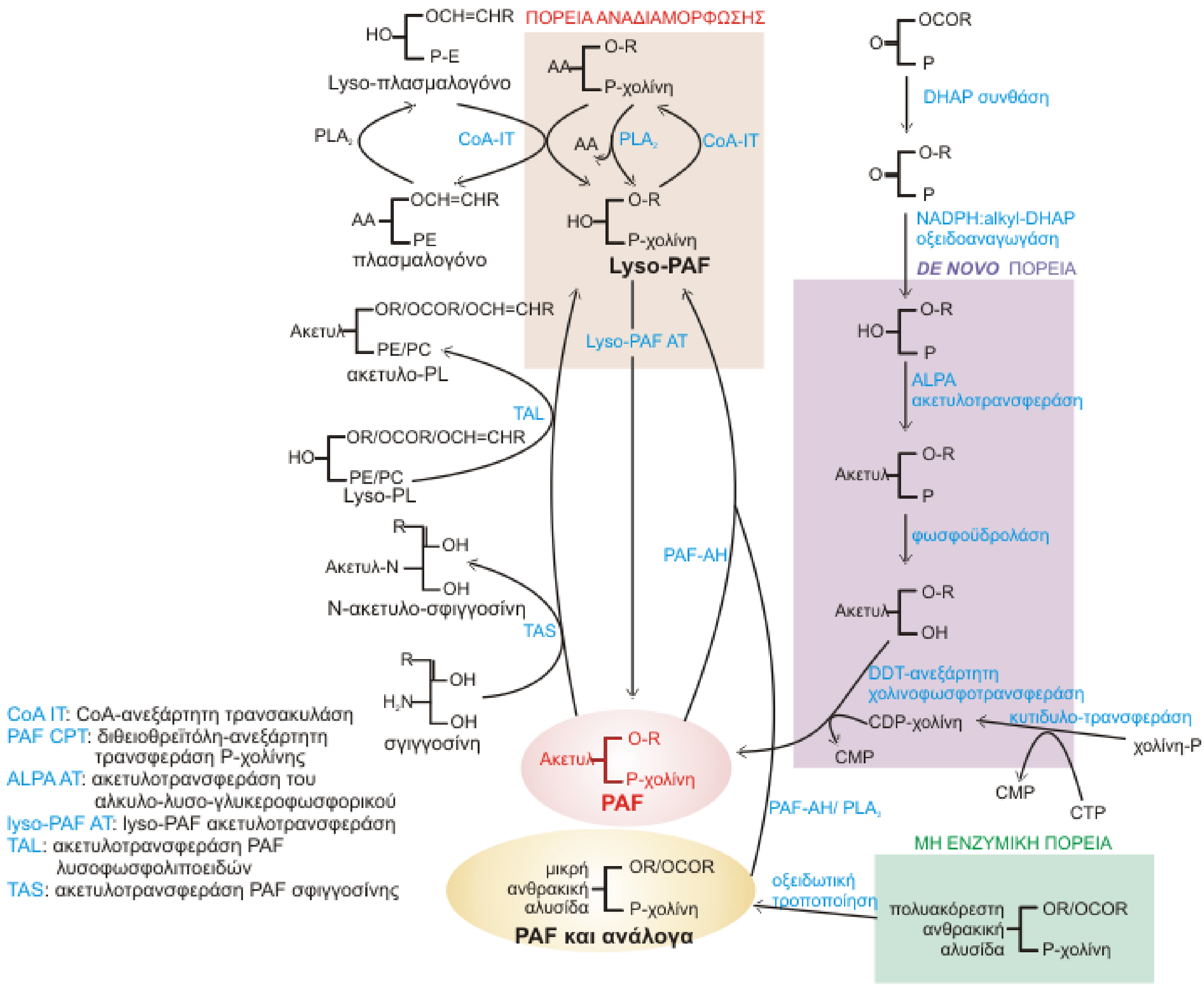
- Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
- Να συντεθεί από τα κύτταρα και να ενσωματωθεί στην πλασματική τους μεμβράνη δρώντας από εκεί ως διακυτταρικός μεσολαβητής, ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα.
- Να παραμείνει στα κύτταρα από τα οποία συντίθεται και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής.
- Να μεταβολιστεί άμεσα.

Το ποσό του PAF που παράγεται και εκκρίνεται από τα κύτταρα εξαρτάται τόσο από το είδος του κυττάρου, όσο και από τις συνθήκες ενεργοποίησής του. Τα ανθρώπινα λευκοκύτταρα μπορούν να εκκρίνουν 0 έως 60% του νεοσυντιθέμενου PAF ανάλογα με το εξωτερικό ερέθισμα και τις συνθήκες ενεργοποίησης. Αντίθετα, τα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν από λίγο έως καθόλου PAF ανεξαρτήτως ερεθίσματος. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα ο PAF δεν εκκρίνεται, αλλά μετά την σύνθεση του μπορεί να εκτεθεί στην εξωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης και από εκεί να δράσει ως διακυτταρικός μεσολαβητής. Με αυτόν τον τρόπο ο παραγόμενος από τα ενδοθηλιακά κύτταρα PAF μπορεί να ενεργοποιήσει τα ουδετερόφιλα, ενώ με παρόμοιο μηχανισμό ο PAF των ουδετεροφίλων μπορεί να ενεργοποιήσει την προσκόλληση αιμοπεταλίων σε αυτά δρώντας από την επιφάνεια τους.

5.6. Μεταβολικές Πορείες Βιοσύνθεσης του PAF

Ο PAF μπορεί να συντεθεί από δύο διαφορετικές ενζυμικές πορείες. Αυτές είναι, η πορεία ανασχηματισμού ή αλλιώς *remodeling* και η εξ’ υπαρχής ή αλλιώς *de novo* πορεία βιοσύνθεσης. Όλα τα ένζυμα της *de novo* πορείας είναι μεμβρανικά και διαφέρουν στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους από τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την *de novo* σύνθεση των άλλων μεμβρανικών γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών. Η *de novo* πορεία βιοσύνθεσης του PAF δεν ενεργοποιείται από φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι υπεύθυνη για την συνεχή, σταθερή παραγωγή PAF από τα κύτταρα με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων του στο αίμα και στους ιστούς. Η πορεία ανασχηματισμού, που είναι η πρώτη πορεία βιοσύνθεσης του

PAF που περιγράφηκε, ενεργοποιείται σε απόκριση φλεγμονωδών και αλλεργικών ερεθισμάτων, με σκοπό την άμεση παραγωγή του από τα κύτταρα. Η βιοσύνθεση του PAF μέσω της *remodeling* πορείας περιλαμβάνει την μετατροπή γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών, που προϋπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, σε PAF. (Εικόνα 5.2).



Εικόνα 5.2. Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης του PAF.

5.7. Απενεργοποίηση του PAF

Στο πλάσμα, ο PAF υδρολύεται και αδρανοποιείται από το ένζυμο ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH), το οποίο κυκλοφορεί συνδεδεμένο με τα λιποπρωτεϊνικά σωματίδια[75] (Εικόνα 5.2). Το μεγαλύτερο ποσοστό του ενζύμου του πλάσματος (>80%) βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες χαμηλής πυκνότητας (LDL), ενώ ένα μικρότερο ποσοστό βρίσκεται στις λιποπρωτεΐνες υψηλής πυκνότητας (HDL). Έτσι, ο όρος PAF-AH του πλάσματος αντικατοπτρίζει κυρίως το ποσοστό του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο στις LDL. Απο παθοφυσιολογική άποψη, η PAF-AH του πλάσματος μπορεί είτε να πυροδοτεί τη φλεγμονώδη επεξεργασία είτε να διαδραματίζει αντιαθηρογόνο ρόλο. Πράγματι, μελέτες έδειξαν ότι, εκτός από τον PAF, το ένζυμο υδρολύει επίσης οξειδωμένα φωσφολιποειδή, τα οποία περιέχουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στη θέση. Σε αντίθεση με την PAF-AH του πλάσματος, τα δεδομένα είναι περισσότερο διευκρινισμένα όσον αφορά στην PAF-AH των HDL. Το τμήμα του ενζύμου που βρίσκεται συνδεδεμένο με αυτές τις λιποπρωτεΐνες διαδραματίζει σαφώς αντιαθηρογόνο ρόλο, δεδομένου ότι προστατεύει την LDL από την οξείδωση, μειώνει τη βιολογική δραστικότητα της ήδη ox-LDL και, τέλος, προστατεύει την ίδια την HDL από την οξείδωση.

5.8. Εμπλοκή του PAF στη Φλεγμονή

Όταν τα φλεγμονώδη κύτταρα ενεργοποιούνται ή υπόκεινται σε βλάβες, παράγονται ο PAF, τα εικοσανοειδή, η ισταμίνη και οι κυτταροκίνες. Ο PAF είναι ένα συνδετικό στοιχείο που εμπλέκεται στις φυσιολογικές καθώς επίσης και παθολογικές φλεγμονώδεις διαδικασίες. Η συμμετοχή του PAF στη φλεγμονή προέρχεται από την ικανότητά του να διεγείρει τα φλεγμονώδη κύτταρα, να δρα ως μεσολαβητής στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου-κυττάρου και στην ενδοκυτταρική σήμανση (intracellular signaling). Ο PAF που παράγεται από αυτά τα ενεργοποιημένα φλεγμονώδη κύτταρα μπορεί να είναι μεμβρανοσύνδετος και μπορεί να ενεργοποιεί άλλα κύτταρα σε έναν ζωντανό οργανισμό, ενισχύοντας κατ' αυτό τον τρόπο την αρχική σήμανση που οδηγεί στην τοπική φλεγμονώδη απάντηση[76]. Ο PAF προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων, απελευθέρωση ισταμίνης και αλλαγή της μορφής τους, παρόμοια με αυτήν που παρατηρείται με άλλους ενεργοποιητές αιμοπεταλίων. Ο PAF ασκεί επίσης παρόμοιες δράσεις σε φαγοκύτταρα και άλλα κυκλοφορούντα φλεγμονώδη κύτταρα, μέσω του υποδοχέα του. Οι ανταγωνιστές του υποδοχέα του PAF εμποδίζουν τις ενέργειες αυτές σχετικά με τα αιμοπετάλια και τα φαγοκύτταρα . Παρόμοια αποτελέσματα του PAF παρατηρούνται σε άλλα φλεγμονώδη κύτταρα, αν και οι συγκεκριμένες απαντήσεις ποικίλλουν μεταξύ κυτταρικών τύπων. Τα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα εκκρίνουν PAF και τον εκθέτουν στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα τη σταθερή προσκόλληση των φαγοκυττάρων σε αυτά. Η σύνθεση του PAF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα είναι γρήγορη και οδηγεί στην παραγωγή και έκκριση συγκεκριμένων αγωνιστών όπως τη θρομβίνη, την ισταμίνη, λευκοτριένιο D4 (LT-D4), βραδυκινίνη, και αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ (ATP).

Ο προτεινόμενος μηχανισμός για την εμπλοκή του PAF στη παραπάνω διαδικασία είναι ο εξής: Η οξείδωση της LDL, λαμβάνει χώρα στο αίμα του ανθρώπου και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως, η διατροφή (αντιοξειδωτικά στη τροφή) και ο τρόπος ζωής (κάπνισμα, άσκηση) κ.λπ. Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν ότι οι αθηρογόνες δράσεις των ox-LDL αποδίδονται στον PAF και στα PAF ανάλογα. Αυτό καθιστά τα παραπάνω μόρια υπεύθυνα για την έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Τα επίπεδα του PAF στον οργανισμό βρίσκονται υπό τον έλεγχο ρυθμιστικών μηχανισμών, όπως η δραστικότητα του ένζυμου PAF-AH, τη παρουσία αντιοξειδωτικών και PAF ανταγωνιστών. Όταν όμως τα επίπεδα του PAF αυξάνονται ανεξέλεγκτα, όπως κατά την διάρκεια οξειδωτικού στρες ή σε περιπτώσεις παθοφυσιολογικών φλεγμονωδών καταστάσεων (π.χ. διάφορες ασθένειες), τότε ο PAF, εκτός από την οξείδωση της LDL, προκαλεί τοπική φλεγμονώδη αντίδραση στο αγγείο, με αποτέλεσμα καταστροφή του ενδοθηλίου και αύξηση της διαπερατότητας αυτού. Τότε εισέρχονται στον υπενδοθηλιακό χώρο μονοκύτταρα και οξειδωμένη LDL, επάγεται ο πολλαπλασιασμός των λείων μυϊκών κυττάρων και ο σχηματισμός αφρωδών κυττάρων, τα οποία είναι το χαρακτηριστικό εύρημα του πρώτου σταδίου της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας.

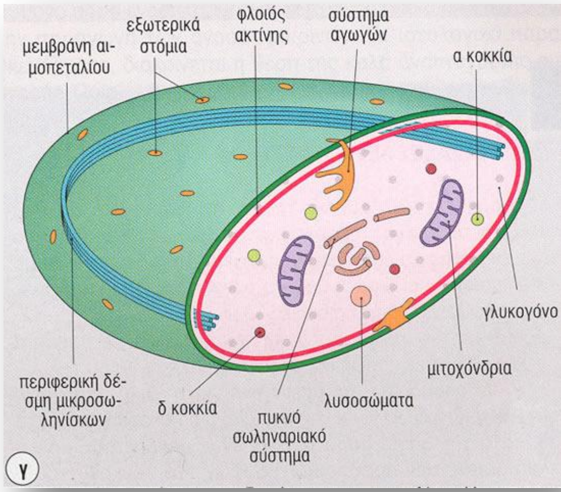
5.9. Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια αποτελούν ένα παράγοντα που διαδραματίζει σημαντικότατο ρόλο στην παθογένεση των καρδιαγγειακών παθήσεων, αφενός μεν διότι, όταν ενεργοποιηθούν προσκολλώνται στο ενδοθήλιο και προωθούν την αθηρογένεση, αφετέρου δε, διότι η συσσωμάτωση τους οδηγεί σε θρόμβωση, με συνέπεια την κλινική εμφάνιση της στεφανιαίας νόσου. Η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων λαμβάνει χώρα μέσω της διέγερσης της ενδοτοξίνης θρομβίνης ή από τη δράση λιποπολυσακχαριτών (LPS) από μικροοργανισμούς, όπως ο *Proteus mirabilis.* Τη διέγερση της θρομβίνης ακολουθεί η σύνθεση εικοσανοειδών, κυτοκινών και προστανοειδών, γεγονός σημαντικό για την παθοφυσιολογική φλεγμονώδη διαδικασία, ενώ τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια συμμετέχουν στη φλεγμονή.

Ως απάντηση στο τραυματισμό ενός αγγείου, τα αιμοπετάλια αποκτούν συγκολλητικές αλληλεπιδράσεις με τις εκτιθέμενες υποενδοθηλιακές δομές ή συνδέονται με χημικούς αγωνιστές οι οποίοι απελευθερώνοναι ή βιοσυντίθενται τοπικά. Η δράση αυτή σηματοδοτεί την αρχή της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων. Εν συνεχεία, τα αιμοπετάλια δεσμεύουν στους υποδοχείς τους διαλυτά μόρια προσκόλλησης με αποτέλεσμα να μετατρέπεται η επιφάνειά του σε δραστική επιφάνεια.

5.10. Γενικά Χαρακτηριστικά των Αιμοπεταλίων

Τα αιμοπετάλια είναι μικρά, απύρηνα, δισκοειδή σωματίδια με διάμετρο 2-4 μm. Προέρχονται από τον κατακερματισμό του κυτταροπλάσματος ενός γιγαντιαίου πολύπλοκου κυττάρου, του μεγακαρυοκυττάρου, που εντοπίζεται στο μυελό των οστών. Σε χρωματισμένα επιχρίσματα αίματος τα αιμοπετάλια συχνά εμφανίζονται με τη μορφή αθροισμάτων. Κάθε αιμοπετάλιο έχει δύο ομόκεντρες ζώνες, μια περιφεριακή αραιοχρωματική ζώνη που ονομάζεται υαλομερές και μια κεντρική πυκνότερη ζώνη που ονομάζεται κοκκιομερές και περιέχει μωβ χρώματος κοκκία. Ο αριθμός των αιμοπεταλίων ρυθμίζεται από μια ορμόνη, τη θρομβοποιητίνη. Σε φωτογραφίες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τα αδρανή αιμοπετάλια έχουν λείο δισκοειδές σχήμα, ενώ τα ενεργοποιημένα αιμοπετάλια αναπτύσσουν άφθονες λεπτές μακριές κυτταροπλασματικές αποφυάδες[77] (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3. Σχηματική απεικόνιση της δομής του αιμοπεταλίου.

5.11. Ενεργοποίηση Αιμοπεταλίων από Αγωνιστές

Απουσία κλινικών συμπτωμάτων, τα αιμοπετάλια βρίσκονται την ανενεργή μορφή τους και δεν προσκολλούνται στα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος ή σε άλλα κύτταρα με αποτέλεσμα τη συσσώρευσή τους. Η ενεργοποίησή τους μπορεί να γίνει μέσω *αγωνιστών*, όπως είναι η θρομβίνη, το ADP, το κολλαγόνο, ο PAF, η σεροτονίνη, η επινεφρίνη, η βασοπρεσίνη κ.α., καθώς και από άλλα συστατικά που εκρρίνονται από τα φυσιολογικά αγγεία ύστερα από κάποια βλάβη ή τραυματισμο αθηρωματικής πλάκας. Οι ενεργοποιητές αυτοί, στην πλειονότητά τους, βιοσυντίθενται ή ελευθερώνονται στο χώρο το αγγειακού τραυματισμού. Οι αγωνιστές συνδέονται σε υποδοχείς της μεμβράνης των αιμοπεταλίων και τον ενεργοποιούν διαμέσου σχηματισμού <u>*ενδοκυττάριων αγγελιοφόρων μορίων*</u>, όπως είναι η διακυλογλυκερόλη και η τριφοσφωρική ινοσιτόλη (ΤΙ). Ένας άλλος παράγοντας που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων είναι κάποιες επιπλέον συνεργιστικές βιοχημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αιμοπεταλίων και ερυθροκυττάρων, αφού ο τραυματισμός των αγγείων οδηγεί στην απελευθέρωση ADP από τα ερυθροκύτταρα.

5.12. Συσσώρευση Αιμοπεταλίων

Ο υποδοχέας CD11b/CD18 κατέχει κεντρικό ρόλο στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ενώ πρέπει να αναφερθεί πως έχει εντοπιστεί σε εξαιρετικά υψηλή πυκνότητα στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών. Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων ξεκινά με τη σύνδεση του ινωδογόνου στον υποδοχέα[78], με αποτέλεσμα η διαδικασία της συσσώρευσης να επιταχύνεται. Όταν όμως τα αιμοπετάλια δεν είναι ενεργοποιημένα, βρίσκονται δηλαδή σε κατάσταση ηρεμίας, τον υποδοχέα αυτόν δεν τον διακρίνει υψηλή συγγένεια δέσμευσης, αλλά ενεργοποιείται από αγωνιστές όπως η σεροτονίνη, το κολλαγόνο και το TxA_2, που εντοπίζονται στις περιοχές αγγειακής βλάβης. Ως αποτέλεσμα, τα αιμοπετάλια μπορούν να κυκλοφορούν στο πλάσμα που περιέχει υψηλές συγκεντρώσεις ινωδογόνου και vWF (παράγοντας Von Willebrand-αιμοστατικό στοιχείο των αγγειακών τοιχωμάτων) που αποτελούν προσδέτες του υποδοχέα CDIIb/CDI8, χωρίς να σχηματίζεται αιμοπεταλιακός θρόμβος.

Ένα αιμοπετάλιο μπορεί να ενεργοποιηθεί και να συνδεθεί με τον vWF ή το ινωδογόνο καθώς βρίσκεται ακόμα σε κυκλοφορία. Ο προσδέτης στην επιφάνεια του αιμοπεταλίου συνδέεται στον ενεργοποιημένο υποδοχέα CDIIb/CDI8 με τελικό στάδιο τον σχηματισμό στοιβάδων από αιμοπετάλια . Έτσι, παράγεται θρομβίνη η οποία ενεργοποιεί περαιτέρω τα αιμοπετάλια και τη θρόμβωση, προκαλώντας την έναρξη της απόθεσης ινώδους που σταθεροποιούν το σχηματιζόμενο θρόμβο και την περαιτέρω απόθεση vWF.

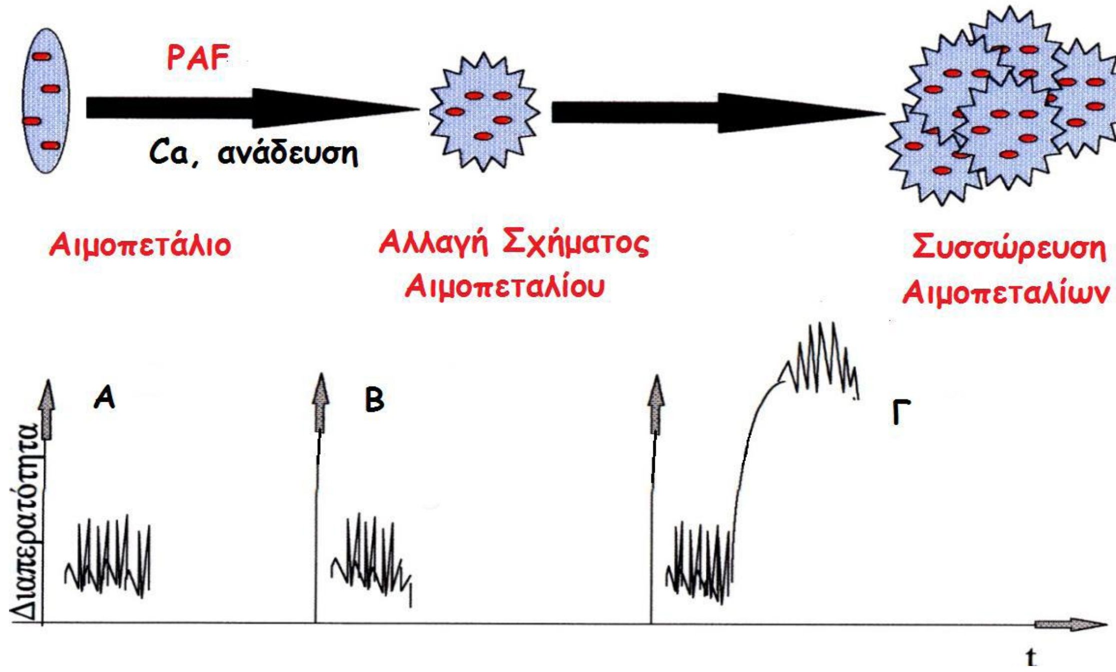
Ωστόσο, *in vivo,* συμβαίνει η ενεργοποίηση αιμοπεταλίων χωρίς αναγκαστικά την επίδραση εξωγενών αγωνιστών, αλλά υπό την επίδραση διατμητικής δύναμης, όπως συμβαίνει στις αρτηρίες. Ο μηχανισμός αυτός βασίζεται στη σύνδεση του vWF (και συγκεκριμένα της υπομονάδας Α1) με τον υποδοχέα GPIb/IX που προκαλεί την ενεργοποίηση του CDIIb/CDI8. Λόγω της παραπάνω σύνδεσης, τα αιμοπετάλια μπορούν να προσκολληθούν σε κάποιο συστατικό εξωκυττάριας ύλης ή σε κάποιο άλλο αιμοπετάλιο. Μια τέτοιου είδους όμως αλληλεπίδραση είναι ασθενής και βραχύβια και προκαλεί μόνο χαλαρή σύνδεση και κυλιόμενη κίνηση των αιμοπεταλίων και όχι ισχυρή σύνδεση, όπως αυτή που προκαλείται από τον vWF. Επιπρόσθετα, ο vWF που ελευθερώνεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, είτε υπό την επίδραση ινώδους είτε άλλων ερεθισμάτων που σχετίζονται με ένα αγγειακό τραύμα, μπορεί επίσης να ενεργήσει τοπικά πριν διαχυθεί στην κυκλοφορία[79].

Κατά το σχηματισμό των θρόμβων, αλλάζουν και οι τιμές των διατμητικών ταχυτήτων. Δηλαδή, όσο αυξάνεται ο θρόμβος, αυξάνονται και οι διατμητικές ταχύτητες, λόγω περιορισμού της ροής του αίματος. Ωστόσο, καθώς το ύψος του θρόμβου αυξάνεται, οι τιμές των διατμητικών δυνάμεων μπορεί να υπερβούν το όριο στο οποίο η σύνδεση που εξαρτάται από το ινωδογόνο είναι επιτυχής. Έτσι, η περαιτέρω προσκόλληση των αιμιπεταλίων χαλαρώνει, εκτός και αν η αρχική χαλαρή πρόσδεση μπορεί να λάβει χώρα μέσω σύνδεσης του vWF και του GPIba.

Οι τρεις διαφορετικοί δρόμοι του ADP, του αραχιδονικού οξέος (AA) και του PAF, που διατυπώθηκαν για να εξηγήσουν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, έχει αποδειχθεί ότι έχουν άμεση αλληλεπίδραση, διότι η προσθήκη αραχιδονικού οξέος στα αιμοπετάλια ακολουθείται από έκκριση ADP που προκαλεί δευτερογενή συσσώρευση και αυτή με τη σειρά της συνοδεύεται από έκκριση ADP και τέλος απελευθέρωση αραχιδονικού οξέος από τα φωσφολιποειδή των αιμοπεταλίων. Ελευθέρωση ADP αλλά και σχηματισμό TxA_2 προκαλείται και από προσθήκη του PAF στα αιμοπετάλια. Όπως έχουν αποδείξει πειράματα με αναστολείς, η δευτερογενής συσσώρευση που προκαλείται από την προσθήκη του PAF στα αιμοπετάλια, οφείλεται τόσο στο ADP όσο και στο αραχιδονικό οξύ, γεγονός που επιβεβαιώνει την συλλογική δράση όλων των παραπάνω παραγόντων.

5.13. Έλεγχος Βιολογικής Δραστικότητας-Ανίχνευση και Προσδιορισμός του PAF

Ο έλεγχος της βιολογικής δραστικότητας διάφορων βιολογικών δειγμάτων, καθώς επίσης και η ανίχνευση και ο προσδιορισμός του PAF σε αυτά, πραγματοποιείται με κατάλληλη βιολογική μέθοδο, που αποτελεί διεθνώς το δόκιμο τρόπο μελέτης για το αν ένα συστατικό έχει βιολογική δράση ανάλογη του PAF ή αν δρα ως αναστολέα αυτού. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ιδιότητα του PAF να προκαλεί συσσώρευση σε αιμοπετάλια (Εικόνα 5.4) και παρακολουθείται φωτομετρικά μέσω συσσωρευματόμετρου, το οποίο είναι ένα τροποποιημένο φωτόμετρο με κυψελίδα χωρητικότητας 0,5 ή 0,25 mL, θερμοστατούμενη στους 37ºC και αναδευόμενη από μικρό μαγνητικό αναδευτήρα στις 1200 rpm.



Εικόνα 5.4. Σχηματική αναπαράσταση της ενεργοποίησης και συσσώρευσης των αιμοπεταλίων μετά από την προσθήκη του PAF και απόδοση της καταγραφόμενης καμπύλης ως αύξηση διαπερατότητας ως προς το χρόνο. Α) Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση, Β) Αιμοπετάλια μετά από προσθήκη PAF, Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Αρχικά προστίθεται το εναιώρημα των αιμοπεταλίων σε πλάσμα αίματος ("πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια") ή σε κατάλληλο διάλυμα ("πλυμένα αιμοπετάλια"). Στη φάση αυτή διέρχεται κάποιο ποσοστό της φωτεινής δέσμης και η διαπερατότητα αυτή καταγράφεται με τη μορφή σταθερής ταλάντωσης καμπύλης σε διάγραμμα % διαπερατότητας ως προς τον χρόνο. 'Οταν στη συνέχεια προστεθεί ο συσσωρευτικός παράγοντας, τότε κατά το πρώτο στάδιο του φαινομένου της συσσώρευσης όπου επέρχεται αλλαγή σχήματος και διόγκωση των αιμοπεταλίων, η διαπερατότητα μειώνεται και το καταγραφικό δίνει καμπύλη μικρότερης ταλάντωσης που κινείται προς τα κάτω. Στη συνέχεια, κατά το δεύτερο στάδιο του φαινομένου της συσσώρευσης όπου σχηματίζονται θρόμβοι από συσσωρευμένα αιμοπετάλια, η διαπερατότητα αυξάνεται και το καταγραφικό δίνει καμπύλη που κινείται προς τα άνω, με συνεχώς μεγαλύτερη ταλάντωση (θόρυβο), ανάλογα με το μέγεθος των σχηματιζόμενων θρόμβων. Αν η συγκέντρωση του συσσωρευτικού μέσου δεν είναι πολύ μεγάλη, ακολουθεί και τρίτο στάδιο κατά το οποίο επέρχεται αποσυσσώρευση των αιμοπεταλίων και επαναφορά τους στην αρχική τους κατάσταση, οπότε η καμπύλη στο καταγραφικό κινείται προς τα κάτω με συνεχώς μικρότερη ταλάντωση και καταλήγει στην αρχική της μορφή και περίπου στο αρχικό επίπεδο της % διαπερατότητας. Η τυπική μέτρηση διαρκεί από 3 έως 6 min.

Στην περίπτωση της αναστολής τα αποτελέσματα αποδίδονται με τον όρο IC_{50}, ο οποίος εκφράζει την ανασταλτική ικανότητα μιας ποσότητας λιποειδούς, η οποία αναστέλλει κατά 50% την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων. Στην περίπτωση της συσσώρευσης τα αποτελέσματα αποδίδονται με τον όρο EC_{50}, ο οποίος εκφράζει τη συσσωρευτική ικανότητα μιας ποσότητας λιποειδούς, η οποία προκαλεί συσσώρευση ίση με το 50% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης που προκαλεί το αντίστοιχο δείγμα.

<u>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>

ΣΚΟΠΟΣ

Για την εκπόνηση της εργασίας, χρησιμοποιήθηκε η τσιπούρα (*Sparus aurata*), διότι είναι ένα είδος ψαριού ιδιαίτερα διαδεδομένο στην Ελλάδα.

Σύμφωνα με τη θεωρία της φλεγμονής και της πρόκλησης της αθηροσκλήρωσης, ο PAF παίζει κυρίαρχο ρόλο στο ξεκίνημα της αθηρογένεσης. Συνεπώς, το ένα από τα αντικείμενα της παρούσας εργασίας έγκειται στη μελέτη της βιολογικής δραστικότητας της τσιπούρας ιχθυοτροφείου σε σχέση με τον PAF και τον μεταβολισμό του, έτσι ώστε να διευκρινιστεί ο μηχανισμός που δρουν τα ευεργετικά τρόφιμ, όπου συγκαταλέγεται και το ψάρι.

Ειδικότερα, ο πρώτος στόχος στο αντικείμενο αυτό είναι ο εξής :

- Απομόνωση, καθαρισμός, και *in vitro* μελέτη βιολογικά πολικών λιποειδών ιχθυελαίου τσιπούρας ιχθυοκαλλιέργειας ως προς την ικανότητά τους να εκδηλώνουν ανασταλτική ή ανταγωνιστική δράση ως προς τον PAF σε μοντέλο πλυμένων αιμοπεταλίων.

Έχοντας ως δεδομένο από τη βιβλιογραφία ότι το ελαιόλαδο καθώς και τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας περιέχουν ενώσεις βιολογικά δραστικές έναντι του PAF και συνεπώς έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, σε συνεργασία με τα ιχθυοτροφεία ‘’ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε.’’, πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός της ιχθυοτροφής με πολικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, δηλαδή το μη εδώδιμο μέρος της ελιάς που απομένει στα ελαιοτριβεία μετά την έκθλιψή της, αντικαθιστώντας τα λιποειδή της συμβατικής ιχθυοτροφής που προέρχονται κυρίως από ιχθυέλαια.

Συνεπώς, το δεύτερο αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας κάνει ένα βήμα παραπάνω και μελετά την ενισχυμένη με ελαιοπυρήνα ιχθυοτροφή.

Ειδικότερα, οι στόχοι στο αντικείμενο αυτό είναι οι εξής :

- Προσδιορισμός της ικανότητας των ολικών πολικών λιποειδών της εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής να παρουσιάζουν βιολογική δραστικότητα έναντι της δράσης του PAF και κατ’επέκταση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων.

- Σύγκρισή τους με τα αντίστοιχα δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα της συμβατικής ιχθυοτροφής, δίνοντας έτσι μια ολοκληρωμένη εικόνα σχετικά με το βαθμό ενίσχυσης που επιτεύχθηκε στην νέα τροφή.

Συνοψίζοντας, ο τελικός σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι η ενίσχυση της ήδη υπαρχουσας καρδιοπροστατευτικής δράσης των ψαριών ως προς τα καρδιαγγειακά νοσήματα με κάποιο άλλο συστατικό του μεσογειακού μοντέλου διατροφής, ενδυναμώνοντας την κυρίαρχη θέση του για την προστασία της καρδιάς και γενικότερα του ανθρώπινου οργανισμού. Παράλληλα, με αυτή την εργασία αξιολογείται πλήρως αυτή η ενίσχυση, δηλαδή κατά πόσον βελτιώνεται η ιχθυοτροφή.

Επιπροσθέτως, τα απόβλητα των ελαιοτριβείων, αντι να ρυπαίνουν θα μπορούσαν να αξιοποιούνται για τη διατροφή ψαριών, που με τη σειρά τους θα καθίστανται ακόμη πιο ωφέλιμη τροφή των καταναλωτών.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Μέθοδοι

6.1. Εκχύλιση Λιποειδών κατά Bligh-Dyer[80]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Δείγματα ψαριών τσιπούρας (*Sparus aurata*) τα οποία προέρχονται από τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε. και αλιευτηκαν από την περιοχή της Χίου τον μήνα Αύγουστο
- Κυκλοαναδευτήρας.
- Αέριο άζωτο.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 ή 20 mL.
- Σφαιρικές φιάλες των 100 ή 250 mL.
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator), Heidolph Laborotora 4000 eco/WB/G1. Οργανικοί διαλύτες ($CHCl_3$, CH_3OH, H_2O) αναλυτικής καθαρότητας

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών ($CHCl_3$, CH_3OH, H_2O), επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων, όπως είναι διάφορα άλατα, αμινοξέα και σάκχαρα. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό σύστημα, αποτελούμενο από χλωροφορμική και υδατική φάση, στη μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μίγμα $CHCl_3$:CH_3OH:H_2O 1/2/0.8 (v/v/v), αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η έντονη ανάδευση επαναλαμβάνεται περιοδικά για διάστημα 10 min. Στη συνέχεια και εφόσον είναι απαραίτητο, το όλο δείγμα φυγοκεντρείται, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Ακολούθως προστίθενται συγκεκριμένες ποσότητες $CHCl_3$ και H_2O ώστε η αναλογία των διαλυτών $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ να γίνει 1/1/0.9 (v/v/v), οπότε σχηματίζονται δύο φάσεις διαλυτών. Η χλωροφορμική (κάτω) φάση φάση που παραλάβαμε από τη διαχωριστική χοάνη, η οποία περιέχει τα λιποειδή, μεταφέρεται ανάλογα τον όγκο της, είτε σε δοκιμαστικό σωλήνα, οπότε το δείγμα εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου, είτε σε σφαιρική φιάλη οπότε ο διαλύτης εξατμίζεται έως μικρό όγκο σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου συνεχίζεται η εξάτμιση έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η θερμοκρασία εξάτμισης κυμαίνεται από 30 έως 35^{o} C. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μίγματος $CHCl_3/CH_3OH$ 1/1 (v/v) για περαιτέρω επεξεργασία.

6.2. Κατανομή Κατ’ αντιρροή[81]

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, CH_3CH_2OH, H_2O) αναλυτικής καθαρότητας.
- Αέριο άζωτο.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες.
- Υάλινες πιπέτες Pasteur.

Αρχή μεθόδου

Τα ολικά λιποειδή αναμιγνύονται με προεξισορροπημένους διαλύτες πετρελαϊκού αιθέρα και CH_3CH_2OH 87 %, σε αναλογία 1/1. Δημιουργείται διφασικό σύστημα διαλυτών, όπου τα μεν πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της CH_3CH_2OH, τα δε ουδέτερα λιποειδή στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα.

Αναλυτική πορεία

Σε διαχωριστική χοάνη, γίνεται εξισορρόπηση των διαλυτών του πετρελαϊκού αιθέρα με την αιθανόλη 87 %. Σχηματίζονται δύο φάσεις, οπότε παραλαμβάνεται χωριστά η κάτω φάση που είναι η εξισορροπημένη CH_3CH_2OH και στη συνέχεια η άνω φάση που είναι ο εξισορροπημένος πετρελαϊκός αιθέρας, για να ακολουθήσει η περαιτέρω κατεργασία των λιποειδών. Στη συνέχεια, τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται και αναδιαλύονται σε 4,5 mL προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα. Προστίθενται 1,5 mL προεξισορροπημένης CH_3CH_2OH 87 % και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η κάτω φάση, που είναι η αιθανολική φάση, παραλαμβάνεται με υάλινη πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει 4,5 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθεί εκ νέου ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα και παραλαβή της αιθανολικής φάσης η οποία το τοποθετείται σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1,5 mL προεξισορροπημένης αιθανόλης 87 % για να επαναληφθεί η ανωτέρω διαδικασία. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά 8 φορές. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αιθανολική φάση (8 × 1,5 mL) που περιέχει τα πολικά λιποειδή, εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο διαλύτη $CHCl_3$/MeOH 1/1 (v/v). Οι φάσεις του πετρελαϊκού αιθέρα (2×4,5 mL) που βρίσκονται στους πρώτους δύο δοκιμαστικού σωλήνες, περιέχούν τα ουδέτερα λιποειδή, και αφού ενωθούν σε έναν υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε μικρό όγκο διαλύτη $CHCl_3$/MeOH 1/1 (v/v).

6.3. Βιολογική Δοκιμασία Συσσώρευσης Πλυμένων Αιμοπεταλίων Κουνελιού[82]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1 %) ελεύθερος πυρετογόνων.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) 10x Tyrodes : Σε 1 L νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g $MgCl_2.6H_2O$ και 10 g γλυκόζης.
- Διάλυμα φύλαξης 100 x $CaCl_2$: Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,911 g $CaCl_2$.
- Διάλυμα φύλαξης EGTA 0,2 M: Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 mL νερό. Ρυθμίζεταιτο pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5 M.
- Υδατικό διάλυμα ζελατίνης 10 % (w/v).
- Διαλύματα Tyrodes με ζελατίνη pH = 6,5 (Tg pH = 6,5), και Tyrodes με ζελατίνη και EGTA pH = 6,5 (Tg EGTA pH = 6,5): Σε 80 mL νερό προσθέτονται 10 mL από το αντιδραστήριο φύλαξης Tyrodes 10x. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται 2,5 mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10 % (w/v) που έχει υποστεί τήξη στο σημείο βρασμού. Ακολούθως, διαλύονται 0,2030 g $NaHCO_3$ σε 10 mL νερό και από το διάλυμα αυτό προστίθενται 5 mL αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 mL. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25 μL EGTA 0,2 M και ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1 N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 20 mL και κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm), αποφεύγοντας τον εγκλεισμό φυσαλίδων αέρα. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.
- Διάλυμα Tyrodes με ασβέστιο pH = 7,2 (Tg-Ca pH = 7,2): Σε 5 mL διαλύματος φύλαξης tyrodes 10x προστίθενται 40 mL νερό. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια

μαγνητικούς αναδευτήρα προστίθενται 1,25 mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10% (w/v). Στη συνέχεια προστίθενται 0,5 mL διαλύματος φύλαξης $CaCl_2$ 100x και αμέσως μετά 2,5 mL διαλύματος $NaHCO_3$ που παρασκευάζεται εκείνη τη στιγμή διαλύοντας 0,2030 g $NaHCO_3$ σε 10 mL νερό. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1 N. Διατηρείται στους 37 ^oC σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm).

- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 1000 mL νερού διαλύονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Διάλυμα φύλαξης βοείας αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL: Ποσότητα 100 mg BSA (Sigma) ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων.Φυλάσσεται στους -20 ^oC.
- Διάλυμα εργασίας βόειας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL: Από 10 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL διαλύματος φύλαξης BSA.
- Ficoll-Paque (Pharmacia).
- Υγρό επίστρωσης σιλικόνης (Serva).
- Πλαστικοί σωλήνες των 50 mL.
- Πλαστικά σιφώνια των 20 mL.
- Συσσωρευματόμετρο, Chrono-log.
- Πεχάμετρο ORION 410A.
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37 ^oC.
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont.
- Διάλυμα φύλαξης PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη CH_3Cl/MeOH 1/1 (v/v)
- Διαλύματα εργασίας PAF συγκεντρώσεων 6,25x10-6M, 6,25x10-8M, 6,25x10^{-9} M, 6,25x10^{-10} M σε διάλυμα εργασία BSA. Σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 25 μL από το διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης 10-4 M τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 400 μL διαλύματος εργασίας BSA. Μετά από παραμονή 10 min από το διάλυμα αυτό συγκέντρωσης 6,25x10^{-6} M, ετοιμάζονται σε πλαστικούς σωλήνες και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις με διάλυμα εργασίας BSA.

Αναλυτική πορεία

Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού.

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 mL προστίθενται 7 mL αντιπηκτικού ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού. Ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50 mL και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 ^{o}C στα 500×g. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 mL Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος που είναι πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) με πλαστικό σιφώνιο των 20 mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Το πλάσμα το πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), τοποθετείται πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό PRP τα 9 mL για κάθε 2 mL Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι PRP σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Οι πλαστικοί σωλήνες κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm) και φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24 ^{o}C στα 750×g. Μετά τη φυγοκέντρηση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος του φτωχού σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma) και του στρώματος του Ficoll. Το PPP αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστικό σιφώνιο των 20 mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Αν υπάρχουν 2 σωλήνες προστίθενται 7 mL Tg-EGTA pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Αν υπάρχουν 3 σωλήνες προστίθενται 3 mL Tg EGTA pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3 mL Tg EGTA pH = 6,5. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 mL Ficoll καλύπτεται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 ^{o}C στα 750×g. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με σιφώνιο των 20 mL. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με σιλικοναρισμένη πιπέτα pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Στην συνέχεια προστίθενται περίπου 8 mL διαλύματος Tg pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το εναιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 mL και καλύπτεται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 ^{o}C στα 750×g. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Ακολούθως προστίθενται 0,8 mL Tg pH = 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με ήπιο τρόπο. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε πλαστικό σωλήνα. Ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH = 6,5 που να περιέχει 1,25×108 κύτταρα/mL. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μL τα οποία αραιώνονται με 990 μL Tg pH = 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μL δίνεται από τον τύπο: κύτταρα/10 μL = A×1,25×108 όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου των 0,5 mL προστίθενται 50 μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει 1,25×108 κύτταρα/mL και 200 μL διαλύματος Tg-Ca pH = 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1.200 στροφές το λεπτό (rpm, rounds per min). Ακολουθεί επώαση για 15 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37 ^{o}C. Στη συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5 mg/mL και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100 % συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική δραστικότητα. Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα ομοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF (γρήγορη συσσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις). Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και σαν συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει το 50% της μέγιστης συσσώρευσης που καλείται EC_{50} (Equivalent Concentration for 50% agreggation).

<u>Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού</u>

Με κάποια συγκέντρωση PAF ή άλλου συσσωρευτικού παράγοντα προκαλείται αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων και όταν τα αιμοπετάλια επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση προστίθεται στην κυψελίδα η ίδια συγκέντρωση PAF ή του άλλου συσσωρευτικού παράγοντα. Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων.

<u>Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού</u>

Στη σειρά αυτή των πειραμάτων πριν την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα, προστίθενται διάφορες ποσότητες του αναστολέα, ακολουθεί επώαση για 1 min και στη συνέχεια προστίθεται ο PAF που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων. Υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής στον PAF για κάθε ποσότητα δείγματος. Σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της ποσότητας και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσότητα δείγματος ικανή να προκαλέσει 50 % αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων που καλείται IC_{50} (Inhibitory Concentration for 50% Inhibition).

6.4. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) Λιποειδών[83]

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ACN, CH_3OH, H_2O) Κυκλοαναδευτήρας.
- Υγρός χρωματογράφος Hewleii-Packard (HP SERIES 1100) συνδεδεμένος με ανιχνευτή υπεριώδους UV HP SERIES 1100 και καταγραφέα HP 3395.

- Μικροσύριγγες ακριβείας 50 και 250 μL
- Σφαιρικές φιάλες των 100 ή 250 mL.
- Στήλη κανονικής φάσης YMC-Pack Amino, 250x20mm, S-5 μm, 12 nm.
- Στήλη αντίστροφης φάσης NUCLEOSIL 300 C18, 250x4mm, 7 μm.

Αρχή μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανήκει στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία λαμβάνουν χώρα φυσικοχημικά φαινόμενα όπως η προσρόφηση (στην περίπτωση της RP-HPLC) και η κατανομή (στην περίπτωση της NP-HPLC) βάσει των οποίων οι λιποειδικές ενώσεις διαχωρίζονται καθώς μια κινητή φάση διαλυτών, υπό την επίδραση ελεγχόμενης πίεσης, περνάει μέσα από μία σχετικά στενή στήλη που περιέχει τη στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή, είτε υγρή ενωμένη χημικά σε στερεό υπόστρωμα.Στην NP-HPLC χρησιμοποιήθηκε στήλη πυριτικού οξέος με αμινομάδες, ενώ στην RP-HPLC χρησιμοποιήθηκε στήλη διοξείδιο του πυριτίου, SiO2, σιλανοποιημένο με πλευρική αλυσίδα C8 ή C18.

Αναλυτική πορεία

Η στήλη καθαρίζεται με μείγμα οργανικών διαλυτών χρωματογραφικής καθαρότητας (ACN, CH_3OH, H_2O). Οι διαλύτες απαερώνονται εισερχόμενοι στον ενσωματωμένο απαερωτή υπερήχων. Ακολουθεί η τοποθέτηση του δείγματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε μικρό όγκο (100 μL) του κατάλληλου διαλύτη, με τη βοήθεια της μκροσύριγγας ακρίβειας. Η έκλουση των δειγμάτων έγινει με σταθερή σύσταση διαλυτών. Στην NP-HPLC η ροή ήταν 3 mL/min και στη RP-HPLC η ροή ήταν 1 mL/min. Η έκλουση των διαχωριζόμενων ουσιών ελέγχεται με τη μεταβολή της απορρόφηση στα 208 nm με ανιχνευτή υπεριώδους. Τα κλάσματα από τη στήλη συλλέχθησαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ-ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

7.1. Εισαγωγή

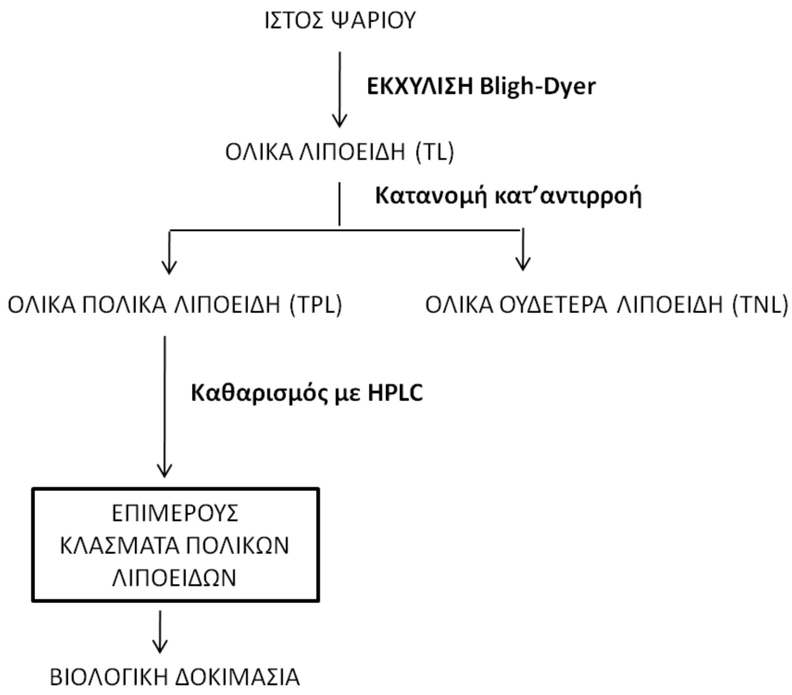
Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η απομόνωση των ολικών πολικών λιποειδών (TPL) του ιστού τσιπούρας ιχθυοτροφείου, ο καθαρισμός και μετέπειτα η έρευνα της δομής και η μελέτη της βιολογικής δραστικότητας των επιμέρους κλασμάτων ως αναστολείς ή ανταγωνιστές του PAF στο μοντέλο των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

7.1.1. Δειγματοληψία Ψαριών

Οι τσιπούρες (*Sparus aurata*) ιχθυοτροφείου που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της πειραματατικής εργασίας προέρχονται από τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε. και αλιεύθηκαν από την περιοχή της Χίου τον μήνα Αύγουστο. Αφαιρέθηκαν τα λέπια, το κεφάλι, τα εντόσθια και τα κόκκαλα και ελήφθησε τελκά το φιλέτο ιστού του ψαριού.

7.1.2. Πειραματική Πορεία Απομόνωσης Λιποειδών

Αρχικός σκοπός των πειραμάτων ήταν η εκχύλιση των ολικών λιποειδών (TL) από 8 κιλά φιλέτο ιστού τσιπούρας ιχθυοτροφείου με τη μέθοδο Bligh-Dyer[80]. Το κλάσμα των TL συμπυκνώθηκε σε μικρό όγκο με περιστροφική συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) και μεταφέρθηκε σε σκουρόχρωμο γυάλινο φιαλίδιο για να εξατμιστεί το δείγμα μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε ο διαχωρισμός αυτών σε ολικά πολικά (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL) με τη μέθοδο της κατανομής κατ’αντιρροή[81] (Πίνακας 7.1). Η γενική πειραματική διαδικασία φαίνεται στην εικόνα που ακολουθεί (Εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε.

Πίνακας 7.1. Ποσότητες TL, TPL και TNL που απομονώθηκαν από φιλέτο ιστού τσιπούρας.

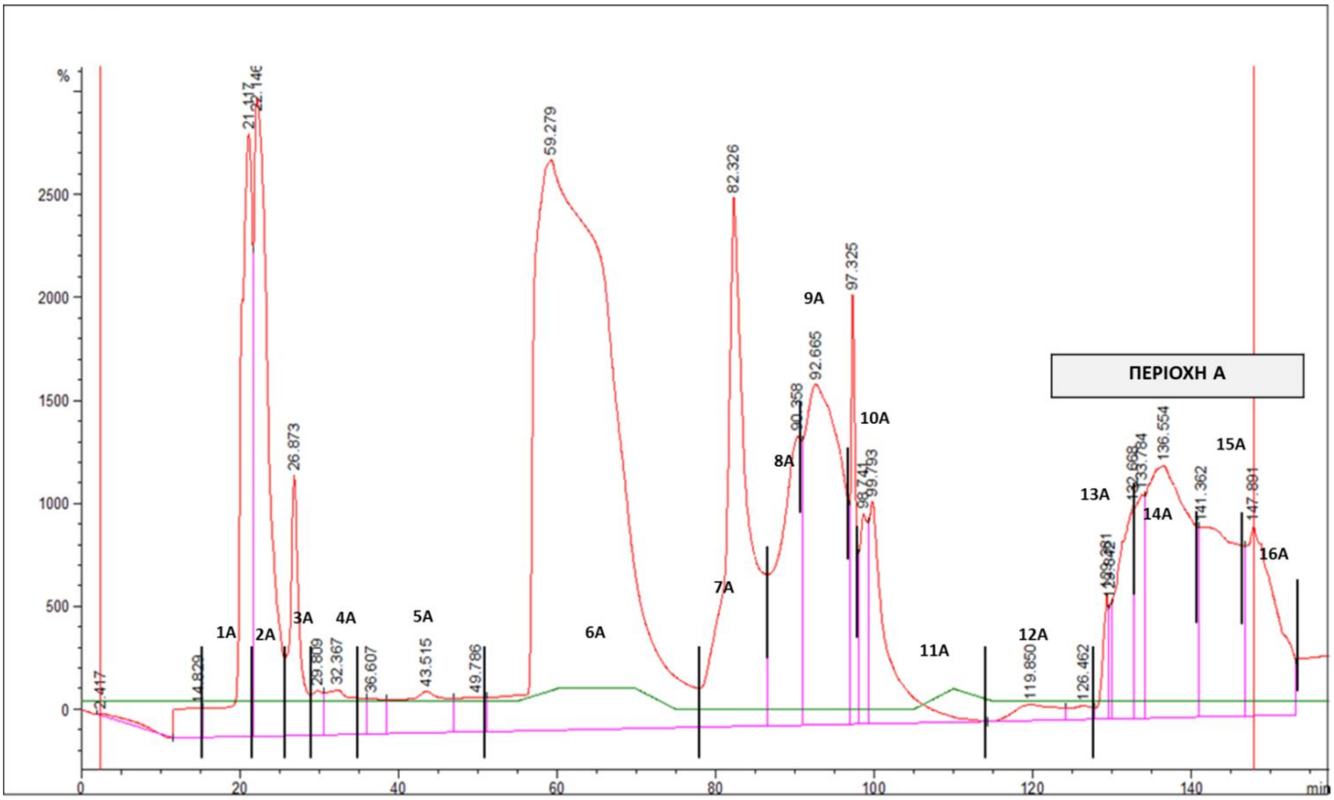
Φιλέτο Ιστού Τσιπούρας (Kg)	TL (gr)	TPL (gr)	TNL (gr)
8	145,3	73,2	70,8

7.1.3. Καθαρισμός των TPL

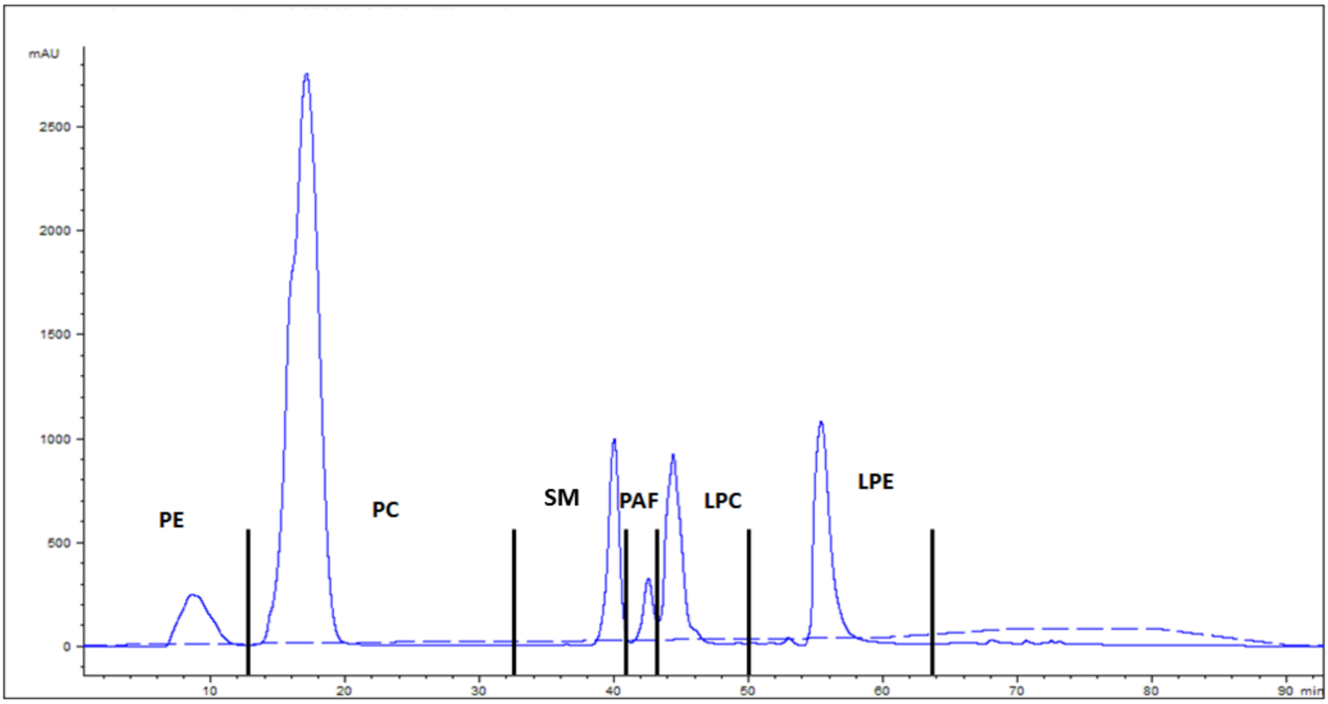
Ο διαχωρισμός των TPL πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) προκειμένου να διαχωριστούν σε επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα. Συνολικά διαχωρίστηκαν 1,3 g TPL. Πραγματοποιήθηκαν 13 ενέσεις δείγματος (TPL από φιλέτο τσιπούρας) στην HPLC (κάθε ένεση είχε όγκο 200 μL που αντιστοιχούσε σε 100 mg δείγματος). Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και στήλη κανονικής φάσης πυριτικού οξέος με αμινομάδες. Η ροή της έκλουσης ήταν 3 mL/min. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης φαίνεται στον πίνακα 7.2. Η μορφή των χρωματογραφημάτων από το διαχωρισμό των TPL στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα φαίνεται στην εικόνα 7.2**.** Οι περιοχές έκλουσης προτύπων ουσιών από μείγμα φωσφολιποειδών φαίνονται στην εικόνα 7.3.

Πίνακας 7.2. Σύστημα διαλυτών έκλουσης για το διαχωρισμό των TPL με HPLC κανονικής φάσης και στήλη πυριτικού οξέος με αμινομάδες, προκειμένου να διαχωριστούν σε επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα.

T (min)	% MeOH (B)	% ACN (C)	% Νερό (D)
0.00	40	60	0
55.00	40	60	0
60.00	100	0	0
70.00	100	0	0
75.00	0	0	100
105.00	0	0	100
110.00	100	0	0
115.00	40	60	0



Εικόνα 7.2. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των TPL φιλέτου τσοιπούρας με HPLC κανονικής φάσης και στήλη πυριτικού οξέος με αμινομάδες.



Εικόνα 7.3. Περιοχές έκλουσης προτύπων ουσιών με HPLC κανονικής φάσης και στήλη πυριτικού οξέος με αμινομάδες: PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PC: Φωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφιγγομυελίνη, PAF: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, LPC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, LPE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη

7.1.4. Βιολογικός Προσδιορισμός των Πολικών Λιποειδικών Κλασμάτων Ψαριού

Μετά το διαχωρισμό συλλέχθηκαν συνολικά 16 κλάσματα, τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA με σκοπό να γίνει έλεγχος της βιολογικής δραστικότητάς τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού, μία μέθοδος που αποτελεί διεθνώς το δόκιμο τρόπο μελέτης για το αν ένα συστατικό έχει βιολογική δράση ανάλογη του PAF ή αν δρα ως αναστολέα αυτού.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, παρατηρήθηκε έντονη συσσωρευτική ικανότητα των αιμοπεταλίων έναντι του PAF των κλασμάτων 13-16, δηλαδή η περιοχή Α όπως φαίνεται στην εικόνα 7.2. Ειδικότερα, τα 10 μL του κλάσματος 13 προκάλεσαν συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων ύψους 14 cm, τα 10 μL του κλάσματος 14 προκάλεσαν συσσώρευση ύψους 1.5 cm, τα 10 μL του κλάσματος 15 προκάλεσαν συσσώρευση ύψους 12 cm, ενώ τα 5 μL του ίδιου κλάσματος προκάλεσαν συσσώρευση 7.2 cm και τα 10 μL του κλάσματος 16 προκάλεσαν συσσώρευση ύψους 2 cm, ενώ όλες οι καμπύλες συσσώρευσης είχαν μορφή ανάλογη με αυτή που προκαλεί ο PAF.

Επιπλέον, με τους κατάλληλους υπολογισμούς, εκφράστηκε η συσσωρευτική δραστικότητα που προκαλείται από τα επιμέρους δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα του ιστού τσιπούρας ιχθυοτροφείου στα πλυμένα αιμοπετάλια, σε συγκέντρωση PAF που προκαλεί αντίστοιχη συσσώρευση. Έτσι, προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα:

Για το κλάσμα 13, 10 μL $\rightarrow$ 1.31 peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς

Για το κλάσμα 14, 10 μL $\rightarrow$ 0.02 peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς

Για το κλάσμα 15, 10 μL $\rightarrow$ 1.96 peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς

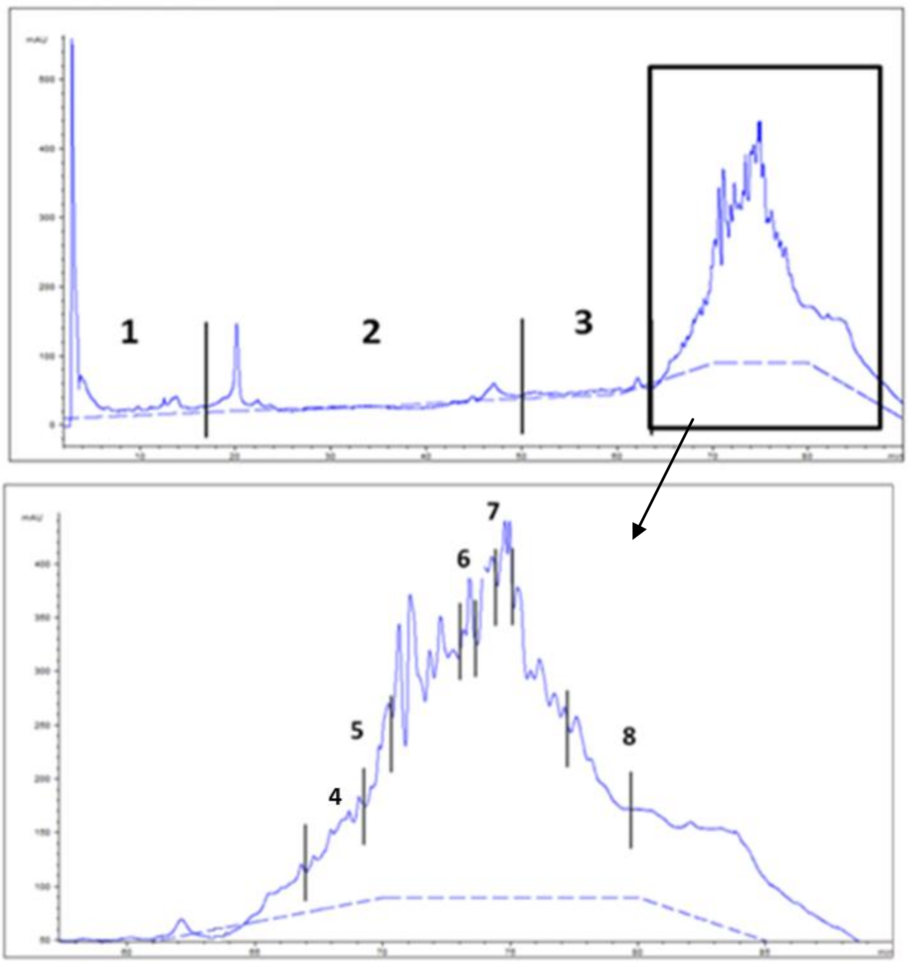
Για το κλάσμα 16, 10 μL $\rightarrow$ 0.10 peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς

Κρίθηκε απαραίτητος ο περαιτέρω διαχωρισμός των κλασμάτων αυτών με στόχο την παραλαβή πιθανώς καθαρότερων δραστικών πολικών λιποειδικών κλασμάτων και κατά συνέπεια πιο ακριβής έλεγχος της δραστικότητας τους. Έτσι, τα κλάσματα που απαρτίζουν την περιοχή Α, ενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν και στη συνέχεια αναδιαλύθηκαν σε μικρό όγκο διαλύτη CH_3Cl:CH_3OH σε αναλογία 1:1 (v/v) και διαχωρίστηκαν με HPLC αντίστροφης φάσης και στήλη Nucleosil-300 C-18, 250x4 mm, 7 μm, ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και η έκλουση έγινε με ροή 1 mL/min. Το νέο σύστημα διαλυτών φαίνεται στον πίνακα 7.3

Πίνακας 7.3. Σύστημα διαλυτών έκλουσης για το διαχωρισμό των δραστικών πολικών λιποειδικών κλασμάτων που αποτελούν την περιοχή Α με HPLC αντίστροφης φάσης, προκειμένου να διαχωριστούν σε πιθανώς καθαρότερα δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα.

T (min)	% water/acetic acid (100:1)	% MeOH/acetic acid (90:1)	% ACN (100)
0.00	90	9	1
0.00-35.00	70	27	3
30.00-35.00 (isocratic)	70	27	3
35.00-45.00	60	36	4
45.00-60.00	50	45	5
60.00-70.00	0	90	10
70.00-80.00	0	90	10
80.00-90.00	90	9	1
90.00-105.00 (isocratic)	90	9	1

Η μορφή των χρωματογραφημάτων από το διαχωρισμό των δραστικών πολικών λιποειδικών κλασμάτων της περιοχής Α στα επιμέρους καθαρότερα πολικά λιποειδικά κλάσματα φαίνεται στην εικόνα 7.4.



Εικόνα 7.4. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των δραστικών πολικών λιποειδικών κλασμάτων της περιοχής Α στα επιμέρους καθαρότερα πολικά λιποειδικά κλάσματα με HPLC αντίστροφης φάσης.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα 7.4, έγινε η συλλογή συνολικά 8 κλασμάτων τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA με στόχο να ελεγχθεί η βιολογική δράση τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Με τους κατάλληλους υπολογισμούς, εκφράστηκε η συσσωρευτική δραστικότητα που προκαλείται από τα επιμέρους δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα του ιστού τσιπούρας ιχθυοτροφείου στα πλυμένα αιμοπετάλια, σε συγκέντρωση PAF που προκαλεί αντίστοιχη συσσώρευση. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.4.

Πίνακας 7.4. Η συσσωρευτική ικανότητα[a] εκφρασμένη σε peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς που προκάλεσαν τα δραστικά λιποειδικά κλάσματα συμβατικής τσιπούρας ιχθυοτροφείου τα οποία προέκυψαν μετά το διαχωρισμό από HPLC αντίστροφης φάσης, σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ peq $PAFg^{-1}$
1	0.13±0.01
3	0.04±0.01
4	0.11±0.01
5	0.11±0.01
6	Activity not detected
7	0.11±0.01
8	0.16±0.01

a: Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών μετρήσεων ± S.D. (Όριο Εμπιστοσύνης 95%).

Ειδικότερα:

Τα 10 μL του κλάσματος 1 από την HPLC με τη στήλη αντίστροφης φάσης παρουσίασαν μικρή συσσωρευτική δράση ύψους 2 cm, ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF συγκέντρωσης 2.24×10^{-9} M σε αντίθεση με τα 4 μL και 80 μL που δεν παρουσίασαν καμία βιολογική δράση.

Τα 10 μL του κλάσματος 3 παρουσίασαν αργή συσσωρευτική δράση ύψους 1.2 cm, όμοιας μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF ενώ τα 80 μL παρουσίασαν ισχυρή συσσωρευτική δράση ύψους 6.3 cm ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF.

Τα 10 μL του κλάσματος 4 και 5 δεν παρουσίασαν καμία βιολογική δράση δράση ενώ τα 80 μL παρουσίασαν μικρή συσσωρευτική δράση ύψους 0.7 cm ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF.

Τα 10 μl του κλάσματος 6 δεν παρουσίασαν καμία βιολογική δράση. Ομοίως και τα 80 μL.

Τα 10 μL του κλάσματος 7 παρουσίασαν συσσωρευτική δράση ύψους 3 cm, ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF, ενώ τα 80 μL παρουσίασαν μικρή συσσωρευτική δράση ύψους 1 cm ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF.

Τα 10 μL του κλάσματος 8 παρουσίασαν συσσωρευτική δράση ύψους 3.7 cm ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν την ύπαρξη **7** τουλάχιστον βιολογικά δραστικών πολικών ουσιών, έτσι ώστε δύναται στο μέλλον ο προσδιορισμός της δομή τους με ESMS και χημικούς προσδιορισμούς.

7.2. Προετοιμασία *in vivo* Πειραμάτων

Στο πλαίσιο του δεύτερου μέρους την ερευνητική εργασίας, έχοντας ως δεδομένο από τη βιβλιογραφία ότι το ελαιόλαδο καθώς και τα παραπροϊόντα της ελαιουργίας περιέχουν ενώσεις βιολογικά δραστικές έναντι του PAF και συνεπώς έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, σε συνεργασία με τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε., πραγματοποιήθηκε εμπλουτισμός της ιχθυοτροφής με πολικά λιποειδή ελαιοπυρήνα, δηλαδή το μη εδώδιμο μέρος της ελιάς που απομένει στα ελαιοτριβεία μετά την έκθλιψή της, αντικαθιστώντας τα λιποειδή της συμβατικής ιχθυοτροφής που προέρχονται από ιχθυέλαια και ιχθυάλευρα. Επόμενος στόχος είναι η εκτροφή τσιπούρας με τη νέα ενισχυμένη ιχθυοτροφή,η απομόνωση των πολικών λιποειδών από το φιλέτου ιστού του ψαριού και εν συνεχεία η μελέτη της επίδρασης τους σε πειραματικό μοντέλο αθηροσκλήρωσης κουνελιού σε αρσενικά λευκά κουνέλια Νέας Ζηλανδίας, με χορήγηση των πολικών λιποειδών μέσω της τροφής τους.

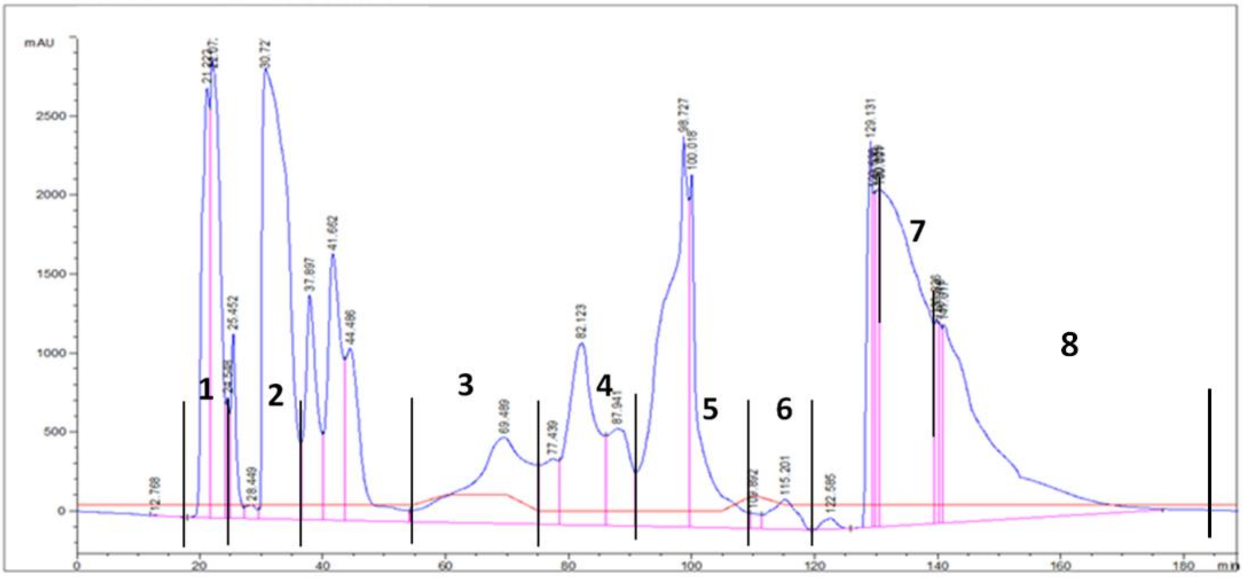
7.2.1. Εμπλουτισμός Ιχθυοτροφής με Πολικά Λιποειδή Ελαιοπυρήνα

Από τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε, λάβαμε δύο δείγματα ελαιοπυρήνα, Α και Β (τα οποία προέρχονταν από την ίδια παρτίδα ελαιοτρίβισης, αλλά από διαφορετική δειγματοληψία), με τον οποίο εμπλουτίστηκε η νέα ενισχυμένη ιχθυοτροφή. Για να επιβεβαιώσουμε την ύπαρξη βιολογικά δραστικών ενώσεων στα δείγματα αυτά, τα TL εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Bligh-Dyer από το κάθε δείγμα και ακολούθησε η παραλαβή των TPL και των TNL με τη μέθοδο της κατανομής κατ’αντιρροή. Οι ποσότητες των διαφόρων κλασμάτων που παραλάβαμε φαίνονται στον πίνακα 7.5.

Πίνακας 7.5. Ποσότητες TL, TPL και TNL στα δείγματα ελαιοπυρήνα.

Ελαιοπυρήνας (3 gr)	TL (gr)	TPL (gr)	TNL (gr)
ΔΕΙΓΜΑ Α	0.6	0.16	0.44
ΔΕΙΓΜΑ Β	0.7	0.11	0.57

Τα TPL και από τα δύο δείγματα, διαχωρίστηκαν με HPLC. Πραγματοποιήθηκαν 3 ενέσεις για τα δείγματα Α και Β στην HPLC (κάθε ένεση είχε όγκο 200 μL που περιείχε σε 120 mg και 140 mg δείγματος, αντίστοιχα). Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και στήλη κανονικής φάσης πυριτικού οξεος με αμινομάδες. Η ροή της έκλουσης ήταν 3 mL/min. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στο διαχωρισμό των TPL της τσιπούρας και φαίνεται στον πίνακα 7.2. Τα χρωματογραφήματα από το διαχωρισμό των TPL στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα φαίνεται στην εικόνα 7.5.



Εικόνα 7.5. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των TPL ελαιοπυρήνα με HPLC και στήλη κανονικής φάσης πυριτικού οξεος με αμινομάδες δείγματος Α.

7.2.2. Βιολογική Δοκιμασία στα Πολικά Λιποειδικά Κλάσματα των δύο δειγμάτων Α και Β του Ελαιοπυρήνα.

Μετά το διαχωρισμό συλλέχθηκαν συνολικά 8 κλάσματα, τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA με σκοπό να γίνει έλεγχος της βιολογικής δραστικότητάς τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Ωστόσο, μόνο 3 από αυτά παρουσίασαν συσσωρευτική ικανότητα, οι περιοχές έκλουσης των οποίων φαίνονται στην παραπάνω εικόνα. Με τους κατάλληλους υπολογισμούς, εκφράστηκε η συσσωρευτική δραστικότητα που προκαλείται από τα επιμέρους δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα του ελαιοπυρήνα στα πλυμένα αιμοπετάλια, σε συγκέντρωση PAF που προκαλεί αντίστοιχη συσσώρευση. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.6.

Πίνακας 7.6. Η συσσωρευτική ικανότητα[a] εκφρασμένη σε peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς που προκάλεσαν τα δραστικά λιποειδικά κλάσματα ελαιοπυρήνα, τα οποία προέκυψαν μετά το διαχωρισμό από HPLC κανονικής φάσης, σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ peq PAF g^{-1}
5	1.01±0.05
6	0.43±0.02
7	2.34±0.12

a: Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών μετρήσεων ± S.D. (Όριο Εμπιστοσύνης 95%).

Ειδικότερα:

Τα 10 μL του κλάσματος 5 από την HPLC με τη στήλη αντίστροφης φάσης παρουσίασαν μικρή συσσωρευτική δράση ύψους 2 cm, ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF συγκέντρωσης 2.24×10^{-9} M σε αντίθεση με τα 4 μL και 80 μL που δεν παρουσίασαν καμία βιολογική δράση.

Τα 10 μL του κλάσματος 6 παρουσίασαν αργή συσσωρευτική δράση ύψους 1.2 cm, όμοιας μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF ενώ τα 80 μL παρουσίασαν ισχυρή συσσωρευτική δράση ύψους 6.3 cm ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF.

Τα 10 μL του κλάσματος 7 δεν παρουσίασαν καμία βιολογική δράση δράση ενώ τα 80 μL παρουσίασαν μικρή συσσωρευτική δράση ύψους 0.7 cm ανάλογης μορφής με αυτή που προκαλεί ο PAF.

7.3. Εμπλουτισμένη Ιχθυοτροφή

Από τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε. παραλάβαμε δύο δείγματα ιχθυοτροφής, Α και Β, (τα οποία προέρχονται από την ίδια παρτίδα παρασκευής ιχθυοτροφής αλλά από διαφορετική δειγματοληψία), ενισχυμένη με τον ελαιοπυρήνα (μείγμα των δειγμάτων Α και Β), η βιολογική δράση του οποίου περιγράφηκε παραπάνω. Σκοπός μας είναι η εκτροφή τσιπούρας ιχθυοτροφείου με την ενισχυμένη με ελαιοπυρήνα τροφή, με στόχο να μελετήσουμε το κατά πόσο αυτή επηρεάζει την σύσταση και κατ'επέκταση τη βιολογική δραστικότητα των λιποειδών του ψαριού καθώς και την προστατευτική του ιδιότητα έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω της επίδρασης τους στη δημιουργία των αθηρωματικών πλακών. Στο πλαίσιο της ενίσχυσης της τροφής, μέρος των λιπαρών που προέρχονταν από ιχθυέλαια αντικαταστάθηκε με τα φυτικά έλαια του ελαιοπυρήνα σε ποσοστό 8%.

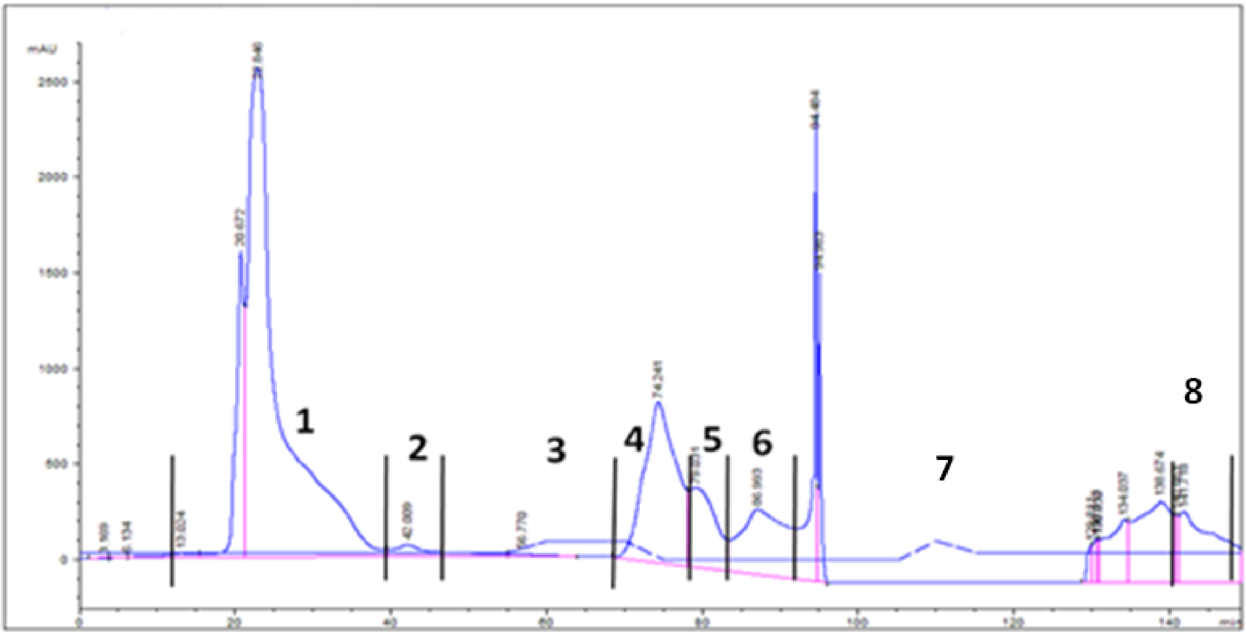
7.3.1. Απομόνωση Λιποειδών Εμπλουτισμένης Ιχθυοτροφής

Έγινε η εκχύλιση των TL της νέας ενισχυμένης ιχθυοτροφής με τη μέθοδο Bligh-Dyer και εν συνεχεία η παραλαβή των TPL και NPL με κατανομή κατ'αντιρροή. Οι ποσότητες των διαφόρων κλασμάτων που ελήφθησαν φαίνονται στον πίνακα 7.7.

Πίνακας 7.7. Ποσότητες TL, TPL και TNL στα δείγματα εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής.

Εμπλουτισμένη Ιχθυοτροφή	TL (gr)	TPL (gr)	TNL (gr)
ΔΕΙΓΜΑ Α (5.22 gr)	1.23	0.92	0.31
ΔΕΙΓΜΑ Β (5.06 gr)	1.12	0.89	0.23

Τα TPL από τα δύο δείγματα, διαχωρίστηκαν με HPLC. Χρησιμοποίηθηκε ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και στήλη κανονικής φάσης πυριτικού οξέος με αμινομάδες. Η ροή της έκλουσης ήταν 3 mL/min. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στο διαχωρισμό των TPL της τσιπούρας και φαίνεται στον πίνακα 7.2. Το χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των TPL στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα φαίνεται στην εικόνα 7.6.



Εικόνα 7.6. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των TPL εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής με HPLC κανονικής φάσης και στήλη πυριτικού οξεος με αμινομάδες.

7.3.2. Βιολογική Δοκιμασία στα PL των δύο δειγμάτων A και B της Εμπλουτισμένης Ιχθυοτροφής.

Μετά το διαχωρισμό συλλέχθηκαν συνολικά 8 κλάσματα από τα δείγματα A και B της εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής, τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA με σκοπό να γίνει έλεγχος της βιολογικής δραστικότητάς τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Με τους κατάλληλους υπολογισμούς, εκφράστηκε η συσσωρευτική δραστικότητα που προκαλείται από τα επιμέρους δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα του δείγματος A της εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής, τα οποία είναι αντιπροσωπευτικά και για τα αντίστοιχα κλάσματα του δείγματος B. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.9.

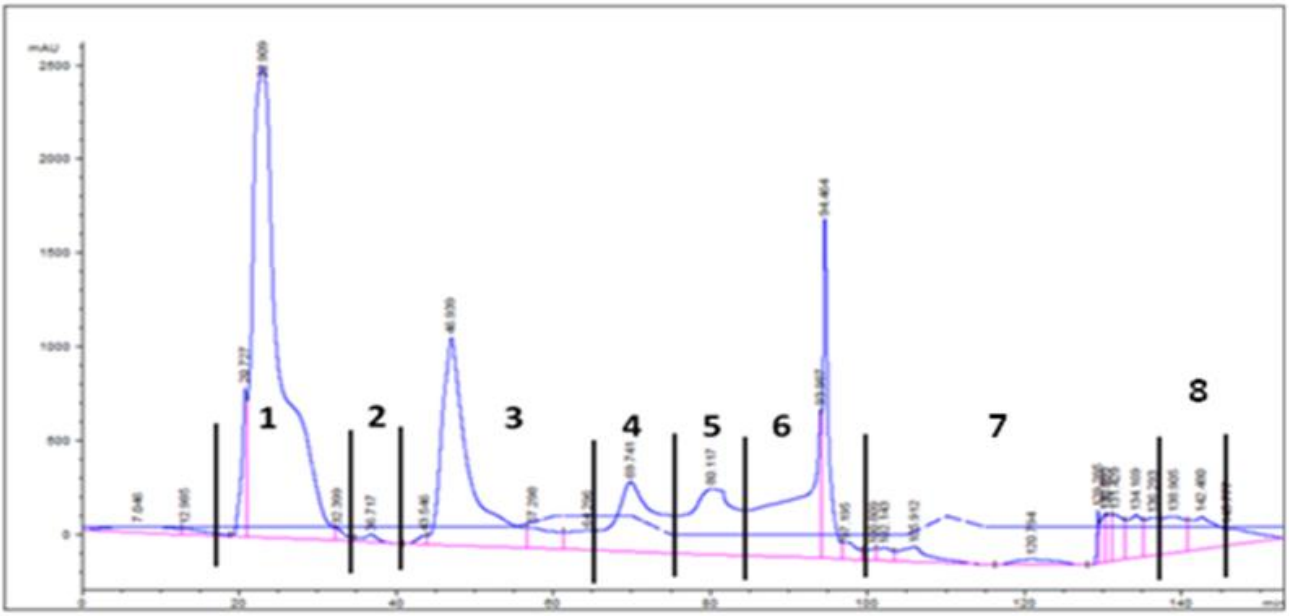
7.4. Απομόνωση Λιποειδών Συμβατικής Ιχθυοτροφής

Από τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε. παραλάβαμε ποσότητα συμβατικής ιχθυοτροφής. Έγινε η εκχύλιση των TL με τη μέθοδο Bligh-Dyer και εν συνεχεία η παραλαβή των TPL και NPL με κατανομή κατ'αντιρροή. (Πίνακας 7.8).

Πίνακας 7.8. Ποσότητες TL, TPL και TNL στα δείγματα συμβατικής ιχθυοτροφής.

Συμβατική Ιχθυοτροφή (50 gr)	TL (gr)	TPL (gr)	TNL (gr)
	0.60	0.33	0.26

Ποσότητα 0.33 gr των TPL διαχωρίστηκαν σε επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα με HPLC. Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και στήλη κανονικής φάσης πυριτικού οξέος με αμινομάδες. Η ροή της έκλουσης ήταν 3 mL/min. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης είναι το ίδιο με αυτό που χρησιμοποιήθηκε και στο διαχωρισμό των TPL της τσιπούρας και φαίνεται στον πίνακα 7.2. Το χρωματογράφημα από το διαχωρισμό των TPL φαίνεται στην εικόνα 7.7.



Εικόνα 7.7. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των TPL συμβατικής ιχθυοτροφής με HPLC κανονικής φάσης και στήλη πυριτικού οξεος με αμινομάδες.

7.4.1. Βιολογική Δοκιμασία στα PL Συμβατικής Ιχθυοτροφής

Μετά το διαχωρισμό συλλέχθηκαν συνολικά 8 κλάσματα τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA με σκοπό να γίνει έλεγχος της βιολογικής δραστικότητάς τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Με τους κατάλληλους υπολογισμούς, εκφράστηκε η συσσωρευτική δραστικότητα που προκαλείται από τα επιμέρους δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα της συμβατικής ιχθυοτροφής. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 7.9.

Πίνακας 7.9. Η συσσωρευτική ικανότητα εκφρασμένη[a] σε peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς που προκάλεσαν τα δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα της συμβατικής και της εμπλουτισμένης με ελαιοπυρηνα ιχθυοτροφής σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	ΣΥΜΒΑΤΙΚΗ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗ	ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΕΝΗ ΙΧΘΥΟΤΡΟΦΗ
5	0.04±0.01[†]	1.24±0.07[†]
6	ΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟ	0.56±0.02
7	>>	ΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟ

a: Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών μετρήσεων ± S.D. (Όριο Εμπιστοσύνης 95%).

[†]: Υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά της δραστικότητας των πολικών λιποειδικών κλασμάτων της συμβατικής ιχθυοτροφής και των αντίστοιχων λιποειδικών κλασμάτων της εμπλουτισμένης με ελαιοπυρήνα ιχθυοτροφής.

7.5. Μελέτη της Δραστικότητας των Λιποειδών του Εμπλουτισμένου Ψαριού που έχει καταναλώσει την Ενισχυμένη με Ελαιοπυρήνα Ιχθυοτροφή

Προκειμένου να εκτιμηθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης της ιχθυοτροφής με τα βιοδραστικά συστατικά του ελαιοπυρήνα, σε συνεργασία με τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε.πραγματοποιήθηκε η εκτροφή τσιπούρας ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata),* καταναλώνοντας την εμπλουτισμένη τροφή. Εν συνεχεία, έγινε η απομόνωση των πολικών λιποειδών του φιλέτου ιστού του νέου ψαριού και η μελέτη της ικανότητας τους να προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων, ανάλογη με αυτή που προκαλεί ο PAF.

7.5.1. Πειραματική Πορεία Απομόνωσης Λιποειδικών Κλασμάτων Ενισχυμένου Ψαριού

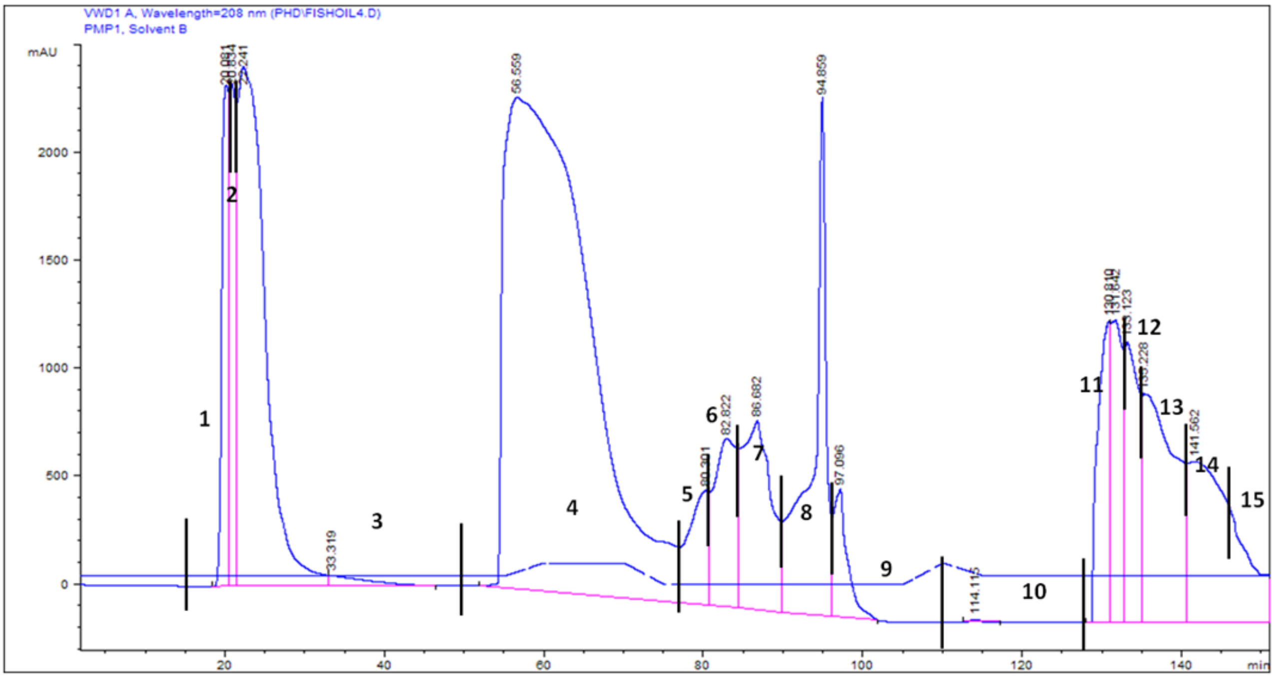
Τα TL της εμπλουτισμένης τσιπούρας εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Bligh-Dyer[80]. Το κλάσμα που παραλήφθηκε, συμπυκνώθηκε σε μικρό όγκο με περιστροφική συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) και μεταφέρθηκε σε σκουρόχρωμο γυάλινο φιαλίδιο για να εξατμιστεί το δείγμα μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε ο διαχωρισμός αυτών TPL και TNL με τη μέθοδο της κατανομής κατ'αντιρροή[81] (Πίνακας 7.10).

Πίνακας 7.10. Ποσότητες TL, TPL και TNL που απομονώθηκαν από φιλέτο ιστού εμπλουτισμένης τσιπούρας.

Εμπλουτισμένο δείγμα ψαριού (10 g)	TL (gr)	TPL (gr)	TNL (gr)
	4	0.42	0.26

7.5.2. Διαχωρισμός των TPL

Ο καθαρισμός των TPL πραγματοποιήθηκε με HPLC προκειμένου να διαχωριστούν σε επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα. Συνολικά διαχωρίστηκαν 0.42 g TPL. Πραγματοποιήθηκαν 4 ενέσεις δείγματος στην HPLC (κάθε ένεση είχε όγκο 200 μL). Χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και στήλη κανονικής φάσης πυριτικού οξέος με αμινομάδες. Η ροή της έκλουσης ήταν 3 mL/min. Το σύστημα των διαλυτών έκλουσης φαίνεται στον πίνακα 7.2. Η μορφή του χρωματογραφήματος από το διαχωρισμό των TPL στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα φαίνεται στην εικόνα 7.8.

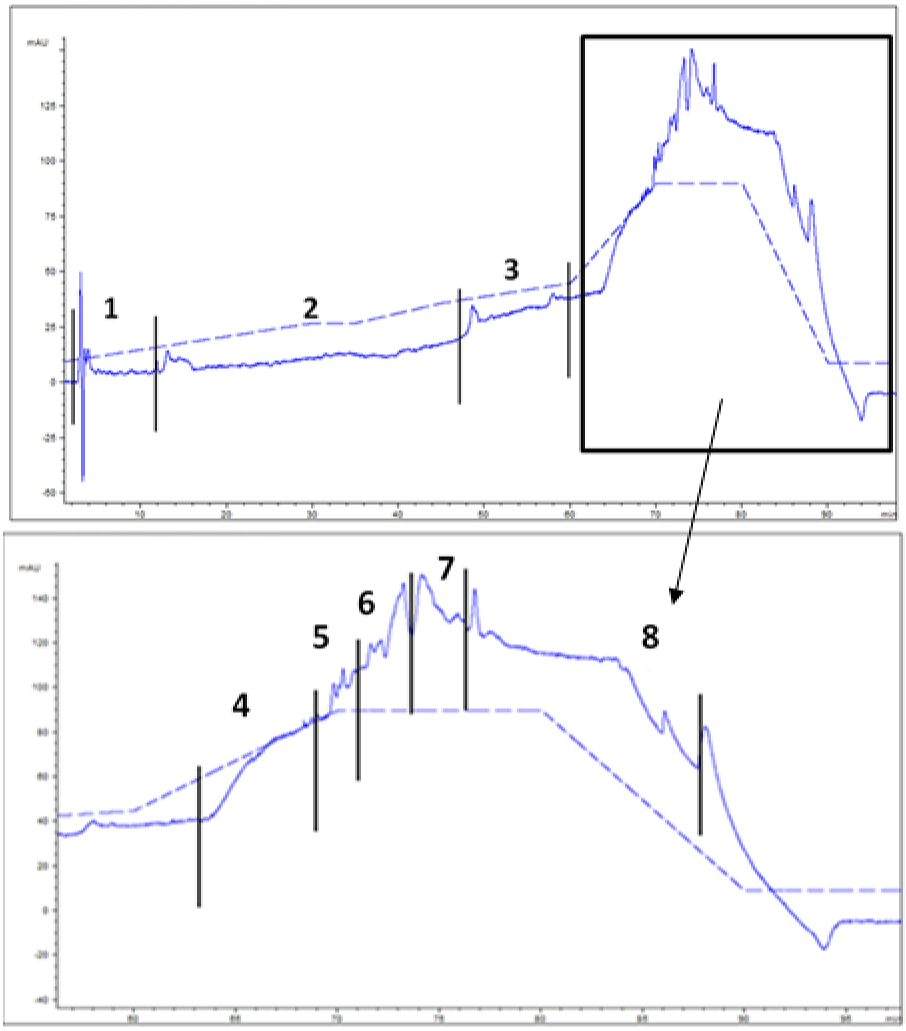


Εικόνα 7.8. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των TPL εμπλουτισμένης τσιπούρας με HPLC κανονικής φάσης και στήλη πυριτικού οξεος με αμινομάδες.

7.5.3. Καθαρισμός των TPL

Τα κλάσματα των TPL (Εικόνα 7.8., κλάσματα 10-15) που εκλούστηκαν στους ίδιους χρόνους έκλουσης με τα πιο ισχυρά βιοδραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα που προέκυψαν από την HPLC κανονικής φάσης της τσιπούρας που είχε τραφεί με τη συμβατική ιχθυοτροφή (υποκεφάλαιο 7.1.3., εικόνα 7.2), καθαρίστηκαν περαιτέρω με HPLC αντίστροφης φάσης, όπως έγινε και με τη σκέτη τσιπούρα. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν αντίστροφης φάσης Nucleosil-300 C-18, 250x4 mm, 7 μm, ανιχνευτής υπεριώδους 208 nm και η έκλουση έγινε με ροή 1 mL/min. Το σύστημα διαλυτών φαίνεται στον πίνακα 7.3.

Η μορφή του χρωματογραφήματος από το διαχωρισμό των δραστικών πολικών λιποειδικών κλασμάτων 10-15 της εμπλουτισμένης τσιπούρας στα επιμέρους καθαρότερα πολικά λιποειδικά κλάσματα φαίνεται στην εικόνα 7.9.



Εικόνα 7.9. Χρωματογραφικός διαχωρισμός των δραστικών πολικών λιποειδικών κλασμάτων 10-15 της εμπλουτισμένης τσιπούρας από την HPLC κανονικής φάσης στα επιμέρους καθαρότερα πολικά λιποειδικά κλάσματα με HPLC αντίστροφης φάσης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 7.9., έγινε η συλλογή συνολικά 8 κλασμάτων τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 200 μL διαλύματος εργασίας BSA με στόχο να ελεγχθεί η βιολογική δράση τους σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού.

Έπειτα, έγινε σύγκριση της βιολογικής δραστικότητας των επιμέρους πολικών λιποειδικών κλασμάτων εμπλουτισμένης τσιπούρας, με τα αντίστοιχα πολικά λιποειδικά κλάσματα που προήλθαν από την HPLC αντίστροφης φάσης του σκέτου ψαριού, τα οποία εκλούστηκαν στους ίδιους χρόνους έκλουσης (Εικόνα 7.4.), εκφρασμένα σε peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς, δηλαδή σε συγκέντρωση PAF που προκαλεί αντίστοιχη συσσώρευση Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 7.11.

Πίνακα 7.11. Σύγκριση της βιολογικής δραστικότητας[a] των επιμέρους πολικών λιποειδικών κλασμάτων εμπλουτισμένης τσιπούρας, με τα αντίστοιχα πολικά λιποειδικά κλάσματα που προήλθαν από την HPLC αντίστροφης φάσης του σκέτου ψαριού, τα οποία εκλούστηκαν στους ίδιους χρόνους έκλουσης, εκφρασμένη σε peq PAF g^{-1} πολικού λιποειδούς.

a : Κάθε τιμή αποτελεί το μέσο όρο τριών μετρήσεων ± S.D. (Όριο Εμπιστοσύνης 95%).

†: Υποδηλώνει στατιστικώς σημαντική διαφορά της δραστικότητας των πολικών λιποειδικών κλασμάτων της τσιπούρας που κατανάλωσε τη συμβατική ιχθυοτροφή και των αντίστοιχων λιποειδικών κλασμάτων της τσιπούρας που κατανάλωσε την εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα ιχθυοτροφή.

ΚΛΑΣΜΑΤΑ	Συμβατικό δείγμα ψαριού	Ενισχυμένο δείγμα ψαριού
1	0.13±0.01†	0.30±0.01†
3	0.04±0.01	ΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟ
4	0.11±0.01†	0.25±0.01†
5	0.11±0.01†	0.24±0.01†
6	ΜΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟ	0.23±0.01
7	0.11±0.01†	0.26±0.01†
8	0.16±0.01†	0.28±0.02†

7.6. Σχολιασμός Αποτελεσμάτων

Το κίνητρο της ερευνητικής μας ομάδας για να ασχοληθεί με τη μελέτη των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων των ψαριών και ειδικότερα της τσιπούρας ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata),* εντοπίζεται στις πολυάριθμες κλινικές μελέτες που αποδεικνύουν ότι, πειραματόζωα που τρέφονται με αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη με πολικά λιποειδή (PL) τσιπούρας, εμφάνισαν σημαντικά μειωμένο πάχος και έκταση της αθηρωματικής πλάκας[23,84] καθώς επίσης και των λιποειδικής φύσεως ενώσεις του ελαιολάδου που εμφάνισαν *in vitro* (σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού) σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του PAF (σαν αναστολείς ή ανταγωνιστές)[8,10,] και έχουν προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων[85,86].
Τα πολικά λιποειδή (PL) παρουσιάζουν βιολογική δραστικότητα - στο μοντέλο της συσσώρευσης αιμοπεταλίων - ανάλογη με εκείνη του PAF. Δηλαδή είναι αγωνιστές της συσσώρευσης, όπως και ο PAF. Παρόλα αυτά, επειδή η δραστικότητά τους είναι κατά πολύ (χιλιάδες ή και εκατομμύρια φορές) μικρότερη εκείνης του PAF, δρουν τελικά σαν αναστολείς του PAF. Έτσι εξηγείται και η προστατευτική δράση αυτών των πολικών λιποειδών.
Σε συνεργασία με τα ιχθυοτροφεία ΝΗΡΕΥΣ Α.Ε., παραλήφθηκε μεγάλη ποσότητα τσιπούρας ιχθυοτροφείου, με σκοπό να εκχυλίσουμε σημαντική ποσότητα TL, TPL και TNL με τις κατάλληλες μεθόδους. Τα TPL διαχωρίστηκαν αρχικά με HPLC κανονικής φάσης και στη συνέχεια, μέρος αυτών διαχωρίστηκαν περαιτέρω με HPLC αντίστροφης φάσης. Η *in vitro* μελέτη των επιμέρους καθαρότερων πολικών λιποειδικών κλασμάτων του ιστού τσιπούρας ως προς την ικανότητά τους να προκαλούν τη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων, αναστέλλοντας ή όχι τη δράση του PAF, ο οποίος είναι ο κύριος προφλεγμονώδης παράγοντας που προκαλεί τη συσσώρευση των κυττάρων αυτών, ενδυναμώνει τα συμπεράσματα των *in vivo* μελετών για τη συμβολή των ιχθυελαίων στη μείωση της αθηρωματικής πλάκας, άρα και στην αντιμετώπιση και την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων.

Σε δεύτερο στάδιο της παρούσας ερευνητικής εργασίας, θελήσαμε να ερευνήσουμε τους τρόπους με τους οποίους θα ενισχυθεί η προστατευτική δράση των ψαριών έναντι των κινδύνων που απειλούν την καρδιά. Για το σκοπό αυτό, τα ιχθυέλαια με τα οποία εμπλουτίζεται η συμβατική ιχθυοτροφή κατά τα στάδια της παρασκευής της, αντικαταστάθηκαν με τα λιποειδή ελαιοπυρήνα που έχουν αποδειχθεί ότι έχουν ισχυρές καρδιοπραστατευτικές ιδιότητες[34]. Αφού παραλήφθησαν και διαχωρίστηκαν τα TPL και από τα δύο είδη ιχθυοτροφών, εξετάστηκαν *in vitro* ως προς την ικανότητά τους να εκδηλώνουν ανασταλτική ή ανταγωνιστική δράση ως προς τον PAF σε μοντέλο πλυμένων αιμοπεταλίων.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη βιολογική δοκιμασία των επιμέρους πολικών λιποειδικών κλασμάτων των δύο ειδών ιχθυοτροφών, όπως φαίνονται στον πίνακα 7.9, παρατηρήθηκε αξιοσημείωτη αύξηση της βιολογικής δραστικότητας έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων των πολικών λιποειδικών κλασμάτων της εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής σε σχέση με τα αντίστοιχα πολικά λιποειδικά κλάσματα της συμβατικής ιχθυοτροφής που είχαν τους ίδιους χρόνους έκλουσης με τα δραστικά πολικά λιποειδή της νέας ιχθυοτροφής. Ειδικότερα, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική αύξηση της βιολογικής δραστικότητας του κλάσματος 5 της εμπλουτισμένης ιχθυοτροφής, καθώς επίσης και αξιόλογη δραστικότητα του κλάσματος 6, όταν το αντίστοιχο κλάσμα της συμβατικής ιχθυοτροφής δεν είχε καμία δράση έναντι της συσσώρευσης των αιμοπεταλών. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι τα δραστικά συστατικά με αποδεδειγμένη αντιαθηρογόνο και καρδιοπροστατευτική ιδιότητα που περιέχονται στο ελαιοπυρήνα, μεταφέρθηκαν σε ικανοποιητικό βαθμό στην ιχθυοτροφή μέσω του εμπλουτισμού της με αυτόν.

Για να εκτιμηθεί ο βαθμός ενίσχυσης της νέας ιχθυοτροφής και το κατά πόσο η κατανάλωσή της επηρρεάζει τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των ψαριών, έγινε εκτροφή με τη νέα τροφή και η σύγκριση της βιολογικής δραστικότητας των πολικών λιποειδών τσιπούρας που τράφηκε με τη συμβατική και με την ενισχυμένη ιχθυοτροφή. Όσον αφορά στα πολικά λιποειδικά κλάσματα της τσιπούρας ιχθυοτροφείου που κατανάλωσε τη συμβατική ιχθυοτροφή, όπως αυτά προέκυψαν από το διαχωρισμό με HPLC κανονικής φάσης, η μεγαλύτερη βιολογική δραστικότητα έναντι της αναστολής του PAF στη συσσώρευση των αιμοπεταλίων σε μοντέλο πλυμένων αιμπεταλιών κουνελιού, εντοπίστηκε στα κλάσματα που εκλούστηκαν στο διάστημα των 120-140 min. Γι'αυτό το λόγο, τα κλάσματα αυτά ενώθηκαν, συμπυκνώθηκαν και διαχωρίστηκαν περαιτέρω με HPLC αντίστροφης φάσης για την παραλαβή πιθανών καθαρότερων πολικών λιποειδικών κλασμάτων, τα οποία εν συνεχεία εξετάστηκαν για τη βιολογική τους ικανότητα να αναστέλλουν ή όχι τη δράση του PAF στη δημιουργία αθηρωματικών πλακών. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τα αντίστοιχα πολικά λιποειδικά κλάσματα που εκλούστηκαν στο χρονικό διάστημα 12-140 min της HPLC κανονικής φάσης της ενισχυμένης τσιπούρας ιχθυοτροφείου που κατανάλωσε την εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα ιχθυοτροφή.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 7.11., παρατηρήθηκε σημαντική ενίσχυση της βιολογικής δραστικότητας των πολικών λιποειδικών κλασμάτων της τσιπούρας που τράφηκε με την εμπλουτισμένη τροφή σε σχέση με τα αντίστοιχα πολικά λιποειδικά κλάσματα της τσιπούρας που τράφηκε με τη συμβατική ιχθυοτροφή. Αξίζει να σημειωθεί, πως το κλάσμα 6 του εμπλουτισμένου ψαριού προκάλεσε σημαντική συσσώρευση των αιμοπεταλίων όταν το αντίστοιχο κλάσμα με τον ίδιο χρόνο έκλουσης του συμβατικού ψαριού δεν παρουσίασε καμία βιολογική δραστικότητα. Η υπόθεση ότι η βελτιωμένη βιολογική δραστικότητα των πολικών λιποειδών της ενισχυμένης τσιπούρας όπως αυτά προέκυψαν από το διαχωρισμό με HPLC αντίστροφης φάσης οφείλεται στην παρουσία των βιολογικά δραστικών μικροσυστατικών του ελαιοπυρήνα με τον οποίο εμπλουτίστηκε η ιχθυοτροφή που κατανάλωσαν, επιβεβαιώνεται από το γεγονός ότι τα αντίστοιχα βιολογικά δραστικά πολικά λιποειδικά κλάσματα του ελαιοπυρήνα αλλά και του ψαριού έχουν τους ίδιους χρόνους έκλουσης, δηλαδή εντοπίζονται στα 60-100 min, στο διαχωρισμό με HPLC αντίστροφης φάσης.

Επιπροσθέτως, τα συμπεράσματα που διεξήχθησαν από τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας ενδυναμώνουν τα αποτελέσματα της Nasopoulou et al[85], σύμφωνα με τα οποία επιτυγχάνεται σημαντική ενίσχυση της βιολογικής δραστικότητας ως αναστολείς του PAF των λιποειδών της τσιπούρας ιχθυοτροφείου και κατά συνέπεια και του καρδιοπροστατευτικού ρόλου της έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, όταν αυτή τράφηκε με ιχθυοτροφή εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα. Παράλληλα σημειώθηκε μειωμένη θνησιμότητα στον πληθυσμό των εκτρεφόμενων ψαριών όταν κατανάλωσαν τη νέα ενισχυμένη ιχθυοτροφή, ενδυναμώνοντας την πρόταση για τα οφέλη της νέας τεχνολογίας ιχθυοτροφών που προτείνεται σχετικά με την αντικατάσταση των ιχθυελαίων της με φυτικής προέλευσης έλαια.

7.7. Επίλογος

Σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές, όταν η ιχθυοτροφή των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας εμπλουτισθεί με φυτικής προέλευσης έλαια, η διατροφική αξία του ψαριού βελτιώνεται . Ειδικότερα, αναφέρεται μείωση της περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στον ιστό τσιπούρας (*Sparus aurata)* όταν τράφηκε με ιχθυοτροφή που περιείχε σογιέλαιο 80% και ιχθυέλαιο 20%, σιναπέλαιο 80% και έλαιο λιναρόσπορου 60%, ενώ αυξήθηκε η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό οξύ, ελαϊκό οξύ και λινολενικό οξύ αντίστοιχα[88]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας άλλης έρευνας, η κατανάλωση ιχθυοτροφής στην οποία τα ιχθυέλαια αντικαταστάθηκαν με φυτικά έλαια, οδήγησε στην παραγωγή ψαριών με χαμηλά επίπεδα ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων[89], το οποίο έρχεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία[87] που αποδεικνύει επιπλέον πως τα φυτικά έλαια της ιχθυοτροφής και ειδικότερα αυτά που προέρχονται από τον ελαιοπυρήνα, βελτιώνουν τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες της τσιπούρας ιχθυοτροφείου.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, επιβεβαιώνεται η αποτελεσματικότητα του μερικού εμπλουτισμού της ιχθυοτροφής με τα βιοδραστικά συστατικά του ελαιοπυρήνα ως=πηγή λιποειδών στη διατροφή των ψαριών, παράγοντας ένα τρόφιμο με βελτιωμένες και ενισχυμένες ιδιότητες ως προς την πρόληψη καρδιαγγειακών νοσημάτων, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο όχι μόνο τη διατροφική αλλά και την εμπορική αξία των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας σε σχέση με τα ψάρια ελεύθερης αλιείας. Έτσι, οι ιχθυοκαλλιέργιες αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα για την αύξηση της ζήτησης ψαριών από το καταναλωτικό κοινό. Συνοψίζοντας όλα τα παραπάνω, η παρούσα εργασία προτείνει ένα νέο τρόπο για την εκμετάλλευση και αξιοποίηση των βιολογικά δραστικών συστατικών του ελαιοπυρήνα, ο οποίος αποτελεί το κύριο παραπροϊόν του τριφασικού συστήματος κατεργασία της ελαιουργίας κατά τα στάδια εξαγωγής ελαιολάδου. Όντας πλούσια σε οργανικό φορτίο, τα απόβλητα αυτά καταλήγουν στα υδάτινα συστήματα, όπως λίμνες, θάλασσες, χείμαρρους και ποτάμια, αποτελώντας ρυπαντική παράμετρο, η οποία είναι υπεύθυνη για τις σημαντικότατες περιβαλλοντικές επιπτώσεις και την αισθητική υποβάθμισή των οικοσυστημάτων.

Αφού επιτεύχθηκε απομόνωση και καθαρισμός των δραστικότερων έναντι της αθηροσκλήρωσης λιποειδών τσιπούρας ιχθυοτροφείου, επόμενος στόχος είναι η ταυτοποίηση της δομής τους με τις μεθόδους GC-MS καθώς επίσης και χημικούς προσδιορισμούς (φωσφόρου/σακχάρων στα λιποειδή). Ανοίγεται έτσι ένα νέο πεδίο επιστημονικής έρευνας των μηχανισμών που σχετίζουν τη διατροφή με τα επίπεδα φλεγμονής, καθώς επίσης και νέες προοπτικές για τη μελέτη και την κατανόηση της βιοσυνθετικής πορείας των ενώσεων αυτών, γεγονός που θα αποτελέσει το δρόμο για το σχεδιασμό και την παραγωγή νέων αποτελεσματικότερων φαρμάκων για την πρόληψη και θεραπεία των καρδιαγγειακών παθήσεων που αποτελούν τη σημαντικότερη αιτία θανάτου παγκοσμίως.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	**Ελληνικός Όρος**
Response to Ingury	Απόκριση στον Τραυματισμό
Electrospray MS	Φασματομετρία Μαζών με την Τεχνική του Ηλεκτροψεκασμού

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AA: αραχιδονικό οξύ
AC: Αντιπηκτικό που περιέχει κιτρικό οξύ και κιτρικό νάτριο
ACD: Αντιπηκτικό που περιέχει κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο και δεξτρόζη
ACN: Ακετονιτρίλιο
ACE: Μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης
ADP: Αδενοσίνο διφωσφορικό οξύ
ANSA: Αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξέος
AT II: Αγγειοτενσίνη II
ATP: Αδενοσινο-τριφωσφορικό οξύ
BOD5: Η μέτρηση του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) κατά τη διάρκεια μιας περιόδου 5 ημερών.
BSA: Αλβουμίνη βοδινού ορού
CARD: Καρδιολιπίνη
CB: Κερεβροζίτες
COD: Η χημική απαίτηση οξυγόνου ή το χημικά απαιτούμενο οξυγόνο
DHA: Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ
EC_{50}: Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί συσσώρευση ίση με το μισό της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης που προκαλεί πρότυπο διάλυμα PAF
EGTA: Αιθυλενο-γλυκολ-δις-(β-αμινο-αιθυλο-αιθερο)-N΄-τετραοξικό οξύ
EPA: Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
f-FA: Ελεύθερα λιπαρά οξέα
FH: Οικογενειακή υπερχοληστερολαιμία
HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HDL-C: Χοληστερόλη της λιποπρωτεΐνης υψηλής πυκνότητας
HMG-CoA: 3-υδροξυμεθυλογλουταρυλο-CoA
HPLC: Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
HT: Υδροξυτυροσόλη
IC_{50}: Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή
IFN-γ: Ιντερφερόνη-γ
IL: Ιντερλευκίνη

LDL: Λιποπρωτείνες χαμηλής πυκνότητας
LDL-C: Χοληστερόλη της λιποπρωτείνης χαμηλής πυκνότητας
LPC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
LPS: Λιποπολυσακχαρίτες
LT-D4: Λευκοτριένιο D4
lyso-PAF AT: 1-O-αλκυλο-2-λυσο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη:ακετυλο CoA ακετυλοτρανσφεράση
MeOH : Μεθανόλη
MS: Φασματοσκοπία Μαζών
MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NO: Μονοξείδιο του Αζώτου
NL: Ουδέτερα λιποειδή
Ox-LDL: Οξειδωμένη μορφή της λιποπρωτεϊνης χαμηλής πυκνότητας
PA : Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH: Ακετυλουδρολάση του PAF
PC: Φωσφατιδυλοχολίνη
PE: Φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη
PI: Φωσφατιδυλοϊνοσιτόλη
PPP: Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
PRP: Πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια
PS: Φωσφατιδυλοσερίνη
PUFA: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SM: Σφιγγομυελίνη
SMCs: Λεία μυϊκά κύτταρα
SR: Εκκαθαριστές υποδοχείς
TG: Τριγλυκερίδια
TI: Τριφοσφωρική ινοσιτόλη
TL: Ολικά λιποειδή
vWF: Παράγοντας Von Willebrand-αιμοστατικό στοιχείο των αγγειακών τοιχωμάτων

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. A. Trichopoulou, T. Costacou, C. Bamia, and D. Trichopoulos, *Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population*. N. Engl. J. Med., 2003, 348, pp. 2599-2608.

2. W.C. Willett, F. Sacks, A. Trichopoulou, G. Drescher, A. Ferro-Luzzi, E. Helsing, and D. Trichopoulos, *Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating*. *Review*. Am. J. Clin. Nutr., 1995, 61, pp. 1402-1406.

3. F. Sofi, F. Cesari, R. Abbate, G.F. Gensini, and A. Casini, *Adherence to Mediterrenean diet and health status: meta-analysis*. BMJ, 2008, 337, p. 1344.

4. S.M. Brown, and J.L. Goldstein, *A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis*. Science, 1986, 232, pp. 34–47.

5. T.A. Mori, L.J. Beilin, and V.Burke 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, pp. 279–286.

6. J. Shepherd, S.M. Cobbe, and I. Ford et al*. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia: West of Scotland Coronary Prevention Study Group.* N. Engl. J. Med., 1995, 333, pp. 1301–1308.

7. R.M. Krauss, R.H. Eckel, B. Howard, et al, AHA Dietary Guidelines: *A statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association*. Circulation, 2000, 102, pp. 2284–2299.

8. S.G. Koussissis, C.E. Semidalas, S. Antonopoulou, V. Kapoulas, C.A. Demopoulos, and V. Kalyvas, *PAF antagonists in food: Isolation and identification of PAF antagonists in virgin olive oil*. Revue Francaise des Corps Gras, 1993, pp. 323-327.

9. M. Massaro, M.A. Carluccio, and R. De Caterina, *Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: a clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet.* Cardiologia, 1999, vol. 44, no. 6, pp. 507-513.

10. H.C. Karantonis, S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Antithrombotic lipid minor constituents from vegetable oils. Comparison between olive oils and others.* J. Agric. Food Chem., 2002, vol. 50, no. 5, pp. 1150-1160.

11. C. Alarcon de la Lastra, M.D. Barranco, V. Motilva, and J.M. Herrerias, *Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil.* Curr. Pharm. Des., 2001, 7, pp. 933-950.

12. F. Visioli, and C. Galli, *Antiatherogenic components of olive oil.* Curr. Atherosc. Reports, 2001, 3, pp. 64-67.

13. F.Visioli, R. Wolfram, D. Richard, B.A. Muhammad Imran Chong, and R. Crea, *Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers.* J. Agric. Food Chem., 2009, vol. 57. No. 5, pp. 1793-1796.

14. C.A. Karantonis, N. Tsantila, G. Stamatakis, M. Samiotaki, G. Panayotou, S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Bioactive polar lipids in Olive Oil, Pomace and Waste Byproducts.* J. Food Biochem. 2008, vol. 32, no. 4, pp. 443-459.

15. R.P. Mensink, and M.B. Katan, *An epidemiological and an experimental study on the effect of olive oil on total serum and HDL cholesterol in healthy volunteers*. Eur. J. Clin. Nutr., 1989, 43, pp. 43-48.

16. A.P. Simopoulos, *The Mediterranenan Diets: What Is So Special about the Traditional Diet of Greece?* J. Nutr., 2001, 131, pp. 30655-30735.

17. A. Nordoy, R. Marchioli, H. Arnesen, and J. Videbaek, *n−3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. To whom, how much, preparations*. Lipids, 2001, vol. 36, no. 1, pp. 127-129.

18. B. Liaset, K. Julshamn, and M. Espe, *Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex.* Proc. Biochem., 2003, 38, pp. 1747-1759.

19. J. Dyerberg, H.O. Bang, and N. Hjorn, *Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos*. N. Am. J. Nutr., 1975, 28, pp. 958-966.

20. D.S. Siscovick, T.E. Raghunathan, and I. King, et al. *Dietary Intake and Cell Membrane Levels of Long-Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Risk of Primary Cardiac Arrest.* JAMA, 1995, vol. 274, no. 17, pp. 1363-1367.

21. H.R. Knapp, and G.A. FitzGerald, *The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension*. N. Engl. J. Med., 1989, 320, pp. 1037-1043.

22. E. Fragopoulou, T. Nomikos, C.H. Karantonis, C. Apostolakis, E. Pilakis, M. Samiotaki, G. Panayotou, and S. Antonopoulou, *Biological Activity of Acetylated Phenolic Compounds.* J. Agric Food Chem., 2007, vol. 55, no. 1, pp. 80-89.

23. C. Nasopoulou, H.C. Karantonis, D.N. Perrea, S.E. Theocharis, D.G. Iliopoulos, C.A. Demopoulos, and I. Zampetakis, *In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (Sparus aurata) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits.* Food Chem., 2010, vol. 120, no. 3, pp. 831-836.

24. D.H.R. Spennemann, and L.R. Allen, *Feral olives (Olea europaea) as future woody weeds in Australia: a review*. Australian Journal of Experimental Agriculture, 2000, vol. 40, no. 6, pp. 889–901.

25. J.A. Karray, J.P. Lhomme, M.M. Masmoudi, and N.B. Mechlia, *Water balance of the olive tree–annual crop association: A modeling approach*. Agricultural Water Management, 2008, vol. 95, no. 5, pp. 575-586.

26. R. Fernández-Escobar, R. Moreno, and M. García-Creus, *Seasonal changes of mineral nutrients in olive leaves during the alternate-bearing cycle.* Horticultural Science, 1999, vol. 82, no. 1-2, pp. 25-45.

27. A.G. Vlyssides, M. Loizidou, K. Gimouhopoulos, and A. Zorpas, *Olive oil processing wastes production and their characteristics in relation to olive oil extraction methods.* Fresenius Envir. Bull., 1998, vol. 7, pp. 502-508.

28. A.G. Vlyssides, H.N. Loukakis, P.K. Karlis, E.M. Barampouti, and S. Mai, *Olive mill wastewater detoxification by applying pH related Fenton's oxidation process*. Fresenius Envir. Bull., 2004, vol. 13, pp. 501-504.

29. A. Roig, M.L. Cayuela, and M.A. Sanchez-Monedero, *An overview on olive mill wastes and their valorisation methods.* Waste Management, 2006, vol. 26, no. 9, pp. 960-969.

30. P. Paraskeva, and E. Diamantopolos, *Technologies for olive mill wastewater (OMW) treatment: a review.* J. Chem. Techn. Biotech., 2006, vol. 81, no. 9, 1475-1485.

31. N. Azbar, A. Bayram, A. Filibeli, A. Muezzinoglu, F. Sengul, and A. Ozer, *A Review of Waste Management Options in Olive Oil Production*. Critical Reviews in Environ. Sci. Technol., 2004, vol. 34, no. 3, pp. 209-247.

32. M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, E. Miniati, A. Machioni, and G. Montedoro, *High performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin oil, vegetation waters and pomace in 1D and 2D nuclear resonance characterization.* J. Am. Oil. Chem. Soc., 1999, vol. 76, no. 7, pp. 873-882.

33. M.J. Paredes, E. Moreno, A. Ramos-Cormenzana, and J. Martinez, *Characteristics of soil after pollution with wastewaters from olive oil extraction plants.* Chemosphere, 1987, vol. 16, no. 7, pp. 1557-1564.

34. H.C. Karantonis, N. Tsantila, G. Stamataki, M. Samiotaki, G. Panayotou, S. Antonopoulou, and C.A. Demopoulos, *Bioactive polar lipids in olive oil, pomace and waste byproducts*. J. Food. Biochem. 2008, vol. 32, no. 4, pp. 443-459.

35. R. Borja, B. Rincon, F. Raposo, J. Alba, and A. Martın, *A study of anaerobic digestibility of two phases olive mill solid waste (OMSW) at mesophilic temperature*. Proc. Biochem., 2002, vol. 38, no. 5, pp. 733-742.

36. S. Çaynak, M. Gürü, A. Biçer, A. Keskin, and Y. İçingür, *Biodiesel production from pomace oil and improvement of its properties with synthetic manganese additive.* Fuel, 2009, vol. 88, no. 3, pp. 534-538.

37. P. Read, and T. Fernandes, *Management of environmental impacts of marine aquaculture in Europe.* Manage Aquac. Effl., 2003, vol. 226, no. 1-3, pp. 139-163.

38. M. Velazquez, S. Zamora, and F.J. Martinez, *Influence of environmental conditions on demand-feeding behavior of gilthead seabream (Sparus aurata).* J. App. Ichth., 2004, vol. 20, no. 6, pp. 536-541.

39. W.W.L. Cheung, T.J. Pitcher, and D. Pauly, *A fuzzy logic expert system to estimate intrinsic extinction vulnerabilities of marine fishes to fishing*. Biol. Conserv., 2005, vol. 124, no. 1, pp. 97-111.

40. K.P. Chandroo, I.J.H. Ducanand, and R.D. Moccia, *Can fish suffer? Perspectives on sentience, pain, fear and stress*. App. Anim. Behav. Sci., 2004, vol. 86, no. 3-4, pp. 225-250.

41. G.L. Jensen, and K.J. Greenlees*, Public health issues in acquaculture*. Rev. Sci. Tech., 1997, vol. 16, no. 2, pp. 641-651.

42. K. Grigorakis, *Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (S aurata) and sea bass (D. labrax) and factors affecting it: a review.* Aquaculture, 2007, vol. 272, no. 1-4, pp. 55-75.

43. M. Izquierdo, D. Montero, L. Robaina, M. Cabarello, G. Rosenlund, and R. Gines, *Alterations in fillet fatty acid profile and flesh quality in gilthead seabream (Sparus aurata) fed vegetable oils for a long term period. Recovery of fatty acid profiles by fish oil feeding.* Aquacaulture, 2005, vol. 250, no. 1-20, pp. 431-444.

44. T. Van Vliet, and M.B. Katan*, Lower ratio of n-3 to n-6 fatty acids in cultured than in wild fish.* Am. J. Clin. Nutr., 1990, vol. 51, no. 1, pp. 1-2.

45. A.P. Simopoulos, *The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases*. Biol. Med., 2008, vol. 233, no. 6, pp. 674-688.

46. S. Jennings, and M.J. Kaiser, *the Effects of Fishing on Marine Ecosystems*. Adv. Mar. Biol., 1998, vol. 34, pp. 201-352.

47. W. Verbeke, F. Vanhonacker, I. Sioen, J. Van Camp, and S. De Henauw, *Perceived importance of sustainability and ethics related with fish: a consumer behaviour perspective*. J. Hum. Environm., 2007, vol. 36, no. 7, pp. 580-585.

48. T. Thom, N. Haase, W. Rosamond, V.J Howars, J. Rumsfeld, and T. Manolio et al, *Heart Disease and Stroke Statistics-2006 update: A Report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee*. Circulation, 2006, vol. 113, pp. 85-151.

49. W.B. Kannel, and D.L. McGee, *Diabetes and cardiovascular disease. The Framigham study*. JAMA, 1979, vol. 241, no. 19, pp. 2035-2038.

50. G.M. London, and T.B. Drueke, *Atherosclerosis and arteriosclerosis in chronic renal failure.* Kindey Int., 1997, vol. 51, pp. 1678-1695.

51. I. Hiroyuki, *Oxidative Modification of LDL: Its Pathological Role in Atherosclerosis.* Clin. Rev. Allerg. Immu., 2009, vol. 37, no. 1, pp. 4-11.

52. Y. Yamada, H. Izawa, and S. Ichihara et al. *Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes*. N. Engl. J. Med., 2002, vol. 347, pp. 1916-1923.

53. A.P. Burke, A. Farb, and G.T. Malcom, et al, *Effect of risk factors on the mechanism of acute thrombosis and sudden coronary death in women*. Circulation, 1998, vol. 97, pp. 2110-2116.

54. J.A. Critchley, and S. Capewell, *Mortality Risk Reduction Associated With Smoking Cessation in Patients with Coronary Heart Disease*. JAMA, 2003, vol. 290, no. 1, 86-97.

55. A.H. Slyper, *Childhood obesity, adipose tissue distribution, and the pediatric practitioner*. Pediatrics, 1998, vol. 102, no. 1, pp. 4-9.

56. J.A. Colwell, M. Lopes-Virella, and P.V. Halushka, *Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus*. Diabetes Care, 1981, vol. 4, no. 1, pp. 121-133.

57. A.M. Gotto, Jr. and S.M. Grundy, *Lowering LDL cholesterol: questions from recent metaanalyses and subset analyses of clinical trial DataIssues from the Interdisciplinary Council on Reducing the Risk for Coronary Heart Disease, ninth Council meeting.* Circulation, 1999, vol. 99, pp. 1-7.

58. T. Gordon, W.P. Castelli, M.C. Hjortland, W.B. Kannel, and T.R Dawber, *High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease.* The Framingham Study. Am.J. Med., 1977, vol. 62, no. 5, pp. 707-714.

59. J.F. Oram, *Tangier disease and ABCA1*. BBA-Mol. Cell. Biol. L., 2000, vol. 1529, no. 1-3, pp. 321-330.

60. A.P. Avolio, S.G. Chen, R.P. Wang, G.L. Zhang, M.F. Li, and M.F. O'Rourke, *Effects of aging on changing artelial compliance and left ventricular load in northern Chinese urban community.* Circulation, 1983, vol. 68, pp. 50-58.

61. A.C. Pearson, R. Guo, D.A. Orsinelli, P.F. Binkley, and T.J. Pasierski, *Transesophageal echocardiographic assessment of the effects of age, gender and hypertension on thoracic aortic wall size, thickness and stiffness*. Am. Heart. J., 1994, vol. 128, no. 2, pp. 344-351.

62. C. Stefanadis, E. Tsiamis, C. Vlachopoulos, C. Stratos, K. Touloouzas, C. Pitsavos, et al*. Unfavorable effect of smoking on the elastic properties of the human aorta.* Ciculation, 1997, vol. 95, pp. 31-38.

63. A. Dart, C. Silagy, E. Dewar, G. Jennings, and J. McNeil, *Aortic distensibility and left ventricular structure and function in isolated systolic hypertension.* Eur. Heart. J., 1993, vol. 14, no. 11, pp. 1465-1470.

64. A. Beltran, G. McVeigh, D. Morgan, S.P. Glasser, J.M. Neutel, M. Weber, S.M. Finkelstein, J.N. Cohn, *Arterial compliance abnormalities in isolated systolic hypertension*. Am. J. Hypertens., 2001, vol. 14, no. 10, pp. 1007-1011.

65. K. Burring, *The endothelium of advanced arteriosclerotic plagues in humans.* Arterioscler. Thromb., 1991, vol. 11, pp. 1678-1689.

66. Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. *In:* Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. Atherosclerosis and coronary artery disease, vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996, pp. 539- 555

67. A. Nordoy, and S.H. Goodnight, *Dietary lipids andthrombosis. Relationships to atherosclerosis*. Arterioscl. Throm. Vasc., 1990, vol. 10, pp. 149-163.

68. R. Ross, *Atherosclerosis an anti-inflammatory disease*. N. Engl. J. Med., 1999, vol. 340, pp. 115-126.

69. J.L. Goldstein, Y.K. Ho, S.K. Basu, and M.S. Brown, *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, vol. 76, no. 1, pp. 333-337.

70. H. Esterbauer, M. Dieber-Rotheneder, G. Waeg, G. Striegl, and G. Jurgens, *Biochemical, structural, and functional properties of oxidized low-density lipoprotein*. Chem. Res. Toxicol., 1990, vol. 3, no. 2, pp. 77-92.

71. C.A. Demopoulos, R.N. Pinckard, and D.J. Hanahan, *Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-0-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphoryl- choline as the active component. (A new class of lipid chemical mediators).* J. Biol. Chem., 1979, vol. 254, pp. 9355-9358.

72. C. O'Neill, *The role of paf in embryo physiology.* Hum. Reprod. Update, 2005, vol. 11, no. 3, pp. 215-228.

73. V.I. Kulikov, and G.I. Muzya, *Ether lipids and platelet-activating factor, evolution and cellular function*. Biochemistry, 1997, vol. 62, no. 10, pp. 1103-1108.

74. D.M. Stafforini, T.M. McIntyre, G. Zimmerman, and S.M. Prescott, *Platelet activating factor acetylhydrolases.* J. Biol. Chem., 1997, vol. 272, 17895–17898.

75. D.M. Stafforini, T.M. McIntyre, M.E. Carter, and S.M. Prescott, *Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: association with lipoprotein particles and role in the degradation of platelet-activating factor*. J. Biol. Chem., 1987, vol. 262, no. 9, pp. 4215–4222.

76. D.M. Stafforini, T.M. McIntyre, G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott, *Platelet-activating factor, a pleiotrophic mediator of physiological and pathological processes.* Crit. Rev. Clin. Lab. Sci., 2003, vol. 40, no. 6, pp. 643-672.

77. V.M. Steen, and H. Holmsen, *Synergism between thrombin and epinephrine in human platelets: different dosw-response relationships for aggregation and dense granule secretion*. Thromb. Haemost., 1985, vol. 54, no. 3, pp. 680-683.

78. E.F. Plow, and M.H. Ginsberg, *Cellular adhesion: CD11b/CD18 as a prototypic adhesion receptor*. Prog. Hemost. Thromb., 1989, vol. 9, pp. 117-156.

79. S. Tsuji, M. Sugimoto, S. Miyata, M. Kuwahara, S. Kinoshita and A. Yoshioka, *Real-time analysis of mural thrombus formation in various platelet aggregation disorders: distinct shear-dependent roles of platelet receptors and adhesive proteins under flow*. Blood, 1999, vol. 94, pp. 968-975.

80. E.G. Bligh, and W.J. Dyer, *A rapid method of total lipid extraction and purification.* Can. J. Biochem. Physiol., 1959, vol. 37, no. 8, pp. 911-917.

81. D.S. Galanos, V.M. Kapoulas, *Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures*. J. Lipid. Res., 1962, vol. 3, pp. 134-137.

82. C.A. Demopoulos, R.N. Pinckard, and D.J. Hanahan, *Platelet-Activating Factor - Evidence for 1-O-Alkyl-2-Acetyl-Sn-Glyceryl-3-Phosphorylcholine as the Active*

Component (a New Class of Lipid Chemical Mediators) J. Biol. Chem., 1979, vol. 254, no. 19, pp. 9355-9358.

83. T.Nomikos, H.C. Karantonis, E.Fragopoulou, C.A.Demopoulos, *One-step separation system for the main phospholipids, glycolipids and phenolics by normal phase HPLC. Application to polar lipid extracts from olive and sunflower oils.* J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol., 2002, vol. 25, no. 1, pp. 137-149.

84. J.S. Parks, J.Kaduck-Sawyer, B.C. Bullock, and L.L. Rudel, *Effect of dietary fish oil on coronary artery and aortic atherosclerosis in African green monkeys*. Arteriosclerosis. 1990, vol. 10, pp. 1102-1112.

85. M. Fito, M. Cladellas, R. de la Torre, J. Marti, D. Munoz, H. Schroder, M. Alcantara, M. Pujaras-Bastardes, J. Marrugat, M.C.Lopez-Sabater, J. Bruguera, M.I. Covas, and the members of the SOLOS Investigators, *Anti-inflammatory effect of vigin olive oil in stable coronary disease patients: a randomized, crossover, controlled trial.* Eur. J. Clin. Nutr. 2007, pp. 1-5.

86. M.I. Covas, K. Nyyssonen, H.E. Poulsen, J. Kaikkonen, H.F. Zunft, H. Kiesewetter, A. Gaddi, R. de la Torre, J. Mursu, H. Baumler, S. Nascetti, J.T Salonen, M. Fito, J. Virtanen, J. Marrugat, and for the EUROLIVE Study Group. *The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors. A Randomized Trial.* Ann. Inter. Med., Vol. 145, no. 5, pp. 333-341.

87. C. Nasopoulou, G. Stamatakis, C.A. Demopoulos, and I. Zabetakis, *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, vol. 129, no. 3, pp. 1108-1113.

88. D. Montero, T.Kalinowski, A. Obach, L. Robaina, L. Tort, M.J. Cabarello, and M.S. Izquierdo, *Vegetable lipid sources for gilthead seabream (Sparus aurata): effects on fish health.* Aquaculture, 2003, vol. 225, no. 1-4, pp. 353-370.

89. R. Shapawi, S. Mustafa, and W.K. Ng, *Effects of dietary fish oil replacement with vegetable oils on growth and tissue fatty acid composition of humpback grouper, Cromileptes altivelis (Valenciennes)*. Aquac. Res., 2008, vol. 39, pp. 315-323.