



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Χημεία τροφίμων»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφής των
Σολομοειδών στα καρδιαγγειακά νοσήματα και μελέτη
των *in vitro* καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων
παραπροϊόντος ελαιουργίας (ελαιοπυρήνα)**

**ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΛΥΤΟΥΔΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ, 2014**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Αξιολόγηση της επίδρασης της διατροφής των Σολομοειδών στα καρδιαγγειακά νοσήματα και μελέτη των *in vitro* καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων παραπροϊόντος ελαιουργίας (ελαιοπυρήνα)

Κωνσταντίνα Λυτούδη

A.M: 0000051202

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ
2. Μαρκάκη Παναγιώτα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΕΚΠΑ
3. Προεστός Χαράλαμπος, Λέκτορας ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 10/10/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το αντικείμενο της παρούσας εργασίας επικεντρώνεται στη μελέτη δυο ιχθύων, της Ιριδίζουσας Πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) και τριών ομάδων Σολομού Ατλαντικού (*Salmo salar*), όπως επίσης και των τροφών τους. Ως πρώτο στάδιο της μελέτης ήταν η εκχύλιση των δειγμάτων και η παραλαβή των ολικών λιποειδών (TL) τους και ο διαχωρισμός αυτών σε ολικά πολικά λιποειδή (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL). Στη συνέχεια ακολούθησε βιολογικός προσδιορισμός σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού *in vitro* στα TL, TPL και TNL, για να προσδιοριστεί η ύπαρξη αναστολέων ή αγωνιστών του PAF. Παράλληλα με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC-FID) έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σημαντικότερων λιπαρών οξέων των TPL και TNL της πέστροφας και της τροφής της, καθώς και των TPL των τριών ομάδων σολομών και των τροφών τους.

Σε επόμενο στάδιο, εκχυλίστηκε δείγμα ελαιοπυρήνα και παρελήφθησαν τα ολικά λιποειδή του (TL), τα οποία διαχωρίστηκαν σε ολικά πολικά λιποειδή (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL). Στη συνέχεια ακολούθησε περαιτέρω διαχωρισμός με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε επιμέρους λιποειδικά κλάσματα. Τα ολικά, τα ολικά πολικά και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί με βιολογικό προσδιορισμό σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού η ικανότητά τους να αναστέλλουν ή όχι την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων. Παράλληλα με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC-FID) έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σημαντικότερων λιπαρών οξέων των TPL του ελαιοπυρήνα.

Απεδείχθη ότι όλα τα δείγματα ιχθύων και ιχθυοτροφών εμφάνισαν βιολογική δράση, παρεμποδίζοντας έτσι τη δράση του PAF και άρα των σχηματισμό αθηρωματικών πλακών. Σε σύγκριση μεταξύ των τριών ομάδων σολομών απεδείχθη ότι η Ιχθυοτροφή 1, όπως και ο Σολομός 1 εμφάνισε ισχυρότερη ανασταλτική δράση, γεγονός που ερμηνεύεται από τη σύνθεση της αντίστοιχης ιχθυοτροφής, η οποία συντίθεται κυρίως από ιχθυέλαιο και ιχθυάλευρο. Έτσι, η μερική αντικατάσταση ιχθυελαίου με κραμβέλαιο δεν είχε

τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί δείγμα ελαιοπυρήνα για την πιθανή βιολογική του δράση, ώστε να χρησιμοποιηθεί ως συστατικό ιχθυοτροφής. Τα αποτελέσματα του βιολογικού προσδιορισμού ήταν πολύ ενθαρρυντικά, καθώς τα ολικά, τα ολικά πολικά και πολικά λιποειδικά κλάσματά του κατέδειξαν ανασταλτική δράση στην επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Επίδραση της διατροφής των Σολομοειδών στα λιπαρά οξέα και στη βιολογική δραστηριότητα των λιποειδών τους, μελέτη των *in vitro* καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων ελαιοπυρήνα

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ιριδίζουσα Πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), Σολομός Ατλαντικού (*Salmo salar*), Κραμβέλαιο, Ελαιοπυρήνας, Πολικά λιποειδή, Καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, Αθηρογένεση, Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).

ABSTRACT

The object of study focuses on two fish, rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and three groups of Atlantic salmon (*Salmo salar*), as well as their feeds. The first stage of the study was the extraction of samples in order to receive total lipids (TL) and the separation of these in total polar lipids (TPL) and total neutral lipids (TNL). TL, TPL and TNL were tested *in vitro* for their ability to aggregate platelets or inhibit the platelet-activating factor (PAF)-induced aggregation. Meanwhile with the use of Gas Chromatography (GC-FID) qualitative and quantitative determination of the most important TPL's and TNL's fatty acids of rainbow trout and feed was taken place, as well as TPL's fatty acids of three groups of Atlantic salmon and their feeds.

As a next stage, the sample of olive pomace was extracted and received total lipids (TL), which were separated in total polar lipids (TPL) and total neutral lipids (TNL). TPL were further separated by preparative thin-layer chromatography (TLC). TL, TPL, and the obtained polar lipid fractions after TLC separation were tested to determine the biological activity against atherosclerosis based on the *in vitro* inhibition of Platelet Activating Factor (PAF)-induced platelet aggregation. Meanwhile with the use of Gas Chromatography (GC-FID) qualitative and quantitative determination of the most important TPL's fatty acids of olive pomace was taken place.

It was proved that all samples of fish and fish feeds exhibited biological activity, by inhibiting the activity of PAF and hence the formation of atherosclerotic plaques. Comparing the three groups of Atlantic salmon, we noted that Salmon Fish Feed 1 and Salmon 1 showed stronger inhibitory activity, which is interpreted by the composition of Fish Feed 1 which mostly consists of fish oil and fish meal. Thus, the partial replacement of fish oil with rapeseed oil didn't show the expected results. For this reason it was necessary to test olive pomace for possible biological activity. It was proved that total polar and polar lipid fractions showed inhibitory effect on PAF-induced platelet aggregation.

SUBJECT AREA: The diet's effect of *Salmonidae* in fatty acid composition and the biological activity of their lipoids, study of *in vitro* cardio protective properties in olive pomace.

KEYWORDS: Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*); Atlantic salmon (*Salmo salar*), Rapeseed oil; Olive pomace; Polar lipids; Cardioprotective properties; Atherogenesis; Platelet Activating Factor (PAF).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης εκπονήθηκε την περίοδο 2012-2014 στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, με επιβλέποντα τον επίκουρο καθηγητή κο Ιωάννη Ζαμπετάκη. Με την ολοκλήρωσή της, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω ολόψυχα τους ανθρώπους που γνώρισα και συνεργάστηκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα επίκουρο καθηγητή κο Ιωάννη Ζαμπετάκη για την δυνατότητα που μου έδωσε να παρακολουθήσω αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, όπως επίσης για την καθοδήγηση και υπομονή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή κο Κωνσταντίνο Α. Δημόπουλο για την καθοδήγηση, τις συμβουλές και τις πολύτιμες γνώσεις που μου προσέφερε. Καθώς επίσης για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω ένα μέρος της πειραματικής διαδικασίας στο εργαστήριο της Βιοχημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια κα Παναγιώτα Μαρκάκη για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή της ερευνητικής μου εργασίας, όπως επίσης και για τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω το λέκτορα κο Χαράλαμπο Προεστό για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή αυτής της ερευνητικής εργασίας, καθώς και για την βοήθεια και τις γνώσεις που μου προσέφερε.

Ευχαριστώ θερμά τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Κωνσταντίνα Νασοπούλου για την βοήθεια και τις γνώσεις κατά την διάρκεια της πειραματικής μου εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ, για το χρόνο που αφιέρωσαν και για την ουσιαστική βοήθεια που μου παρείχαν ο Δρ. Γεώργιος Σταματάκης και η Δρ. Βασιλική

Παπακωνσταντίνου. Για τις συμβουλές και την υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Βιοχημείας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις εταιρείες BioMar Hellenic ABEEI, BioMar Ltd και την Sparta Life A.E. για τα δείγματα προς ανάλυση που μου προσέφεραν.

Θέλω να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, καθώς η ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας μου συγχρηματοδοτήθηκε μέσω του έργου 'Υποτροφίες ΙΚΥ' από πόρους του ΕΠ 'Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση', του Ευρωπαϊκού Κοινωνικού Ταμείου (ΕΚΤ) του ΕΣΠΑ, 2007-2013'.

Θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην υποψήφια διδάκτορα Μαρία Ντετοπούλου, και την Σελήνη Τσοροτιώτη, για την πραγματικά πολύτιμη βοήθεια τους από την αρχή μέχρι και το τέλος της μεταπτυχιακής μου εργασίας, όπως και για τις υπέροχες στιγμές στο εργαστήριο. Ένα ευχαριστώ, στους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που ήταν μαζί μου στο εργαστήριο την Ελένη και την Κωνσταντίνα, για τις όμορφες ώρες στο εργαστήριο. Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ στο συμφοιτητή και φίλο μου Γρηγόρη Μορφή για τις συμβουλές και τις ατέλειωτες στιγμές γέλιου αυτά τα τελευταία δυο χρόνια.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου του φίλους μου και ιδιαίτερω τον Αποστόλη και τη Νίκη, οι οποίοι ήταν μαζί μου από την πρώτη στιγμή που ξεκίνησα τις σπουδές μου στο πανεπιστήμιο, πίστεψαν σε εμένα και με στήριξαν.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια μου, τους γονείς μου Μαίρη και Νίκο και την αδερφή μου Βούλα, για την ηθική κυρίως στήριξη που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια και για τη συμπαράσταση και τη δύναμη που μου έδωσαν ώστε να εκπληρώσω τους στόχους μου. Κυρίως όμως τους ευχαριστώ επειδή ποτέ δε σταμάτησαν να πιστεύουν σε εμένα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	v
ABSTRACT	vii
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	x
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	xii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	xvii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xxii
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	1
Η Μεσογειακή Διατροφή και η Σχέση της με τα Καρδιαγγειακά Νοσήματα.....	1
1.1. Εισαγωγή.....	1
1.2. Χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Διατροφής	2
1.3. Ιστορικά δεδομένα	2
1.4. Ο ρόλος της Μεσογειακής Διατροφής στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων	4
1.5. Ο ρόλος των ιχθύων και των ιχθυελαίων σε σχέση με την Αθηρογένεση	5
1.6. Ο ρόλος του ελαιολάδου σε σχέση με την Αθηρογένεση.....	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	9
Αθηρογένεση και PAF.....	9
2.1. Αθηρογένεση	9
2.1.1. Εισαγωγή	9
2.1.2. Η παθογένεια της αρτηριοσκλήρωσης.....	10
2.1.3. Κυτταρική επικοινωνία στην αθηροσκλήρωση	11
2.1.3.1. Κυτταροκίνες.....	11
2.1.3.2. Μόρια προσκόλλησης	12
2.1.4. Κυτταρικό και μοριακό επίπεδο της αθηρογένεσης.....	13
2.1.4.1. Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας	13
2.1.4.2. Ενδοθηλιακά κύτταρα	14
2.1.4.3. Αιμοπετάλια	15
2.1.4.4. Μονοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα	16
2.1.4.5. Λεία μυϊκά κύτταρα.....	17
2.1.4.6. T- λεμφοκύτταρα	18
2.1.5. Παράγοντες κινδύνου της Αθηροσκλήρωσης.....	18
2.2. Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).....	19

2.2.1. Γενικά στοιχεία για τον PAF	19
2.2.2. Βιοσύνθεση του PAF	19
2.2.3. Δράσεις του PAF ως προς την αθηρογένεση.....	21
2.2.4. Η σχέση του PAF με την ox-LDL	22
2.2.5. Ο ρόλος της ακετυλοϋδρολάσης.....	23
2.2.6. Θεωρητικός μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	27
Χημική Σύσταση και Βιολογική Αξία Ιχθύων – Σολομοειδή	27
3.1. Βιολογική αξία ιχθύων.....	27
3.1.1. Γενικά στοιχεία για την βιολογική αξία των ψαριών.....	27
3.1.2. Πρωτεΐνες.....	28
3.1.3. Λιπαρά οξέα	29
3.1.4. Υδατάνθρακες	31
3.1.5. Βιταμίνες	32
3.1.6. Ανόργανα στοιχεία.....	32
3.1.7. Υγρασία.....	33
3.1.8. Πτητικές ενώσεις που προσδίδουν άρωμα στα ψάρια	34
3.2. Σολομοειδή	34
3.2.1. Ιριδίζουσα πέστροφα (<i>Oncorhynchus mykiss</i>).....	35
3.2.1.1. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά Ιριδίζουσας Πέστροφας	35
3.2.1.2. Βιολογία της ιριδίζουσας πέστροφας.....	37
3.2.2. Σολομός Ατλαντικού (<i>Salmo salar</i>)	39
3.2.2.1.Μορφολογικά Χαρακτηριστικά Σολομού Ατλαντικού.....	39
3.2.2.2. Βιολογία Σολομού Ατλαντικού	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.....	43
Ιχθυοκαλλιέργεια	43
4.1. Εισαγωγή.....	43
4.2. Ιχθυοκαλλιέργεια στον ελλαδικό χώρο	44
4.3. Ιχθυοκαλλιέργεια στην Ευρώπη	45
4.4. Ιχθυοκαλλιέργεια σε γλυκά νερά	48
4.5. Ιχθυοκαλλιέργεια σε θαλασσινό νερό	48
4.6. Μια τυπική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας.....	49
4.6.1. Επιλογή θέσης εγκατάστασης	49
4.6.2. Παραγωγικά στάδια σε μία τυπική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας	49

4.6.3. Θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια σε κλωβό	50
4.6.4. Εντατική υδατοκαλλιέργεια σε γλυκά ύδατα	51
4.7. Εκτροφή σολομοειδών	52
4.7.1. Υδατοκαλλιέργειες	53
4.7.1.1. Υδατοκαλλιέργεια Ιριδίζουσας Πέστροφας	53
4.7.1.2. Περιγραφή υδατοκαλλιέργειας Ιριδίζουσας Πέστροφας	55
4.7.1.3. Εκτροφή Ιριδίζουσας Πέστροφας	55
4.7.2.1. Υδατοκαλλιέργεια Σολομού Ατλαντικού	57
4.7.2.2. Περιγραφή υδατοκαλλιέργειας Σολομού Ατλαντικού	58
4.7.2.3. Εκτροφή Σολομού Ατλαντικού	58
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	61
Λειτουργικές Ιχθυοτροφές - Ελιά και απόβλητα ελαιοτριβείου	61
5.1. Εισαγωγή.....	61
5.2. Μορφή και σύσταση ιχθυοτροφής.....	61
5.3. Ιχθυέλαια και ιχθυάλευρα	62
5.4. Ανάγκη αντικατάστασης ιχθυελαίων	63
5.5. Φυτικά έλαια και επίδραση στους ιχθύες	64
5.5.1. Έλαιο κράμβης	66
5.5.1.1. Έλαιο κράμβης ως υποκατάστατο των ιχθυελαίων.....	67
5.5.2. Ελαιοπυρήνας ως υποκατάστατο των ιχθυελαίων	67
5.5.2.1. Ελαιοπυρήνας, απόβλητο της βιομηχανίας ελαιολάδου	68
5.5.2.2. Συστήματα παραγωγής ελαιολάδου	70
5.5.2.3. Παραδοσιακά συστήματα πίεσης	70
5.5.2.4. Φυγοκεντρικά συστήματα τριών φάσεων	71
5.5.2.5. Φυγοκεντρικά συστήματα δυο φάσεων	72
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	74
Σκοπός της εργασίας.....	74
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	75
Πειραματικό Μέρος	75
7.1. Εκχύλιση Λιποειδών κατά Bligh-Dyer.....	75
7.2. Κατανομή κατ' αντιρροή.....	76
7.3. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) Λιποειδών	77
7.4. Βιολογική δοκιμασία Πλυμένων Αιμοπεταλίων Κουνελιού in vitro.....	79
7.5. Αέρια Χρωματογραφία (GC)	85

7.5.1 Μέθοδος εστεροποίησης λιπαρών οξέων	85
7.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8.....	89
Αποτελέσματα – Σχολιασμός αποτελεσμάτων	89
8.1. Ιχθύες και ιχθυοτροφές	89
8.1.1. Δειγματοληψία ιχθύων και ιχθυοτροφών.....	89
8.1.1.1. Δειγματοληψία πέστροφας και ιχθυοτροφής.....	89
8.1.1.2. Δειγματοληψία σολομών και ιχθυοτροφής.....	90
8.1.2. Πειραματική πορεία	91
8.1.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL	92
8.1.3.1. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Πέστροφας και Ιχθυοτροφής.....	92
8.1.3.2. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομών και Ιχθυοτροφών Σολομών.....	93
8.1.3.2.1. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1	93
8.1.3.2.2. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2.....	93
8.1.3.2.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3.....	93
8.1.4. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού	94
8.1.4.1. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Πέστροφας και Ιχθυοτροφής.....	95
8.1.4.2. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των τριών δειγμάτων Σολομού και Ιχθυοτροφής Σολομού.....	96
8.1.4.2.1. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής 1	96
8.1.4.2.2. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής 2.....	97
8.1.4.2.3. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής 3	98
8.1.4.2.4. Σύγκριση των αποτελεσμάτων βιολογικής δοκιμασίας για τα δείγματα Σολομού και τις Ιχθυοτροφών	98
8.1.5. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC).....	100
8.1.5.1. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL και TNL της πέστροφας και της ιχθυοτροφής	101

8.1.5.2. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL των σολομών και των ιχθυοτροφών	107
8.1.5.2.1. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Σολομού 1 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 1.....	107
8.1.5.2.2. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Σολομού 2 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 2.....	110
8.1.5.2.3. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Σολομού 3 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 3.....	113
8.1.5.2.4. Σύγκριση των αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL των Σολομών και των Ιχθυοτροφών.....	116
8.2. Ελαιοπυρήνας.....	118
8.2.1. Δειγματοληψία ελαιοπυρήνα.....	118
8.2.2. Πειραματική πορεία	118
8.2.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL	119
8.2.4. Αποτελέσματα της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (TLC)	119
8.2.5. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας του Ελαιοπυρήνα	120
8.2.6. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Ελαιοπυρήνα	122
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9.....	125
Συμπεράσματα – Επίλογος	125
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	130
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	131

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Ποσοστό θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις ανά 100.000 άτομα σύμφωνα με την μελέτη των 7 χωρών.	3
Σχήμα 2.2: Η δομή της αρτηρίας	9
Σχήμα 2.3: Η χημική δομή του PAF	19
Σχήμα 2.4: Βιοσυνθετική πορεία του PAF	20
Σχήμα 2.5: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας με τον PAF ως γενεσιουργό αίτιο	24
Σχήμα 4.6: Τα βασικότερα εκτρεφόμενα είδη της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας (FAO, 2011)	45
Σχήμα 4.7: Απεικόνιση της ευρωπαϊκής παραγωγής ιχθύων ιχθυοκαλλιέργειας (FEAP 2010)	46
Σχήμα 4.8: Σημαντικότερες χώρες για τη Ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια (FAO, 2011)	47
Σχήμα 4.9: Παραγωγή Ιριδίζουσας Πέστροφας (FAO, 2011)	54
Σχήμα 4.10: Παραγωγή Σολομού Ατλαντικού (FAO, 2011)	58
Σχήμα 5.11: Παραδοσιακό σύστημα πίεσης	70
Σχήμα 5.12: Φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων	71
Σχήμα 5.13: Φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων	73
Σχήμα 7.14: Τρανσεστεροποίηση των τριαλογλυκερολών καταλυόμενη από βάση	85
Σχήμα 8.15: Σχηματική απόδοση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε	92
Σχήμα 8.16: Σύγκριση των IC ₅₀ των τριών Ιχθυοτροφών Σολομού	99
Σχήμα 8.17: Σύγκριση των IC ₅₀ και "ανάλογο της EC ₅₀ " των τριών Σολομών	99
Σχήμα 8.18: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Πέστροφας και Πέστροφας, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)	103
Σχήμα 8.19: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TNL Ιχθυοτροφής Πέστροφας και Πέστροφας, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)	106

- Σχήμα 8.20:** Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 1 και Σολομού 1, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm) 109
- Σχήμα 8.21:** Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 2 και Σολομού 2, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm) 112
- Σχήμα 8.22:** Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 3 και Σολομού 3, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm) 115
- Σχήμα 8.23:** Σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL των τριών Ιχθυοτροφών Σολομού, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm) 116
- Σχήμα 8.24:** Σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL των τριών Σολομών, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm) 117
- Σχήμα 8.25:** Σχηματική απόδοση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε 118
- Σχήμα 8.26:** Σχηματική απεικόνιση των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Ελαιοπυρήνα. (L-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφιγγομυελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, LPE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη). Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των πολικών λιποειδών ήταν χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (65:35:6 v/v/v) 120
- Σχήμα 8.27:** Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ελαιοπυρήνα, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm) 124

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Κατηγορίες μορίων προσκόλλησης και αντιπρόσωποι κάθε κατηγορίας	12
Πίνακας 3.2: Χημική σύσταση ιχθύων	27
Πίνακας 3.3: Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια ψαριών και κρεάτων	28
Πίνακας 3.4: Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών)	30
Πίνακας 3.5: Περιεχόμενο σε EPA και DHA σε δείγματα ιχθύων	31
Πίνακας 3.6: Περιεκτικότητα σε ανόργανα στοιχεία ήπατος, μυών και ολόκληρου του σώματος ιριδίζουσας πέστροφας <i>Oncorhynchus mykiss</i>	33
Πίνακας 3.7: Συστηματική κατάταξη του είδους Ιριδίζουσα Πέστροφα	35
Πίνακας 3.8: Παράμετροι ποιότητας νερού για την ανάπτυξη Ιριδίζουσας Πέστροφας	38
Πίνακας 3.9: Συστηματική κατάταξη του είδους Σολομού Ατλαντικού	40
Πίνακας 5.10: Τυπική χημική σύσταση ανά 100g και θρεπτική αξία των σημαντικότερων ζωοτροφών που χρησιμοποιούνται κατά την κατάρτιση σιτηρεσίων (κυρίως σαρκοφάγων εκτρεφόμενων ιχθύων)	62
Πίνακας 5.11: Παγκόσμια παραγωγή σε εκατομμύρια τόνους από επιλεγμένα φυτικά έλαια από 2000-2006. (Malaysian Palm Oil Board, 2008)	65
Πίνακας 7.12: Συγκέντρωση των λιπαρών οξέων 17:0 και 21:0 στα πρότυπα διαλύματα	88
Πίνακας 8.13: Χημική σύσταση Ιχθυοτροφής Πέστροφας	89
Πίνακας 8.14: Σύσταση των πρώτων υλών Ιχθυοτροφής Πέστροφας	90
Πίνακας 8.15: Χημική σύσταση των τριών Ιχθυοτροφών των Σολομών	90
Πίνακας 8.16: Σύσταση των πρώτων υλών των τριών Ιχθυοτροφών των Σολομών	91
Πίνακας 8.17: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Πέστροφας και Ιχθυοτροφής, (g/100g δείγματος)	92
Πίνακας 8.18: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1, (g/100g δείγματος)	93

Πίνακας 8.19: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2, (g/100g δείγματος)	93
Πίνακας 8.20: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3, (g/100g δείγματος)	93
Πίνακας 8.21: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC ₅₀ και "ανάλογο της EC ₅₀ ") των TL, TPL Πέστροφας και Ιχθυοτροφής	95
Πίνακας 8.22: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC ₅₀ και "ανάλογο της EC ₅₀ ") των TL, TPL, TNL Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1	96
Πίνακας 8.23: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC ₅₀ και "ανάλογο της EC ₅₀ ") των TL, TPL, TNL Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2	97
Πίνακας 8.24: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC ₅₀ και "ανάλογο της EC ₅₀ ") των TL, TPL, TNL Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3	98
Πίνακας 8.25: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL της Πέστροφας και της ιχθυοτροφής σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης	101
Πίνακας 8.26: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Πέστροφα και Ιχθυοτροφή	102
Πίνακας 8.27: Ταυτοποίηση των κορυφών των TNL της Πέστροφας και της Ιχθυοτροφής σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης	104
Πίνακας 8.28: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TNL των δειγμάτων Πέστροφα και Ιχθυοτροφή	105
Πίνακας 8.29: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Σολομού 1 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 1 σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης	107
Πίνακας 8.30: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Σολομού 1 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 1	108
Πίνακας 8.31: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Σολομού 2 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 2 σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης	110
Πίνακας 8.32: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Σολομού 2 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 2	111
Πίνακας 8.33: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Σολομού 3 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 3 σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης	113
Πίνακας 8.34: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Σολομού 3 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 3	114

Πίνακας 8.35: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Ελαιοπυρήνα, (g/100g δείγματος)	119
Πίνακας 8.36: Βιολογική δραστικότητα (τιμές IC ₅₀) των TL, TPL Ελαιοπυρήνα	121
Πίνακας 8.37: Βιολογική δραστικότητα (τιμές IC ₅₀) των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Ελαιοπυρήνα	121
Πίνακας 8.38: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Ελαιοπυρήνα σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης	122
Πίνακας 8.39: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL του Ελαιοπυρήνα	123

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Πυραμίδα Μεσογειακής Δίαιτας	1
Εικόνα 2.2: Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση (α) και αιμοπετάλια συσσωρευμένα (β)	15
Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση του είδους <i>Oncorhynchus mykiss</i>	36
Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση του είδους <i>Salmo salar</i>	40
Εικόνα 4.5: Θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια σε κλωβό	51
Εικόνα 4.6: Ενταπική υδατοκαλλιέργεια σε γλυκά ύδατα	52
Εικόνα 4.7: Παραγωγές χώρες Ιριδίζουσας Πέστροφας (FAO Fishery Statistics, 2006)	54
Εικόνα 4.8: Αναπαραγωγικός κύκλος της Ιριδίζουσας Πέστροφας, <i>Oncorhynchus mykiss</i> (FAO, 2007)	56
Εικόνα 4.9: Παραγωγές χώρες Σολομού Ατλαντικού (FAO Fishery Statistics, 2006)	57
Εικόνα 4.10: Αναπαραγωγικός κύκλος του Σολομού Ατλαντικού, <i>Salmo Salar</i> (FAO, 2007)	59
Εικόνα 5.11: Στερεά απόβλητα ελαιοτριβείου	69
Εικόνα 5.12: Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου	69

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η Μεσογειακή Διατροφή και η Σχέση της με τα Καρδιαγγειακά Νοσήματα

1.1. Εισαγωγή

Η Μεσογειακή Διατροφή αντιπροσωπεύει τις καθημερινές διατροφικές συνήθειες του πληθυσμού της Μεσογείου. Περιλαμβάνει σημαντική κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, μονοακόρεστου λίπους, ψαριών, δημητριακών και ξηρών καρπών, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, και τέλος χαμηλή κατανάλωση κόκκινου κρέατος και κορεσμένου λίπους.¹ Η Μεσόγειος θάλασσα περιβάλλεται από πολλές χώρες συνεπώς, η διατροφή ποικίλλει από χώρα σε χώρα. Αυτό που αντιπροσωπεύει ο όρος Μεσογειακή Δίαιτα διαφέρει από χώρα σε χώρα αλλά πάντα σχετίζεται με την καλή υγεία και τη μακροζωία.²



Εικόνα 1.1: Πυραμίδα Μεσογειακής Δίαιτας

1.2. Χαρακτηριστικά της Μεσογειακής Διατροφής

Όπως έχει ήδη αναφερθεί η Μεσογειακή Διατροφή εμφανίζεται σε διαφορετικές εκδοχές ανάλογα με την χώρα και την κουλτούρα. Η παραπάνω εικόνα παρουσιάζει την βασική εκδοχή.

Η βασική εκδοχή της Μεσογειακής Διατροφής περιλαμβάνει χαμηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ ταυτόχρονα είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία προέρχονται κυρίως από το ελαιόλαδο. Αυτό σημαίνει ότι ενώ το συνολικό ποσοστό του λίπους είναι υψηλό (~40% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης), η αναλογία μονοακόρεστων προς κορεσμένα λίπη είναι περίπου 2:1. Το τυρί, το γιαούρτι και γενικότερα τα γαλακτοκομικά προϊόντα συνιστάται να καταναλώνονται καθημερινά αλλά σε μικρές ποσότητες.³

Η κατανάλωση ψαριών είναι πολύ σημαντική και για το λόγο αυτό συστήνεται η κατανάλωση 5-6 μερίδων ψαριού την εβδομάδα. Το κόκκινο κρασί συστήνεται σε μικρές ποσότητες (30g για τους άνδρες και 15g για τις γυναίκες) καθημερινά μαζί με τα γεύματα.³

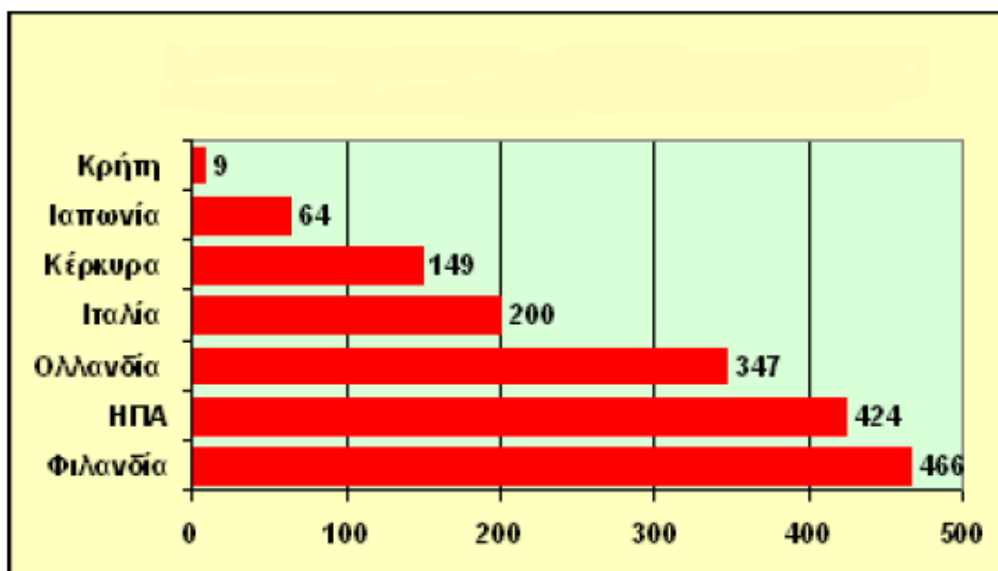
Επίσης η Μεσογειακή Διατροφή είναι πλούσια σε σύνθετους υδατάνθρακες, κυρίως από τα όσπρια, ενώ ταυτόχρονα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, οι οποίες προέρχονται κυρίως από τα λαχανικά και τα φρούτα.⁴

Οι βασικές αρχές της Μεσογειακής Δίαιτας προτείνουν καθημερινή φυσική δραστηριότητα ώστε τα άτομα να είναι υγιείς. Σύμφωνα με τις συστάσεις αυτές, είναι απαραίτητα τουλάχιστον 30 λεπτά οποιασδήποτε μορφής φυσικής άσκησης, για τουλάχιστον πέντε φορές την εβδομάδα. Με τον τρόπο αυτό, μειώνονται σε μεγάλο βαθμό οι πιθανότητες εμφάνισης διαφόρων νοσημάτων και παχυσαρκίας.

1.3. Ιστορικά δεδομένα

Η μελέτη των '7 χωρών' αποτελεί μια από τις πρώτες και σημαντικότερες έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί για την κατανόηση της επίδρασης της Μεσογειακής διατροφής στην υγεία του ανθρώπου. Η έρευνα των '7 χωρών' ξεκίνησε στα τέλη της δεκαετίας του '40 στις ΗΠΑ από τον καθηγητή του

Πανεπιστημίου της Μινεσότα Ancel Keys. Ο Keys ήταν ο πρώτος επιστήμονας που θεωρούσε ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της διατροφής και της κατάστασης της καρδιάς. Η μελέτη αυτή έδωσε τις βάσεις ώστε να δημιουργηθεί το μοντέλο της Μεσογειακής Διατροφής, όπως το ξέρουμε σήμερα.⁵ Έπειτα από παρακολούθηση 15 ετών, κατέληξαν ότι οι κάτοικοι της Κρήτης, Ιαπωνίας και Κέρκυρας εμφάνισαν πολύ μικρότερη συχνότητα θνησιμότητας από καρδιαγγειακές παθήσεις, συγκριτικά με τους πληθυσμούς των ΗΠΑ και των βόρειων Ευρωπαϊκών χωρών, που έχουν υψηλή κατανάλωση ζωικών λιπών.^{6,7}



Σχήμα 1.1: Ποσοστό θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις ανά 100.000 άτομα σύμφωνα με την μελέτη των 7 χωρών.

Τα αποτελέσματα αυτά ερμηνεύτηκαν σύμφωνα με το γεγονός ότι η διατροφή των κατοίκων της Κρήτης χαρακτηρίζεται από μεγάλη κατανάλωση ελαιολάδου σε συνδυασμό με σκληρή αγροτική εργασία - σωματική άσκηση σε καθημερινή βάση. Επίσης κατανάλωναν σε μεγάλο βαθμό ψάρια, φρέσκα φρούτα, λαχανικά, χόρτα και κόκκινο κρασί καθώς και πολύ μικρή ποσότητα ζωικών λιπών.⁵ Αντίστοιχα για τους Ιάπωνες, η διατροφή των οποίων ήταν διαφορετική μεν από αυτή των κατοίκων της Κρήτης, αλλά ήταν πλούσια σε ψάρια. Έτσι, για πρώτη φορά οι επιστήμονες συσχέτισαν τη διατροφή με την

θνησιμότητα των ανθρώπων και συγχρόνως είχαν τις πρώτες ενδείξεις ότι το ελαιόλαδο, τα ψάρια και το κρασί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σ' αυτό.

Ακολούθησαν πολλές μελέτες για την επιβεβαίωση της Μεσογειακής Διατροφής, με πιο σημαντικές τη μελέτη του Φράμιγχαμ των ΗΠΑ⁸ και τη μελέτη Lyon Heart.⁹ Η μελέτη του Φράμιγχαμ κατέδειξε την ισχυρή σχέση μεταξύ αυξημένης χοληστερόλης και στεφανιαίας νόσου - όσο υψηλότερη ήταν η χοληστερόλη τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος εμφράγματος. Αρκετά χρόνια αργότερα, από τη μελέτη Lyon Heart κατέληξαν ότι η ομάδα των ατόμων που ακολουθούσε διατροφή μεσογειακού τύπου παρουσίασε μια μείωση κατά 70% στους θανάτους από καρδιά και στα μη θανατηφόρα εμφράγματα του μυοκαρδίου. Όλες οι παραπάνω έρευνες δείχνουν ότι μια αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση των θανάτων από καρδιαγγειακά θα πρέπει πρωτίστως να περιλαμβάνει ένα καρδιοπροστατευτικό διαιτολόγιο, να δημιουργηθεί το μοντέλο της μεσογειακής διατροφής και να γίνει γνωστό διεθνώς.

1.4. Ο ρόλος της Μεσογειακής Διατροφής στην πρόληψη των καρδιαγγειακών νοσημάτων

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) 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 κλίμακα. Εκτιμάται ότι 17,3 εκατομμύρια ανθρώπων πέθαναν από καρδιαγγειακές ασθένειες το 2008 (WHO). Μέχρι το 2030, εκτιμάται ότι ο αριθμός των θανάτων που οφείλονται σε καρδιοπάθειες και εγκεφαλικά επεισόδια θα ανέλθει περίπου στα 23,3 εκατομμύρια. Η Μεσογειακή Διατροφή βάσει πολλών ερευνών μπορεί να βελτιώσει την υγεία του ανθρώπου, καθώς μπορεί να μειώσει την εμφάνιση πολλών σοβαρών ασθενειών, όπως του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και της στεφανιαίας νόσου.^{10, 11}

Έτσι, καθώς τα τελευταία χρόνια τα ποσοστά της καρδιοπάθειας σε όλο τον κόσμο έχουν πολλαπλασιαστεί, εμφανίζεται μια αυξανόμενη τάση για την εύρεση ενός φαρμάκου, τροφίμου ή διατροφής που να μειώνει τον κίνδυνο

εμφάνισης των καρδιαγγειακών ασθενειών. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην εύρεση των τροφίμων αυτών που έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τη δημιουργία ή ακόμα και να μειώσουν το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας. Το επιστημονικό ενδιαφέρον, την τελευταία δεκαετία έχει μετατοπιστεί, προς το σύνολο των διατροφικών συνηθειών των ατόμων και όχι σε μεμονωμένα τρόφιμα. Συγκεκριμένα η Μεσογειακή Διατροφή έχει συνδεθεί με μειωμένο κίνδυνο αγγειακών επεισοδίων.^{12, 13}

Το παγκόσμιο ενδιαφέρον στράφηκε συγκεκριμένα στα επίπεδα της χοληστερόλης που μεταβάλλονται από τη δίαιτα και από άλλες συμπεριφορές στον τρόπο ζωής. Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια να εξηγηθεί πώς αυτό επιδρά στην εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων.¹⁴

Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, προτείνεται ότι η αυξημένη πρόσληψη πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μπορεί να δράσει προληπτικά στην αθηροσκλήρωση. Το γεγονός αυτό οφείλεται στη μείωση των επιπέδων της τριακυλογλυκερόλης, μειώνοντας τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων ή μειώνοντας την αρτηριακή πίεση.¹⁵

Η Αμερικάνικη Καρδιολογική Ένωση (AHA-American Heart Association) έχει δώσει ιδιαίτερη έμφαση στη Μεσογειακή Διατροφή, ως συστατικό της θεραπείας για ασθενείς που διατρέχουν κίνδυνο στεφανιαίων καρδιαγγειακών παθήσεων.¹⁶

Σήμερα, λόγω του γεγονότος ότι 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.¹⁷

1.5. Ο ρόλος των ιχθύων και των ιχθυελαίων σε σχέση με την Αθηρογένεση

Τα ψάρια αποτελούν βασικό συστατικό της Μεσογειακής Διατροφής και είναι πλούσια πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και κυρίως του εικοσιδυεξαενοϊκού (DHA, 22:6) και εικοσιπενταενοϊκού οξέος (EPA, 20:5), τα

οποία περιέχονται στα λιποειδή των θαλασσινών και μάλιστα σε συγκεντρώσεις 10-100 φορές μεγαλύτερες από ότι σε άλλα τρόφιμα, όπως φρούτα, λαχανικά, καρύδια, λιναρόσπορο κ.α. Σύμφωνα με μελέτες, τα λιποειδή των ψαριών έχουν προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, της ρευματοειδούς αρθρίτιδας, του καρκίνου, του διαβήτη τύπου II, της κατάθλιψης και της σχιζοφρένειας. Όσον αφορά την καρδιοπροστατευτική τους δράση, μειώνουν σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στο αίμα, αυξάνουν τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης και ελαττώνουν τα επίπεδα της LDL χοληστερόλης στο αίμα. Επίσης προϊόντα του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων έχουν ισχυρή δράση έναντι της αρτηριοσκλήρυνσης και των θρομβώσεων.¹⁸

Μικροσυστατικά των λιπιδίων συγκεκριμένων τροφίμων της Μεσογειακής Διατροφής έχει βρεθεί ότι έχουν *in vitro* καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες (προκαλούν αναστολή της δράσης του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων, PAF). Ο PAF, όπως θα αναφερθεί σε επόμενο κεφάλαιο, είναι ο πιο ισχυρός φλεγμονώδους μεσολαβητή των λιπιδίων, αγωνιστής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που παίζει ουσιαστικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, δηλαδή την εμφάνιση των καρδιαγγειακών παθήσεων. Αυτά τα συστατικά, βρίσκονται κυρίως στα λιποειδή των ψαριών, του ελαιολάδου, του ελαιοπυρήνα και του γιαουρτιού και μπορούν να αναστείλουν ουσιαστικά την εμφάνιση της αθηροσκλήρωσης και της ανάπτυξη των καρδιαγγειακών παθήσεων.¹⁹ Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, έχει επιβεβαιωθεί ότι τα πολικά λιποειδή των ψαριών, του ελαιολάδου και του ελαιοπυρήνα μπορούν να μειώσουν το πάχος των αρτηριοσκληρωτικών αλλοιώσεων. Σε *in vivo* πείραμα με κουνέλια που τρέφονταν με αθηρογόνο δίαιτα, δοκιμάστηκαν τα πολικά λιποειδή από τσιπούρες, τα οποία περιείχαν βιολογικώς δραστικά μόρια. Βρέθηκε ότι τα κουνέλια που τράφηκαν με πολικά λιποειδή τσιπούρας εμφάνισαν στατιστικώς σημαντική μείωση τόσο του πάχους, όσο και της επιφάνειας των αθηρωματικών πλακών.²⁰ Σε περαιτέρω μελέτη αποδείχθηκε ότι τα πολικά λιπίδια των ψαριών μπορούν να αναστείλουν την αθηροσκλήρωση μέσω ενζυμικών δραστηριοτήτων.²¹

Έχει αποδειχθεί σύμφωνα με μελέτες, ότι τα άτομα που έχουν ενσωματώσει στις διατροφικές συνήθειες χαρακτηριστικά της Μεσογειακής διαίτας

εμφανίζουν μικρότερο κίνδυνο παρουσίασης καρωτιδικής αθηρωματικής πλάκας. Περιορίζοντας έτσι τον κίνδυνο εμφάνισης αγγειακών νοσημάτων.¹⁶

1.6. Ο ρόλος του ελαιολάδου σε σχέση με την Αθηρογένεση

Τα προϊόντα της ελιάς, το λάδι και οι ελιές διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη Μεσογειακή διατροφή.²² Το ελαιόλαδο αποτελεί ένα από τα κύρια στοιχεία της διατροφής του πληθυσμού της μεσογειακής λεκάνης και βασική πηγή λίπους της διατροφής αυτής. Επίσης είναι ένα από τα τρόφιμα στα οποία έχουν αποδοθεί, σημαντικές ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία των ανθρώπων. Η πλούσια σύστασή του σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα και το πλήθος μικροθρεπτικών συστατικών, καθιστούν το ελαιόλαδο ένα πολύτιμο διατροφικό στοιχείο μιας ισορροπημένης διατροφής.^{23, 24} Η κατανάλωσή του ως κύρια πηγή λιπαρής ύλης στις μεσογειακές χώρες έχει συσχετιστεί με χαμηλά επίπεδα καρδιαγγειακών παθήσεων.

Σύμφωνα με συγκεκριμένες μελέτες, ο ελαιοπυρήνας, το ακατέργαστο πυρηνέλαιο και τα υποπροϊόντα του πυρηνελαιίου περιέχουν πολικά λιπίδια τα οποία αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις που αναστέλλουν (ανταγωνίζονται) την δράση του PAF.²⁵ Στο ελαιόλαδο, έχουν βρεθεί λιποειδικής φύσης ενώσεις που εμφανίζουν *in vitro* (σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού) σημαντική ανασταλτική δράση έναντι του PAF (σαν αναστολείς ή αγωνιστές). Ίδιες ενώσεις έχουν πιστοποιηθεί και στον ελαιοπυρήνα. Όμοια βιολογική δραστηριότητα με αυτή του ελαιολάδου ανιχνεύτηκε στα ολικά πολικά λιποειδή του, όπου ανιχνεύτηκε βιολογική δραστηριότητα μέσω αναστολής του PAF, στο μοντέλο των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.²¹ Έχουν διεξαχθεί, επίσης, *in vivo* έρευνες σε κουνέλια τα οποία έχουν τραφεί με αθηρογόνο δίαιτα. Σκοπός ήταν να διαπιστωθούν οι αντιαθηρογενετικές ιδιότητες των πολικών λιποειδών του ελαιολάδου και του ελαιοπυρήνα. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα πολικά λιποειδή του ελαιολάδου και του ελαιοπυρήνα αναστέλλουν σημαντικά την ανάπτυξη αθηροσκληρωτικών βλαβών, όπως επίσης προκαλούν υποχώρηση των υφιστάμενων πλακών, υποδηλώνοντας έτσι ότι τα πολικά λιποειδή του ελαιολάδου και του ελαιοπυρήνα μπορούν να θεραπεύσουν την υπάρχουσα αθηρωμάτωση.²⁶

Η ευεργετική επίδραση του ελαιολάδου στην υγεία οφείλεται και στην περιεκτικότητά του σε βιοδραστικά μικροσυστατικά, τα οποία επιδεικνύουν σημαντική βιολογική δράση, παρά το γεγονός ότι απαντώνται σε πολύ μικρές ποσότητες.²⁷ Στα μικροσυστατικά αυτά συμπεριλαμβάνονται τα ακόρεστα λιπαρά οξέα, οι βιταμίνες, τα φαινολικά συστατικά, και άλλα λιποειδικά μικροσυστατικά. Ο ρόλος που διαδραματίζουν 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.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

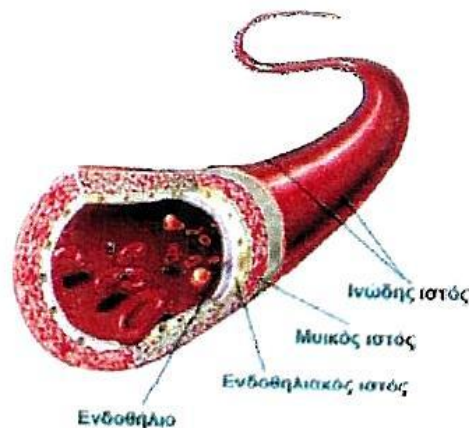
Αθηρογένεση και PAF

2.1. Αθηρογένεση

2.1.1. Εισαγωγή

Ο όρος αρτηριοσκλήρωση ή αρτηριοσκήρυνση αναφέρεται σε ομάδα παθήσεων που χαρακτηρίζεται από πάχυνση και απώλεια ελαστικότητας των αρτηριακών τοιχωμάτων και εμφανίζεται με τρεις μορφές: την αθηροσκλήρωση κατά την οποία σχηματίζονται αθηρώματα μεταξύ του έσω και του μέσου χιτώνα των μεγάλων και μέσου μεγέθους αρτηριών, την αρτηριοσκλήρωση Møckenberg που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση ασβεστίου στον μέσο χιτώνα των μικρών και μέσων αρτηριών και την αρτηριδιοσκλήρωση που αναφέρεται στη βλάβη μικρών αρτηριδίων.

Η αθηρογένεση αναφέρεται στη διαδικασία έναρξης του σχηματισμού αθηρωματοδών βλαβών στα αρτηριακά τοιχώματα. Οι βλάβες αυτές χαρακτηρίζονται από συσσώρευση λιπιδίων, κυττάρων και συστατικών της εξωκυττάριας ύλης.^{28, 29}



Σχήμα 2.2: Η δομή της αρτηρίας²⁸

Στις δυτικές χώρες, τα καρδιαγγειακά νοσήματα είναι η σημαντικότερη αιτία νοσηρότητας και θνησιμότητας. Η αθηροσκλήρωση αποτελεί το γενεσιουργό

αίτιο για διαταραχές όπως είναι το έμφραγμα του μυοκαρδίου, τα εγκεφαλικά επεισόδια και οι περιφερειακές αγγειακές παθήσεις. Καθώς η αθηροσκλήρωση είναι μία ασθένεια που αναπτύσσεται αργά, ξεκινώντας από την παιδική ηλικία χωρίς να γίνεται αντιληπτή έως και τη μέση ηλικία του ανθρώπου ή και αργότερα, η παθογένεση είναι δύσκολο να αποσαφηνιστεί. Σήμερα πιστεύεται ότι η ασθένεια αυτή εμφανίζεται μετά από φλεγμονώδη αντίδραση στο αγγειακό τοίχωμα και επομένως είναι αποτέλεσμα της απόκρισης του αγγειακού τοιχώματος στον τραυματισμό.^{28, 30, 31}

Έχουν διατυπωθεί διάφορες θεωρίες για την αθηροσκλήρωση, αυτή, όμως, που έχει επικρατήσει είναι η θεωρία της φλεγμονής. Η αθηροσκλήρωση στους ανθρώπους εντοπίζεται σε αρτηρίες μετρίου μεγέθους όπως η στεφανιαία, καθώς και αρτηρίες των κάτω άκρων. Οι πιο μελετημένοι σχηματισμοί της αρτηριοσκληρωτικής βλάβης είναι οι λιπαρές λωρίδες (fatty streak) και η ινώδης λιπαρή πλάκα ή αθηρωματική πλάκα.²⁸

2.1.2. Η παθογένεια της αρτηριοσκλήρωσης^{28,30,31}

Η αθηρογένεση είναι μία νόσος εξαιρετικά πολύπλοκη, γεγονός που καθιστά δύσκολο τον προσδιορισμό του μηχανισμού της. Η θεωρία απόκρισης του αγγειακού τοιχώματος στον τραυματισμό είναι επικρατέστερη. Παλαιότερα πίστευαν ότι το ενδοθήλιο των αρτηριών απογυμνώνεται μετά από τραυματισμό που μπορεί να γίνει με μηχανικό, χημικό, τοξικό, ανοσολογικό παράγοντα ή από ιούς. Ακολουθεί προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων καθώς και η ελευθέρωση του αιμοπεταλιακού παράγοντα ανάπτυξης (PDGF) ο οποίος μεταναστεύει στα λεία μυϊκά κύτταρα, όπου συνδεδεμένος στον υποδοχέα του, προκαλεί αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών, τα οποία εκκρίνουν συστατικά του συνδετικού ιστού. Η επανάληψη αυτού του φαινόμενου οδηγεί στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Σήμερα γνωρίζουμε ότι πέρα από την απογύμνωση ή τη νέκρωση, τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται σε πλήθος από διεγέρτες, οι οποίοι οδηγούν σε δυσλειτουργία αυτών των κυττάρων, ικανοί για την έναρξη δημιουργίας της αθηροσκλήρωσης. Επίσης, εκτός του PDGF υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που προέρχονται και από άλλα κύτταρα, όπως τα

μακροφάγα, τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων. Σύμφωνα με τη νέα εκδοχή της θεωρίας των Ross και Glomset τα κύτταρα που εμπλέκονται στον τραυματισμό είναι τα ενδοθηλιακά, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα κύτταρα αυτά επικοινωνούν και κατά συνέπεια αλληλεπιδρούν μεταξύ τους, έχοντας ως μεσολαβητές μόρια "προσκόλλησης", πρωτεϊνικής φύσεως.

2.1.3. Κυτταρική επικοινωνία στην αθηροσκλήρωση^{28,32}

Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων των αρτηριών και του αίματος παίζουν κεντρικό ρόλο στην ανάπτυξη της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης. Σε φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα του αίματος δεν αλληλεπιδρούν με τα αρτηριακά τοιχώματα. Μετά όμως από κάποια αθηρογόνο διέγερση τα αιμοπετάλια, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα λευκοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα τοιχώματα των αρτηριών και προκαλούν αλλαγές που ευνοούν το σχηματισμό αθηρώματος. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου καθώς και τη μετατροπή του από αντιθρομβωτικό σε προθρομβωτικό, την επαγωγή μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων και την παραγωγή εξωκυττάριας ύλης από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Υπεύθυνα για τις παραπάνω διαδικασίες είναι τα ενδοκυτταρικά - μηνυματοφόρα μόρια γνωστά ως κυτοκίνες (ή κυτταροκίνες).

2.1.3.1. Κυτταροκίνες^{28,33}

Οι κυτταροκίνες ορίζονται ως οι διαλύτες (γλυκο)πρωτεΐνες που ελευθερώνονται από τα κύτταρα για να ρυθμίσουν κυτταρικές λειτουργίες και δρουν σε συγκεντρώσεις της τάξεως των nM ή pM. Τα μόρια αυτά διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: τις ιντερλευκίνες (IL), τις ιντερφερόνες (INF), τους παράγοντες διέγερσης των αποικιών (colony stimulating factor, CFS) και τους πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες (GF).

Οι κυτταροκίνες παράγονται από τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν

στην μετανάστευση των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων. Όταν τα κύτταρα αυτά προσκολληθούν σε μόρια της εξωκυττάριας ύλης, σε άλλα κύτταρα ή εκθέσουν κυτταροκίνες στην επιφάνειά τους, τότε τα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηρογένεση παράγουν κυτταροκίνες. Οι κυτταροκίνες στη συνέχεια επιδρούν στα κύτταρα που τροποποιούν την εξωκυττάρια ύλη, εκφράζουν στην επιφάνεια τους μόρια προσκόλλησης και παράγουν άλλες κυτταροκίνες. Οι παραπάνω διαδικασίες έχουν σαν συνέπεια την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων.

2.1.3.2. Μόρια προσκόλλησης^{28, 33}

Τα μόρια προσκόλλησης των κυττάρων του αίματος και των αρτηριών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τις σελεκτίνες (Selectins), τις ιντεγκρίνες (Integrins) και την υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin superfamily). Τα μόρια που πιστεύεται ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αθηρογένεση παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1: Κατηγορίες μορίων προσκόλλησης και αντιπρόσωποι κάθε κατηγορίας²⁸

ΣΕΛΕΚΤΙΝΕΣ	ΙΝΤΕΓΚΡΙΝΕΣ	ΑΝΟΣΟΣΦΑΙΡΙΝΕΣ
E-σελεκτίνη	LFA-1 (CD11a/CD18)	PECAM
P-σελεκτίνη	Mac-1 (CD11b/CD18)	ICAM-1
L-σελεκτίνη	P150,95 (CD11c/CD18)	ICAM-2
	VLA-4 (CD49d/CD29)	VCAM-1

2.1.4. Κυτταρικό και μοριακό επίπεδο της αθηρογένεσης

Πέρα από τις μικροσκοπικές παρατηρήσεις που είχαν γίνει αρχικά, σήμερα είναι γνωστά σε μοριακό επίπεδο πολλά στοιχεία που αφορούν το μεταβολισμό των κυττάρων που εμπλέκονται στην παθογένεια της αθηροσκλήρωσης. Τα κύτταρα αυτά είναι τα ενδοθηλιακά και τα αιμοπετάλια που θεωρείται ότι οι δύο αυτές ομάδες κυττάρων παίζουν τον καθοριστικότερο ρόλο στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης, όπως επίσης και τα μονοκύτταρα, τα λεμφοκύτταρα τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Επιπλέον, η ox-LDL φαίνεται να έχει σχέση με το γενεσιουργό αίτιο της αθηρογένεσης.

2.1.4.1. Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας^{28, 34}

Η έρευνα που αφορά στη στεφανιαία νόσο υποδεικνύει ότι η ox-LDL παίζει εξαιρετικά σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης. Η πρώτη παρατήρηση που οδήγησε σε αυτό το συμπέρασμα, ήταν η δημιουργία των αφρωδών κυττάρων μετά από πρόσληψη ox-LDL μέσω ειδικών εκκαθαριστικών υποδοχέων, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων/μακροφάγων. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτών των υποδοχέων είναι ότι δεν βρίσκονται κάτω από έλεγχο με αντίστροφη τροφοδότηση όπως οι λιγότερου αριθμού υποδοχείς της LDL.

Παρόλα αυτά, η ox-LDL είναι σε θέση να προκαλέσει την προσκόλληση και την ενεργοποίηση αιμοπεταλίων, τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και καταστροφή των αντισυσσωρευτικών και θρομβωλυτικών ιδιοτήτων του ενδοθηλίου.

Στην κατανόηση της δράσης της ox-LDL βοήθησε η προστατευτική δράση της HDL. Η HDL έχει ενζυμική δράση PAF ακετυλοϋδρολάσης η οποία υδρολύει τον PAF προς lyso-φωσφολιποειδή. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η δράση της ox-LDL οφείλεται στη δημιουργία PAF ή αναλόγων του κατά την οξείδωση της LDL.⁶⁵

2.1.4.2. Ενδοθηλιακά κύτταρα ^{28,35,36,37}

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα έχουν πρωτεύοντα ρόλο στην αρτηριοσκλήρωση, αφού ο τραυματισμός του ενδοθηλίου είναι το αρχικό γεγονός της διαδικασίας. Υπό φυσιολογικές συνθήκες έχουν μη θρομβωγενή επιφάνεια που δεν είναι προσιτή στα κύτταρα του αίματος.

Κατά τον τραυματισμό τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν 'μόρια προσκόλλησης', τα οποία παρακινούν την προσκόλληση των κυττάρων του αίματος στο ενδοθήλιο.

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγουν ένα φάσμα από βιολογικά ενεργά συστατικά, τα οποία ελέγχουν τη διαπερατότητα του αγγειακού τοιχώματος, τον αγγειακό τόνο, τη θρόμβωση, τη θρομβώλυση καθώς και τις φλεγμονώδεις αντιδράσεις. Έτσι σε φυσιολογικές συνθήκες το ενδοθήλιο συμβάλλει στην αγγειοδιαστολή και αναστέλλει την προσκόλληση και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, καταστέλλει τον καταρράκτη πήξεως του αίματος, συμβάλλει στη διάλυση των θρόμβων και αναστέλλει τις φλεγμονώδεις διαδικασίες, που προέρχονται από ενεργοποίηση και προσκόλληση των λευκοκυττάρων. Κατά συνέπεια ένα φυσιολογικό ενδοθήλιο τείνει να έχει αντιθρομβωτικό και αντιφλεγμονώδη χαρακτήρα.

Αντίθετα από το φυσιολογικό ενδοθήλιο, το ενδοθήλιο που έχει υποστεί διατάραξη φυσική ή λειτουργική αποκτά προθρομβωτικό, προσυσσωρευτικό και προφλεγμονώδη χαρακτήρα λόγω των μηχανισμών αγγειοσυστολής που κυριαρχούν. Ο χαρακτήρας αυτός του ενδοθηλίου μπορεί να διεγείρει την προσκόλληση αιμοπεταλίων, λευκοκυττάρων και άλλων κυττάρων του αίματος καθώς και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων. Υπό φυσιολογικές συνθήκες οι αλλαγές αυτές λαμβάνουν χώρα σαν ανοσοαπόκριση για την επούλωση και την αποκατάσταση της βλάβης του ιστού, οπότε και βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο. Όταν αυτός ο έλεγχος δεν είναι εφικτός τότε ενδέχεται να έχουμε την έναρξη της αθηροσκλήρωσης.

Απουσία ή διατάραξη του ενδοθηλίου αλλάζει δραματικά την αλληλεπίδραση του αρτηριακού τοιχώματος με τα αιμοπετάλια. Τίποτα πλέον δεν αντιτίθεται στη πληθώρα των παραγόντων που ενεργοποιούν τα αιμοπετάλια και επιπλέον το γυμνό πλέον υποενδοθήλιο εκθέτει σημεία προσκόλλησης των

αιμοπεταλίων.

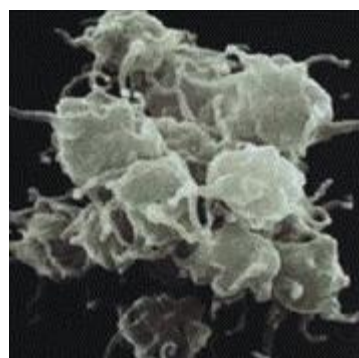
Ακόμη, η διατάραξη του ενδοθηλίου από οξειδωτικό παράγοντα παράγει PAF και ισοπροστάνια και προωθεί το σχηματισμό θρομβίνης απευθείας στην κυτταρική επιφάνεια, γεγονός που οδηγεί στην προσκόλληση ενεργοποιημένων αιμοπεταλίων στα ενεργοποιημένα ενδοθηλιακά κύτταρα.

2.1.4.3. Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας. Αρχικά αλληλεπιδρούν με το τραυματισμένο ενδοθήλιο και προσκολλώνται στα αφρώδη κύτταρα και στην εξωκυττάρια ουσία. Η προσκόλληση συνεχίζεται έως ότου όλη η τραυματισμένη επιφάνεια καλυφθεί με ένα μονό ή ένα διπλό στρώμα αιμοπεταλίων.³⁸



(α)



(β)

Εικόνα 2.2: Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση (α) και αιμοπετάλια συσσωρευμένα (β)³⁹

Η φλεγμονή είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο που περιλαμβάνει ένα δίκτυο επικοινωνίας και ελέγχου κυττάρων. Τα αιμοπετάλια συνεισφέρουν στην κυτταρική επικοινωνία, που είναι υπεύθυνη για τα κύρια χαρακτηριστικά της φλεγμονής, μέσω της ελευθέρωσης κυρίως αυξητικών παραγόντων, που θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την αλληλεπίδραση των αιμοπεταλίων με τα άλλα φλεγμονώδη κύτταρα.

Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου χαρακτηρίζεται από επακόλουθη μετανάστευση φλεγμονωδών κυττάρων, όπως είναι και τα αιμοπετάλια, στην

περιοχή της βλάβης του αρτηριακού τοιχώματος. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια δρουν ως πηγή αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι συνεργάζονται και διεγείρουν τα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγείου και προωθούν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό τους.⁴⁰ Επίσης ο έλεγχος που ασκούν τα αιμοπετάλια στο να προσελκύουν τα φλεγμονώδη κύτταρα γίνεται μέσω μιτογόνων και χημειοτακτικών ουσιών, όπως ο PDGF και ο PAF.

Ο PDGF βρίσκεται αποθηκευμένος στα α-κοκκία των αιμοπεταλίων. Ελευθερώνεται όμως μόνο μετά από ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων από παράγοντες όπως ο PAF, το ADP, η θρομβίνη και το κολλαγόνο. Ο PDGF είναι σε θέση να προκαλέσει μετανάστευση και πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων και μονοκυττάρων, χημειοτακτισμό μονοκυττάρων, παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίων καθώς και αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, που προκαλείται από θρομβίνη.

Οι σελεκτίνες εκφράζονται μόνο σε ενεργοποιημένα κύτταρα γεγονός που φανερώνει πάλι την ύπαρξη ενός παράγοντα που θα προκαλούσε τη διέγερση αυτή. Η P-σελεκτίνη δεν ελευθερώνεται από τα αιμοπετάλια, αλλά μεταφέρεται στην επιφάνειά τους από τα α-κοκκία όπου είναι αποθηκευμένη. Επιπλέον αυξάνει την παραγωγή PAF και την φαγοκύτωση από τα μονοκύτταρα.

Η ισταμίνη, που παράγεται επίσης από τα αιμοπετάλια ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα ώστε να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης όπως η P- και E σελεκτίνη και ο PAF. Σε αυτά τα μόρια οφείλεται η αυξημένη συγκολλητικότητα του ενδοθηλίου.⁴¹

2.1.4.4. Μονοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα ²⁸

Η προσέλκυση των λευκοκυττάρων από το αίμα αποτελεί απαραίτητο στοιχείο της φλεγμονής και απαιτεί αλληλεπιδράσεις κυττάρων με κύτταρα ή με εξωκυττάρια ύλη.

Αρχικά, η αλληλεπίδραση γίνεται μέσω των μορίων που ανήκουν στην οικογένεια των σελεκτινών. Αποτέλεσμα αυτής της αλληλεπίδρασης είναι ότι τα κύτταρα παρουσιάζουν μία κυλιόμενη κίνηση στο ενδοθήλιο. Το κύλισμα των κυττάρων σταματά μετά τη δράση των ιντεγκρινών οι οποίες τα καθηλώνουν. Τέλος, το πέρασμα των κυττάρων στον υποενδοθηλιακό χώρο

γίνεται με τη βοήθεια άλλων μορίων προσκόλλησης, που ανήκουν στην οικογένεια των ιντεγκρινών. Το πέρασμα αυτό γίνεται κυρίως μέσω των κυτταρικών συνδέσμων των ενδοθηλιακών κυττάρων.

Τα κύτταρα που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και είναι ορατά στις αθηροσκληρωτικές βλάβες είναι τα αφρώδη κύτταρα. Μετά από διάφορα πειράματα που έγιναν σε κουνέλια, αρουραίους και πιθήκους με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, αναγνωρίστηκε ότι προσκολλημένα μονοκύτταρα στο ενδοθήλιο μετανάστευαν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετασχηματίζονταν σε μακροφάγα και τελικά σε αφρώδη κύτταρα μετά την πρόσληψη λιποπρωτεϊνών. Τα λιποειδή αυτά είναι συνήθως οξειδωμένες LDLs (ox-LDL).⁴² Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι απέδειξαν ότι τα αφρώδη κύτταρα που σχηματίζονται στα πρώιμα στάδια προέρχονται από μακροφάγα, ενώ είναι περιορισμένα τα αφρώδη κύτταρα που σχηματίζονται από λεία μυϊκά κύτταρα σε προχωρημένα στάδια.

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που έχουν προσκολληθεί μέσω μορίων προσκόλλησης πρωτεϊνικής φύσης, παράγουν διάφορα συστατικά τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της παθογένεσης. Κάποια από αυτά τα συστατικά, όπως τα μόρια IL-1 και TNF-α, επάγουν την έκφραση μορίων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων που αυξάνουν προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λευκοκυττάρων, όπως επίσης και τη δευτερογενή παραγωγή μορίων όπως PAF και PDGF από άλλα κύτταρα. Επιπλέον, παράγονται χημειοτακτικοί παράγοντες για τα λευκοκύτταρα, όπως ο PDGF και ουσίες που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όπως PGE₂, ιντερφερόνη-α και TGF-β.^{43, 44, 45}

2.1.4.5. Λεία μυϊκά κύτταρα

Τα λεία μυϊκά κύτταρα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης με δύο τρόπους. Πρώτον μπορούν να αποκριθούν σε μόρια που δρουν σε αιμοφόρα αγγεία, όπως το NO και να μεταβάλλουν τον αγγειακό τόνο. Δεύτερον, τα λεία μυϊκά κύτταρα εκφράζουν γονίδια που εμπλέκονται στο ρυθμό ανάπτυξης, όπως τα γονίδια του FGF και του PDGF.⁴⁶

2.1.4.6. T- λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα μπορούν να βρεθούν στην αθηρωματική πλάκα, γεγονός που δηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει κάποια ανοσολογική απόκριση στην αρτηριοσκλήρωση.⁴⁷

2.1.5. Παράγοντες κινδύνου της Αθηροσκλήρωσης⁴⁸

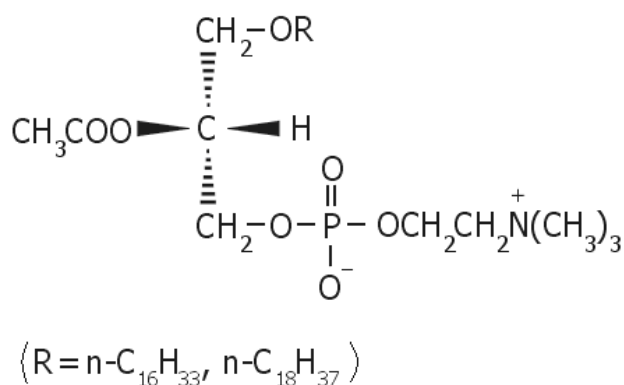
Οι παράγοντες κινδύνου μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους. Έτσι, μπορούν να διακριθούν σε προδιαθεσικούς παράγοντες (π.χ. ηλικία, φύλο, οικογενειακό ιστορικό, γονίδια), παράγοντες που σχετίζονται με τροποποιήσιμες συμπεριφορές (π.χ. κάπνισμα, αθηρογόνος διατροφή, πρόσληψη αλκοόλ, φυσική δραστηριότητα), μεταβολικούς παράγοντες κινδύνου (π.χ. δυσλιπιδαιμίες, υπέρταση, παχυσαρκία, διαβήτης, μεταβολικό σύνδρομο) και καρδιαγγειακούς δείκτες (π.χ. μικροαλβουμινουρία, κ.λ.π.). Ο συνήθης διαχωρισμός τους, είναι σε κλασικούς παράγοντες κινδύνου και σε νεότερους. Ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες υπάρχουν κάποιοι που δεν τροποποιούνται (π.χ. φύλο, ηλικία) αλλά και άλλοι που δύναται να τροποποιηθούν (δυσλιπιδαιμία, υπέρταση κ.ά.). Έτσι έχουμε τους κλασικούς παράγοντες κινδύνου στους οποίους συγκαταλέγονται η δυσλιπιδαιμία, η υπέρταση, το κάπνισμα, ο σακχαρώδης διαβήτης, η παχυσαρκία, το φύλο, η ηλικία, το στρες, η καθιστική ζωή, η κατάθλιψη και διάφορες ψυχολογικές παράμετροι και τους νεότερους παράγοντες κινδύνου οι οποίοι περιλαμβάνουν την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη, την αντίσταση στην ινσουλίνη, το μεταβολικό σύνδρομο, την ομοκυστεΐνη, τη λιποπρωτεΐνη-α, τη μεταγευματική λιπαιμία, το ινωδογόνο, τη μη αλκοολική διήθηση του ήπατος, την ιντερλευκίνη 6 (IL-6) και το ουρικό οξύ.

2.2. Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF)

2.2.1. Γενικά στοιχεία για τον PAF

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) αποτελεί μια λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών. Η ονομασία της ένωσης κατά IUPAC είναι: 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφο-χολίνη και προσδιορίζει δομικά την ένωση ως ένα γλυκεριναιθερικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης.¹⁷

Από άποψη χημικής δομής ο PAF διαθέτει δύο χαρακτηριστικά, τα οποία είναι σχετικώς ασυνήθιστα για τα φωσφολιποειδή: (α) Στον άνθρακα C1 (*sn*-1) της γλυκερόλης (ή γλυκερίνης) υπάρχει αιθερικός δεσμός (-CH₂OR) με μία μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας αλκυλομάδα, κάτι το ασυνήθιστο, αφού ο κανόνας είναι η ύπαρξη εστερικού δεσμού (-CH₂OCOR) με μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας λιπαρά οξέα (β) το υδροξύλιο του άνθρακα C2 (*sn*-2) της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένο με οξικό οξύ, (>CHOCOCH₃), κάτι το οποίο είναι επίσης ασυνήθιστο λόγω του μικρού μεγέθους του οξέος. (Σχήμα 2.3)



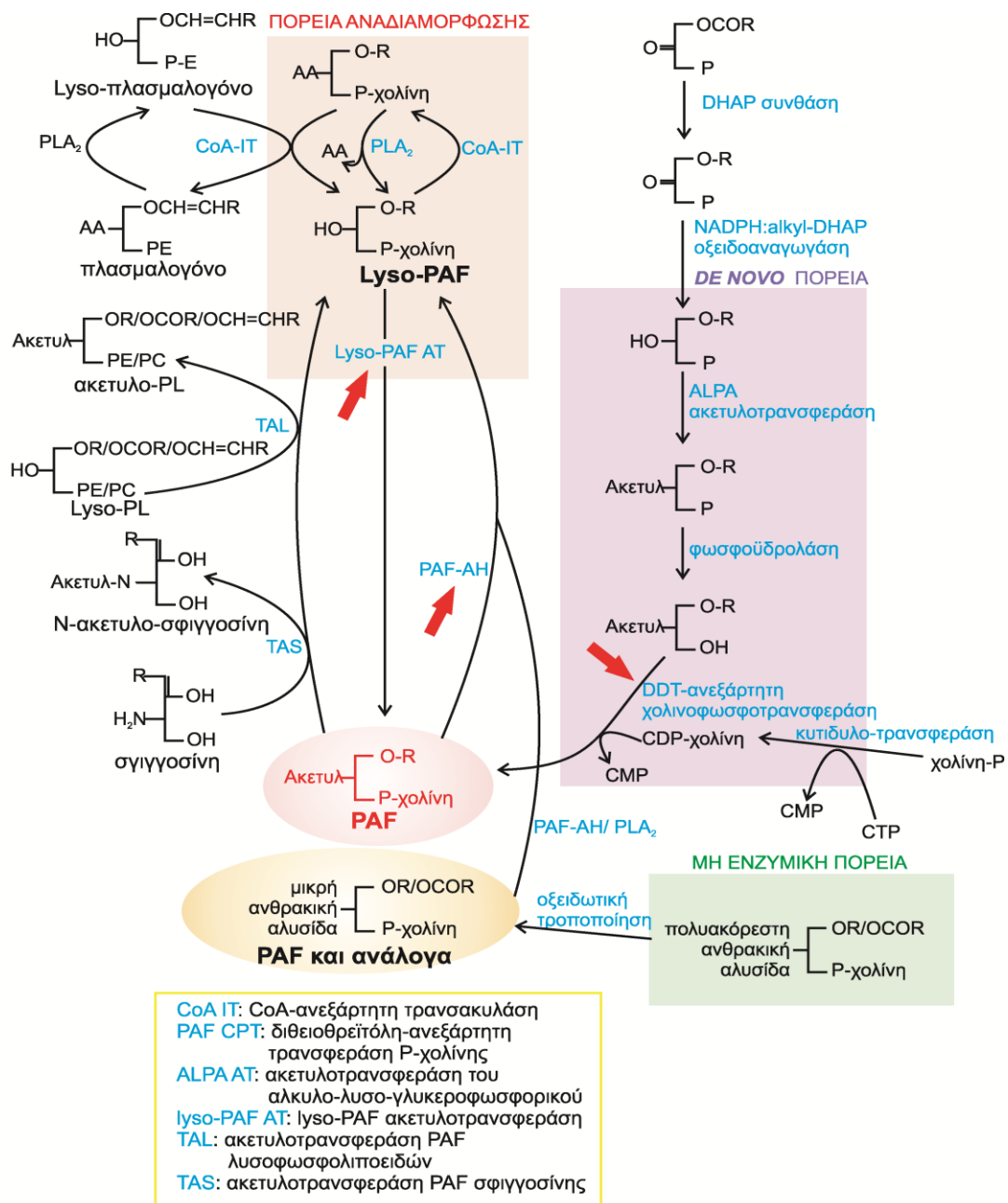
Σχήμα 2.3: Η χημική δομή του PAF³⁹

2.2.2. Βιοσύνθεση του PAF²⁸

Η κύρια οδός βιοσύνθεσης του PAF είναι η οδός του ανασχηματισμού που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της ακετυλοτρανσφεράσης, η οποία ακετυλιώνει τον λύσο-PAF (1-O-αλκυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) προς PAF.⁴⁹ Στη συνέχεια, μία σημαντική ποσότητα του κυτταρικού PAF εκκρίνεται

και μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος συνδεδεμένος με αλβουμίνη, ενώ μία μικρή ποσότητα είναι συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος⁵⁰ (Σχήμα 2.4).

Ο PAF επιδρά στα κύτταρα στόχους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως του 10^{-12} - 10^{-9} M μέσω ειδικών υποδοχέων που έχουν ανιχνευθεί σε πολλά είδη κυττάρων.



Σχήμα 2.4: Βιοσυνθετική πορεία του PAF⁵¹

Τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού και του εκκρινόμενου PAF ελέγχονται και από την ακετυλοϋδρολάση, ένα ένζυμο ανεξάρτητο ασβεστίου που υδρολύει τον PAF μετατρέποντας τον σε λυσο-PAF. Εκκρίνεται από διάφορα κύτταρα όπως τα ανθρώπινα μακροφάγα, αιμοπετάλια και ηπατοκύτταρα και μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος συνδεδεμένη κυρίως με λιποπρωτεΐνες χαμηλής (LDL) και υψηλής (HDL) πυκνότητας του πλάσματος. Στις παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπου ο PAF έχει κεντρικό ρόλο ως μεσολαβητής, η ακετυλοϋδρολάση φαίνεται να είναι ένζυμο κλειδί.²⁸

2.2.3. Δράσεις του PAF ως προς την αθηρογένεση²⁸

Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι ο PAF παίζει κύριο ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως το αναφυλακτικό σοκ, το άσθμα, οι αλλεργίες, ισχαιμία και οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις.⁵² Ισχυρές ενδείξεις υποδεικνύουν τον PAF ως μόριο με προαθηρογόνο δράση στο μικροπεριβάλλον του αρτηριακού χιτώνα και με σημαντική συμμετοχή στις επιπλοκές που επακολουθούν και σχετίζονται με σχηματισμό θρόμβων.⁵³ Επίσης, έχει βρεθεί ως συστατικό της αθηρωματικής πλάκας ενώ ταυτόχρονα έχουν βρεθεί μόρια ανταγωνιστές του με προστατευτική δράση έναντι της αθηροσκλήρωσης.⁵⁴

Ο PAF επάγει την ελευθέρωση διαφόρων συστατικών που πιθανόν να έχουν προαθηρογόνο δράση, όπως η ελασάση, η οποία καταβολίζει τα συστατικά της εξωκυττάριας ύλης του έσω και μέσω χιτώνα των αρτηριών καθώς και ενώσεις ενεργού οξυγόνου οι οποίες με τη σειρά τους καταστρέφουν ιστούς και συνεισφέρουν στην οξειδωση της LDL. Άρα ο PAF φαίνεται ότι εμπλέκεται στις φλεγμονώδεις καταστάσεις της αθηρογένεσης, οι οποίες είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων καθώς και με την έκκριση κυτταροκινών. Τέτοιου είδους όμως ενεργοποιημένα κύτταρα βιοσυνθέτουν PAF, κάνοντας φανερό πως ένα λανθασμένο σήμα μπορεί να ενισχυθεί και να επιφέρει καταστροφή σε κάποιον ιστό.

Οι δράσεις του PAF εκδηλώνονται μετά από σύνδεση του σε ειδικό υποδοχέα, ο οποίος παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα αφού δείχνει εκατοντάδες φορές

μεγαλύτερη εκλεκτικότητα για τον αιθερικό δεσμό του μορίου στη θέση *sn-1* και πλήρη εξειδίκευση για την ακετυλομάδα της *sn-2* θέσης.⁵⁵ Η κεφαλή της χολίνης επίσης αναγνωρίζεται από τον υποδοχέα και μάλιστα πολλές χιλιάδες φορές εκλεκτικότερα σε σχέση με τα ανάλογα της αιθανολαμίνης.⁵⁶

2.2.4. Η σχέση του PAF με την ox-LDL

Όπως προαναφέρθηκε, η οξειδωση της LDL παίζει σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση, διότι η ox-LDL περιέχει PAF ή/και βιολογικά δραστικά ανάλογά του, στα οποία οφείλονται οι βιολογικές δράσεις της ox-LDL.⁶⁴ Είναι αποδεδειγμένο ότι η ox-LDL προσλαμβάνεται με γρήγορους ρυθμούς από τα μακροφάγα του υποενδοθηλιακού χώρου του αρτηριακού τοιχώματος μέσω του εκκαθαριστή υποδοχέα και τα μετατρέπει σε αφρώδη κύτταρα που είναι χαρακτηριστικά της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Επιπλέον, η ox-LDL ως κυτταροτοξική μεταβάλλει τις λειτουργίες διάφορων κυττάρων.⁵⁷

Η οξειδωση της ανθρώπινης LDL παράγει προφλεγμονώδεις μεσολαβητές που επιφέρουν φλεγμονώδεις αντιδράσεις και ενεργοποιούν τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα και κύτταρα που εκτός σωστής θέσης και χρόνου εκφράζουν τον υποδοχέα του PAF. Έτσι, γίνεται φανερό πως αυτοί οι μεσολαβητές εμπλέκονται στα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης.⁵⁸

Καθοριστικός παράγοντας στην εξήγηση των βιολογικών ιδιοτήτων της ox-LDL αποτέλεσε η απόδειξη της παραγωγής PAF κατά την οξειδωση της LDL. Αυτό αποδείχθηκε με την *in vitro* οξειδωση της LDL παρουσία ειδικού αναστολέα της PAF-ακετυλοϋδρολάσης, οπότε η παραγόμενη ποσότητα PAF δεν υδρολυόταν από την ακετυλοϋδρολάση που υπάρχει στην LDL. Ο μηχανισμός για την παραγωγή PAF στην ox-LDL περιλαμβάνει τη δράση μίας τρανσακετυλάσης, η οποία μεταφέρει ακετυλομάδα από την *sn-2* θέση της 1-ακυλο-2-ακετυλο-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης στην θέση της *sn-2* θέσης του λύσο-PAF, ο οποίος αποτελεί αναστολέα της ακετυλοϋδρολάσης.⁵⁹ Μετά την απομόνωση και τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του κλάσματος και ενώ μελετήθηκε και η βιολογική του δράση, παράλληλα μελετήθηκε και δομικά. Έτσι αποδείχθηκε ότι η ένωση με χρωματογραφική συμπεριφορά PAF και βιολογική δράση PAF παρουσιάζει στο φάσμα μάζας τα χαρακτηριστικά

θραύσματα του PAF επίσης.

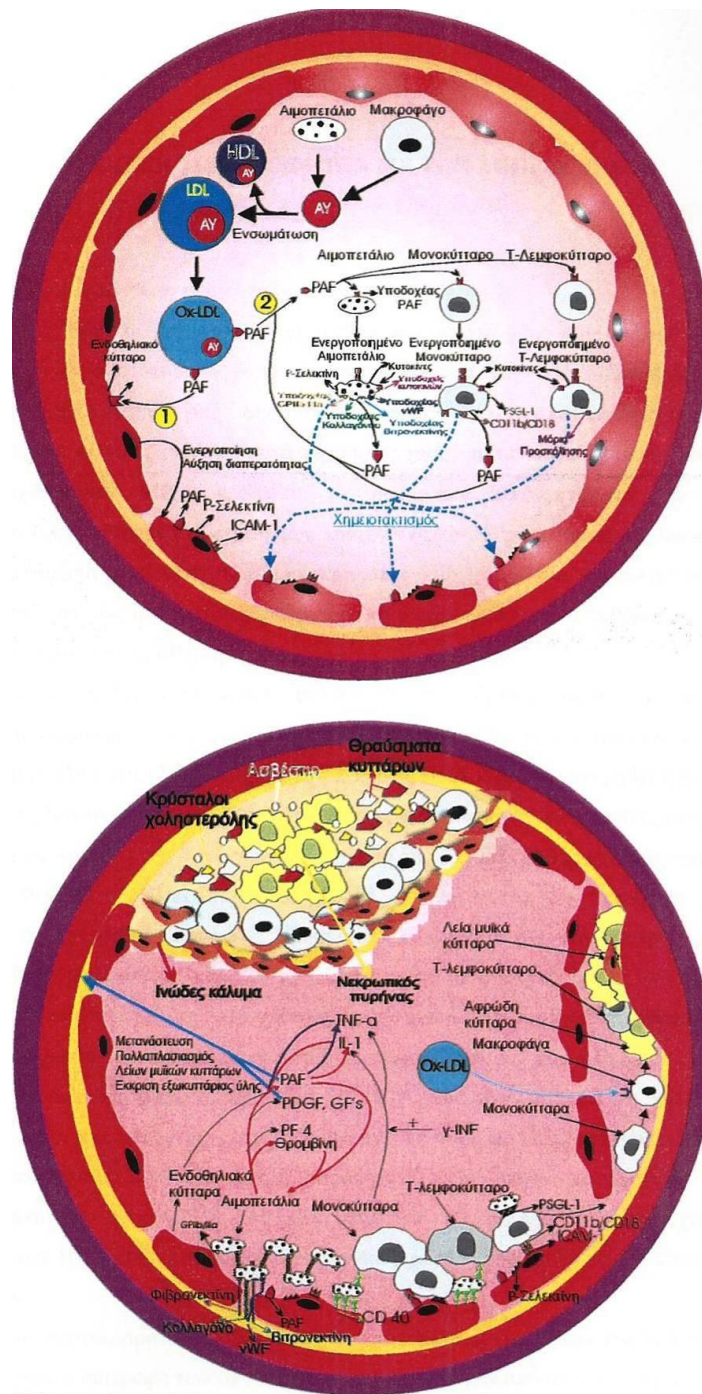
Τέλος, και κατόπιν μακροχρόνιων ερευνών και με τη βοήθεια των φασμάτων MS καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η *in vitro* οξειδωση της LDL παράγει και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, τα οποία δρώντας μέσω του υποδοχέα του PAF αποτελούν όπως και ο PAF γενεσιουργό αίτιο του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών.^{60,61} Οι ενώσεις αυτές προκαλούν υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων.⁶² Επίσης, είναι υπεύθυνες όπως και ο PAF για την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και την πρόκληση φλεγμονής.⁶³

2.2.5. Ο ρόλος της ακετυλοϋδρολάσης²⁸

Σύμφωνα με πειράματα που έγιναν σε διάφορα μοντέλα ζώων, η ακετυλοϋδρολάση είναι ένα ένζυμο που μπορεί να προφυλάξει τον οργανισμό από ανεπιθύμητες φλεγμονώδεις αντιδράσεις αφού παίζει το ρόλο του κυτταρικού μηνύματος που θα σταματήσει την διαδικασία της φλεγμονής. Η ακετυλοϋδρολάση είναι ένα ένζυμο που αποικοδομεί τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή που είναι ανάλογα του PAF. Ακόμη είναι στενά συνδεδεμένη με την LDL και την HDL αφού έχει υψηλή εξειδίκευση μόνο στα παραπάνω ασυνήθιστα φωσφολιποειδή ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως δεν έχει καμία δράση υδρολάσης στα συνηθισμένα φωσφολιποειδή των μεμβρανών. Επιπλέον φαίνεται ότι εμποδίζει την οξειδωση της LDL, εμποδίζοντας έτσι την παραγωγή του PAF και των αναλόγων του. Ενώ όμως η ακετυλοϋδρολάση προστατεύει τον οργανισμό από τον PAF και τα ανάλογά του κατά τα πρώτα στάδια οξειδωσης της LDL, δεν φαίνεται να συνεχίζει να έχει την ίδια δράση σε προχωρημένα στάδια οξειδωσης της LDL γιατί καταστρέφεται. Έτσι, η δραστηριότητα του ενζύμου είναι αντιστρόφως ανάλογη της οξειδωτικής κατάστασης της LDL, σε αντίθεση με την ακετυλοϋδρολάση της HDL που φαίνεται να έχει συνεχώς προστατευτική δράση.⁶⁴

2.2.6. Θεωρητικός μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας

Ο πιθανός μηχανισμός για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας δίνεται στην εικόνα του Σχήματος 2.4.



Σχήμα 2.5: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας με τον PAF ως γενεσιουργό αίτιο ¹⁰²

Τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα κύτταρα εκκρίνουν ακετυλοϋδρολάση, η οποία ενσωματώνεται στις LDL και HDL και με τη μορφή αυτή κυκλοφορεί στο πλάσμα. Κατά την οξείδωση της LDL, η οποία είναι μία φυσιολογική

διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον οργανισμό, παράγεται PAF, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η δραστηριότητα της ακετυλοϋδρολάσης, η οποία είναι ένα από τα ένζυμα που ρυθμίζουν τα επίπεδα του. Σημαντικό ρόλο στην έκταση της οξειδωσης της LDL διαδραματίζουν τα αντιοξειδωτικά του αίματος, τα οποία προέρχονται κυρίως από την τροφή. Αν όμως για κάποιο λόγο η οξειδωση της LDL επεκταθεί πέραν του κανονικού, τότε και ο PAF παράγεται άτοπα και άκαιρα σε υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα. Εκτός από την ακετυλοϋδρολάση ο οργανισμός μας έχει και άλλους μηχανισμούς προστασίας έναντι της ανεξέλεγκτης δράσης του PAF, όπως οι ενδογενείς και άλλοι αναστολείς αυτού που υπάρχουν στο αίμα. Αν όμως παρ' όλους τους μηχανισμούς προστασίας τελικά τα επίπεδα του αυξηθούν πάνω από τα φυσιολογικά όρια τότε μπορεί στη συνέχεια να συμβούν τα ακόλουθα: Ο PAF ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος διαμέσου του υποδοχέα του μετατρέπει το ενδοθήλιο από αντιθρομβωτικό σε προθρομβωτικό. Τότε παρατηρείται παραγωγή του PAF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο οποίος δεν ελευθερώνεται, αλλά παραμένει συνδεδεμένος στην περικυτταρική μεμβράνη τους. Στα ενεργοποιημένα πλέον ενδοθηλιακά κύτταρα παράγονται επίσης κυτταροκίνες και εκφράζονται μόρια προσκόλλησης. Συγχρόνως, ο PAF που παράγεται από την οξειδωση της LDL διεγείρει την παραγωγή κυτταροκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα κύτταρα του αίματος που εμπλέκονται στο μηχανισμό της αθηρωμάτωσης. Ο PAF είναι ικανός να προκαλέσει χημειοτακτισμό στα παραπάνω κύτταρα. Έτσι τα κύτταρα προσελκύονται από τον PAF, που είναι συνδεδεμένος στην περικυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, στο χώρο του ενδοθηλίου. Το κρίσιμο σημείο φαίνεται να είναι η παραγωγή του PAF από την οξειδωση της LDL και η διατάραξη του ενδοθηλίου. Από το σημείο αυτό οι διεργασίες που ακολουθούν είναι εξαιρετικά πολύπλοκες καθώς ο PAF είναι σε θέση να προκαλέσει την παραγωγή κυτταροκινών από κύτταρα του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος, οι οποίες στη συνέχεια προκαλούν με τη σειρά τους την παραγωγή του PAF από τα κύτταρα αυτά, με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα ένα δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων, όπου το αρχικό σήμα συνεχώς ενισχύεται μέσω θετικών ανάδρομων μηχανισμών.²⁸

Στη συνέχεια, τα κύτταρα του αίματος συνδέονται στα ενδοθηλιακά κύτταρα

μέσω των σελεκτινών, οπότε παρατηρείται μία κυλιόμενη κίνηση. Στο σημείο αυτό το παρατεταμένο σήμα από τον PAF και τα μόρια των κυτοκινών οδηγούν στην περαιτέρω ενεργοποίηση και καθήλωση στο ενδοθήλιο μετά τη σύνδεση μέσω των ιντεγκρινών. Κατά τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα στρώμα κυττάρων από αιμοπετάλια, μονοκύτταρα και λίγα T-λεμφοκύτταρα. Επαναλαμβάνεται ότι τα διάφορα αυτά κύτταρα είναι ικανά να συνδέονται όχι μόνο στο ενδοθήλιο αλλά και μεταξύ τους, μέσω συμπληρωματικών μορίων προσκόλλησης.²⁸

Με αυτό τον τρόπο η διατάραξη του ενδοθηλίου λόγω φλεγμονής, οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας του. Η οξειδωμένη LDL και τα προσκολλημένα στο ενδοθήλιο κύτταρα διαπερνούν το ενδοθήλιο και μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο. Εκεί τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα, τα οποία προσλαμβάνουν την οξειδωμένη LDL, διαμέσου του ειδικού εκκαθαριστή υποδοχέα και σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα. Η ενεργοποίηση όλων αυτών των κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή μορίων, όπως ο PDGF, που μαζί με τον PAF προκαλούν μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια εκκρίνουν εξωκυττάρια ύλη. Στο χώρο λοιπόν των αφρωδών κυττάρων μεταναστεύουν λίγα λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και πολύ λίγα T-λεμφοκύτταρα. Το παρατεταμένο σήμα οδηγεί σε μία συνεχώς αυξανόμενη βλάβη, όπου παρατηρείται μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία μαζί με λίγα λευκοκύτταρα και συνδετικό ιστό δημιουργούν ένα «ινώδες» κάλυμμα, κάτω από το οποίο δημιουργείται ένα στρώμα από μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα. Κάτω από αυτό το στρώμα κυττάρων νεκρώνονται άλλα είδη κυττάρων που βρίσκονται σε αυτό το σημείο και συσσωρεύονται θραύσματα κυττάρων, χοληστερόλη, ασβέστιο και λίγα αφρώδη κύτταρα δημιουργώντας έναν πυρήνα, τον «νεκρωτικό» πυρήνα.²⁸

Ο σχηματισμός λοιπόν από το ινώδες κάλυμμα έως και τον νεκρωτικό πυρήνα αποτελεί την αθηρωματική πλάκα. Μία πιθανή ρήξη της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγία και σχηματισμό θρόμβου με τελικό αποτέλεσμα το έμφραγμα του μυοκαρδίου.²⁸

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Χημική Σύσταση και Βιολογική Αξία Ιχθύων – Σολομοειδή

3.1. Βιολογική αξία ιχθύων

3.1.1. Γενικά στοιχεία για την βιολογική αξία των ψαριών

Η κατανάλωση ψαριών αποτελεί βασικό στοιχείο της Μεσογειακής δίαιτας. Αποτελούν πηγή βιολογικά πολύτιμων πρωτεϊνών, λιπών και λιποδιαλυτών βιταμινών. Η χημική σύσταση των ψαριών δεν είναι σταθερή και επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Πιο συγκεκριμένα, διαφέρει από είδος σε είδος αλλά και σε άτομα του ίδιου είδους, γεγονός που οφείλεται στην εποχή τη θερμοκρασία των υδάτων, την ηλικία, το φύλο, τη φάση του αναπαραγωγικού κύκλου στην οποία βρίσκονται, και τέλος στη γεωγραφική τοποθεσία.^{66,67} Η χημική σύσταση της σάρκας χαρακτηρίζεται από αυξημένα ποσά πρωτεΐνης και λίπους (ποικίλει σημαντικά ανάλογα με το είδος και την ηλικία), μικρή ποσότητα υδατανθράκων (κυρίως γλυκογόνο), ανόργανα άλατα, βιταμίνες, και πλήθος ιχνοστοιχείων (κυρίως μαγγάνιο, μολυβδαίνιο, ιώδιο, ψευδάργυρο, χαλκό και κοβάλτιο).

Πίνακας 3.2: Χημική σύσταση ιχθύων⁶⁹

Συστατικό	Πρωτεΐνες	Λίπος	Υγρασία	Τέφρα
Ιριδίζουσα πέστροφα (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	19,95%	3,35%	76,10%	1,25%
Σολομός Ατλαντικού (<i>Salmo salar</i>)	21,9%	12,4%	64,6%	1,1%

Πίνακας 3.3: Περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά και ενέργεια ψαριών και κρεάτων⁶⁸

	Υγρασία (%)	Πρωτεΐνες (%)	Λίπος (%)	Τέφρα (%)	Ενέργεια (kJ/100g)
Σκουμπρί	61,4	22,5	14,5	1,6	920
Γατόψαρο	71,1	16,5	11,3	1,0	729
Βακαλάος	81,3	17,0	0,7	1,0	317
Πέστροφα	76,3	19-20	3,40	1,2	351
Κυπρίνος	75,8	18,0	4,8	1,17	522
Βοδινό κρέας	74,3	20	3,5	-	485
Κοτόπουλο	74,6	21,5	2,5	1,2	460
Αρνίσιο κρέας	66,4	19,7	12,7	-	812
Χοιρινό κρέας	56,8	17-19	25,3	0,8	1238

3.1.2. Πρωτεΐνες

Οι πρωτεΐνες εκπροσωπούν το υψηλότερο ποσοστό των οργανικών ενώσεων του σώματος των ιχθύων και βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα και στο αίμα τους συνιστώντας μια από τις σημαντικότερες ομάδες των συστατικών που μετέχουν στις διεργασίες της ζωής τους. Σε αναπτυσσόμενα και ενήλικα άτομα ιχθύων, ελεύθερων και εκτρεφόμενων, το ποσοστό των πρωτεϊνών στο σώμα τους κυμαίνεται στο 16-23%.⁷⁰ Η περιεκτικότητα ωστόσο των πρωτεϊνών του ιστού των ψαριών αυξάνεται με το μέγεθος του ψαριού, ενώ μειώνεται κατά την αναπαραγωγική περίοδο.⁷¹ Αυτές περιλαμβάνουν δομικές πρωτεΐνες (ακτίνη, μυοσίνη, τροπομυοσίνη, ακτομυοσίνη), σαρκοπλασματικές πρωτεΐνες (σφαιρίνη και ένζυμα) και πρωτεΐνες του συνδετικού ιστού (κολλαγόνο). Τα επίπεδα των διαφόρων αμινοξέων που απαντώνται στο σώμα των ιχθύων παρουσιάζουν σχετικά αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού οξέος, ασπαραγινικού οξέος και λυσίνης και εμφανώς μειωμένα επίπεδα θρυπτοφάνης.

3.1.3. Λιπαρά οξέα

Η ποσοτική παρουσία και η σύνθεση των λιπαρών οξέων των διαφόρων ιστών του σώματος των ιχθύων ποικίλλουν ανάλογα με το είδος του ιχθύος, τη βιολογική του φάση και τη διατροφική του κατάσταση αλλά και την εποχή. Το ποσοστό (επί του συνολικού ποσοστού των λιπών) των ακόρεστων λιπαρών οξέων κυμαίνεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα 40-70%. Υψηλά είναι επίσης και τα ποσοστά (επί του εκατοστιαίου ποσοστού των ακόρεστων λιπαρών οξέων) του EPA 2-10% και του DHA 2,5-21%.⁷⁰ Η εναπόθεση του λίπους πραγματοποιείται κυρίως στους μυϊκούς ιστούς, στο συκώτι και στα έντερα.⁷²

Το λίπος των ψαριών αποτελείται από τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα (f-FA), χοληστερόλη καθώς και από φωσφολιποειδή, όπως φωσφατιδυλοχολίνη (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη (PE), φωσφατιδυλοϊνσιτόλη (PI), φωσφατιδυλοσερίνη (PS), σφιγγομυελίνη (SM), φωσφατιδικό οξύ και καρδιολιπίνη (CARD).⁷³ Τα λιπαρά ψάρια και θαλασσινά περιέχουν μια από τις δύο οικογένειες λιπαρών οξέων που ο οργανισμός αδυνατεί να παράγει μόνος του, την ομάδα των ω-3 λιπαρών οξέων. Τα ω-3 είναι πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που προστατεύουν και συμβάλλουν στην πρόληψη και ρύθμιση ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος, το εγκεφαλικό επεισόδιο, οι ανωμαλίες του ανοσοποιητικού και του πεπτικού συστήματος, ο καρκίνος του μαστού, ο προστάτης κ.ά. Παράλληλα, συμβάλλουν στην ανάπτυξη, στην καλή λειτουργία του εγκεφάλου και γενικότερα του νευρικού συστήματος και στην καλύτερη υφή και προστασία του δέρματος.

Πίνακας 3.4: Περιεκτικότητα λιπαρών οξέων (% των ολικών λιπαρών)⁶⁸

Λιπαρά οξέα	Κυπρίνος	Γατόψαρο	Ιριδίζουσα Πέστροφα	Σκουμπρί	Σολομός Ατλαντικού	Σαρδέλα
14:0	0,97	3,39	3,57	7,2	3,6	5,5
16:0	20,01	19,97	23,67	13,4	17,0	39,0
16:1	8,33	8,47	7,72	4,8	9,6	4,0
18:0	5,97	5,17	6,61	2,2	3,5	5,1
18:1 (ω-9)	48,29	19,04	34,79	11,9	21,2	6,7
18:2 (ω-6)	9,68	6,51	7,30	2,1	3,7	2,8
18:3 (ω-3)	0,73	2,97	0,89	2,0	2,5	0,4
20:1	1,53	4,73	2,20	11,4	1,6	0,4
20:4(ω-)	0,02	1,01	0,25	0,5	2,9	-
20:5(ω-3)	0,38	3,24	1,17	6,2	7,5	10,7
22:5(ω-3)	0,12	1,78	0,58	0,9	2,5	-
22:6(ω-3)	0,48	9,24	3,86	10,8	13,1	20,6

Πίνακας 3.5: Περιεχόμενο σε EPA και DHA σε δείγματα ιχθύων⁷⁴

	DHA (g/100 g)	EPA (g/100 g)	Άθροισμα DHA και EPA (g/100 g)
Σολομός Ατλαντικού	1,429	0,411	1,840
Ιριδίζουσα Πέστροφα	0,520	0,468	9,988
Ξιφίας	0,681	0,087	0,768
Σφυρίδα	0,213	0,035	0,248
Βακαλάος	0,162	0,076	0,238
Ρέγγα Ατλαντικού	1,105	0,909	2,014
Μπακαλιάρος	0,154	0,004	0,158
Τόνος	1,141	0,363	1,504
Σκουμπρί Ατλαντικού	0,699	0,504	1,203

3.1.4. Υδατάνθρακες

Οι ιχθύες έχουν πολύ μικρή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες (0,04-1,69%), δεδομένου ότι ο οργανισμός τους επενδύει ενεργειακά κυρίως στα λίπη και κατά δεύτερο λόγο στις πρωτεΐνες. Η περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες ποικίλει ανάλογα το είδος, την ηλικία, και τη διατροφή του ψαριού. Σε μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκεται η γλυκόζη, η οποία αποτελεί άμεσα διαθέσιμη πηγή ενέργειας και το γλυκογόνο, το οποίο ενωμένο με γλοβουλίνες αποτελεί αποθηκευμένη πηγή ενέργειας. Σε μικρότερες ποσότητες απαντώνται η φρουκτόζη, η γαλακτόζη, η λακτόζη καθώς και μερικοί βλενοπολυσακχαρίτες.

3.1.5. Βιταμίνες

Τα ψάρια αποτελούν σημαντική πηγή βιταμινών, καθώς περιέχουν σημαντικές ποσότητες βιταμίνης A και D, θειαμίνης, ριβοφλαβίνης, νιασίνης και κοβαλαμίνης (βιταμίνες B1, B2, B3 και B12 αντίστοιχα). Η βιταμίνη A είναι αναγκαία για τη φυσιολογική όραση και για την ανάπτυξη των οστών. Η βιταμίνη D που βρίσκεται στο ήπαρ των ψαριών είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ανάπτυξη των οστών, δεδομένου ότι είναι απαραίτητη για την απορρόφηση και το μεταβολισμό του ασβεστίου. Οι βιταμίνες A και D βρίσκονται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στα λιπαρά ψάρια όπως ο σολομός. Η θειαμίνη, η ριβοφλαβίνη, η νιασίνη και η κοβαλαμίνη είναι σημαντικές για το μεταβολισμό της ενέργειας και την υγεία των νευρικών ιστών. Επιπλέον, η κοβαλαμίνη είναι απαραίτητη για το σχηματισμό υγιών ερυθρών αιμοσφαιρίων.⁷⁵

3.1.6. Ανόργανα στοιχεία

Τα ψάρια αποτελούν καλή πηγή ασβεστίου, φωσφόρου, ιωδίου, σιδήρου, μαγνησίου, ψευδαργύρου, μαγγάνιου, καλίου που είναι απαραίτητο για τη λειτουργία του μυϊκού και του νευρικού συστήματος καθώς και σεληνίου που έχει έντονη αντιοξειδωτική δράση. Το ιώδιο είναι σημαντικό για τις ορμόνες που ρυθμίζουν το μεταβολισμό του σώματος (θυρεοειδικές ορμόνες) και στα παιδιά είναι απαραίτητο για την ομαλή σωματική και πνευματική ανάπτυξη. Ο σίδηρος είναι απαραίτητος για τη σύνθεση της αιμοσφαιρίνης. Ο ψευδάργυρος είναι συστατικό πολλών ενζύμων. Τέλος, το μαγγάνιο συμμετέχει σε πολλές μεταβολικές αντιδράσεις.⁷⁶

Πίνακας 3.6: Περιεκτικότητα σε ανόργανα στοιχεία ήπατος, μυών και ολόκληρου του σώματος ιριδιζουσας πέστροφας *Oncorhynchus mykiss*⁷⁰

Ανόργανα στοιχεία	Ήπαρ	Μύες	Ολόκληρο σώμα
Ca*	0,082±0,030	0,116±0,035	5,164±1,16
P*	3,332±0,354	2,472±0,231	4,804±0,963
Mg*	0,209±0,028	0,322±0,027	0,333±0,163
K*	3,248±0,540	3,885±0,788	3,154±0,469
Na*	1,439±0,320	0,661±0,129	1,326±0,300
Fe**	0,089±0,055	0,004±0,001	0,012±0,004
Cu**	0,101±0,041	0,059±0,000	0,0012±0,050
Mn**	0,0015±0,0003	0,00012±0,00002	0,0018±0,00088
Zn**	0,024±0,040	0,0044±0,001	0,025±0,0016

* g/kg ιχθύος

** mg/kg ιχθύος

3.1.7. Υγρασία

Το νερό είναι το στοιχείο που βρίσκεται σε μεγαλύτερη αφθονία στον ιστό των ψαριών. Το περιεχόμενο νερό συνήθως κυμαίνεται σε ποσοστά της τάξεως του 70-80%. Γενικά, το επίπεδο της υγρασίας στο σώμα των ιχθύων μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας και του μεγέθους τους, ενώ παράλληλα αυξάνεται το επίπεδο των λιπών. Η μεγάλη περιεκτικότητα του νερού στα ψάρια επηρεάζει σημαντικά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα καθιστά τον ιστό τους πιο ζουμερό λόγω του ότι το νερό δεσμεύεται από τις πρωτεΐνες. Ειδικότερα, η τριχοειδής σύνδεση του νερού επηρεάζει τις οργανοληπτικές ιδιότητες καθώς το χαλαρά δεσμευμένο νερό συγκεντρώνεται στους μεγάλους πόρους της σάρκας του ψαριού και συνεισφέρει στην απελευθέρωση της αίσθησης του ζουμερού.

3.1.8. Πτητικές ενώσεις που προσδίδουν άρωμα στα ψάρια

Η σάρκα των ψαριών αποτελείται από πτητικές ενώσεις που καθορίζουν και το τελικό τους άρωμα. Γενικά, τα ωμά φρέσκα ψάρια έχουν μια πιο ασθενή οσμή και χαρακτηρίζονται από μαλακές και γλυκές νότες φρεσκάδας. Αντίθετα, οι πτητικές θειούχες ενώσεις επηρεάζουν κατά πολύ το άρωμα ακόμη κι αν βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Λόγω του χαμηλού ορίου ανιχνεύσεως δίδουν την άσχημη οσμή στα ψάρια και έτσι συνδέονται με την αλλοίωση τους.⁷⁷ Μερικές από τις πτητικές ενώσεις προέρχονται από ενζυμική οξειδωση ή αυτοοξειδωση των λιποειδών.^{78, 79, 80}

3.2. Σολομοειδή

Η οικογένεια των σολομοειδών είναι μια από τις σπουδαιότερες οικογένειες των ψαριών του γλυκού νερού. Η σπουδαιότητά τους οφείλεται τόσο στη προτίμηση τους από τους ερασιτέχνες ψαράδες, όσο και στη μεγάλη εμπορικότητα που παρουσιάζουν λόγω της υψηλής κατανάλωσης τους.

Τα είδη της οικογένειας αυτής είναι ενδημικά του βορείου ημισφαιρίου. Εντούτοις μερικά είδη έχουν εισαχθεί με επιτυχία στο νότιο ημισφαίριο, όπου παρουσίασαν ικανοποιητικό εγκλιματισμό και ανάπτυξη. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει ψάρια μέσου μέχρι και μεγάλου μεγέθους. Το σώμα τους είναι καλυμμένο από μικρά κυκλοειδή λέπια. Τα πτερύγιά τους αποτελούνται από μαλακές ακτίνες, το ραχιαίο πτερύγιο σπάνια είναι μεγάλο ενώ τα κοιλιακά πτερύγια βρίσκονται στο ίδιο ύψος με το ραχιαίο. Το σώμα τους είναι επίμηκες και δε φέρουν μουστάκια. Ένα χαρακτηριστικό όλων των ειδών της οικογένειας, είναι το λιπώδες πτερύγιο (adipose fin). Είναι ένας μικρός σαρκώδης λοβός χωρίς ακτίνες και βρίσκεται στη ραχιαία περιοχή, μεταξύ ραχιαίου και ουριαίου πτερυγίου.

Τα είδη αυτά είναι σαρκοφάγα και η ωστοκία τους λαμβάνει χώρα το χειμώνα. Τα αυγά μετά την ωρίμανση τους πέφτουν στην υπογάστριο κοιλότητα, γεγονός που κάνει εύκολη τόσο την λήψη τους, όσο και την τεχνητή γονιμοποίηση τους. Όλα τα είδη της οικογένειας των σολομοειδών ζουν σε

υδάτινους βιότοπους με δροσερό και διαυγές νερό, πλούσιο σε οξυγόνο και με χαλικώδη πυθμένα.⁸¹

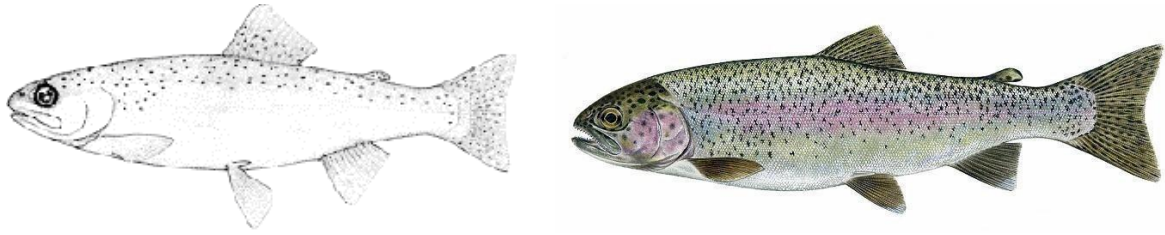
3.2.1. Ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*)

3.2.1.1. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά Ιριδίζουσας Πέστροφας

Το είδος αυτό της πέστροφας, εισήχθη από την Βόρεια Αμερική σε πάρα πολλές χώρες και είναι το είδος που εκτρέφεται στα εκτροφεία. Το σχήμα του σώματος της μοιάζει με αυτό της ευρωπαϊκής πέστροφας. Το κεφάλι συνήθως είναι μικρό σε σχέση με το μέγεθος της, αλλά μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας και το φύλο. Το ουραίο πτερύγιο είναι περισσότερο εγκολπωμένο από αυτό της ευρωπαϊκής πέστροφας. Τα λέπια είναι πάρα πολύ μικρά και έχει 15-16 μεταξύ της βάσης του λιπώδους πτερυγίου και της πλευρικής γραμμής.

Πίνακας 3.7: Συστηματική κατάταξη του είδους Ιριδίζουσα Πέστροφα ⁸²

Βασίλειο	Ζωικό
Ομοταξία	Οστεοϊχθύες
Κλάση	Ακτινοπτερύγιοι
Τάξη	Σολομοειδή
Οικογένεια	<i>Salmonidae</i>
Γένος	<i>Oncorhynchus</i>
Είδος	<i>Oncorhynchus mykiss</i>



Εικόνα 3.3: Σχηματική απεικόνιση του είδους *Oncorhynchus mykiss*

Το κεφάλι συνήθως είναι μικρό σε σχέση με το μήκος του σώματος, αλλά μπορεί να ποικίλλει με το στάδιο ωριμότητας και το φύλο. Το σώμα είναι επίμηκες και η αναλογία ύψους σώματος - ολικού μήκους είναι περίπου 1 : 5, ενώ στην ίδια περίπτωση κυμαίνεται και η αναλογία μήκους κεφαλής - ολικού μήκους σώματος. Τον πρώτο χρόνο το μήκος της φθάνει στις ευρωπαϊκές συνθήκες εκτροφής τα 10-15cm, ενώ στη χώρα μας τα 17–22cm. Το σχήμα του σώματος μοιάζει με αυτό της "άγριας" πέστροφας (*Salmo trutta*).

Τα λέπια είναι πολύ μικρά, κυκλοειδή και καλά ορατά. Η κεφαλή είναι γυμνή από λέπια. Ο αριθμός των λεπιών της πλευρικής γραμμής είναι 135-150.

Ο αριθμός των ακτινών των πτερυγίων συνήθως δεν μεταβάλλεται μεταξύ διαφόρων ποικιλιών. Το ραχιαίο πτερύγιο έχει 14-15 ακτίνες, τα θωρακικά 13-14, το ουραίο 11-11, τα κοιλιακά 12-14 και ο αριθμός των σπονδύλων κυμαίνεται μεταξύ 61-62. Κοινό χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των ειδών αυτής της οικογένειας είναι η παρουσία, πίσω από το ραχιαίο πτερύγιο, ενός συμπληρωματικού μαλακού πτερυγίου. Πρόκειται για μια λιπώδη μάζα, που καλύπτεται από δέρμα, γι' αυτό και ονομάζεται λιπώδες πτερύγιο.

Είναι ψάρι με λαμπερούς χρωματισμούς. Η ράχη του είναι γαλαζοπράσινη και η κοιλιά υπόλευκη – γκρι. Κατά μήκος των πλευρών του και από το βραγχιακό επικάλυμμα μέχρι τη βάση της ουράς έχει μια μακρόστενη πορφυρένια ταινία, με μεγάλες μπλε κηλίδες και ιριδίζουσες ανταύγειες. Σε όλη την επιφάνεια του σώματος μερικές φορές και μέχρι τα ραχιαία, κοιλιακά, και το ουραίο πτερύγιο, έχει κηλίδες μαύρες ή σκουρόχρωμες.⁷⁰

3.2.1.2. Βιολογία της ιριδίζουσας πέστροφας

Η ανάπτυξη της Ιριδίζουσας Πέστροφας είναι ταχεία εφόσον τρέφεται με κατάλληλα τροφή. Τον πρώτο χρόνο το μήκος της φτάνει κάτω από τις ευρωπαϊκές συνθήκες εκτροφής στα 10-15cm, ενώ στη χώρα μας τα 17-22cm. Το σύνηθες μήκος της στη φύση είναι 25-35 cm με μέγιστο τα 70 cm.

Η Ιριδίζουσα Πέστροφα εμφανίζει μικρό μεταναστευτικό ρυθμό και συνήθως ζει στα ρέματα των ορεινών και ημιορεινών περιοχών καθώς και σε ποτάμια και λίμνες.

Τα γεννητικά ώριμα άτομα, αναγνωρίζονται από τη συμπεριφορά τους και από τα δευτερεύοντα γεννητικά χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα, η πλευρική κόκκινη γραμμή είναι ζωηρότερη στα θηλυκά, ενώ στα αρσενικά άτομα προχωρημένης ηλικίας, η άκρη της κάτω γνάθου μοιάζει με άγκιστρο. Τα θηλυκά επίσης έχουν ογκώδη κοιλιά, ενώ ο γεννητικός πόρος είναι κόκκινος.

Περιβαλλοντικές και διατροφικές συνθήκες

Οι απαιτήσεις της Ιριδίζουσας Πέστροφας για νερό καλής ποιότητας είναι υψηλές καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου και αυτό γιατί η πέστροφα είναι ψυχρόφιλο είδος και έχει αυξημένες απαιτήσεις διαλυμένου στο νερό οξυγόνου. Διαμένει στα γλυκά νερά των ποταμών και λιμνών και εφόσον η θερμοκρασία της καλοκαιρινής περιόδου δεν υπερβαίνει τους 12°C. Στα υδροστάσια και τις δεξαμενές εκτροφής, όμως, η Ιριδίζουσα Πέστροφα έχει προσαρμοστεί σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών και η βέλτιστη θερμοκρασία εκτροφής φαίνεται να είναι μεταξύ 14-16 °C.

Πίνακας 3.8: Παράμετροι ποιότητας νερού για την ανάπτυξη Ιριδίζουσας Πέστροφας.⁸²

Παράμετρος	Διακυμάνσεις
Διαλυμένο οξυγόνο	5,5 mg/L και άνω έως κορεσμού
Θερμοκρασία	10-18 °C
pH	6,4-8,4
Ολική σκληρότητα (CaCO ₃)	10-400 ppm
Ασβέστιο	4-160 ppm
Μαγγάνιο	0-0,01 ppm
Ολικός σίδηρος	0-0,15 ppm
Φωσφόρος	0,01-3,0 ppm
Νιτρικά	0-3,0 ppm
Ψευδάργυρος	0-0,05 ppm
H ₂ S	<0,1 ppm
CO ₂	<10 ppm

Η καλύτερη ποιότητα του νερού για την εκτροφή της πέστροφας είναι αυτή που προέρχεται από λίμνες και ποτάμια. Είναι ανθεκτική σε μεγάλες διακυμάνσεις αλατότητας από καθαρό γλυκό μέχρι και θαλασσινό των 35 psu, δεδομένου ότι είναι ένα ανάδρομο ψάρι και μεταναστεύει στη θάλασσα για αναζήτηση τροφής. Στα αλμυρά νερά αναπτύσσεται μέχρι τη γενετική της ωριμότητα, οπότε επιστρέφει στα γλυκά νερά για την απελευθέρωση των αυγών. Οι πέστροφες προτιμούν διακυμάνσεις των τιμών pH από 6,4 έως 8,4, ενώ τιμές μεταξύ 7 και 7,5 θεωρούνται ιδανικές.⁸²

Γεωγραφία

Η Ιριδίζουσα Πέστροφα είναι αυτόχθονο είδος στα εσωτερικά νερά της περιοχής του Ειρηνικού της Βόρειας Αμερικής από την Αλάσκα έως το Μεξικό. Μέχρι το 1984 είχε εισαχθεί σε όλα τα εσωτερικά νερά των ηπείρων εκτός της

Ανταρκτικής, αρχικά με εμπλουτισμό των ορεινών ρεόντων υδάτων λιμνών και ποταμών και στη συνέχεια για υδατοκαλλιεργητικούς σκοπούς.⁸²

3.2.2. Σολομός Ατλαντικού (*Salmo salar*)

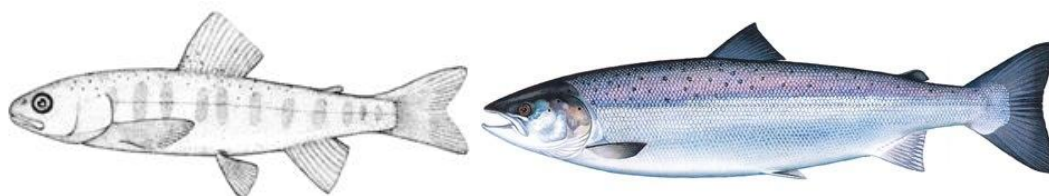
3.2.2.1.Μορφολογικά Χαρακτηριστικά Σολομού Ατλαντικού

Ο Σολομός Ατλαντικού είναι ο τυπικός αντιπρόσωπος της οικογένειας των σολομοειδών. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του είναι το τορπιλοειδές σχήμα του σώματός του, που το βοηθά να κολυμπά γρήγορα.⁸¹

Ο Σολομός του Ατλαντικού είναι ένα σχετικά μεγάλο ψάρι με μέσο μήκος τα 71-75 cm και μέσο βάρος τα 3,6-5,4 kg. Το σώμα του είναι στενόμακρο και ατρακτοειδές με μακρύ ρύγχος. Ο χρωματισμός του σώματος αλλάζει ανάλογα με το στάδιο ζωής του ψαριού. Το χρώμα του ενήλικου ατόμου που βρίσκεται στο θαλασσινό νερό είναι πράσινο-μπλε ραχιαία που γίνεται ασημένιο στα πλάγια του ψαριού και λευκό στην κοιλιά. Χαρακτηριστικά είναι τα μαύρα στίγματα σχήματος X που έχει στην ραχιαία επιφάνειά του και σπανίως κάτω από την πλάγια γραμμή. Κατά την αναπαραγωγική περίοδο τα ψάρια χάνουν την ασημένια λάμψη τους και γίνονται πιο καφετί ή κιτρινωπά. Τα αρσενικά άτομα μπορεί να έχουν και κόκκινους -πορτοκαλί χρωματισμούς ή να αποκτούν μεγάλα σκούρα στίγματα. Στο κεφάλι του είδους διακρίνεται ένα μεγάλο στόμα με καλά σχηματισμένα δόντια. Η άκρη της πάνω σιαγώνας φτάνει μέχρι και το πίσω όριο του ματιού και στα ενήλικα άτομα, πριν και κατά την διάρκεια της αναπαραγωγής, η άκρη στόματος επιμηκύνεται και γίνεται αγκιστρωτή (hooked). Στον κορμό του ψαριού βρίσκεται το ραχιαίο πτερύγιο τοποθετημένο περίπου στην μέση του και πίσω από αυτό το λιπώδες πτερύγιο. Η ουρά είναι ελαφρώς διχαλωτή ή τετράγωνη. Τα πνευλικά πτερύγια βρίσκονται κάτω από το ραχιαίο πτερύγιο και προς τα πίσω ενώ πίσω από αυτό βρίσκεται το εδραίο πτερύγιο. Ο σκελετός του αποτελείται από 58-61σπονδύλους. Τα λέπια που καλύπτουν το σώμα του είναι σχετικά μικρά. Χαρακτηριστικό είναι ότι η πλάγια γραμμή αποτελείται από 114-130 λέπια και η απόσταση μεταξύ της βάσης του λιπώδους πτερυγίου και της πλάγιας γραμμής καλύπτεται από 11-15 λέπια. Επίσης χαρακτηριστικός είναι ο αριθμός των βραγχιακών ακάνθων που κυμαίνεται από 17 ως 24.⁸¹

Πίνακας 3.9: Συστηματική κατάταξη του είδους Σολομού Ατλαντικού⁸²

Βασίλειο	Ζωικό
Ομοταξία	Οστεϊχθύες
Κλάση	Ακτινοπτερύγιοι
Τάξη	Σολομοειδή
Οικογένεια	<i>Salmonidae</i>
Γένος	<i>Salmo</i>
Είδος	<i>Salmo salar</i>



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση του είδους *Salmo salar*

Ανήκει στα ανάδρομα ψάρια, με αποτέλεσμα η ανάπτυξή του στο γλυκό νερό να είναι πολύ μικρή, ενώ στη θάλασσα πολύ μεγάλη. Ο σολομός πριν μεταναστεύσει στη θάλασσα διέρχεται από δυο στάδια με ανάλογο χρωματισμό, (α) το τέλειο ιχθύδιο (parr), όπου το ψάρι φτάνει τα 15 cm μήκος και (β) 'νεαρός' σολομός (smolt) όπου το ψάρι φτάνει στην ηλικία των δυο χρόνων και είναι έτοιμο να μεταναστεύσει στη θάλασσα.

Μετά τον πρώτο χρόνο παραμονής του στη θάλασσα αποκτά μήκος 50-65cm και βάρος 1,5 - 3,5kg, ενώ μετά το δεύτερο χρόνο αποκτά μήκος 90-105cm και βάρος 8-13kg. Αφού παραμένει στη θάλασσα 1-4 χρόνια ωριμάζει και είναι έτοιμο για την επιστροφή στο γλυκό νερό για αναπαραγωγή. Το μέγιστο μήκος του αρσενικού είναι 1,5 m και το βάρος περίπου 36kg, ενώ το θηλυκό σπάνια φτάνει τα 120 cm και το βάρος 20 kg. Η πιο συνηθισμένη ηλικία που ζουν είναι τα 5-7 χρόνια και η μέγιστη τα 10 χρόνια.

3.2.2.2. Βιολογία Σολομού Ατλαντικού

Ο σολομός είναι ανάδρομο ψάρι και περνάει μέρος της ζωής του τόσο στο γλυκό όσο και στο αλμυρό νερό. Τα θηλυκά άτομα γεννούν τα αυγά τους σε ποτάμια ή ρυάκια σε ένα βαθούλωμα που σκάβουν με την ουρά τους και στην συνέχεια το καλύπτουν με πέτρες. Αυτά γονιμοποιούνται αμέσως από τα αρσενικά και εκκολάπτονται σε 2 με 3 μήνες σε μικρούς διαφανής ιχθυονεοσσούς μήκους 1,5-2 εκ. Οι ιχθυονεοσσοί αυτοί τρέφονται από τον λεκιθικό σάκο και κρύβονται ανάμεσα στις πέτρες του βυθού μέχρι να μπορούν να τραφούν μόνοι τους, αρχικά ως ιχθύδια και αργότερα ως σολομίδια. Τα νεαρά αυτά άτομα τρέφονται με λάβρες εντόμων και μικρά ψάρια. Μετά από μερικά χρόνια (1-4) τα ψάρια κατεβαίνουν κατά κοπάδια στην θάλασσα όπου ολοκληρώνεται η ανάπτυξή τους. Στην θάλασσα αναζητούν βαθιά νερά και τρέφονται με ψάρια, καλαμάρια και γαρίδες. Μετά από 2-3 χρόνια επιστρέφουν πίσω στα ποτάμια όπου γεννήθηκαν για να αναπαραχθούν. Η αναπαραγωγική τους περίοδος είναι Οκτώβριο με Δεκέμβριο ενώ η περίοδος που κατεβαίνουν προς την θάλασσα είναι από Μάρτιο ως Ιούνιο.

Φυσιολογικές ανοχές

Οι συνθήκες του ενδιαιτήματος του ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του ψαριού. Τα αυγά γεννιούνται σε καθαρά γλυκά νερά που οξυγονώνονται αρκετά και με θερμοκρασία χαμηλότερη των 10°C. Σε ανάλογες συνθήκες βρίσκουμε και τους ιχθυονεοσσούς ενώ τα ιχθύδια τα συναντάμε σε καθαρά γλυκά νερά με μεγαλύτερη ροή (30-92 cm/sec) και βάθος 10-61 εκ. Σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης είναι πιο ανθεκτικά σε υψηλότερες θερμοκρασίες αλλά και πάλι η θερμοκρασία δεν μπορεί να ξεπερνά τους 21°C και αυτό μόνο για λίγες βδομάδες τον χρόνο. Ενήλικα άτομα που επιστρέφουν για την αναπαραγωγή τους τα βρίσκουμε σε θαλασσινό νερό θερμοκρασίας μικρότερης από 22,8°C και με περιεκτικότητα σε οξυγόνο μεγαλύτερη από 5 ppm.

Γεωγραφία

Η φυσική γεωγραφική του εξάπλωση είναι οι ακτές του βόρειου Ατλαντικού, τόσο δυτικά όσο και ανατολικά. Στην Ευρωπαϊκή ήπειρο συναντάται από τη Ρωσία (θάλασσα Μπέρινγκ), Νορβηγία, Βαλτική και κατά μήκος των ακτών έως και τη βόρεια Πορτογαλία. Επίσης στις ακτές της Ισλανδίας και της νότιας Γροιλανδίας, όπως επίσης και στις ακτές του Καναδά και των βορειοανατολικών ΗΠΑ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Ιχθυοκαλλιέργεια

4.1. Εισαγωγή

Η Ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί ένα σημαντικό τομέα, που καλύπτει τη συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση για τροφή παγκοσμίως. Σύμφωνα με επίσημα στοιχεία του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (FAO, 2010) οι υδατοκαλλιέργειες είναι ο ταχύτερα αναπτυσσόμενος παραγωγικός τομέας τροφίμων στον κόσμο. Συγκεκριμένα, από το 1 εκατ. τόνους ετήσια παραγωγή το 1950, έφτασε τους 52,5 εκατ. τόνους το 2008, αξίας 98,4 δισεκατομμυρίων δολαρίων. Συγχρόνως, αυξήθηκε η κατά κεφαλήν κατανάλωση υδρόβιων ζωικών οργανισμών από 0,7 kg το 1970 στα 7,8 kg το 2008, που αντιστοιχεί σε ετήσια αύξηση 6,6%. Στην παραγωγή αυτή επικεφαλής είναι οι χώρες της Ασίας και του Ειρηνικού με ποσοστό που φτάνει σε τόνους το 89% της ολικής παραγωγής και σε αξία το 79%.⁸²

Η υπολογιζόμενη, κατά την παρούσα περίοδο, ετήσια παγκόσμια παραγωγή σαρκοφάγων και παμφάγων ιχθύων, με την εφαρμογή κυρίως εντατικών και ημιεντατικών συστημάτων παραγωγής και με τη χορήγηση ξηρών ιχθυοτροφών, ανέρχεται στο επίπεδο των περίπου 11 εκατ. τόνων. Θεωρώντας ως αρκετά ενδεικτικό μέσο όρο συντελεστή εκμεταλλεύσεως της χορηγούμενης τροφής το επίπεδο του 1,8, υπολογίζεται ότι η παγκοσμίως απαιτούμενη ετήσια ποσότητα ξηρών ιχθυοτροφών είναι της τάξεως των 19,8 εκατομμυρίων τόνων.⁷⁰

Τα τελευταία χρόνια έχουν μειωθεί τα διαθέσιμα αποθέματα ψαριών ελεύθερης αλιείας και ταυτόχρονα έχει αυξηθεί σημαντικά η κατανάλωση ψαριών. Το ζήτημα αυτό μπορεί να λυθεί μέσω της ιχθυοκαλλιέργειας, που βρίσκεται σε μια συνεχόμενη αύξηση τα τελευταία χρόνια. Η ιχθυοκαλλιέργεια έχει ως στόχο την ολοένα και μεγαλύτερη παραγωγή ψαριών με όσο το δυνατόν καλύτερη ποιότητα και μικρότερο κόστος.⁸³ Τα κυριότερα είδη ψαριών που παράγει η ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια είναι: Σολομός (*Salmo salar*), Πέστροφα (*Salmo trutta* και *Oncorhynchus mykiss*), Λαβράκι

(*Dicentrarchus labrax*), Τσιπούρα (*Sparus aurata*) και Κυπρίνο (*Cyprinus carpio*). Τα κυριότερα είδη ψαριών που προέρχονται από την ελεύθερη αλιεία στην Ευρώπη είναι: Τσιπούρα (*Sparus aurata*), Ρέγγα (*Clupea harengus*), Κολιός (*Scomber japonicus*) και Σαρδέλα (*Sardina pilchardus*).

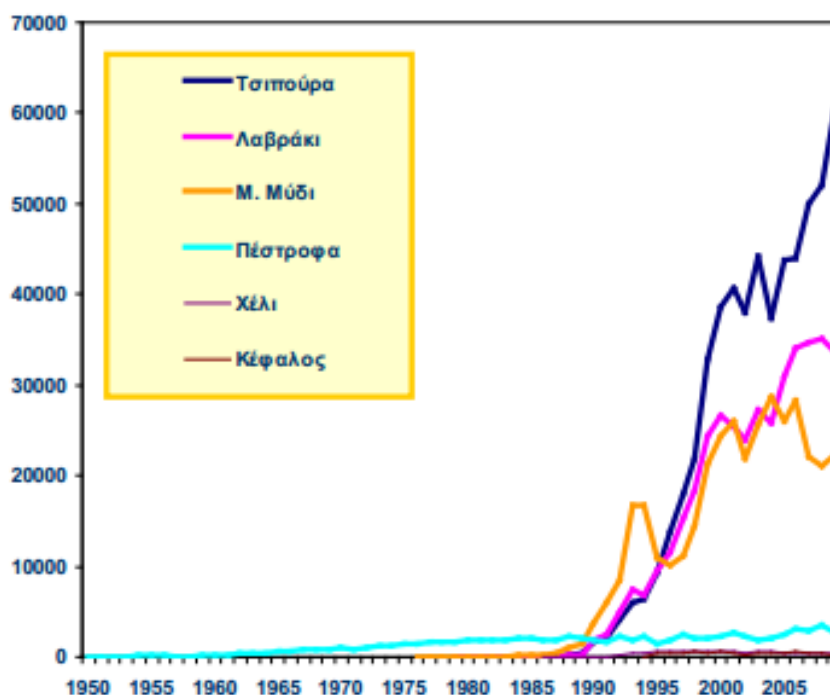
Ο ρόλος της ιχθυοκαλλιέργειας και η συμβολή της είναι σημαντική και καθοριστική στη βαθμιαία μείωση της προσφοράς αλιευμάτων που προέρχονται από τη συλλεκτική και ελεύθερη αλιεία των θαλασσών, στην τόνωση των τοπικών οικονομιών, στη δημιουργία νέων θέσεων εργασίας καθώς και στη προσφορά πρόσθετων αλιευτικών προϊόντων στην αγορά. Ο ρόλος της ενισχύεται και από το γεγονός ότι η συμβατική συλλεκτική αλιεία αντιμετωπίζει έντονα προβλήματα παραγωγής που οφείλονται κυρίως στην εντατική εκμετάλλευση των αποθεμάτων καθώς και στους κοινοτικούς περιορισμούς. Γίνεται λοιπόν αντιληπτό ότι η ιχθυοκαλλιέργεια στις μέρες μας γίνεται όλο και πιο σημαντική από τη στιγμή που η βαριά αλιεία όσο και η μόλυνση του νερού έχουν επηρεάσει τον φυσικό πληθυσμό των ψαριών.

4.2. Ιχθυοκαλλιέργεια στον ελλαδικό χώρο

Ο κλάδος των υδατοκαλλιεργειών στη χώρα μας παρουσιάζει ιδιαίτερη ανάπτυξη, με υψηλές παραγωγικές επιδόσεις. Η Ελλάδα είναι η βασική χώρα παραγωγός μεσογειακών ψαριών και διατηρεί σταθερά μερίδιο της τάξης του 50% της παγκόσμιας παραγωγής.

Σύμφωνα με στοιχεία της Ελληνικής Εταιρίας Στατιστικών και Οικονομικών Πληροφοριών (Hellastat A.E.) οι προοπτικές για τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας αναμένεται να είναι ιδιαίτερα ευνοϊκές με προβλεπόμενη ετήσια αύξηση της παραγωγής κατά 5%. Κύριοι λόγοι στους οποίους βασίζονται οι θετικές αυτές προβλέψεις είναι η μείωση των αλιευμάτων, λόγω ρυθμιστικών και περιβαλλοντικών παραγόντων, η αυξανόμενη έμφαση για την υγιεινή διατροφή, η όλο και μεγαλύτερη εξοικείωση του καταναλωτικού κοινού με τους ιχθύες ιχθυοκαλλιέργειας, οι πιο έντονες διαφημιστικές ενέργειες των εταιρειών, η διεύρυνση των αλιευμάτων σε νέες αγορές του εξωτερικού, η ανάπτυξη καλλιέργειας νέων ειδών και η υψηλή τεχνογνωσία και η μακροχρόνια εμπειρία των εταιρειών του κλάδου. Σε γενικές γραμμές, η

ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα επικεντρώνεται στην παραγωγή γόνου και ιχθύων τσιπούρας και λαβρακίου, ενώ γίνονται συνεχείς προσπάθειες και έρευνα από τις εταιρείες του κλάδου, με στόχο την ανάπτυξη της καλλιέργειας νέων ειδών (μυτάκι, λυθρίνι, φαγκρί, σαργός, συναγρίδα).



Σχήμα 4.6: Τα βασικότερα εκτρεφόμενα είδη της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας (FAO, 2011)

4.3. Ιχθυοκαλλιέργεια στην Ευρώπη

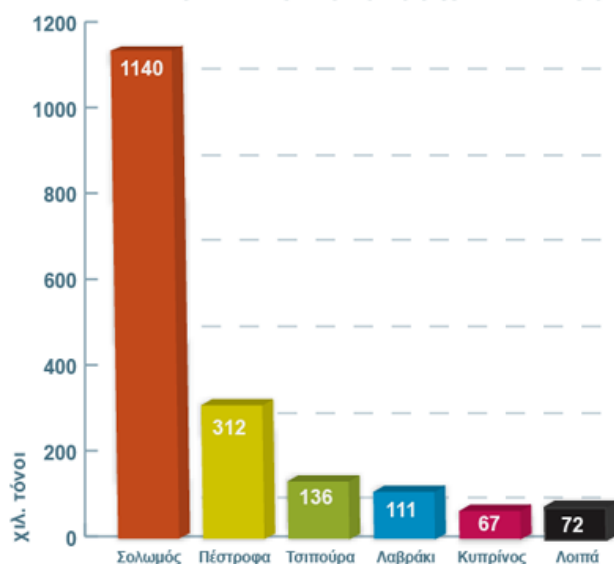
Σύμφωνα με τα τελευταία επίσημα στατιστικά στοιχεία (2009), η υδατοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει περίπου το ένα τέταρτο της παραγωγής ψαριών, μαλακοστράκων και μαλακίων της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ), ενώ το υπόλοιπο προέρχεται από την αλιεία. Το ποσοστό αυτό αντιστοιχεί σε περίπου 1,3 εκατομμύριο τόνους τροφίμων.

Η δεύτερη μεγαλύτερη ιχθυοπαραγωγός ζώνη του κόσμου, περίπου το 16% της παγκόσμιας παραγωγής ψαριών προερχόμενων από ιχθυοκαλλιέργειες, είναι η περιοχή της Ευρώπης. Οι χώρες που πρώτες ανέπτυξαν την παραγωγή ψαριών στο θαλάσσιο περιβάλλον ήταν οι Σκανδιναβικές και η Μεγάλη Βρετανία. Αρχικά με το σολομό και την πέστροφα και αργότερα με την

τσιπούρα και το λαβράκι. Τα τελευταία είκοσι χρόνια ο ετήσιος ρυθμός ανάπτυξης της ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας ξεπερνά το 9%. Στην Ευρώπη καταναλώνονται περίπου 9 εκατ. τόνοι ψάρια το χρόνο. Εφόσον όμως η αλιεία της είναι μόνο 6 εκατ. τόνοι, εκ των οποίων 1,4 εκατ. τόνοι εξάγονται, είναι υποχρεωμένη να εισάγει 4 εκατ. τόνους για να καλύψει τη ζήτηση της. Προς το παρόν παράγει 0,4 εκατ. τόνους μέσω των ιχθυοκαλλιεργειών και εισάγει τα υπόλοιπα.

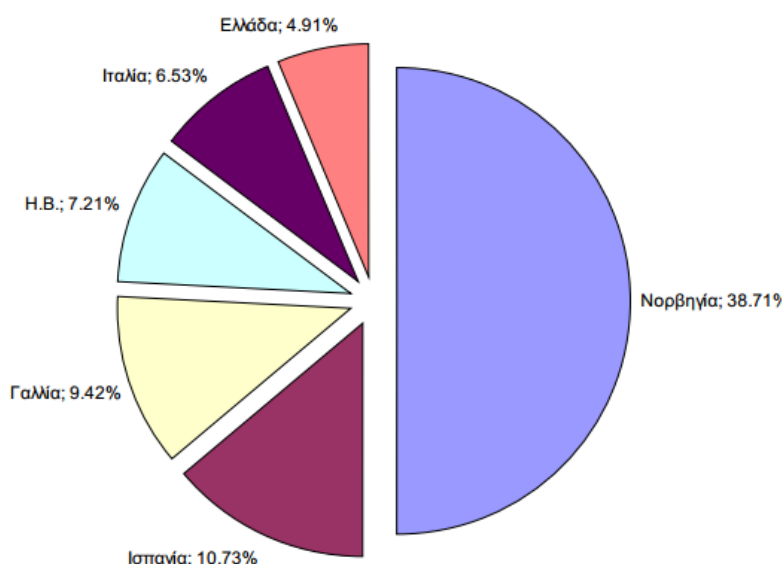
Η ευρωπαϊκή παραγωγή υδατοκαλλιέργειας παρέμεινε σχετικά σταθερή κατά την περίοδο 1995 έως 2010, κυμαινόμενη μεταξύ 1,2 και 1,4 εκατομμυρίων τόνων. Έφθασε το 1,26 εκατομμύρια τόνους το 2010, δηλαδή το 20,3% του συνόλου της αλιευτικής παραγωγής. Η αξία της ευρωπαϊκής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας έφθασε τα 3,1 δισ. ευρώ το 2010, το 70% της οποίας αντιστοιχεί σε ψάρια και το 30% σε καρκινοειδή και μαλάκια. Η υδατοκαλλιέργεια στην ΕΕ εστιάζεται κατά κύριο λόγο σε τέσσερα είδη: μύδια, πέστροφα, σολομό και στρείδια. Ωστόσο πρόοδος έχει σημειωθεί και στην παραγωγή άλλων ειδών όπως η τσιπούρα, το λαβράκι και το καλκάνι.

FEAP 2010 - Ευρωπαϊκή παραγωγή ιχθυοκαλλιέργειας



Σχήμα 4.7: Απεικόνιση της ευρωπαϊκής παραγωγής ιχθύων ιχθυοκαλλιέργειας (FEAP 2010)

Οι βασικοί παραγωγοί υδατοκαλλιέργειας μεταξύ των κρατών μελών είναι η Ισπανία, η Γαλλία, το Ηνωμένο Βασίλειο, η Ιταλία και η Ελλάδα, που από κοινού αντιστοιχούν περίπου στο 75% της συνολικής παραγωγής υδατοκαλλιέργειας το 2010. Ωστόσο, αν ληφθεί υπόψη η ποιότητα της παραγωγής, η Γαλλία είναι ο κύριος παραγωγός (21%) και ακολουθεί το Ηνωμένο Βασίλειο (19%) και η Ισπανία (12%). Τα δίθυρα μαλάκια (μύδια, στρείδια και κυδώνια) κυριαρχούν στην Ισπανία, τη Γαλλία και την Ιταλία. Το Ηνωμένο Βασίλειο παράγει κατά βάσει σολομό, ενώ η Ελλάδα παράγει κυρίως τσιπούρα και λαβράκι.



Σχήμα 4.8: Σημαντικότερες χώρες για τη Ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια (FAO, 2011)

Σε παγκόσμιο επίπεδο, η ανάπτυξη είναι ακόμα πιο σημαντική. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO), από τα 118 εκατομμύρια τόνους ψαριών, μαλακίων και μαλακοστράκων που καταναλώθηκαν παγκοσμίως το 2009, τα 55 εκατομμύρια, ή σχεδόν το ήμισυ αυτών, προέρχονταν από την υδατοκαλλιέργεια. Από το 2000, η εν λόγω παραγωγή αυξήθηκε κατά περίπου 35 %. Η ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια δεν ακολουθεί αυτή την γενική τάση, διότι έχει παραμείνει στάσιμη τώρα και αρκετά χρόνια.

4.4. Ιχθυοκαλλιέργεια σε γλυκά νερά

Η εκτροφή ψαριών σε γλυκά νερά στην Ελλάδα, ξεκίνησε στις αρχές της δεκαετίας του '60, με την εκτροφή της πέστροφας, ιδρύοντας τον πρώτο κρατικό ιχθυογεννητικό σταθμό, στις πηγές του ποταμού Λούρου, κοντά στα Ιωάννινα. Στη συνέχεια αυτή η δραστηριότητα επεκτάθηκε σε ολόκληρη την περιοχή της Ηπείρου, της Μακεδονίας, καθώς και σε άλλες περιοχές της χώρας, κυρίως στην Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο.

Σήμερα στην Ελλάδα λειτουργούν περίπου 100 μονάδες εκτροφής πέστροφας, καταμεμημένες κυρίως στις περιοχές της Ηπείρου και της Μακεδονίας, χρησιμοποιώντας τα νερά των ποταμών Λούρο και Βοϊδομάτη, καθώς και άλλων μικρότερων ποταμιών, ακόμα και φυσικών πηγών ή γεωτρήσεων, για την λειτουργία αυτών των μονάδων.

Η ετήσια παραγωγή στην Ελλάδα ανέρχεται συνολικά σε περίπου 3.000 τόνους, όταν στην Ευρώπη γενικώς, η παραγωγή της πέστροφας, σε ετήσια βάση, ανέρχεται στους 220.000 τόνους, με πρωτοπόρους τη Γαλλία, τη Δανία, τη Γερμανία, την Ιταλία, καθώς και την Ισπανία.

4.5. Ιχθυοκαλλιέργεια σε θαλασσινό νερό

Η μεγάλη ανάπτυξη του κλάδου παρατηρήθηκε μετά το 1985, όταν η χώρα προώθησε την ανάπτυξη των θαλασσοκαλλιεργειών. Ο κλάδος αυτός μέσα σε 25 χρόνια σταθερής ανοδικής πορείας, έδωσε εντυπωσιακά αποτελέσματα, όχι μόνο μέσω της παραγωγής φρέσκου και ανταγωνιστικού σε τιμή ψαριού, αλλά και λόγω της δημιουργίας ενός ολόκληρου κοινωνικο - οικονομικού οικοδομήματος. Σήμερα στον τομέα υδατοκαλλιεργειών απασχολούνται άμεσα περί τα 9.500 άτομα σε μόνιμη και εποχική απασχόληση και έμμεσα άλλα 10.000 άτομα, σε βιοτεχνίες, βιομηχανίες, υπηρεσίες, υποστήριξη.

Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Γεωργίας, στις αρχές του 2007 σε ολόκληρη την Ελληνική επικράτεια λειτουργούσαν 314 μονάδες εκτροφής και 40 ιχθυογεννητικοί σταθμοί που ελέγχονταν από 125 εταιρείες - ομίλους. Η συνολική ετήσια παραγωγή έτοιμου προϊόντος τα τελευταία χρόνια εκτιμάται ότι φτάνει και ξεπερνά τους 100.000 τόνους, ενώ αντίστοιχα η συνολική

παραγωγή γόνου των ελληνικών ιχθυογεννητικών σταθμών εκτιμάται ότι κυμαίνεται στα 400-420 εκατομμύρια ιχθύδια ετησίως.

Στην Ελλάδα αλλά και γενικότερα στη Μεσόγειο, καλλιεργούνται σε μαζική κλίμακα τσιπούρες, λαβράκια και ούγκενες (αλλιώς χιόνες ή μυτάκια). Αυτά τα τρία είδη αποτελούν το 98% της συνολικής ετήσιας παραγωγής ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας. Καλλιεργούνται επίσης αλλά σε πολύ μικρότερη κλίμακα, λυθρίνια και σαργοί και ακόμα, σε κάποιες περιοχές της Ελλάδας, κέφαλοι. Αυτά αποτελούν το υπόλοιπο 2% της συνολικής ετήσιας παραγωγής. Σε πειραματικό στάδιο και σε αμελητέες ποσότητες, παράγονται ακόμα φαγγριά, συναγρίδες, μουρμούρες, μελανούρια, σηκιόι.

Πλέον τα ψάρια της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας αποτελούν ένα από τα τέσσερα σημαντικότερα εξαγόμενα αγροτικά προϊόντα της χώρας (μαζί με το ελαιόλαδο, τον καπνό και το βαμβάκι), ενώ κατά τα τελευταία τέσσερα χρόνια (με εξαίρεση το 2005) καταλαμβάνουν σταθερά την 2η θέση στο σύνολο των Ελληνικών εξαγωγών αγροτικών προϊόντων.

4.6. Μια τυπική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας

4.6.1. Επιλογή θέσης εγκατάστασης

Είναι προφανές ότι η κατάλληλη θέση εγκατάστασης της μονάδας αποτελεί το κυριότερο πρόβλημα που θα αντιμετωπίσει ο ιχθυοτρόφος, δεδομένου ότι η θέση εκτροφής είναι εκείνη που τελικά καθορίζει τις συνθήκες εκτροφής, αλλά και το κόστος του εξοπλισμού που θα απαιτηθεί. Η επιλογή της θέσης εγκατάστασης μια μονάδας ιχθυοκαλλιέργειας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με το είδος του ψαριού που πρόκειται να εκτραφεί, καθώς κάθε ψάρι επηρεάζεται από άλλους παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν το κλίμα, τα χαρακτηριστικά εδάφους, την περιοχή, την ποσότητα και ποιότητα του νερού και άλλους βιολογικούς και οικονομικούς – κοινωνικούς παράγοντες.

4.6.2. Παραγωγικά στάδια σε μία τυπική μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας

Ο όρος υδατοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, κατά την οποία διατηρείται ο έλεγχος ολόκληρου ή

μέρους του κύκλου ζωής τους. Ο έλεγχος αυτός διακρίνει τις υδατοκαλλιέργειες από τις συμβατικές μεθόδους αλιείας, στις οποίες οι οργανισμοί συλλέγονται από φυσικά αποθέματα.

Το πρώτο στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας αφορά την παραγωγή γόνου, η οποία λαμβάνει χώρα στους ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Ένας σύγχρονος ιχθυογεννητικός σταθμός αποτελείται από το τμήμα γεννητόρων, το τμήμα λαρβών, το τμήμα ζωντανής τροφής και το τμήμα πάχυνσης.⁷⁰

Στο τμήμα γεννητόρων κάτω από απόλυτα ελεγχόμενες συνθήκες οι ιχθύες γεννούν τα αυγά (γεννήτορες). Στη συνέχεια στο τμήμα λαρβών, οι ιχθύες εκκολάπτονται και τα ιχθύδια τρέφονται αρχικά με ζωντανή τροφή και μετά τον απογαλακτισμό τους με βιομηχανική τροφή. Στο τμήμα ζωντανής τροφής παράγεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες φυτοπλαγκτόν για το πρώτο στάδιο διατροφής των λαρβών. Τέλος, στο τμήμα πάχυνσης, πραγματοποιείται η ολική προετοιμασία του γόνου μέχρι να μεταφερθεί στους ιχθυοκλωβούς για την τελική πάχυνσή του σε έτοιμο ιχθύ.⁸⁴ Στο στάδιο αυτό, τα ιχθύδια (γόνοι) μεταφέρονται από τους ιχθυογεννητικούς σταθμούς στις μονάδες πάχυνσης και τοποθετούνται σε πλωτά κλουβιά με δίκτυα ή σε δεξαμενές. Εκεί εκτρέφονται μέχρι να φτάσουν σε εμπορεύσιμο μέγεθος. Οι ιχθυοτροφές που χρησιμοποιούνται παρασκευάζονται από ιχθυάλευρα και έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και βιταμίνες.

4.6.3. Θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια σε κλωβό

Τα ψάρια διατηρούνται σε αγκυροβολημένους κλωβούς και συγκρατούνται στην επιφάνεια από ένα πλωτό πλαίσιο από πλαστικό, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.5. Η εν λόγω μορφή εκτροφής ασκείται κυρίως σε προστατευόμενες περιοχές κοντά στην ακτή, αλλά οι πιο εξελιγμένες τεχνικές (καταδυόμενοι κλωβοί, τηλεπαρακολούθηση, αυτόματη σίτιση, κ.λπ.) καθιστούν εφικτή την απομάκρυνση από αυτές. Αυτή η μορφή ιχθυοκαλλιέργειας χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτροφή του σολομού του Ατλαντικού, του λαβρακίου, της τσιπούρας, του μαγιάτικο, κ.λπ.



Εικόνα 4.5: Θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια σε κλωβό

4.6.4. Εντατική υδατοκαλλιέργεια σε γλυκά ύδατα

Στα εντατικά συστήματα, τα ψάρια εκτρέφονται σε δεξαμενές μέχρι να αποκτήσουν το εμπορεύσιμο μέγεθος. Υπάρχουν δύο τεχνικές: της συνεχούς ροής (οι δεξαμενές τροφοδοτούνται μέσω του νερού του ποταμού στα ανάντη-τμήματα του ποταμού προς τις πηγές- και του το επιστρέφουν στα κατάντη-τμήματα του ποταμού προς τις εκβολές) και της ανακυκλοφορίας (το νερό παραμένει σε κλειστό κύκλωμα και ανακυκλώνεται για να μπορεί να «ανακυκλοφορεί» στις δεξαμενές). Τα συστήματα ανακυκλοφορίας έχουν μεγαλύτερο κόστος, επιτρέπουν όμως τον καλύτερο έλεγχο των συνθηκών εκτροφής (θερμοκρασία, οξυγόνο) και της ποιότητας νερού. Αυτή η μορφή ιχθυοκαλλιέργειας χρησιμοποιείται κυρίως για την εκτροφή της ιριδίζουσας πέστροφας και του χελιού.



Εικόνα 4.6: Εντατική υδατοκαλλιέργεια σε γλυκά ύδατα

4.7. Εκτροφή σολομοειδών

Από τα σολομοειδή δυο είδη εκτρέφονται ευρύτατα στον κόσμο: η Ιριδίζουσα Πέστροφα, *Oncorhynchus mykiss* και ο Σολομός Ατλαντικού, *Salmo salar*. Είναι τα κυριότερα μεταναστευτικά ψάρια μαζί με τα χέλια. Τα μεταναστευτικά ή διάδρομα είδη μετακινούνται μεταξύ των γλυκών και θαλασσινών νερών στη διάρκεια της ζωής τους. Η μορφή της μετανάστευσης διαφέρει ανάμεσα στα ψάρια του γλυκού και του θαλασσινού νερού, είναι διαφορετική για κάθε είδος ψαριού και παρουσιάζει εποχιακή και βιολογική ιδιαιτερότητα. Οι αποστάσεις που καλύπτουν κατά τις μεταναστευτικές κινήσεις διαφέρουν. Σε όλες τις περιπτώσεις τα μεταναστευτικά είδη υφίστανται μεγάλες βιολογικές μεταβολές που τους επιτρέπουν να μετακινηθούν από τα γλυκά στα αλμυρά νερά. Ανάλογα με την φορά της μεταναστευτικής κίνησης χαρακτηρίζονται ως ανάδρομα ή κατάδρομα.⁸²

Στα ανάδρομα είδη ανήκουν τα μισά του συνόλου των μεταναστευτικών ψαριών, όπως τα περισσότερα σολομοειδή, οι οξύρυγχοι και μερικά είδη της οικογένειας *Clupeidae*. Τα ανάδρομα είδη δαπανούν συνήθως το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους στη θάλασσα και μεταβαίνουν στα ποτάμια και στις λίμνες για αναπαραγωγή στις περιοχές που εκκόλαφθηκαν τα αυγά τους. Μετά την εκκόλαψη των αυγών τους τα ανάδρομα είδη περνούν μέρος της

ζωής τους στα γλυκά νερά για την αναπαραγωγή τους. Μετά την ωοτοκία μερικά πεθαίνουν ενώ άλλα είδη πραγματοποιούν αυτό το ταξίδι πολλές φορές στη ζωή τους.⁸²

Στην Ελλάδα από τα σολομοειδή εκτρέφονται κυρίως η Ιριδίζουσα Πέστροφα στις βόρειες περιοχές της χώρας (Ήπειρο, Μακεδονία και Θράκη). Η κύρια όμως περιοχή είναι η Ήπειρος, όπου κατά μήκος του Λούρου και του Βοϊδομάτη έχει αναπτυχθεί το 70% περίπου της ελληνικής πέστροφοκαλλιέργειας. Κατά μήκος το ποταμού Λούρου λειτουργούν είκοσι μονάδες σε απόσταση 20 km, οι οποίες στην πλειονότητα τους ξαναχρησιμοποιούν το ίδιο νερό. Ο Σολομός Ατλαντικού δεν εκτρέφεται στην Ελλάδα. Στην χώρα μας εκτρέφεται ο σολομός κόχο (*Oncorhynchus kisutsch*), του Ειρηνικού ωκεανού. Έχει εισαχθεί στην χώρα μας από τα 1986 σε μονάδα εκτροφής στον Γοργοπόταμο.⁸²

Η εκτροφή της πέστροφας είναι ευρύτατα διαδεδομένη τόσο στο βόρειο όσο και στο νότιο ημισφαίριο (Αυστραλία, Νέα Ζηλανδία) παράλληλα με την εκτροφή του σολομού.⁸²

4.7.1. Υδατοκαλλιέργειες

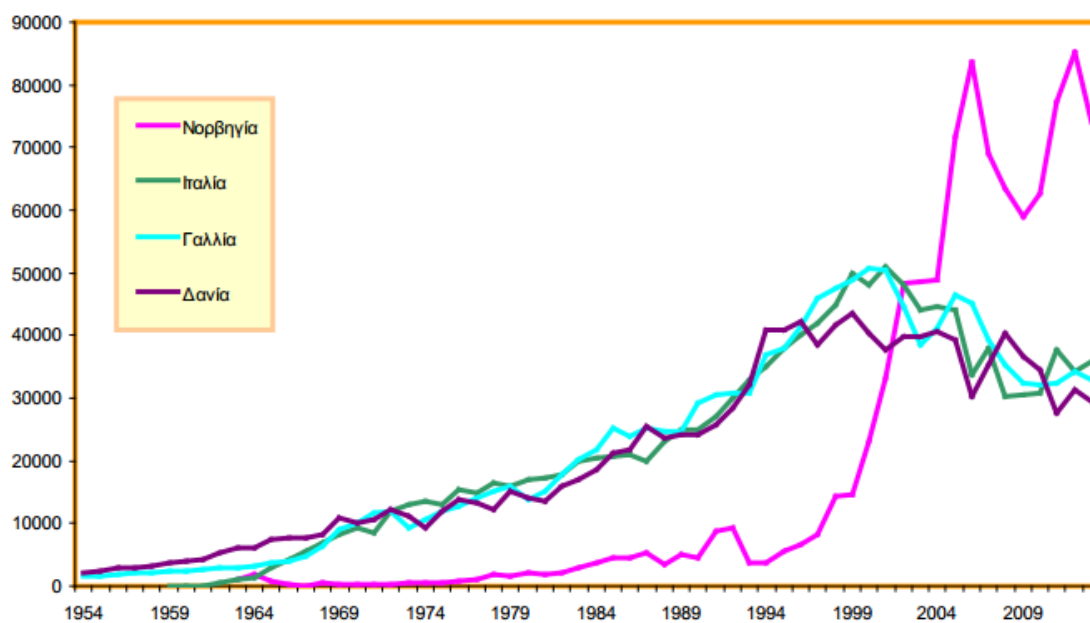
4.7.1.1. Υδατοκαλλιέργεια Ιριδίζουσας Πέστροφας

Η πέστροφα είναι ένα ανθεκτικό ψάρι που είναι εύκολο να αναπαραχθεί. Αναπαράγεται γρήγορα και είναι ανεκτική σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι ανήκει στην κατηγορία των ανάδρομων ψαριών. Η καλλιέργεια πέστροφας ως κλάδος πρωτογενούς παραγωγής, έκανε τα πρώτα της βήματα στις αρχές τις δεκαετίας του '60. Η συνολική παραγωγή της εκτρεφόμενης ιριδίζουσας πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss*, στην Ελλάδα ανέρχεται στους 3.643 τόνους ετησίως, αξίας 10 εκατομμυρίων ευρώ.⁸⁵



Εικόνα 4.7: Παραγωγές χώρες Ιριδίζουσας Πέστροφας (FAO Fishery Statistics, 2006)

Το 2009, οι κύριες παραγωγί χώρες στην ΕΕ είναι η Νορβηγία, η Ιταλία, η Γαλλία, η Δανία, η Γερμανία και η Ισπανία. Οι εισαγωγές προέρχονται κυρίως από την Τουρκία.



Σχήμα 4.9: Παραγωγή Ιριδίζουσας Πέστροφας (FAO, 2011)

4.7.1.2. Περιγραφή υδατοκαλλιέργειας Ιριδίζουσας Πέστροφας

Η εκτροφή της πέστροφας πραγματοποιείται σε μια μεγάλη ποικιλία εγκαταστάσεων. Αρχικά, για την εκτροφή χρησιμοποιήθηκαν χωμάτινα υδροστάσια στα οποία ο πυθμένας είχε κατάλληλη κλίση, ώστε το νερό που περιείχαν να εκκενώνεται με τη βαρύτητα. Εκτός από τα χωμάτινα υδροστάσια είχαν χρησιμοποιηθεί και ειδικές δεξαμενές, η μία συνέχεια της άλλης, οι γνωστές ως raceway. Οι εγκαταστάσεις αυτές είναι τοποθετημένες σε φαράγγι ώστε να αξιοποιείται το άφθονο νερό. Είναι συνήθως τσιμεντένιες δεξαμενές, στις οποίες το νερό εισέρχεται διαδοχικά από η μία δεξαμενή στην άλλη. Τέλος, η πέστροφα μπορεί να εκτραφεί σε ιχθυοκλωβούς στη θάλασσα, κυρίως σε περιοχές της Βόρειας Ευρώπης, όπου επικρατούν μειωμένες τιμές αλατότητας σε σχέση με τις ελληνικές θάλασσες.⁸²

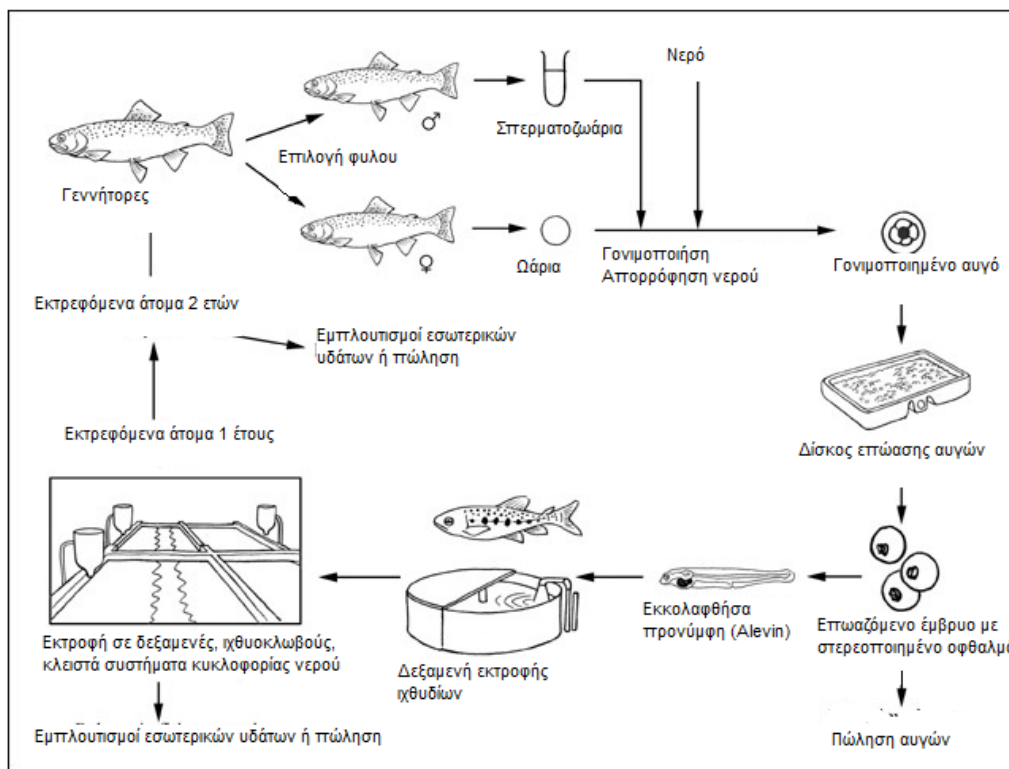
4.7.1.3. Εκτροφή Ιριδίζουσας Πέστροφας

Οι γόννοι πέστροφας εκτρέφονται σε στρογγυλές δεξαμενές από υαλοβάμβακα ή σκυρόδεμα στις οποίες υπάρχει τακτικό ρεύμα και ομοιόμορφη κατανομή των γόννων.

Οι γόννοι εκκολάπτονται με λεκιθικό σάκο που περιέχει την τροφή που χρειάζονται για την αρχική ανάπτυξή τους. Μόλις απορροφηθεί ο σάκος, τα ιχθύδια κολυμπούν προς την επιφάνεια προς αναζήτηση τροφής και αρχίζουν να ρυθμίζουν την πλευστότητά τους. Τρέφονται με μικρές νιφάδες (ιδιοσκευάσματα ζωοτροφής) που περιέχουν πρωτεΐνες, βιταμίνες και έλαια. Η χορήγηση τροφής δια χειρός προτιμάται κατά τα πρώτα στάδια της εκτροφής ώστε να αποφευχθεί ο υπερσιτισμός. Τα ιχθύδια σιτίζονται στη συνέχεια με μικρούς σβώλους έως ότου να φτάσουν τα 50 γραμμάρια σε βάρος και τα 8 έως 10 εκατοστά σε μήκος.

Στο σημείο αυτό τα νεαρά ψάρια μεταφέρονται σε μονάδες πάχυνσης, είτε σε πλωτούς κλωβούς σε λίμνες είτε, συχνότερα, σε δεξαμενές τοποθετημένες μέσα σε ποτάμια. Οι δεξαμενές αυτές που έχουν γενικά ορθογώνιο σχήμα και κατασκευάζονται από σκυρόδεμα λειτουργούν βάσει δύο τεχνικών: συνεχούς ροής, ενός ανοικτού συστήματος μέσω του οποίου το νερό του ποταμού εισέρχεται στις μονάδες μέσω ενός διαδρόμου· ή επανακυκλοφορίας, ενός

κλειστού συστήματος που συνίσταται στην κυκλοφορία νερού στις δεξαμενές και στην ανακύκλωσή του ή ενός συστήματος μερικής ανακυκλοφορίας. Το πλεονέκτημα της ανακυκλοφορίας είναι ότι η θερμοκρασία του νερού δύναται να ελέγχεται κατά τη διάρκεια όλου του έτους, οπότε τα υγρά που εκρέουν στο περιβάλλον είναι πολύ περιορισμένα.



Εικόνα 4.8: Αναπαραγωγικός κύκλος της Ιριδίζουσας Πέστροφας, *Oncorhynchus mykiss* (FAO, 2007)

Η πέστροφα καλλιεργείται επίσης σε πλωτούς κλωβούς στη θάλασσα, στα χαμηλής περιεκτικότητας σε αλάτι νερά της Βαλτικής και στα προστατευμένα νερά των σκανδιναβικών φιόρδ, καθώς και έξω από τις δυτικές ακτές της Σκωτίας και της Ιρλανδίας. Στο θαλασσινό νερό, οι πέστροφες ακολουθούν διατροφή παρόμοια με αυτή του σολομού, η οποία προκαλεί το ροζ χρώμα στο κρέας τους.

Όταν τα ψάρια φτάσουν σε εμπορεύσιμο βάρος, οι πέστροφες συλλέγονται με δίχτυ ή διοχετεύονται στην ξηρά.

4.7.2.1. Υδατοκαλλιέργεια Σολομού Ατλαντικού

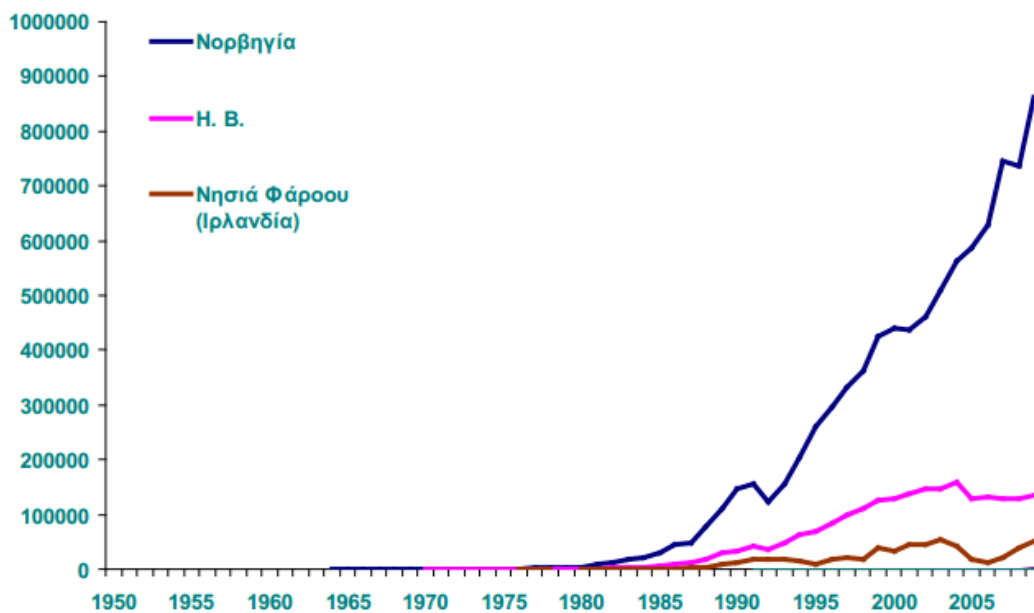
Η υδατοκαλλιέργεια του Σολομού του Ατλαντικού δεν είναι καινούρια ιδέα και χρονολογείται στις αρχές του 19ου αιώνα στο Ηνωμένο Βασίλειο. Η πρώτη όμως οργανωμένη προσπάθεια εκτροφής σολομού σε κλουβιά μέσα στην θάλασσα με σκοπό την εκτροφή του σε εμπορεύσιμο μέγεθος έγινε την δεκαετία του '60 στην Νορβηγία με θεαματικά αποτελέσματα. Σύντομα το παράδειγμα αυτό ακολούθησαν κι άλλες χώρες και σήμερα ο σολομός που παράγεται με ιχθυοκαλλιέργεια είναι 1.000.000 τόνοι ετησίως που αντιστοιχεί στο 50% της συνολικής αγοράς σολομού.

Οι παραγωγές χώρες σολομού φαίνονται στο παρακάτω σχήμα, με κυρίαρχες χώρες την Νορβηγία και την Χιλή με 35.4% και 28% της παγκόσμιας καλλιέργειας σολομού αντίστοιχα. Η Ευρώπη (πλην της Νορβηγίας) παράγει συνολικά 18.9% ενώ η παραγωγή της Ασίας και της βόρειας Αμερικής είναι 7.9 και 7.4% αντίστοιχα.



Εικόνα 4.9: Παραγωγές χώρες Σολομού Ατλαντικού (FAO Fishery Statistics, 2006)

Οι μεγαλύτερες αγορές καλλιεργούμενου σολομού είναι η Ιαπωνία, η ευρωπαϊκή ένωση και η Βόρεια Αμερική.



Σχήμα 4.10: Παραγωγή Σολομού Ατλαντικού (FAO, 2011)

4.7.2.2. Περιγραφή υδατοκαλλιέργειας Σολομού Ατλαντικού

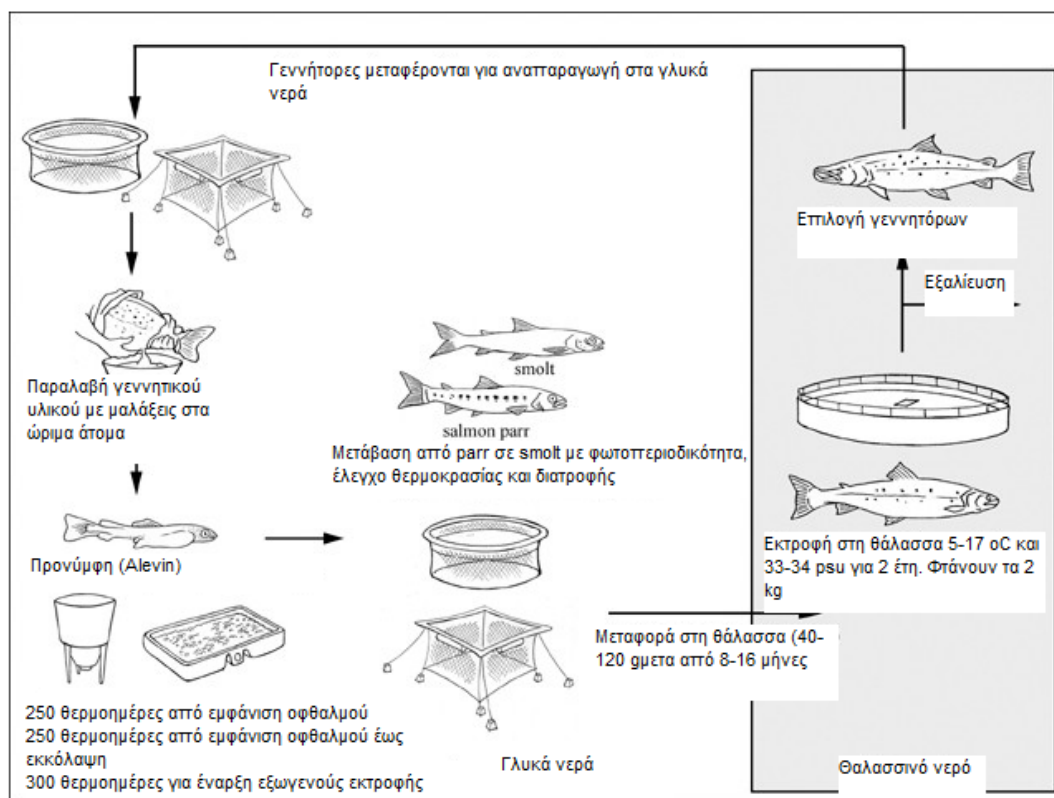
Η εντατική εκτροφή του Σολομού του Ατλαντικού πραγματοποιείται κυρίως σε μονάδες πλωτών ιχθυοκλωβών. Η εκτροφή του ξεκίνησε στα γλυκά νερά τον 19^ο αιώνα στο Ηνωμένο Βασίλειο. Οι πλωτοί ιχθυοκλωβοί χρησιμοποιήθηκαν για την εκτροφή του τη δεκαετία του 1960 στη Νορβηγία και στη συνέχεια εξαπλώθηκαν στη Σκωτία και την Ιρλανδία. Σήμερα εκτρέφεται στα νησιά Φερόε, στον Καναδά, στις ακτές των ΗΠΑ, στη Χιλή, τη Νέα Ζηλανδία και την Τασμανία.⁸²

4.7.2.3. Εκτροφή Σολομού Ατλαντικού

Για την εξασφάλιση της επιτυχίας της γονιμοποίησης απαραίτητη προϋπόθεση είναι η σωστή επιλογή των γεννητόρων, οι οποίοι προέρχονται κυρίως από ιχθυοκαλλιέργεια. Έχει παρατηρηθεί ότι το μέγεθος των αυγών και η ανθεκτικότητα τους έχουν να κάνουν με το μέγεθος των θηλυκών ατόμων, όπως και η ποιότητα του σπέρματος με το μέγεθος των αρσενικών. Κατάλληλη ηλικία για τα θηλυκά ψάρια είναι κάτω των 6 ετών και για τα αρσενικά 2-4 ετών.

Αφού επιλεγούν οι σωστοί γεννήτορες τοποθετούνται σε δεξαμενές ή κλουβιά με φρέσκο νερό για περίπου 2 μήνες πριν πάρουμε το γενετικό υλικό από τα ψάρια. Τα αυγά γονιμοποιούνται επικαλύπτοντας τα με το σπέρμα του αρσενικού, ανακατεύονται καλά και τοποθετούνται σε κουβά με νερό. Αφού αναδευτεί προσεκτικά το διάλυμα αφήνεται να ηρεμήσει και αντικαθίσταται το νερό, αρκετά συχνά ώστε να αποφευχθεί η θολερότητα του. Στην συνέχεια τα γονιμοποιημένα αυγά αφού πλυθούν προσεκτικά και καταμετρηθούν τοποθετούνται σε ειδικούς δίσκους επώασης. Η φύλαξη των αυγών γίνεται στο σκοτάδι σε θερμοκρασίες κάτω των 10°C. Για την γονιμοποίηση αυγών από τέσσερα θηλυκά χρειάζεται σπέρμα από 2 αρσενικά.

Το στάδιο της επώασης ξεκινά με την εμφάνιση ματιών στα γονιμοποιημένα αυγά ακολουθεί η επώασή τους και η απορρόφηση του λεκιθικού σάκου. Καθώς απορροφάται ο λεκιθικός σάκος η προνύμφη επιμηκύνεται και αποκτά πιο χαρακτηριστική εμφάνιση, ο πεπτικός σωλήνας ανοίγει και το ιχθύδιο μπορεί να απελευθερωθεί στις δεξαμενές προπάχυνσης και να τραφεί με τροφή.



Εικόνα 4.10: Αναπαραγωγικός κύκλος του Σολομού Ατλαντικού, *Salmo Salar* (FAO, 2007)

Τα παραγόμενα ιχθίδια μεγαλώνουν σε δεξαμενές βάθους 25-35 εκ., σε νερό πλούσιο σε ανθρακικό ασβέστιο και οξυγόνο (9mg/L). Τα ιχθύδια μεγαλώνουν σε νεαρά ψάρια ένα χρόνο μετά την εκκόλαψή τους σε φυσιολογικές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού κάτι που όμως μπορεί να επιταχυνθεί με τεχνίτη μεταβολή των συνθηκών του περιβάλλοντός τους.

Τα νεαρά ψάρια 40-120g μεταφέρονται σε περιβάλλον με θαλασσινό νερό αφού πρώτα ελεγχτεί η ικανότητά τους επιβίωσης στο θαλασσινό νερό. Η μεταφορά τους γίνεται συνήθως σε θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες αλλά μπορεί να γίνει και σε χερσαίες που αντλούν το νερό από την θάλασσα. Ο σολομός μεγαλώνει καλύτερα σε νερό με θερμοκρασία 6-16°C, αλατότητας 30-33% και περιεκτικότητας σε οξυγόνο 8ppm. Τα ψάρια φτάνουν το ιδανικό μέγεθος μετά από 2 περίπου χρόνια.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Λειτουργικές Ιχθυοτροφές - Ελιά και απόβλητα ελαιοτριβείου

5.1. Εισαγωγή

Οι ιχθυοκαλλιέργειες, ετησίως, παρέχουν τεράστιες ποσότητες ψαριών στο καταναλωτικό κοινό. Για την σύνθεση, όμως, των ιχθυοτροφών απαιτούνται εξίσου μεγάλες ποσότητες αλιευμάτων- με την μορφή ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων. Σύμφωνα με πρόσφατα στοιχεία της Greenpeace, για την παραγωγή ενός κιλού σολομού, απαιτούνται 4 με 5 κιλά άλλων ψαριών για ιχθυοτροφή, με αποτέλεσμα να αυξάνεται η αλιευτική πίεση σε αυτά τα είδη.

Την τελευταία δεκαετία έχει σημειωθεί αύξηση της τάξεως του 10%, στην αλίευση ψαριών για την ανθρώπινη κατανάλωση. Συγχρόνως, όμως, χρησιμοποιούνται τεράστιες ποσότητες ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων για την παρασκευή των ιχθυοτροφών, καθώς αποτελούν την βασική πηγή πρωτεϊνών και των λιπιδίων για τα ψάρια. Η ζήτηση ιχθύων προς ανθρώπινη κατανάλωση, αλλά και των υποπροϊόντων τους για την παρασκευή ιχθυοτροφών αυξάνεται με ταχείς ρυθμούς. Οι τρέχουσες εκτιμήσεις υποστηρίζουν ότι οι απαιτήσεις για τις ιχθυοτροφές θα μπορούσαν να υπερβούν τα παγκόσμια αποθέματα ιχθυελαίων και ιχθυαλεύρων εντός των επόμενων δύο έως οκτώ ετών, αντίστοιχα.⁸⁶

5.2. Μορφή και σύσταση ιχθυοτροφής

Τα σιτηρέσια ξηρών ιχθυοτροφών αποτελούν το σημαντικότερο είδος ιχθυοτροφής. Αυτός ο τύπος χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλα τα είδη εκτρεφόμενων ιχθύων, κατά τη μεγαλύτερη περίοδο της εκτροφής τους.

Σε γενικές γραμμές η τροφή των ψαριών περιέχει πρωτεΐνες (55%), λίπη (11%), ίνες (3%), μεταλλικά στοιχεία (13%) και νερό (10%). Η σύσταση της διαφέρει ελαφρά σε σχέση με το μέγεθος των ψαριών και το ίδιο ισχύει για την μορφή με την οποία παρέχεται. Μέχρι και το μέγεθος των 8 γραμμαρίων η τροφή παρέχεται στα ιχθύδια σε μικρούς κόκκους ενώ όσο τα ψάρια

μεγαλώνουν έχει τη μορφή pellets, δηλαδή τεμαχίων διαφόρων μεγεθών που ξεκινούν από τα 1,5 χιλιοστά και φθάνει τα 4,5 χιλιοστά όταν τα ψάρια ξεπεράσουν το μέγεθος των 100 γραμμαρίων. Η πρώτη ύλη των ιχθυοτροφών είναι ψάρια (ιχθυάλευρα 50%, λίπη ψαριών 7%), τα φυτά, κυρίως η σόγια (μέχρι 25%), το σιτάρι (μέχρι και 20%), και οι μικροοργανισμοί όπως σακχαρομύκητες με τη μορφή μαγιάς για την παροχή των απαραίτητων βιταμινών.

Πίνακας 5.10: Τυπική χημική σύσταση ανά 100g και θρεπτική αξία των σημαντικότερων ζωοτροφών που χρησιμοποιούνται κατά την κατάρτιση σιτηρεσιών (κυρίως σαρκοφάγων εκτρεφόμενων ιχθύων)⁷⁰

Ζωοτροφές	ΞΟ	ΟΑΟ	ΟΛΟ	ΙΟ	Τ	ΣΕ
Ιχθυάλευρο	92,0	65,5	4,1	1,0	14,8	19,0
Οστεοκρεατάλευρο	93,0	50,3	9,7	2,2	30,8	15,9
Άλευρο υπ. Γαρίδων	90,0	44,2	3,9	14,0	27,9	12,1
Άλευρο υπ. πνηνοσφαγείων	93,0	62,8	13,1	2,2	14,9	20,6
Βαμβακάλευρο	91,0	41,1	1,5	12,1	6,5	15,4
Σιτάλευρο	89,0	18,4	4,4	7,3	4,6	15,7
Άλευρο αραβοσίτου	92,0	27,1	9,5	9,1	4,4	17,6
Άλευρο ηλίανθου	93,0	40,8	2,9	11,3	7,5	14,7
Άλευρο λιναριού	90,0	36,5	15,0	10,0	6,0	18,7
Άλευρο σόγιας	90,0	49,9	1,3	5,9	6,3	17,1

ΞΟ: Ξηρά ουσία (g/100g), ΟΑΟ: Ολικές αζωτούχες ουσίες/πρωτεΐνες, ΟΛΟ: Ολικές λιπαρές ουσίες/λίπη, ΙΟ: Ινώδεις ουσίες, Τ: Τέφρα, ΣΕ: Συνολική ενέργεια (MJ/kg)

5.3. Ιχθυέλαια και ιχθυάλευρα

Παραδοσιακά οι σημαντικότερες πρώτες ύλες για την σύνθεση των ιχθυοτροφών είναι οι θαλάσσιες πρώτες ύλες με την μορφή ιχθυαλεύρων ή ιχθυελαίων. Οι θαλάσσιες πρώτες ύλες προέρχονται από τα πελάγια είδη ψαριών με μικρά οστά (συνήθως σαρδέλες και ρέγκες), τα οποία αποτελούν

επίσης τη φυσική τροφή των ψαριών όπως ο σολομός, η πέστροφα, ο μπακαλιάρος και άλλα σαρκοφάγα είδη ψαριών, που σπάνια χρησιμοποιούνται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Μια ακόμα πηγή θαλάσσιων πρώτων υλών είναι τα υποπροϊόντα από την βιομηχανία επεξεργασίας ψαριών. Αυτό το είδος ιχθυοτροφής περιέχει όλα τα απαραίτητα λιπαρά οξέα για την ομαλή ανάπτυξή τους. Η παραγωγή ιχθυελαίων που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ιχθυοτροφών καταλαμβάνει σήμερα το 75% (0,96 εκατομμύρια τόνοι) της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυελαίων. Είναι προφανές λοιπόν ότι η αντικατάσταση των ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές είναι πλέον αναγκαία.⁸³

Η συνολική παγκόσμια παραγωγή ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων είναι σήμερα σχετικά σταθερή σε περίπου 6.000.000 τόνους ιχθυάλευρων και 1.000.000 τόνου ιχθυελαίου ανά έτος. Το κύριο μερίδιο προέρχεται από την αλιεία ενώ τα υποπροϊόντα από την βιομηχανία επεξεργασίας αποτελούν το 15-20% της παγκόσμιας παραγωγής των θαλασσίων πρώτων υλών.

5.4. Ανάγκη αντικατάστασης ιχθυελαίων

Η παγκόσμια ανάπτυξη των ιχθυοκαλλιεργειών έχει δημιουργήσει την ανάγκη αυξημένης παραγωγής ιχθυελαίων, καθώς για την ανάπτυξη των εκτρεφόμενων ψαριών απαιτούνται μεγάλες ποσότητες ιχθυελαίου. Η παγκόσμια παραγωγή ιχθυάλευρων και ιχθυελαίων δεν μπορεί να αυξηθεί σημαντικά χωρίς να προκύψει κίνδυνος καταστροφής των φυσικών ιχθυαποθεμάτων.

Η μείωση των επιπέδων των διαθέσιμων άγριων ψαριών σε όλο τον κόσμο σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα εκτρεφόμενα σαρκοφάγα είδη απαιτούν μεγάλες ποσότητες άγριων ψαριών στη διατροφή τους δημιουργούν μια αναδυόμενη ανάγκη να εντοπιστούν και να αξιοποιηθούν εναλλακτικές πηγές λιπιδίων με υψηλή διατροφική αξία για τα εκτρεφόμενα ψάρια και στη συνέχεια τους ανθρώπους. Η χρήση τέτοιων πηγών θα μπορούσε να εξασφαλίσει τη βιώσιμη παραγωγή ιχθυοτροφών, και ως εκ τούτου των εκτρεφόμενων ψαριών, καθώς μειώνεται η ανάγκη για θαλάσσιες πρώτες ύλες. Μελέτες έδειξαν ότι ακόμα και με ένα μίγμα ιχθυελαίων και φυτικών ελαίων, ο

σολομός και η πέστροφα διατηρούν την ευεργετική τους επίδραση στην υγεία για την κατανάλωση από τον άνθρωπο μέσα από την περιεκτικότητά τους σε πρωτεΐνες, μεταλλικά στοιχεία και υγιεινά λιπαρά οξέα.

Η διαθεσιμότητα, η βιωσιμότητα, το κόστος και η θρεπτική αξία των ιχθυοτροφών αποτελούν παραμέτρους ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας. Το καταναλωτικό κοινό αναζητά τροφές σε λογικό κόστος.²¹ Έτσι ένας από τους άμεσους στόχους των βιομηχανιών είναι να μειώσει την εξάρτησή από τις θαλάσσιες πρώτες ύλες και συγχρόνως να βελτιώσει την ποιότητα των προϊόντων. Αυτό επιτυγχάνεται με το να συμπεριλαμβάνονται εναλλακτικές λύσεις όπως φυτικές πρωτεΐνες και έλαια, οι οποίες αποτελούν οικονομικότερες λύσεις σε σχέση με τα ιχθυάλευρα.⁸³

5.5. Φυτικά έλαια και επίδραση στους ιχθύες

Για να μειωθεί η εξάρτηση των ιχθυοκαλλιεργειών από τα ιχθυέλαια, έχουν πραγματοποιηθεί σημαντικές μελέτες τα τελευταία χρόνια. Υπάρχουν κάποιες ελπιδοφόρες και κυρίως βιώσιμες πηγές λιποειδών, όπως τα φυτικά έλαια. Η χρήση των φυτικών ελαίων ως βασικό συστατικό της τροφής ζώων και ψαριών έχει κάποια ισχυρά πλεονεκτήματα. Τα φυτά αυτά έχουν περιορισμένη εξάρτηση από το νερό, μεγάλη βιωσιμότητα και διαθεσιμότητα, καθώς αναπτύσσονται γρήγορα και τέλος δεν επηρεάζονται από τις κλιματικές αλλαγές. Μ' αυτό τον τρόπο οι βιομηχανίες μπορούν να μειώσουν το κόστος και να προσφέρουν βελτιωμένα προϊόντα. Τα πιο κοινά φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται για ιχθυοτροφές είναι η σόγια, ο λιναρόσπορος, η ελαιοκράμβη, το ηλιέλαιο, το φοινικέλαιο και το ελαιόλαδο.⁸³

Η χρήση των φυτικών ελαίων ως βασική πηγή λιποειδών στην τροφή των ιχθύων είναι περιορισμένη, καθώς τα λιπαρά οξέα που υπάρχουν στην τροφή θα πρέπει να είναι σε επαρκείς ποσότητες για την κάλυψη των αναγκών των ιχθύων.²¹ Η σύσταση των φυτικών ελαίων διαφέρει σημαντικά από αυτή των ιχθυελαίων. Τα φυτικά έλαια δεν διαθέτουν πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA λιπαρά οξέα >C₂₀ με >3 διπλούς δεσμούς), EPA και DHA που βρίσκονται σε υψηλές ποσότητες στα ιχθυέλαια. Αυτά τα λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την ομαλή ανάπτυξη των ιχθύων. Η έλλειψη αυτών από την

διατροφή των ιχθύων μπορεί να οδηγήσει σε προβλήματα ανάπτυξης ακόμα και στον θάνατο ιχθύων. Αντίθετα, τα φυτικά έλαια είναι πλούσια σε ω-6 και ω-9 λιπαρά οξέα κυρίως λινελαϊκό (18:2 ω-6) και ελαϊκό οξύ (18:1 ω-9) και διαθέτουν περιορισμένες ποσότητες ω-3 λιπαρών οξέων, κυρίως αλινολενικού οξέος (18:3 ω-3)

Πίνακας 5.11: Παγκόσμια παραγωγή σε εκατομμύρια τόνους από επιλεγμένα φυτικά έλαια από 2000-2006. (Malaysian Palm Oil Board, 2008)

Έτος	Φοινικέλαιο	Σογιέλαιο	Ηλιέλαιο	Ελαιόλαδο	Ιχθυέλαιο
2000	21.9	25.6	9.8	2.5	1.3
2001	24.0	27.8	8.2	2.8	1.2
2002	25.4	29.9	7.6	2.8	1.0
2003	28.3	31.2	8.9	2.9	1.0
2004	31.0	30.7	9.4	3.1	1.1
2005	33.8	33.6	9.8	3.0	1.0
2006	37.1	35.3	11.2	2.8	0.9

Το σογιέλαιο και το κραμβέλαιο θεωρούνται πιθανές εναλλακτικές πηγές λιπιδίων για ψάρια ανοιχτής θάλασσας και ιχθυοκαλλιέργειας, δεδομένου ότι είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), συγκεκριμένα σε λινελαϊκό (18:2 ω-6), και ελαϊκό οξύ (18:1ω-9), αλλά υστερούν σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.^{87, 88}

Ευρωπαϊοί μελετητές⁸⁹ έκαναν μια προσπάθεια ώστε να εκμεταλλευτούν τα θετικά στοιχεία που μπορεί να προσφέρει το ιχθυέλαιο στην διατροφή του σολομού, απομακρύνοντας όμως επιβλαβείς ενώσεις όπως σταθερούς οργανικούς επιμολυντές, σε συνδυασμό με μια εναλλακτική και πιο οικονομική πηγή λιπαρών οξέων, τα φυτικά έλαια. Εξέτρεφαν, έτσι, σολομό με καθαρό ιχθυέλαιο (FO), με ιχθυέλαιο χωρίς επιμολυντές και μείγμα από έλαιο σόγιας, ελαιοκράμβη και ιχθυέλαιο, το οποίο είναι πλούσιο σε PUFA. Κατέληξαν στο γεγονός ότι σε κάθε περίπτωση δεν επηρεάστηκε η σύνθεση των λιπαρών ελαίων των ψαριών, όπως επίσης και το βάρος τους. Παρατήρησαν ότι τα

επίπεδα των λιποειδών στο ήπαρ και λιγότερο στην σάρκα του ψαριού, ήταν χαμηλότερα στα εκτρεφόμενα ψάρια με φυτικά έλαια. Επίσης κατέληξαν ότι το έλαιο σόγιας είναι πλουσιότερο σε PUFA από την ελαιοκράμβη.

Έχει παρατηρηθεί, ότι το σογιέλαιο ενώ αποτελεί καλή πηγή λιπαρών οξέων για τα ψάρια συγχρόνως περιέχει αντιθρεπτικούς παράγοντες, όπως λεκτίνες, αναστολείς θρυψίνης (TI) και ολιγοσακχαρίτες (OLIG). Οι λεκτίνες είναι γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες δεσμεύουν τους υδατάνθρακες στην επιθηλιακή επιφάνεια του εντέρου παρεμβαίνοντας στην απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών, έτσι τα ψάρια (κυρίως πέστροφες και σολομοί) που έχουν τραφεί με προϊόντα σόγιας εμφανίζουν εντερικές βλάβες. Οι αναστολείς θρυψίνης αναστέλλουν τη δραστικότητα είτε της θρυψίνης είτε της θρυψίνης και της χυμοθρυψίνης στο γαστρεντερικό σωλήνα, παρεμβαίνοντας έτσι στην πέψη των πρωτεϊνών. Έπειτα από πειράματα σε σολομοειδή που εκτράφηκαν με τέτοιου είδους τροφές, κατέληξαν στο γεγονός ότι τα ψάρια ήταν λιποβαρή και δεν αναπτύσσονταν σωστά.⁹⁰ Έχει παρατηρηθεί επίσης ότι εκτρέφοντας σολομοειδή με φυτικά έλαια, μεταβάλλεται η έκφραση ορισμένων ηπατικών γονιδίων με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων των ψαριών.⁹¹

5.5.1. Έλαιο κράμβης

Το κραμβέλαιο προέρχεται από τους σπόρους ενός τύπου ελαιοκράμβης, γνωστό ως rapeseed. Επιστημονικά οι δύο βασικές ποικιλίες είναι η *Brassica napus* και η *Brassica rapa* και ανήκουν στη φυτική οικογένεια *Brassicaceae*. Το φυτό ευδοκίμει σε εύκρατα κλίματα και παράγει κίτρινα άνθη. Οι σπόροι του φυτού χρησιμοποιούνται στη παραγωγή του βρώσιμου λαδιού, το οποίο παράλληλα είναι κατάλληλο και για τη παραγωγή βιοκαυσίμου (biodiesel). Το εμπορικό όνομα canola είναι το αρκτικόλεξο από τις λέξεις “CANadian Oil, Low Acid” που πρωτοχρησιμοποιήθηκε το 1978, για να υποδηλώσει τη διαφορετικότητα του από το αυθεντικό κραμβέλαιο, που περιέχει φυσικά υψηλές ποσότητες του τοξικού ερουκικού οξέος.⁹²

Το κραμβέλαιο αποτελεί το 16% της παγκόσμιας παραγωγής φυτικού ελαίου, τρίτο μετά το σογιέλαιο και το φοινικέλαιο, ενώ το στερεό υπόλειμμα

επεξεργασίας ελαιοκράμβης αποτελεί παγκοσμίως το 12% της πρωτεΐνης για τη διατροφή των ζώων.

5.5.1.1. Έλαιο κράμβης ως υποκατάστατο των ιχθυελαίων

Ερευνητές που έκαναν πειράματα σε σολομό, εκτρεφόμενος με διάφορες αναλογίες ιχθυελαίου και κραμβέλαιου (RO) κατέληξαν ότι όσο αυξάνεται η ποσότητα RO στη διατροφή των ψαριών, τόσο μειώνεται το 20:5 (ω-3) και 22:6 (ω-3), αλλά αυξάνεται το 18:2 (ω-6), έτσι ώστε το ποσοστό ω-3/ω-6 PUFA να μειώνεται στα 2/3.^{93, 94}

Μελέτες έγιναν σε Ιριδίζουσα Πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), σχετικά με την επίδραση των φυτικών ελαίων και ιχθυελαίων στην λιποειδική και πρωτεϊνική οξειδωση της πέστροφας. Τα ψάρια εκτράφηκαν με ιχθυέλαια και μείγμα ελαιοκράμβης. Η αντικατάσταση του ιχθυελαίου με ελαιοκράμβη, έδειξε ότι αυξήθηκε η ποσότητα του λινελαϊκού οξέος 18:2 ω-6, ενώ μειώθηκε το EPA (20:5 ω-3) και το DHA (22:6 ω-3). Όταν η ποσότητα των ιχθυελαίου ήταν χαμηλή, τότε το α-λινολενικό οξύ (18:3 ω-3) φαίνεται πως διατηρούνταν σε σταθερά επίπεδα, ενώ σε αντίθετα συμπεράσματα κατέληξαν για το EPA και DHA. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει μια αλλαγή στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων της πέστροφας, όταν ένα μεγάλο ποσοστό ιχθυαλεύρου ή ιχθυελαίου έχει αντικατασταθεί από φυτική πρωτεΐνη.⁹⁵

5.5.2. Ελαιοπυρήνας ως υποκατάστατο των ιχθυελαίων

Ο ελαιοπυρήνας περιέχει μικρή ποσότητα ελαιολάδου, ενώ κυρίως αποτελείται από νερό, φλοιό και σάρκα ελιάς, θραύσματα και κομμάτια των πυρήνων. Η χημική σύσταση του ελαιοπυρήνα χαρακτηρίζεται από υψηλή περιεκτικότητα σε ακατέργαστες ίνες και σάκχαρα (κυρίως πολυσακχαρίτες) και μικρότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες, λιπαρά οξέα (ελαϊκό οξύ, 18:1 ω-9), πολυαλκοόλες, πολυφαινόλες και άλλες χρωστικές.²⁶ Επίσης περιέχονται ενώσεις με αντιοξειδωτική δράση και μικρό-συστατικά με αθηροπροστατευτική δραστηριότητα, όπως παρεμποδιστές του PAF.²⁵

Ο ελαιοπυρήνας ως συστατικό για την διατροφή των ιχθύων συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα. Το κόστος του είναι σχεδόν μηδενικό, καθώς προέρχεται από την παραγωγή του ελαιολάδου και δεν απαιτείται περαιτέρω επεξεργασία. Αποτελεί θρεπτική τροφή για τα ψάρια, αφού περιέχει αντιοξειδωτικά συστατικά και ουσίες με παρεμποδιστική δράση στον PAF. Πρόσφατα, αποδείχτηκε ότι η μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου στην τσιπούρα και το λαβράκι βελτιώνει την ικανότητά τους για την πρόληψη της αθηρογένεσης και συνεπώς καρδιαγγειακών νοσημάτων.²¹ Στην περίπτωση της υποκατάστασης των ιχθυελαίων με ελαιοπυρήνα τα ποσοστά κυμαίνονται στο 8% και παρατηρούμε ότι ακόμα και σε τόσο χαμηλά ποσοστά υποκατάστασης μπορούμε να έχουμε ανάπτυξη των ιχθύων (τσιπούρας και λαβράκι) με γοργό ρυθμό.

Οι βιομηχανίες ελαιολάδου αντιμετωπίζουν τον ελαιοπυρήνα ως απόβλητο, έτσι τον απορρίπτουν στο περιβάλλον χωρίς επεξεργασία, με σαφές κίνδυνο μόλυνσης του υπόγειου υδροφόρου ορίζοντα. Έτσι η χρήση του ως ιχθυοτροφή θα μπορούσε εν μέρει να λύσει το πρόβλημα διαχείρισης των αποβλήτων των ελαιοτριβείων.

5.5.2.1. Ελαιοπυρήνας, απόβλητο της βιομηχανίας ελαιολάδου

Ο ελαιοπυρήνας και τα υγρά απόβλητα ελαιολάδου είναι τα δυο φυσικά υποπροϊόντα της παραγωγής ελαιολάδου, τα οποία προέρχονται από τριφασικό ή διφασικό σύστημα ελαιοτριβείου. Τα σύγχρονα διφασικά ελαιοτριβεία -περισσότερο κατάλληλα και φιλικά προς το περιβάλλον- συγχωνεύουν τα δυο υποπροϊόντα παρασκευάζοντας ένα τελικό προϊόν με περισσότερη υγρασία και λιγότερα ελαιώδη στοιχεία σε σχέση με αυτά που παράγονταν από το παραδοσιακό τριφασικό ελαιοτριβείο.²⁶

Τα απόβλητα των ελαιοτριβείων αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα ρύπανσης και ένα δυσεπίλυτο πρόβλημα στο χώρο των γεωργικών βιομηχανιών. Το κόστος της εγκατάστασης των μέχρι σήμερα προτεινόμενων συστημάτων επεξεργασίας αποβλήτων αποθαρρύνει τους ελαιοπαραγωγούς να αλλάξουν την υφιστάμενη πρακτική διαχείρισης που ακολουθούν, δηλαδή την απόρριψή τους σε παρακείμενους υδάτινους αποδέκτες (χείμαρρους,

ρέματα, θάλασσα κ.λπ.). Με τέτοιες όμως πρακτικές η διαχείριση των αποβλήτων από τα περισσότερα ελαιουργεία οδηγεί συχνά σε σημαντική περιβαλλοντική επιβάρυνση της περιοχής.



Εικόνα 5.11: Στερεά απόβλητα ελαιοτριβείου

Η ετήσια παραγωγή ελαιολάδου εκτιμάται ότι ανέρχεται στα 2,9 εκατομμύρια τόνους. Για κάθε 100 κιλά ελιές, παράγονται 35 κιλά ελαιοπυρήνα, θα μπορούσε, επομένως, να υποστηριχθεί ότι η παραγωγή ελαιοπυρήνα είναι βιώσιμη και είναι άμεσα διαθέσιμος για την παραγωγή οποιασδήποτε ζωοτροφής.²⁶



Εικόνα 5.12: Υγρά απόβλητα ελαιοτριβείου

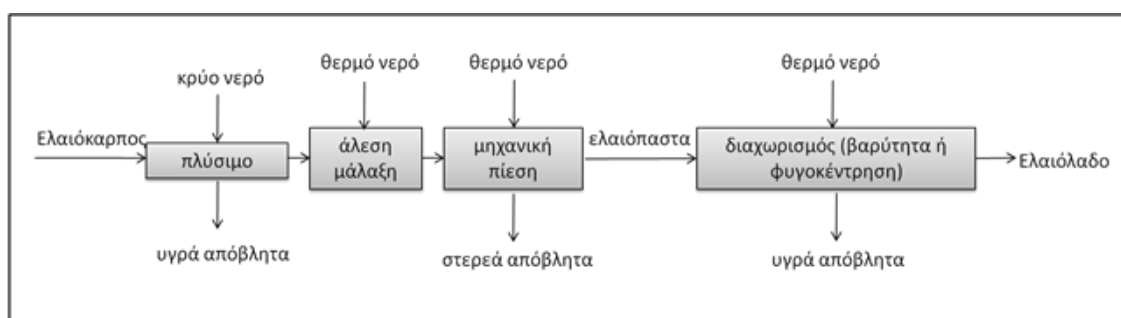
5.5.2.2. Συστήματα παραγωγής ελαιολάδου

Η εξαγωγή του ελαιολάδου από τον καρπό της ελιάς μπορεί να πραγματοποιηθεί με πίεση ή με φυγοκέντρηση. Τα φυγοκεντρικά συστήματα διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, δύο και των τριών φάσεων.⁹⁶ Στα συστήματα πίεσης και στα τριφασικά φυγοκεντρικά συστήματα, τα απόβλητα είναι και υγρά και στερεά (κασίγαρος και ελαιοπυρήνα) ενώ στα διφασικά συστήματα το απόβλητο που προκύπτει είναι υγρή ελαιοπυρήνα.

5.5.2.3. Παραδοσιακά συστήματα πίεσης

Στα κλασικά συγκροτήματα όπου εφαρμόζεται υψηλή πίεση στην ελαιοζύμη, το έλαιο διαχωρίζεται μηχανικά σε υδραυλικές πρέσες (σε πιέσεις που μπορεί να ανέλθουν ακόμη και σε 400 atm). Η τεχνική αυτή είναι η παλαιότερη και η χρήση της σήμερα είναι πολύ περιορισμένη. Η παραδοσιακή μέθοδος πίεσης παράγει το παρθένο ελαιόλαδο και δύο τύπους αποβλήτων, τα υγρά απόβλητα (απόνερα ή κασίγαρος) και τα στερεά απόβλητα (ελαιοπυρήνα).⁹⁶ Σε αυτή τη διαδικασία, η χυμώδης φάση διαχωρίζεται με πίεση, ενώ ο τελικός διαχωρισμός του ελαιολάδου από την υδατική φάση πραγματοποιείται με φυγοκέντρηση. Η διαδικασία παραγωγής φαίνεται αναλυτικά στο Σχήμα 5.11.

Για το λόγο ότι η διαδικασία παραγωγής των παραδοσιακών συστημάτων είναι ασυνεχής, δεν χρησιμοποιείται πλέον στη σύγχρονη βιομηχανία. Τα κλασικού τύπου ελαιοτριβεία αποτελούν μόνο το 20% του συνολικού αριθμού ελαιοτριβείων.



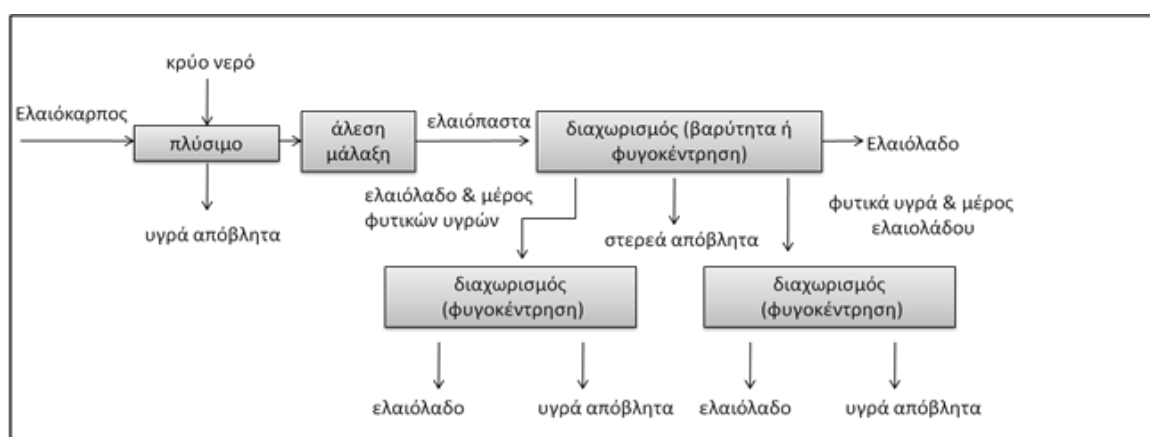
Σχήμα 5.11: Παραδοσιακό σύστημα πίεσης

5.5.2.4. Φυγοκεντρικά συστήματα τριών φάσεων

Η παραδοσιακή μέθοδος αντικαταστάθηκε εδώ και χρόνια από την τριφασική διαδικασία, και χρησιμοποιείται ευρέως ακόμα και σήμερα για την εξαγωγή του ελαιόλαδου. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται την διαφορά του ειδικού βάρους ανάμεσα στο νερό και στο λάδι. Χαρακτηριστικό αυτού του τύπου ελαιοτριβείο είναι η συνεχής ροή του υλικού από το στάδιο του καρπού ως τα τελικά προϊόντα, το ελαιόλαδο και την ελαιοπυρήνα.⁹⁶

Για τη άλεση του καρπού χρησιμοποιούνται μεταλλικοί σπαστήρες, με τους οποίους ρυθμίζεται το μέγεθος της λειοτρίβησης του ελαιοκάρπου. Ακολουθεί μάλαξη της ελαιοζύμης πριν εισαχθεί στο φυγοκεντρικό σύστημα. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται σε οριζόντια φυγοκεντρικά μηχανήματα. Σ' αυτό το στάδιο η ελαιοζύμη διαχωρίζεται σε φυτικά υγρά (νερό επεξεργασίας), ελαιόλαδο και ελαιοπυρήνα. Ο διαχωρισμός του ελαιόλαδου από τα υγρά απόβλητα γίνεται σε επόμενο στάδιο, με φυγοκεντρικό διαχωριστήρα, με βάση τη διαφορά ειδικού βάρους.

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της τριφασικής διαδικασίας παραγωγή ελαιόλαδου είναι οι αυξημένες ποσότητες υγρών αποβλήτων που παράγονται, λόγω της μεγάλης κατανάλωσης νερού συγκριτικά με την παραδοσιακή διαδικασία (1.25-1.75 φορές μεγαλύτερη κατανάλωση νερού)⁹⁶



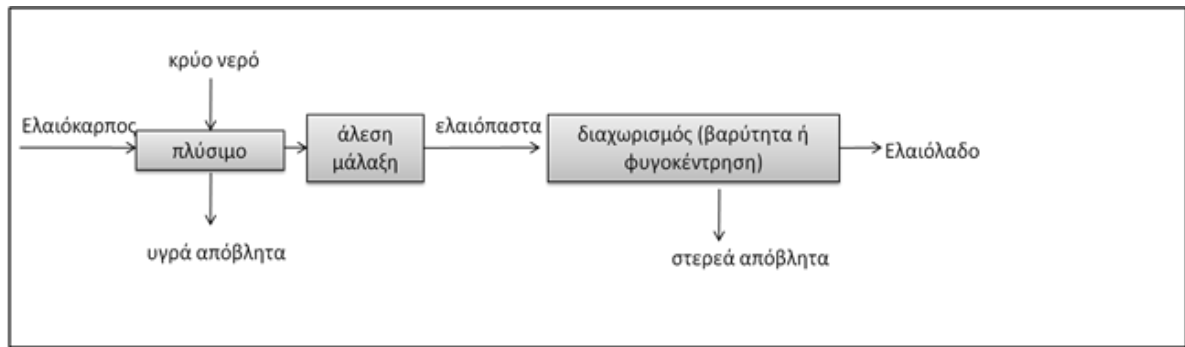
Σχήμα 5.12: Φυγοκεντρικό σύστημα τριών φάσεων

5.5.2.5. Φυγοκεντρικά συστήματα δυο φάσεων

Η μεγάλη ποσότητα υγρών αποβλήτων από την επεξεργασία τριών φάσεων, αποτέλεσε σοβαρό πρόβλημα για τις βιομηχανίες ελαιολάδου στις αρχές του 1990. Για το λόγο αυτό, το 1992 άρχισαν να προωθούνται νέοι τύποι φυγοκεντρικών μηχανημάτων που μπορούν να διαχωρίσουν την ελαιούχα φάση από την ελαιόπαστα χωρίς την προσθήκη νερού. Έτσι δεν παράγονται υγρά απόβλητα, καθώς ενσωματώνονται στον ελαιοπυρήνα, ο οποίος για το λόγο αυτό περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα υγρασίας.

Η διαδικασία της άλεσης του καρπού και η μάλαξη της ελαιοζύμης είναι παρόμοια με εκείνη της επεξεργασίας τριών φάσεων. Η μόνη διαφορά βρίσκεται στη φυγοκέντρηση της ελαιοζύμης και στον τελικό διαχωρισμό του ελαιολάδου. Η ελαιούχος φάση διαχωρίζεται από τον ελαιοπυρήνα (στον οποίο είναι ενσωματωμένα τα υγρά απόβλητα) με την επίδραση της φυγόκεντρου δύναμης, η οποία αυξάνει τη διαφορά ειδικού βάρους μεταξύ ελαιολάδου και υγρού ελαιοπυρήνα. Η διαδικασία πραγματοποιείται σε φυγοκεντρικό διαχωριστήρα με οριζόντιο άξονα. Σε επόμενο στάδιο η ελαιούχος φάση υποβάλλεται σε διαχωρισμό με φυγοκεντρικό διαχωριστήρα. Το νερό είναι το μόνο υγρό απόβλητο που παράγεται από με αυτή τη διαδικασία εξαγωγής ελαιολάδου.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα του συστήματος είναι η μειωμένη κατανάλωση νερού και η έλλειψη υγρών αποβλήτων παράλληλα όμως το πρόβλημα της διαχείρισης των αποβλήτων μετατοπίζεται από τα υγρά στα στερεά απόβλητα. Υπολογίζεται ότι για κάθε κιλό επεξεργασμένου ελαιοκαρπού παράγονται 800 κιλά υγρής ελαιοπυρήνας. Σοβαρό όμως μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η ελαιοπυρήνα που προκύπτει έχει αυξημένη υγρασία και είναι δύσκολη στο χειρισμό, στη μεταφορά και την επεξεργασία.⁹⁷



Σχήμα 5.13: Φυγοκεντρικό σύστημα δύο φάσεων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Σκοπός της εργασίας

Η Μεσογειακή Διατροφή όπως έχει ήδη αναφερθεί εκτενώς, έχει αποδειχτεί βάσει πολλών ερευνών ότι είναι ωφέλιμη για την υγεία του ανθρώπου, καθώς εμφανίζει ευεργετική δράση έναντι πολλών σοβαρών ασθενειών. Σημαντική θέση στην πυραμίδα της Μεσογειακής Διατροφής κατέχουν τα ψάρια, τα οποία αποτελούν μια πλούσια πηγή πρωτεϊνών υψηλής διατροφικής αξίας, απαραίτητων βιταμινών, μετάλλων και ιχνοστοιχείων, αλλά κυρίως αποτελούν εξαιρετική πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων.

Έτσι, αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η Ιριδίζουσα Πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και τρεις ομάδες Σολομού Ατλαντικού (*Salmo salar*), δυο βασικοί εκπρόσωποι της οικογένειας των σολομοειδών, όπως επίσης και οι αντίστοιχες τροφές αυτών. Σκοπός λοιπόν, της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της επίδρασης της διατροφής των ιχθύων στους ιχθύες, καθώς επίσης και η σύγκριση ιχθυοτροφών με διαφορετική σύνθεση. Για το λόγο αυτό κρίθηκε σκόπιμο να πραγματοποιηθεί ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών και ουδέτερων λιποειδών των δειγμάτων της ιχθυοτροφής της Πέστροφας και της Σολομιάς, ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών λιποειδών των δειγμάτων των ιχθυοτροφών των Σολομών και των Σολομιάς, όπως επίσης και η σύγκριση των αποτελεσμάτων των ιχθύων και των ιχθυοτροφών μελέτη των επιμέρους λιποειδών ως προς τη βιολογική δραστηριότητα τους δρώντας είτε ως αναστολείς είτε ως ανταγωνιστές του PAF, δρώντας κατά της αθηρογένεσης.

Λόγω τις εκτεταμένης χρήσης ιχθυελαίων για τη σύνθεση ιχθυοτροφών κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί ένα φυτικής προέλευσης προϊόν, ως συστατικό αντικατάστασης μέρους των ιχθυελαίων των ιχθυοτροφών. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τα ολικά, τα ολικά πολικά λιποειδή, όπως επίσης και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα ελαιοπυρήνα για την πιθανή δράση των συστατικών του έναντι της αθηρογένεσης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των πολικών λιποειδών του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

Πειραματικό Μέρος

7.1. Εκχύλιση Λιποειδών κατά Bligh-Dyer⁹⁸

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (CHCl_3 , CH_3OH , H_2O) αναλυτικής καθαρότητας
- 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

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 $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:2:0,8 (v/v/v), αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η έντονη ανάδευση επαναλαμβάνεται περιοδικά για διάστημα 20 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

$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ να γίνει 1:1:0,9 (v/v/v), οπότε σχηματίζονται δύο φάσεις διαλυτών. Η χλωροφορμική στιβάδα μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης απομακρύνεται με περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και σε θερμοκρασία 30 - 35°C. Τα λιποειδή μεταφέρονται με μικρή ποσότητα μίγματος χλωροφόρμιο:μεθανόλη (1:1 v/v) σε δοκιμαστικό σωλήνα για περαιτέρω επεξεργασία. Μικρή ποσότητα των ολικών λιποειδών ζυγίζεται και φυλάσσεται στους -20°C. Σε επόμενο στάδιο, η υπόλοιπη ποσότητα των ολικών λιποειδών πρόκειται να διαχωριστεί σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή με κατανομή κατ αντιρροή.

7.2. Κατανομή κατ' αντιρροή ⁹⁹

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, H_2O) αναλυτικής καθαρότητας
- Αέριο άζωτο
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Υάλινες πιπέτες Pasteur

Αρχή μεθόδου

Τα ολικά λιποειδή αναμιγνύονται με προεξισορροπημένους διαλύτες πετρελαϊκού αιθέρα και $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 87%, σε αναλογία 1:1. Δημιουργείται διφασικό σύστημα διαλυτών, όπου τα μεν πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, τα δε ουδέτερα λιποειδή στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα. Για τον ποσοτικό διαχωρισμό των δύο τάξεων η πορεία επαναλαμβάνεται τουλάχιστον 8 φορές.

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 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ και στη συνέχεια η άνω φάση που είναι ο εξισορροπημένος

πετρελαϊκός αιθέρας, για να ακολουθήσει η περαιτέρω κατεργασία των λιποειδών.

Τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 9mL πετρελαϊκού αιθέρα προεξισορροπημένου με αιθανόλη 87%. Στο διάλυμα προστίθενται 3mL αιθανόλης 87% προεξισορροπημένης με πετρελαϊκό αιθέρα. Μετά από ισχυρή ανάδευση, παραλαμβάνεται με πιπέτα Pasteur η αιθανολική (κάτω) φάση η οποία και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει επίσης 9mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθεί εκ νέου ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της αιθανολικής φάσης του 2^{ου} σωλήνα η οποία τοποθετείται σε ογκομετρική φιάλη. Στη συνέχεια, προστίθεται και πάλι στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα 3mL αιθανόλης 87% προεξισορροπημένης με πετρελαϊκό αιθέρα και επαναλαμβάνεται η παραπάνω διαδικασία. Η πορεία της κατανομής επαναλαμβάνεται συνολικά 8 φορές. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αιθανολική φάση (8×3mL), όπου περιέχονται τα πολικά λιποειδή σε ποσοστό >97%, εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο διαλύτη χλωροφορμίου:μεθανόλης αναλογίας 1:1 (v/v). Οι φάσεις του πετρελαϊκού αιθέρα (2×9mL), οι οποίες βρίσκονται στους πρώτους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες, περιέχουν τα ουδέτερα λιποειδή, και αφού ενωθούν σε ένα γυάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και έπειτα, αναδιαλύονται σε μικρό όγκο διαλύτη χλωροφορμίου:μεθανόλης αναλογίας 1:1 (v/v).

7.3. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) Λιποειδών^{100, 101}

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (ακετόνη, μεθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα λιποειδή: Merck, Supelco, Sigma
- Προσοφητικό υλικό: πηκτή SiO₂ (Silica gel G 60)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20×20 cm, 20×10 cm
- Φούρνος
- Φυγόκεντρος: Sorvall RC-5B Refrigerated, Du Pont
- Σωλήνες φυγόκεντρου

- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25×25×10 cm
- Θάλαμος ιωδίου

Αρχή Μεθόδου

Στην Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας, TLC, χρησιμοποιείται ως στατική φάση πυριτική πηκτή, έτσι ο διαχωρισμός ενός μίγματος λιπιδίων στα συστατικά του οφείλεται στη διαφορετική προσρόφηση της κάθε ομάδας λιπιδίων στην πηκτή. Με την χρήση της Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας, TLC επιτυγχάνονται καλύτεροι διαχωρισμοί απ' ό,τι με τη χρωματογραφία στήλης, δεν επιτρέπει όμως η TLC το διαχωρισμό μεγάλων ποσοτήτων λιπιδίων.

Αναλυτική πορεία

Επίστρωση και ενεργοποίηση των πλακών

Το πυριτικό οξύ αναμιγνύεται με νερό σε αναλογία 1:2 (w/v). Το διάλυμα που προκύπτει, αναδεύεται έντονα για 2 λεπτά και επιστρώνεται σε πλάκες διαστάσεων 20×20cm (και 20×10cm), με τη συσκευή Desaga, με πάχος επίστρωσης 0,5mm. Οι πλάκες παραμένουν για 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στεγνώσουν και στη συνέχεια ενεργοποιούνται με θέρμανση στους 120°C για 1 ώρα.

Προετοιμασία του θάλαμου χρωματογραφίας

Ο θάλαμος χρωματογραφίας γεμίζεται με το εξής σύστημα ανάπτυξης: χλωροφόρμιο:μεθανόλη:νερό (65:35:6 v/v/v) για την ανάλυση των πολικών λιπιδίων (TPL).

Ο θάλαμος καλύπτεται εσωτερικά με διηθητικό χαρτί και αφήνεται να κορεσθεί από τους διαλύτες.

Τοποθέτηση των δειγμάτων και ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων

Οι πλάκες χωρίζονται σε δύο ζώνες και το δείγμα τοποθετείται στην αριστερή πλευρά, με μορφή κηλίδας σε μία ευθεία νοητή γραμμή περίπου 2cm από το κάτω μέρος της πλάκας. Η δεξιά πλευρά των πλακών έχει χωριστεί σε επιμέρους ισοπαχείς ζώνες και εκεί τοποθετούνται επίσης με μορφή κηλίδας

τα πρότυπα δείγματα λιπιδίων. (Μετά την ανάπτυξη, η σύγκριση των Rf των προτύπων και των αγνώστων λιπιδίων εξυπηρετεί την ταυτοποίηση των τελευταίων). Χρησιμοποιούνται ως πρότυπα διαλύματα, διάλυμα φωσφατιδυλοχολίνης (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) και σφιγγομυελίνης (SM) για την ανάλυση των πολικών λιπιδίων (TPL). Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, οι πλάκες εισάγονται στους χρωματογραφικούς θαλάμους και αναπτύσσονται. Απομακρύνονται δε από αυτούς όταν ο διαλύτης φτάσει σε προκαθορισμένο σημείο στο πάνω μέρος της πλάκας.

Εμφάνιση των χρωματογραφημάτων

Όταν οι πλάκες στεγνώσουν, τοποθετούνται στο θάλαμο ιωδίου. Τα διαχωρισμένα λιπίδια εμφανίζονται ως κίτρινες κηλίδες μετά από περίπου 5 λεπτά. Οι πλάκες φωτογραφίζονται, συγκρίνονται οι κηλίδες των προτύπων με αυτές των αγνώστων λιπιδίων και ταυτοποιούνται τα τελευταία. Οι κηλίδες ή οι οριζόντιες λωρίδες των διαχωρισμένων λιποειδών αποξύνονται με τη βοήθεια μικρής υάλινης αντικειμενοφόρου πλάκας, μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρου και τα κλάσματα που προκύπτουν υπόκεινται σε βιολογική δοκιμασία *in vitro*. Το πυριτικό οξύ απομακρύνεται, πριν τη μετατροπή του μονοφασικού συστήματος εκχύλισης σε διφασικό, με φυγοκέντρωση.

7.4. Βιολογική δοκιμασία Πλυμένων Αιμοπεταλίων Κουνελιού *in vitro*^{101,17}

Αντιδραστήρια-Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1 %) ελεύθερος πυρετογόνων
- Διάλυμα φύλαξης (stock) 10xTyrodes: Σε 1 L νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g MgCl₂·6H₂O και 10 g γλυκόζης
- Διάλυμα φύλαξης 100xCaCl₂: Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,911 g CaCl₂
- Διάλυμα φύλαξης EGTA 0,2 M: Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 mL νερό. Ρυθμίζεται το 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 πήξη 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 μαγνητικού 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°C 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 βοείου 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°C.
- Διάλυμα εργασίας βοείου 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
- Γυάλινες κυβέτες
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log.
- Πεχάμετρο ORION 410A.
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37°C.
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont.
- Διάλυμα φύλαξης PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη $\text{CH}_3\text{Cl}:\text{MeOH}$ 1:1 (v/v)
- Διαλύματα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $6,25 \times 10^{-6}$ M, $6,25 \times 10^{-8}$ M, $6,25 \times 10^{-9}$ M, $6,25 \times 10^{-10}$ M σε διάλυμα εργασίας BSA. Σε γυάλινο 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 $6,25 \times 10^{-6}$ 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 φυγόκεντρωση για 15 min στους 24°C στα 500g (~1850rpm). Κατά την διάρκεια της φυγόκεντρωσης 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 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°C στα 750g (~2200 rpm). 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 Pasteur, 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°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°C στα 750g (2350 rpm). 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 $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μ L 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:

$$\text{κύτταρα}/10 \mu\text{L} = A \times 1,25 \times 10^8 \text{ όπου } A \text{ είναι η απορρόφηση.}$$

Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

Συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου των 0,5 mL προστίθενται 50 μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει $1,25 \times 10^8$ 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°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 συσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσώρευση 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 συσώρευση, το δε φαινόμενο της συσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100% συσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσώρευση των αιμοπεταλίων.

Με βάση τις καμπύλες συσώρευσης που προκαλούνται από το εκάστοτε εξεταζόμενο δείγμα, σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό μέγιστης αντιστρεπτής συσώρευσης που προκαλεί το εκάστοτε δείγμα, συναρτήσει της ποσότητας του συγκεκριμένου δείγματος. Ως 100% συσώρευση, ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσώρευση των αιμοπεταλίων, που προκαλείται από

το εκάστοτε εξεταζόμενο δείγμα, ενώ η τιμή EC_{50} αντιστοιχεί σε εκείνη την ποσότητα δείγματος που προκαλεί 50% συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Μετά την προσθήκη του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος, προστίθεται γνωστή συγκέντρωση PAF που προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων γνωστού ύψους. Υπολογίζεται το επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων για κάθε συγκέντρωση δείγματος και σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό αναστολής, συναρτήσει της συγκέντρωσης του δείγματος. Η τιμή IC_{50} ορίζεται ως η συγκέντρωση του δείγματος που προκαλεί 50% αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων.

Αν μετά την προσθήκη του εκάστοτε εξεταζόμενου δείγματος, προκύψει συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δηλαδή πρόκειται για αγωνιστή του PAF, τότε όταν σταθεροποιηθεί σε κάποιο ύψος η καμπύλη συσσώρευσης, προστίθεται ποσότητα PAF γνωστής συγκέντρωσης που να προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων ανάλογου ύψους με την καμπύλη συσσώρευσης του εξεταζόμενου δείγματος. Αν ο PAF προκαλέσει συσσώρευση στο αναμενόμενο γνωστό ύψος, τότε ο εν λόγω αγωνιστής προκαλεί συσσώρευση από διαφορετικό δρόμο (υποδοχέα) από εκείνον του PAF. Στην περίπτωση όμως που ο PAF προκαλέσει συσσώρευση μικρότερου ύψους από το αναμενόμενο, τότε προκαλεί συσσώρευση από τον ίδιο δρόμο (υποδοχέα) από εκείνον του PAF. Δηλαδή απευαισθητοποιεί τον PAF.

Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

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 που προκαλεί ίδιου ύψους καμπύλη συσσώρευσης. Αν παρατηρηθεί ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση

από την αρχική, τότε θεωρείται ότι αυτό γίνεται λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων, δηλαδή οι δύο συσσωρευτικοί παράγοντες δρουν μέσα από τον ίδιο υποδοχέα στα αιμοπετάλια. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων.

7.5. Αέρια Χρωματογραφία (GC-FID) ¹⁰¹

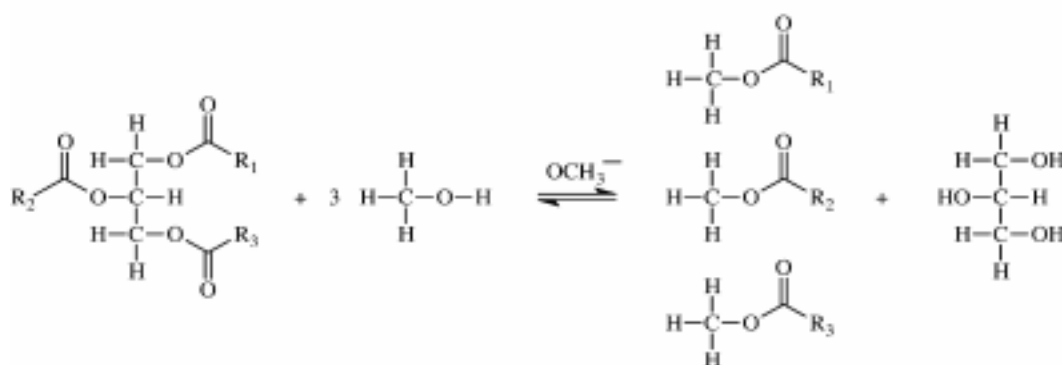
7.5.1 Μέθοδος εστεροποίησης λιπαρών οξέων

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα ΚΟΗ σε MeOH 0,5N 90%
- Κανονικό εξάνιο
- Διάλυμα ΗCl 6N
- Άνυδρο Na₂SO₃
- Πεχαμετρικό χαρτί
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες
- Υάλινα σιφώνια 1mL, 5mL και 10mL
- Κυκλοαναδευτήρας

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος παρασκευής μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που χρησιμοποιήθηκε καταλύεται από βάση και συγκεκριμένα από ΚΟΗ. Η μέθοδος αυτή επιδρά στα τριγλυκερίδια, με μια διαδικασία ενός βήματος προκαλώντας την τρανσεστεροποίησή τους.



Σχήμα 7.14: Τρανσεστεροποίηση των τριαλογλυκερολών καταλυόμενη από βάση

Η συγκεκριμένη μέθοδος πλεονεκτεί έναντι των μεθόδων εστεροποίησης που καταλύονται από οξύ, ως προς το ότι είναι πολύ πιο απλή, πιο γρήγορη, πιο ασφαλής και οι παραγόμενοι μεθυλεστέρες έχουν μεγάλο χρόνο ζωής.

Αναλυτική πορεία

Συγκεκριμένη ποσότητα λιποειδούς ($m_{\text{δείγματος}}=35\text{mg}$) φέρεται σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα σε μορφή διαλύματος από το οποίο εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 . Στη συνέχεια προστίθεται στο δοκιμαστικό σωλήνα 1mL κανονικού εξανίου, γίνεται ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα προκειμένου να διαλυτοποιηθούν τα λιποειδή και τέλος προστίθεται 4mL διαλύματος KOH σε MeOH 0,5N 90%. Ακολουθεί ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα επί 5min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH=7 με διάλυμα HCl 6N, προσθέτονται 2mL νερό και 2mL κανονικό εξάνιο, ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της στιβάδας του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια προστίθενται στο δοκιμαστικό σωλήνα επιπλέον 2mL κανονικού εξανίου, ανάδευση και παραλαβή της στιβάδας του εξανίου. Η συνολική ποσότητα του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίζονται με 2mL νερό και τελικά η στιβάδα του εξανίου ξηραίνεται με άνυδρο στερεό Na_2SO_3 . Ακολουθεί διήθηση και εξάτμιση της περισσειας του διαλύτη και διαλυτοποίηση των μεθυλεστέρων σε μικρό όγκο κανονικού εξανίου.

7.5.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων με αέρια χρωματογραφία ¹⁰¹

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φέρον αέριο H_2
- Φέρον αέριο He
- Φέρον αέριο αέρος
- Πολική τριχοειδής στήλη DB-23 Agilent J&W (60m x 0,25mm ID x 0,25 μ m) και θερμοκρασιών 40°C - 250°C
- Αέριος χρωματογράφος Shimadzu CLASS-VP (GC-17A) (Kyoto, Japan) με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID)
- Μικροσύριγγα ακριβείας 5 μ L

- Εξάνιο
- Πρότυπα διαλύματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων:
 - ο παλμιτικού οξέος (16:0)
 - ο παλμιτελαϊκού οξέος (16:1)
 - ο (17:0)
 - ο στεατικού οξέος (18:0)
 - ο ελαϊκού οξέος (18:1)
 - ο λινελαϊκού οξέος (18:2)
 - ο α-λινολενικού οξέος (18:3)
 - ο αραχιδονικού οξέος (20:4)
 - ο εικοσιπενταενοϊκό οξέος (EPA) (20:5)
 - ο (21:0) και
 - ο εικοσιδυεξαενοϊκού οξέος (DHA) (22:6)

Αναλυτική πορεία

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ξεκινούσε από τους 120°C και παρέμενε για 5min, στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξανόταν με ρυθμό 10°C/min μέχρι τους 180°C και τέλος αυξανόταν με ρυθμό 20°C/min μέχρι τους 220°C και παρέμενε για 40min. Η θερμοκρασία εισόδου του δείγματος και του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας ήταν 240°C και 250°C αντίστοιχα, ενώ η ροή του φέροντος αερίου είναι 1mL/min. Για την ποιοτική ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα των μεθυλεστέρων και η ταυτοποίηση έγινε με βάση τους χρόνους έκλυσης.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν δύο λιπαρά οξέα το 17:0 και το 21:0, που δεν υπάρχουν στα ιχθυέλαια. Παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα, η σύσταση των οποίων φαίνεται στον Πίνακα 7.12.

Πίνακας 7.12: Συγκέντρωση των λιπαρών οξέων 17:0 και 21:0 στα πρότυπα διαλύματα ¹⁰¹

Λιπαρά οξέα	Διάλυμα 1 (ppm)	Διάλυμα 2 (ppm)	Διάλυμα 3 (ppm)	Διάλυμα 4 (ppm)	Διάλυμα 5 (ppm)
17:0	500	500	500	500	500
21:0	1000	500	200	100	50

*ppm=mg/kg

Στη συνέχεια έγινε ένεση 5μL από κάθε δείγμα στον αέριο χρωματογράφο και καταγράφηκαν τα εμβαδά κορυφών των δύο λιπαρών οξέων. Η διαδικασία αυτή έγινε τέσσερις φορές. Ο μέσος όρος των λόγων του εμβαδού του 21:0 προς το εμβαδόν του 17:0 αποτελεί τις τεταγμένες των σημείων της καμπύλης αναφοράς, ενώ η συγκέντρωση του 21:0 (ppm) αποτελεί τις τετμημένες των σημείων αυτών.

Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίστηκε η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς: ¹⁰¹

$$y = 0,0021x + 0,0210 \quad R^2=0,9961 \quad (1)$$

Από την οποία είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συγκέντρωση (τετμημένη x) κάθε λιπαρού οξέος των χρωματογραφημάτων των δειγμάτων αν στη θέση του y μπαίνει κάθε φορά ο λόγος του εμβαδού του λιπαρού οξέος που θέλουμε να υπολογίσουμε τη συγκέντρωσή του προς το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου. Στα δείγματα χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικό πρότυπο το λιπαρό οξύ 17:0 σε συγκέντρωση 500ppm.

Από κάθε δείγμα έγινε ένεση 5μL, καταγράφηκαν τα εμβαδά των κορυφών των λιπαρών οξέων και με τη βοήθεια της εξίσωσης (1) προσδιορίστηκε ποσοτικά το κάθε λιπαρό οξύ των δειγμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

Αποτελέσματα – Σχολιασμός αποτελεσμάτων

8.1. Ιχθύες και ιχθυοτροφές

8.1.1. Δειγματοληψία ιχθύων και ιχθυοτροφών

8.1.1.1. Δειγματοληψία πέστροφας και ιχθυοτροφής

Το δείγμα Ιριδίζουσας Πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) ιχθυοτροφείου, όπως επίσης και το δείγμα της τροφής της, που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της εν λόγω πειραματικής εργασίας προέρχονται από τα ιχθυοτροφεία BioMar Hellenic ABEEI. Από τις πέστροφες αφαιρέθηκαν τα λέπια, το κεφάλι, τα εντόσθια και τα κόκκαλα και τελικά απομονώθηκε μόνο το φιλέτο ιστού του ψαριού, το οποίο ομογενοποιήθηκε ($m_{\text{δείγματος}}=80,91\text{g}$). Η δειγματοληψία της ιχθυοτροφής έγινε λαμβάνοντας μικρές ποσότητες από διάφορα σημεία το δείγματος. Για την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας, το δείγμα της ιχθυοτροφής ομογενοποιήθηκε ($m_{\text{δείγματος}}=50\text{g}$).

Πίνακας 8.13: Χημική σύσταση Ιχθυοτροφής Πέστροφας

Συστατικά	Ιχθυοτροφή
Πρωτεΐνη (%)	42,03
Λίπος (%)	17,22
Υγρασία (%)	4,50
Τέφρα (%)	6,49
Ενέργεια (MJ/kg)	21,98

*Biomar Ελλάδας

Πίνακας 8.14: Σύσταση των πρώτων υλών Ιχθυοτροφής Πέστροφας

Σύσταση πρώτων υλών (%)	Ιχθυοτροφή Πέστροφας
Σιτάρι	21,09
Ιχθυέλαιο	30,40
Ηλιέλαιο	15,00
Σόγια	14,40
Ιχθυάλευρο	5,00
Γλουτένη από σιτάρι	13,10

*Biomar Ελλάδας

8.1.1.2. Δειγματοληψία σολομών και ιχθυοτροφής

Τα δείγματα Σολομών Ατλαντικού (*Salmo salar*) ιχθυοτροφείου, όπως επίσης και οι τροφές τους, που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή της εν λόγω πειραματικής εργασίας προέρχονται από τα ιχθυοτροφεία BioMar Ltd, στην Σκωτία. Εξετάστηκαν τρεις ομάδες σολομού και οι αντίστοιχες τροφές αυτών. Από τους σολομούς αφαιρέθηκαν τα λέπια, το κεφάλι, τα εντόσθια και τα κόκκαλα και τελικά απομονώθηκε μόνο το φιλέτο ιστού του ψαριού, το οποίο ομογενοποιήθηκε ($m_{\text{δείγματος}}=50\text{g}$). Οι ιχθυοτροφές που εξετάστηκαν αποτελούν την τελική τροφή που λαμβάνουν τα ψάρια για 10 εβδομάδες. Η δειγματοληψία των ιχθυοτροφών έγινε λαμβάνοντας μικρές ποσότητες από διάφορα σημεία το δείγματος, κι έπειτα τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν ($m_{\text{δείγματος}}=50\text{g}$).

Πίνακας 8.15: Χημική σύσταση των τριών Ιχθυοτροφών των Σολομών

Συστατικά	Ιχθυοτροφή 1	Ιχθυοτροφή 2	Ιχθυοτροφή 3
Πρωτεΐνη (%)	36	37,2	37,5
Λίπος (%)	33,2	33,3	33,2
Υγρασία (%)	4,7	4,1	4,3
Τέφρα (%)	5,8	5,2	4,7
Ενέργεια (KJ/g)	24,27	23,84	23,37

*Biomar Σκωτίας

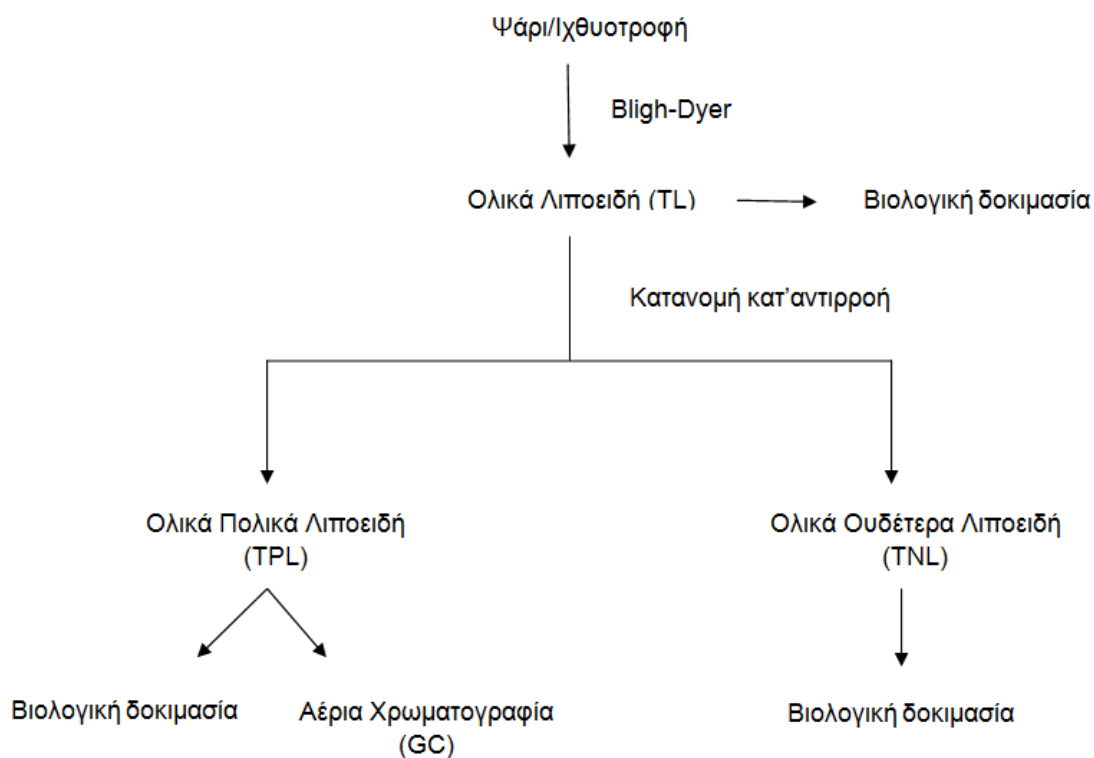
Πίνακας 8.16: Σύσταση των πρώτων υλών των τριών Ιχθυοτροφών των Σολομών

Σύνθεση (%)	Ιχθυοτροφή 1	Ιχθυοτροφή 2	Ιχθυοτροφή 3
Ιχθυάλευρο	25,00	15,00	10,00
Ιχθυέλαιο	21,03	15,05	8,97
Κραμβέλαιο	9,01	15,05	20,94

*Biomar Σκωτίας

8.1.2. Πειραματική πορεία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ολικών λιπιδίων (TL) των δειγμάτων με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Ακολούθως έγινε διαχωρισμός των ολικών λιπιδίων σε ολικά πολικά (TPL) και ολικά ουδέτερα λιπιδία (TNL) με κατανομή κατά αντιρροή (CCD). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε βιολογική δοκιμασία στα TL, TPL και TNL. Παράλληλα έγινε και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) τόσο στα TPL όσο και στα TNL. Η ίδια πειραματική πορεία ακολουθήθηκε για την πέστροφα, τους σολομούς και τις αντίστοιχες τροφές. Η πειραματική πορεία απεικονίζεται και σχηματικά στο Σχήμα 8.15.



Σχήμα 8.15: Σχηματική απόδοση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε

8.1.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL

Τα ολικά (TL), τα ολικά πολικά (TPL) και τα ολικά ουδέτερα (TNL) λιποειδή ζυγίστηκαν και η ποσότητα τους εκφρασμένη σε g/100g δείγματος φαίνεται στους παρακάτω πίνακες.

8.1.3.1. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Πέστροφας και Ιχθυοτροφής

Πίνακας 8.17: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Πέστροφας και Ιχθυοτροφής, (g/100g δείγματος)

Δείγμα	TL g/100g δείγματος	TPL g/100g δείγματος	TNL g/100g δείγματος
Ιχθυοτροφή Πέστροφας	4,76 ± 0,24	1,66 ± 0,58	3,04 ± 0,15
Πέστροφα	9,83 ± 0,49	2,21 ± 1,01	7,64 ± 0,98

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

8.1.3.2. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομών και Ιχθυοτροφών Σολομών

8.1.3.2.1. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1

Πίνακας 8.18: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιπιδίων Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1, (g/100g δείγματος)

Δείγμα	TL g/100g δείγματος	TPL g/100g δείγματος	TNL g/100g δείγματος
Ιχθυοτροφή Σολομού 1	23,02 ± 1,15	1,72 ± 0,09	14,63 ± 0,07
Σολομός 1	10,00 ± 0,45	1,03 ± 0,08	8,60 ± 0,49

8.1.3.2.2. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2

Πίνακας 8.19: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιπιδίων Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2, (g/100g δείγματος)

Δείγμα	TL g/100g δείγματος	TPL g/100g δείγματος	TNL g/100g δείγματος
Ιχθυοτροφή Σολομού 2	23,29 ± 1,19	1,14 ± 1,01	20,77 ± 0,09
Σολομός 2	8,36 ± 0,97	0,93 ± 0,06	6,9 ± 1,08

8.1.3.2.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3

Πίνακας 8.20: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιπιδίων Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3, (g/100g δείγματος)

Δείγμα	TL g/100g δείγματος	TPL g/100g δείγματος	TNL g/100g δείγματος
Ιχθυοτροφή Σολομού 3	28,28 ± 1,21	2,72 ± 1,10	21,81 ± 0,10
Σολομός 3	8,62 ± 0,79	1,08 ± 0,31	7,40 ± 0,36

8.1.4. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε έλεγχος της βιολογικής δραστηριότητας των TL, TPL και TNL 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.

Η εμφάνιση αναστολής της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης ή η εμφάνιση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα λιποειδή των εξεταζόμενων ψαριών ή ιχθυοτροφών, υποδεικνύει την ύπαρξη ανταγωνιστών ή αγωνιστών του PAF, αντίστοιχα. Οι ανταγωνιστές του PAF εμποδίζουν τη δράση του ως αναστολείς, αλλά και οι αγωνιστές επειδή δρουν με πολλές τάξεις μεγέθους μικρότερη βιολογική δραστηριότητα, τελικά και αυτοί αποτελούν αναστολείς του PAF.

Στην περίπτωση που τα δείγματα εμφανίζουν αναστολή (ανταγωνιστές), 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 συγκεκριμένη ποσότητα PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Στην περίπτωση που τα δείγματα εμφανίζουν συσσώρευση (συναγωνιστές), τα αποτελέσματα αποδίδονται με τον όρο "ανάλογο της EC_{50} ", ο οποίος εκφράζει την συσσωρευτική ικανότητα μιας ποσότητας λιποειδούς, η οποία προκαλεί το 50% της μέγιστης συσσώρευσης αιμοπεταλίων, ανάλογης αυτής που προκαλεί από συγκεκριμένη ποσότητα PAF.

Έτσι είναι φανερό ότι όσο πιο μικρή είναι αυτή η τιμή IC_{50} ή "ανάλογο της EC_{50} " τόσο καλύτερη δράση έχει το συγκεκριμένο λιποειδές, αφού θα απαιτείται μικρότερη ποσότητα για να προκαλέσει τη συγκεκριμένη αναστολή της δράσης του PAF, ή αντίστοιχα τη συγκεκριμένη συσσώρευση, η οποία θα ανταγωνίζεται τη δράση του PAF.

Συγκεκριμένα, αφού βρέθηκαν οι τιμές συσσώρευσης και αναστολής για τα TL, TPL και TNL των δειγμάτων, υπολογίστηκαν οι τιμές "ανάλογο της EC_{50} "

και IC₅₀ αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές φαίνονται στους πίνακες και σχηματικά διατυπώνονται στα αντίστοιχα ραβδογράμματα.

8.1.4.1. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Πέστροφας και Ιχθυοτροφής

Πίνακας 8.21: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC₅₀ και "ανάλογο της EC₅₀") των TL, TPL Πέστροφας και Ιχθυοτροφής

Δείγμα	IC ₅₀ (μg)	"Ανάλογο της EC ₅₀ "(μg)
Ιχθυοτροφή Πέστροφας TL	29,33	-
Ιχθυοτροφή Πέστροφας TPL	63,81	-
Πέστροφα TL	111,59	59,27
Πέστροφα TPL	-	15,00

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα του Πίνακα 8.21, τα TL της Ιχθυοτροφής, προκάλεσαν αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων (IC₅₀=29,33μg), ενώ τα TL της Ιριδίζουσας Πέστροφας που έχει τραφεί με αυτή την Ιχθυοτροφή εμφάνισαν διπλή επίδραση στα αιμοπετάλια, (IC₅₀=11,59μg και "ανάλογο της EC₅₀"=59,27μg), δηλαδή ανασταλτική δράση που εκδηλώνεται σε μικρή ποσότητα δρώντας ως ανταγωνιστής και σε μεγαλύτερη ως συναγωνιστής. Τα TPL της Ιχθυοτροφής παρουσίασαν ανασταλτική δράση του PAF, δηλαδή εμφάνισαν βιολογική δράση αναστολέων (ανταγωνιστών) του PAF ενώ τα TPL της αντίστοιχης Ιριδίζουσας Πέστροφας εμφάνισαν συσσωρευτική δράση στα αιμοπετάλια, δηλαδή βιολογική δράση αγωνιστών του PAF.

Τα εν λόγω αποτελέσματα δείχνουν ακόμα ότι τα λιποειδή της τροφής μεταβολίζονται και μετατρέπονται στο ψάρι σε δραστικές ενώσεις που δρουν και ως συναγωνιστές.

8.1.4.2. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των τριών δειγμάτων Σολομού και Ιχθυοτροφής Σολομού

8.1.4.2.1. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής 1

Πίνακας 8.22: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC₅₀ και "ανάλογο της EC₅₀") των TL, TPL, TNL Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1

Δείγμα	IC ₅₀ (μg)	"Ανάλογο της EC ₅₀ " (μg)
Ιχθυοτροφή Σολομού 1 TL	1,14	-
Ιχθυοτροφή Σολομού 1 TPL	5,95	-
Ιχθυοτροφή Σολομού 1 TNL	9,94	-
Σολομός 1 TL	10,17	-
Σολομός 1 TPL	-	2,56
Σολομός 1 TNL	5,39	-

Σύμφωνα με τον παραπάνω Πίνακα τα TL της Ιχθυοτροφής 1 καθώς και του αντίστοιχου ψαριού προκαλούν αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων (IC₅₀=1,14μg και "ανάλογο της EC₅₀"=10,17μg, αντίστοιχα) δρώντας ως ανταγωνιστές (σε μικρότερη ποσότητα) και αγωνιστές (σε μεγαλύτερη ποσότητα) του PAF. Συγκεκριμένα, η τιμή IC₅₀ των TL της Ιχθυοτροφής είναι εμφανώς μικρότερη, άρα συμπεραίνουμε ότι το δείγμα αυτό έχει καλύτερη βιολογική δράση σε σχέση με το ψάρι. Τα TPL της Ιχθυοτροφής προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF, ενώ ο Σολομός που έχει τραφεί με αυτή, προκαλεί συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Όσον αφορά τα TNL των δυο συγκρινόμενων δειγμάτων, παρατηρούμε ότι καλύτερη βιολογική δράση έχει το δείγμα του Σολομού 1 σε σχέση με το αντίστοιχο δείγμα της Ιχθυοτροφής 1, καθώς εμφανίζει χαμηλότερες τιμές "ανάλογο της EC₅₀".

8.1.4.2.2. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής 2

Πίνακας 8.23: Βιολογική δραστηριότητα (τιμές IC₅₀ και "ανάλογο της EC₅₀") των TL, TPL, TNL Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2

Δείγμα	IC ₅₀ (μg)	"Ανάλογο της EC ₅₀ " (μg)
Ιχθυοτροφή Σολομού 2 TL	31,06	-
Ιχθυοτροφή Σολομού 2 TPL	9,67	-
Ιχθυοτροφή Σολομού 2 TNL	151,47	-
Σολομός 2 TL	142,56	-
Σολομός 2 TPL	26,99	28,78
Σολομός 2 TNL	30,44	-

Παρατηρώντας τον Πίνακα, συμπεραίνουμε ότι τα TL της Ιχθυοτροφής 2, όπως επίσης και του Σολομού 2, παρουσιάζουν ανασταλτική δράση, δρώντας έτσι ως ανταγωνιστές του PAF. Πρέπει να σημειωθεί ότι η τιμή IC₅₀ της Ιχθυοτροφής 2 είναι εμφανώς μικρότερη, από αυτή του Σολομού 2, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι τα TL της Ιχθυοτροφής 2 εμφανίζουν ισχυρότερη βιολογική δραστηριότητα. Σχετικά με τα TPL των δυο συγκρινόμενων δειγμάτων, παρατηρούμε ότι η Ιχθυοτροφή 2, αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων (IC₅₀=9,67 μg), δηλαδή τα TPL εμφάνισαν βιολογική δράση αναστολέων (ανταγωνιστών) του PAF ενώ το δείγμα Σολομού 2 παρουσιάζει διπλή επίδραση στα αιμοπετάλια. Τα TNL του Σολομού 2 εμφανίζουν καλύτερη βιολογική δραστηριότητα σε σχέση με την Ιχθυοτροφή 2, καθώς η τιμή IC₅₀ των TNL του Σολομού 2, είναι πολύ μικρότερη.

8.1.4.2.3. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας των δειγμάτων Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής 3

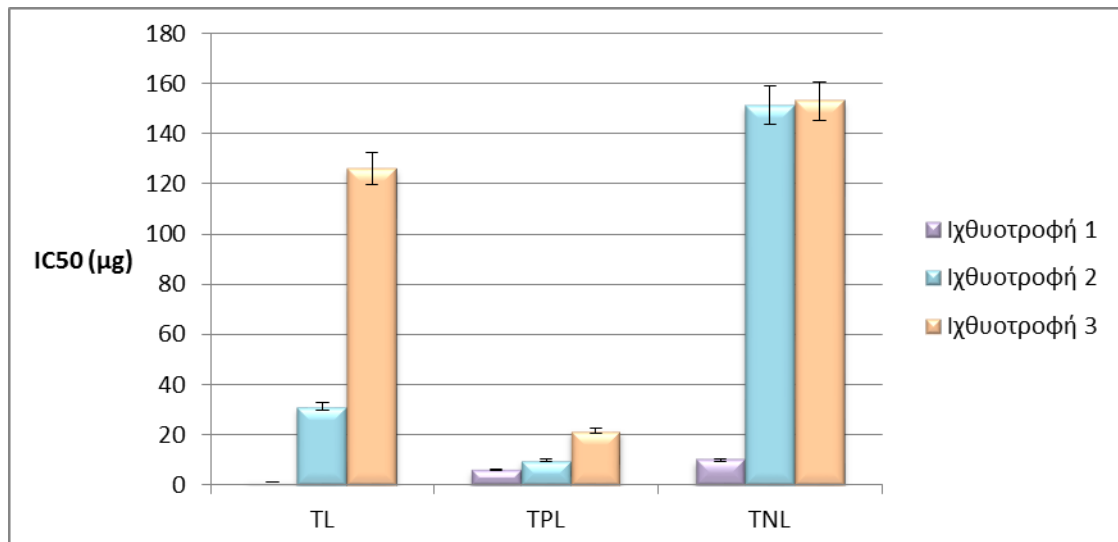
Πίνακας 8.24: Βιολογική δραστικότητα (τιμές IC_{50} και "ανάλογο της EC_{50} ") των TL, TPL, TNL Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3

Δείγμα	IC_{50} (μg)	"Ανάλογο της EC_{50} " (μg)
Ιχθυοτροφή Σολομού 3 TL	126,28	-
Ιχθυοτροφή Σολομού 3 TPL	21,67	-
Ιχθυοτροφή Σολομού 3 TNL	153,20	-
Σολομός 3 TL	254,62	-
Σολομός 3 TPL	36,51	-
Σολομός 3 TNL	40,52	-

Σύμφωνα με τον Πίνακα, συμπεραίνουμε ότι τα TL, TPL, TNL της Ιχθυοτροφής 3 και του Σολομού 3, προκάλεσαν αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, τα TL της Ιχθυοτροφής 3 και του Σολομού 3 εμφάνισαν μικρή βιολογική δραστικότητα αναστολέων του PAF, καθώς οι αντίστοιχες τιμές IC_{50} είναι αρκετά υψηλές. Όσον αφορά τα TPL της Ιχθυοτροφής 3 έχουν μικρότερη τιμή IC_{50} ($IC_{50}=21,67\mu g$) σε σχέση με τα TPL του Σολομού 3 ($IC_{50}=36,51\mu g$), άρα ισχυρότερη ανασταλτική δράση. Τέλος, τα TNL του Σολομού 3, αποτελούν ισχυρότερους ανταγωνιστές του PAF ($IC_{50}=40,52\mu g$), από τα TNL της Ιχθυοτροφής του Σολομού 3 ($IC_{50}=153,2\mu g$).

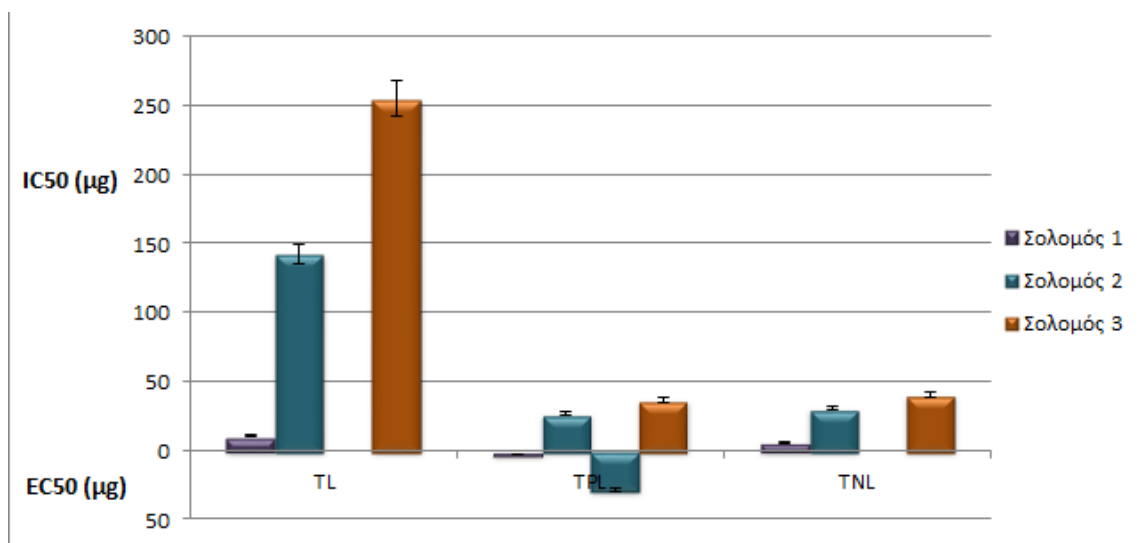
8.1.4.2.4. Σύγκριση των αποτελεσμάτων βιολογικής δοκιμασίας για τα δείγματα Σολομού και τις Ιχθυοτροφών

Στα παρακάτω ραβδογράμματα παρατίθενται συγκριτικά τα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας για τις τρεις ομάδες σολομού και τις αντίστοιχες ιχθυοτροφές.



Σχήμα 8.16: Σύγκριση των IC₅₀ των τριών Ιχθυοτροφών Σολομού

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα του παραπάνω ραβδογράμματος, παρατηρούμε ότι το σύνολο των Ιχθυοτροφών των Σολομών που εξετάστηκαν παρουσιάζουν ανασταλτική δράση. Συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι τα TL, TPL και TNL της Ιχθυοτροφής Σολομού 1, έχουν μικρότερες τιμές IC₅₀ σε σχέση με τις άλλες δυο Ιχθυοτροφές. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ότι τα TL, TPL και TNL της Ιχθυοτροφής Σολομού 1, περιέχουν ισχυρότερους αναστολείς του PAF, σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Συνεπώς, τα λιπιδιό της Ιχθυοτροφής Σολομού 1, εμφανίζουν ισχυρότερη βιολογική δράση ανταγωνιστών του PAF.



Σχήμα 8.17: Σύγκριση των IC₅₀ και "ανάλογο της EC₅₀" των τριών Σολομών

Σύμφωνα με τα δεδομένα του παραπάνω ραβδογράμματος συμπεραίνουμε ότι το σύνολο των Σολομών που εξετάστηκαν αναστέλλουν την επαγόμενη από τον PAF δράση των αιμοπεταλίων. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούμε ότι τα TL, TPL και TNL του Σολομού 1, έχουν μικρότερες τιμές IC₅₀ σε σχέση με τα άλλα δυο ψάρια. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι τα TL, TPL και TNL του Σολομού 1, αναστέλλουν ισχυρότερα τη δράση του PAF, σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Συνεπώς, τα λιποειδή του Σολομού 1, εμφανίζουν ισχυρότερη βιολογική δραστηριότητα ανταγωνιστών του PAF.

Σε ένα γενικότερο πλαίσιο παρατηρούμε ότι η Ιχθυοτροφή του Σολομού 1 και ο Σολομός 1, παρουσιάζουν μικρότερες τιμές IC₅₀ σε σχέση με αυτές των άλλων δυο δειγμάτων, συνεπώς ισχυρότερη βιολογική δράση. Το γεγονός αυτό, ενδεχομένως να οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των ιχθυοτροφών. Έτσι, η ισχυρότερη βιολογική δραστηριότητα της Ιχθυοτροφής Σολομού 1 και του Σολομού 1, ενδεχομένως να οφείλεται στα υψηλότερα ποσοστά ιχθυελαίου της Ιχθυοτροφής Σολομού 1.

8.1.5. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC)

Στο Παράρτημα (Εικόνα Α) φαίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα λιποειδών από αεριοχρωματογράφο. Σε κάθε χρωματογράφημα είναι σημειωμένοι οι χρόνοι έκλουσης και τα εμβαδά κάθε κορυφής.

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων μεθυλεστέρων ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των λιπαρών οξέων με βάση τους χρόνους έκλουσης όπως φαίνονται στους ακόλουθους πίνακες. Επίσης από τα εμβαδά των κορυφών των λιπαρών οξέων και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς προσδιορίστηκαν και ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL και TNL των δειγμάτων της πέστροφας και της ιχθυοτροφής, καθώς και στα TPL των δειγμάτων των τριών σολομών και των ιχθυοτροφών.

8.1.5.1. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL και TNL της πέστροφας και της ιχθυοτροφής

Πίνακας 8.25: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL της Πέστροφας και της Ιχθυοτροφής σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

		TPL Ιχθυοτροφής Πέστροφας	TPL πέστροφας
ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ		Χρόνος έκλουσης	
14:0	Μυριστικό οξύ	16,05 ± 0,04	16,11 ± 0,00
16:0	Παλμικό οξύ	18,43 ± 0,02	18,45 ± 0,01
16:1 (ω-7)	Παλμιτελαϊκό οξύ	18,84 ± 0,02	18,89 ± 0,01
17:0	Δεκαεπταενοϊκό οξύ	19,72 ± 0,02	19,79 ± 0,01
18:0	Στεατικό οξύ	21,11 ± 0,02	21,12 ± 0,01
18:1 cis	Ελαιϊκό οξύ	21,62 ± 0,01	21,62 ± 0,01
18:1 trans	Ελαιϊδικό οξύ	21,72 ± 0,02	21,73 ± 0,01
18:2 (ω-6)	Λινελαϊκό οξύ	22,60 ± 0,02	22,54 ± 0,01
18:3 (ω-3)	α- λινολενικό οξύ	23,78 ± 0,02	23,79 ± 0,01
20:4 (ω-6)	Αραχιδονικό οξύ	28,52 ± 0,02	28,56 ± 0,01
20:5 (ω-3)	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA)	30,76 ± 0,01	30,81 ± 0,01
22:5 (ω-3)	Εικοσιδυεπταενοϊκό οξύ	40,31 ± 0,02	40,36 ± 0,00
22:6 (ω-3)	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA)	41,44 ± 0,04	41,58 ± 0,03

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

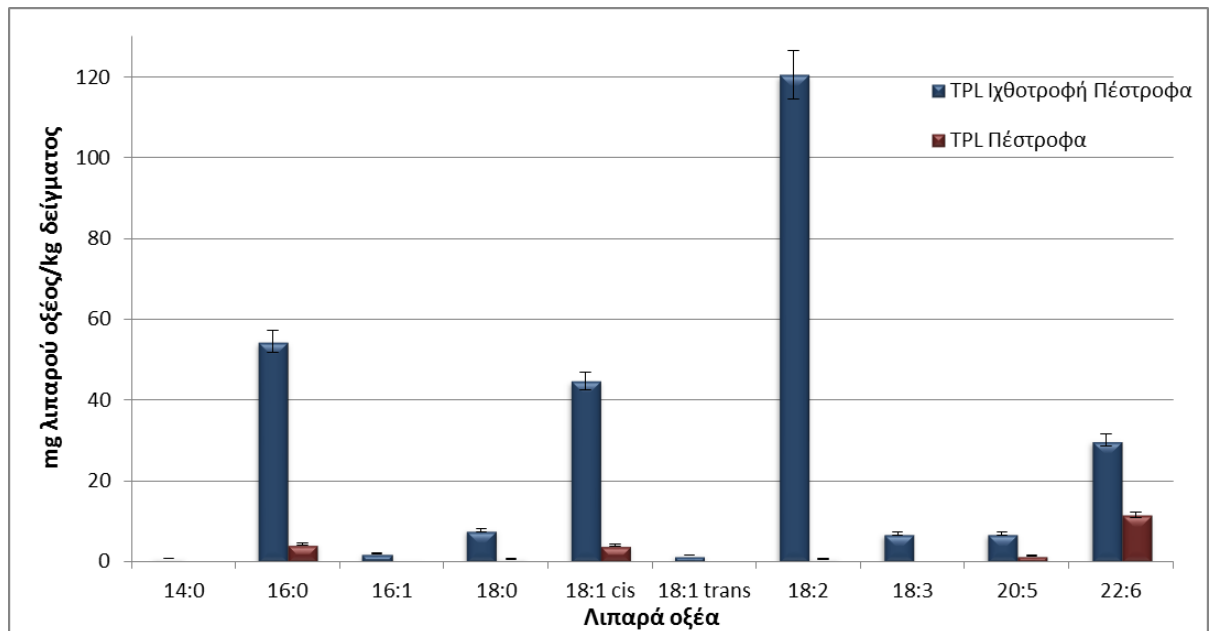
Από τα εμβαδά των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς ($y=0,0021x + 0,0210$), προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL των δειγμάτων Πέστροφας και Ιχθυοτροφής. Η συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων καθώς και τα αθροίσματα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 8.26.

Πίνακας 8.26: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Πέστροφα και Ιχθυοτροφή

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/kg δείγματος)	
	TPL Ιχθυοτροφής Πέστροφας	TPL Πέστροφας
14:0	0,70 ± 0,07	M.A.
16:0	54,47 ± 0,72	4,29 ± 0,01
16:1 (ω-7)	2,03 ± 0,05	0,05 ± 0,00
18:0	7,81 ± 0,28	0,66 ± 0,01
18:1 cis	44,77 ± 1,36	4,03 ± 0,01
18:1 trans	1,57 ± 0,46	0,67 ± 0,00
18:2 (ω-6)	120,56 ± 1,54	M.A.
18:3 (ω-3)	6,89 ± 0,61	M.A.
20:4 (ω-6)	M.A.	M.A.
20:5 (ω-3)	6,87 ± 0,19	1,42 ± 0,02
22:5 (ω-3)	M.A.	M.A.
22:6 (ω-3)	29,97 ± 0,85	11,53 ± 0,20
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΩΝ Λ.Ο	62,98 ± 1,07	4,95 ± 0,02
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-7 Λ.Ο.	2,03 ± 0,05	0,05 ± 0,00
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-9 Λ.Ο.	46,34 ± 1,82	4,7 ± 0,01
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΜΟΝΟΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	48,37 ± 1,87	4,75 ± 0,01
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	164,29 ± 3,19	12,95 ± 0,22
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-3 Λ.Ο.	43,73 ± 1,65	12,95 ± 0,22
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-6 Λ.Ο.	120,56 ± 1,54	M.A.

* M.A. : Μη Ανιχνεύσιμο

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 8.18: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Πέστροφας και Πέστροφας, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Σύμφωνα, με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, όσον αφορά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL της Τροφής Πέστροφας, παρατηρούμε ότι το παλμιτικό οξύ (16:0), το ελαϊκό οξύ (18:1 cis) και το λινελαϊκό οξύ (18:2) είναι τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα, με συγκεντρώσεις 54,47 mg/kg, 44,77 mg/kg και 120,56 mg/kg, αντίστοιχα. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, σχεδόν αμελητέες, βρίσκονται τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν.

Για τα TPL του δείγματος της Πέστροφας, ανιχνεύτηκαν μικρές ποσότητες παλμιτικού (16:0), ελαϊκού (18:1 cis) και εικοσιδυεξαενοϊκού οξέος (DHA), με συγκεντρώσεις 4,29 mg/kg, 4,03 mg/kg και 11,53 mg/kg, αντίστοιχα. Ενώ τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα σχεδόν δεν ανιχνεύτηκαν.

Συγκρίνοντας τα TPL της Τροφής Πέστροφας και τα TPL της Πέστροφας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα TPL της Τροφής Πέστροφας είναι αυτά που ανιχνεύτηκαν στα TPL της Πέστροφας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την επίδραση της ιχθυοτροφής στα ψάρια.

Πίνακας 8.27: Ταυτοποίηση των κορυφών των TNL της Πέστροφας και της Ιχθυοτροφής σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

		TNL Ιχθυοτροφής Πέστροφας	TNL Πέστροφας
ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ		Χρόνος έκλουσης	
14:0	Μυριστικό οξύ	15,99 ± 0,18	16,10 ± 0,07
16:0	Παλμιτικό οξύ	18,32 ± 0,18	18,44 ± 0,05
16:1 (ω-7)	Παλμιτελαϊκό οξύ	18,75 ± 0,18	18,88 ± 0,05
17:0	Δεκαεπταενοϊκό οξύ	19,64 ± 0,18	19,77 ± 0,04
18:0	Στεατικό οξύ	20,99 ± 0,18	21,11 ± 0,04
18:1 cis	Ελαϊκό οξύ	21,52 ± 0,18	21,62 ± 0,04
18:1 trans	Ελαϊδικό οξύ	21,62 ± 0,18	21,73 ± 0,04
18:2 (ω-6)	Λινελαϊκό οξύ	22,43 ± 0,18	22,54 ± 0,04
18:3 (ω-3)	α- λινολενικό οξύ	23,68 ± 0,18	23,79 ± 0,04
20:4 (ω-6)	Αραχιδονικό οξύ	28,62 ± 0,07	28,55 ± 0,05
20:5 (ω-3)	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA)	30,68 ± 0,18	30,79 ± 0,08
22:5 (ω-3)	Εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ	40,25 ± 0,20	40,32 ± 0,07
22:6 (ω-3)	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA)	41,30 ± 0,19	41,36 ± 0,08

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

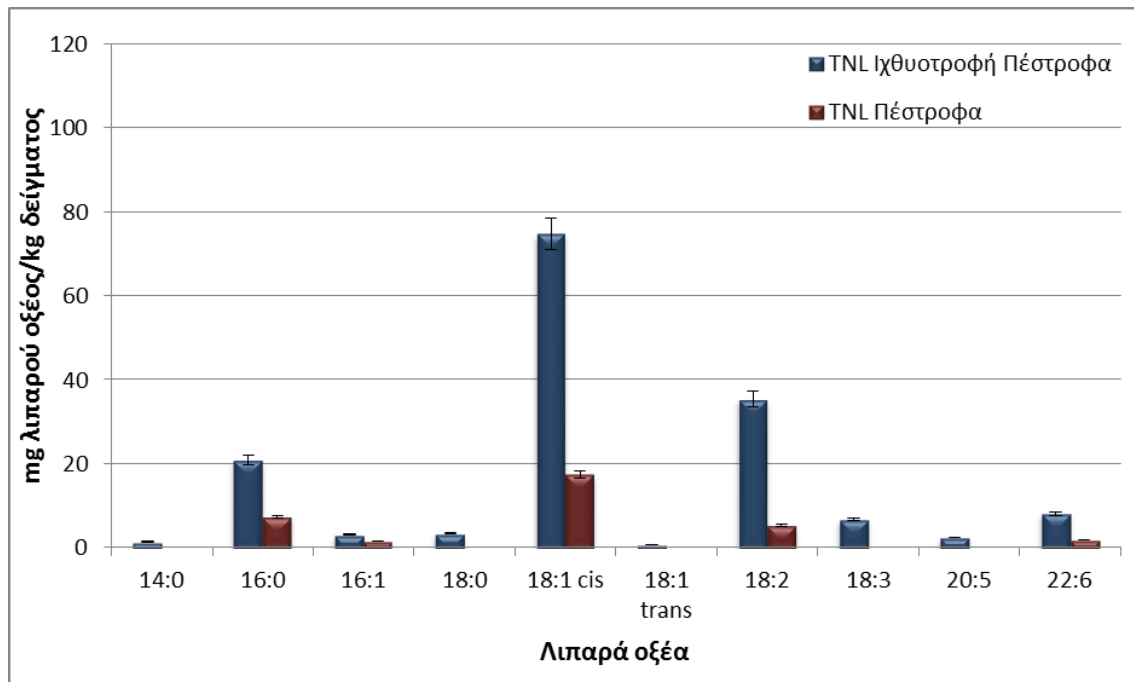
Από τα εμβαδά των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς ($y=0,0021x + 0,0210$), προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TNL των δειγμάτων Πέστροφας και Ιχθυοτροφής. Η συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων καθώς και τα αθροίσματα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 8.28.

Πίνακας 8.28: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TNL των δειγμάτων Πέστροφα και Ιχθυοτροφή

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/kg δείγματος)	
	TNL Ιχθυοτροφής Πέστροφας	TNL Πέστροφας
14:0	1,35 ± 0,05	M.A.
16:0	20,31 ± 2,20	7,27 ± 0,11
16:1 (ω-7)	3,01 ± 0,97	1,46 ± 0,04
18:0	3,29 ± 1,49	M.A.
18:1 cis	74,75 ± 1,57	17,28 ± 0,08
18:1 trans	0,62 ± 0,38	M.A.
18:2 (ω-6)	35,39 ± 1,45	5,37 ± 0,08
18:3 (ω-3)	6,69 ± 0,83	M.A.
20:4 (ω-6)	M.A.	M.A.
20:5 (ω-3)	2,40 ± 0,62	M.A.
22:5 (ω-3)	M.A.	M.A.
22:6 (ω-3)	8,11 ± 2,87	1,77 ± 0,23
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΩΝ Λ.Ο	24,95 ± 3,74	7,27 ± 0,11
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-7 Λ.Ο.	3,01 ± 0,97	1,46 ± 0,04
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-9 Λ.Ο.	75,37 ± 1,95	17,28 ± 0,08
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΜΟΝΟΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	78,38 ± 4,15	18,74 ± 0,12
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	52,59 ± 5,77	7,14 ± 0,31
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-3 Λ.Ο.	17,20 ± 4,32	1,77 ± 0,23
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-6 Λ.Ο.	35,39 ± 1,45	5,37 ± 0,08

* M.A. : Μη Ανιχνεύσιμο

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 8.19: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TNL Ιχθυοτροφής Πέστροφας και Πέστροφας, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Σύμφωνα, με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, όσον αφορά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TNL της Τροφής Πέστροφας, παρατηρούμε ότι το παλμιτικό οξύ (16:0), το ελαϊκό οξύ (18:1 cis) και το λινελαϊκό οξύ (18:2) είναι τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα, με συγκεντρώσεις 20,31 mg/kg, 74,75 mg/kg και 35,39 mg/kg, αντίστοιχα. Σε μικρότερες συγκεντρώσεις, βρίσκονται τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν.

Για τα TPL του δείγματος της Πέστροφας, ανιχνεύτηκαν μικρές ποσότητες παλμιτικού (16:0), ελαϊκού (18:1 cis) και λινελαϊκού οξέος (18:2), με συγκεντρώσεις 7,27 mg/kg, 17,28 mg/kg και 5,37 mg/kg, αντίστοιχα. Ενώ τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα σχεδόν δεν ανιχνεύτηκαν.

Συγκρίνοντας τα TNL της Τροφής Πέστροφας και τα TNL της Πέστροφας, καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι τα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στα TNL της Τροφής Πέστροφας είναι τα ίδια λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν στα TNL της Πέστροφας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την επίδραση της ιχθυοτροφής στα ψάρια.

8.1.5.2. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL των σολομών και των ιχθυοτροφών

8.1.5.2.1. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Σολομού 1 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 1

Πίνακας 8.29: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Σολομού 1 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 1 σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ		TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 1	TPL Σολομός 1
		Χρόνος έκλουσης	
14:0	Μυριστικό οξύ	15,95 ± 0,17	15,98 ± 0,14
16:0	Παλμιτικό οξύ	18,30 ± 0,17	18,24 ± 0,34
16:1 (ω-7)	Παλμιτελαϊκό οξύ	18,72 ± 0,17	18,78 ± 0,15
17:0	Δεκαεπταενοϊκό οξύ	19,59 ± 0,19	19,67 ± 0,15
18:0	Στεατικό οξύ	20,98 ± 0,17	21,07 ± 0,15
18:1 cis	Ελαϊκό οξύ	21,49 ± 0,17	21,29 ± 0,28
18:1 trans	Ελαιϊδικό οξύ	21,59 ± 0,17	21,64 ± 0,09
18:2 (ω-6)	Λινελαϊκό οξύ	22,43 ± 0,17	22,22 ± 0,28
18:3 (ω-3)	α- λινολενικό οξύ	23,65 ± 0,16	23,78 ± 0,15
20:4 (ω-6)	Αραχιδονικό οξύ	28,47 ± 0,17	28,62 ± 0,15
20:5 (ω-3)	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA)	30,78 ± 0,16	30,96 ± 0,13
22:5 (ω-3)	Εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ	40,42 ± 0,16	40,72 ± 0,09
22:6 (ω-3)	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA)	41,58 ± 0,15	41,93 ± 0,16

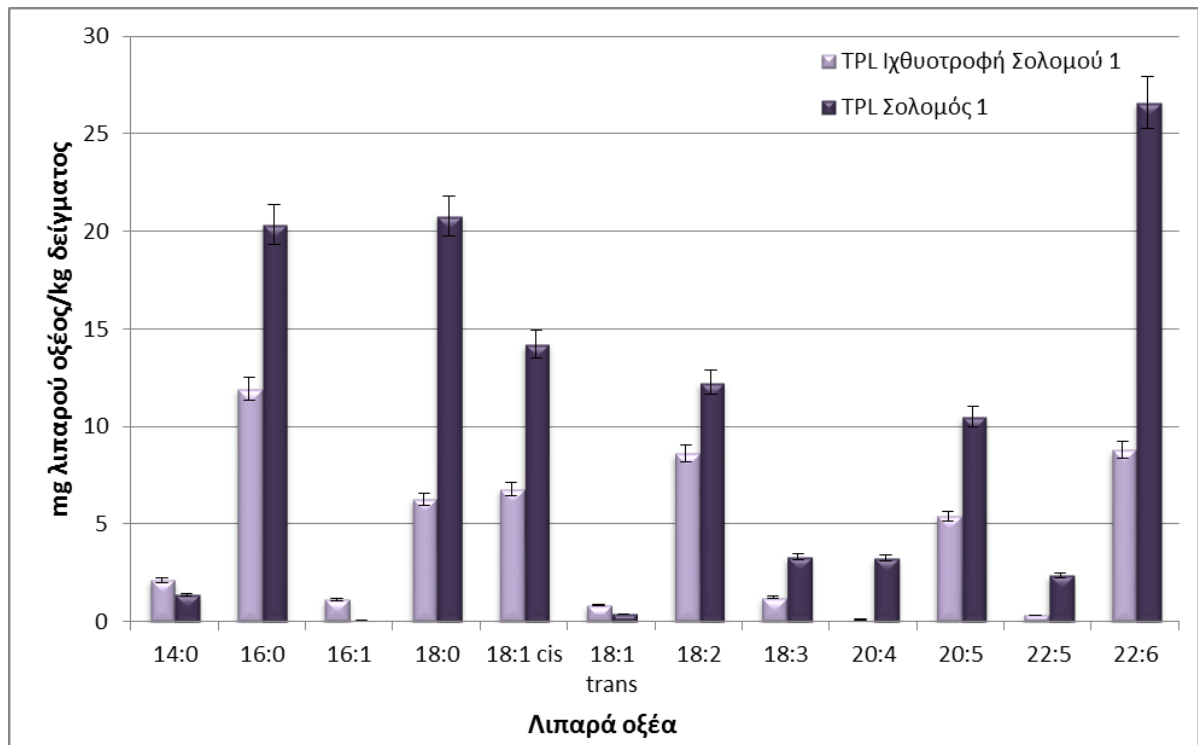
* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

Από τα εμβαδά των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς ($y=0,0021x + 0,0210$), προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL των δειγμάτων Σολομού 1 και Ιχθυοτροφής Σολομού 1. Η συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων καθώς και τα αθροίσματα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 8.30.

Πίνακας 8.30: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Σολομού 1 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 1

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/kg δείγματος)	
	TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 1	TPL Σολομού 1
14:0	2,13 ± 0,67	1,39 ± 1,53
16:0	11,95 ± 2,35	20,35 ± 1,40
16:1 (ω-7)	1,15 ± 0,03	0,07 ± 0,23
18:0	6,29 ± 7,13	20,79 ± 0,25
18:1 cis	6,77 ± 0,34	14,20 ± 0,20
18:1 trans	0,84 ± 0,09	0,38 ± 0,06
18:2 (ω-6)	8,63 ± 0,30	12,26 ± 0,08
18:3 (ω-3)	1,23 ± 0,91	3,31 ± 0,11
20:4 (ω-6)	0,10 ± 0,04	3,26 ± 3,07
20:5 (ω-3)	5,39 ± 0,33	10,52 ± 0,10
22:5 (ω-3)	0,33 ± 0,01	2,39 ± 0,33
22:6 (ω-3)	8,80 ± 1,23	26,61 ± 2,78
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΩΝ Λ.Ο.	20,37 ± 10,15	42,53 ± 3,18
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-7 Λ.Ο.	1,15 ± 0,03	0,07 ± 0,23
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-9 Λ.Ο.	7,61 ± 0,43	14,58 ± 0,26
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΜΟΝΟΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	8,76 ± 0,46	14,65 ± 0,49
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	24,48 ± 3,61	18,35 ± 6,47
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-3 Λ.Ο.	15,75 ± 2,48	42,83 ± 3,32
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-6 Λ.Ο.	8,73 ± 0,13	15,52 ± 3,15

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 8.20: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 1 και Σολομού 1, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, συμπεραίνουμε ότι τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα που εμφανίζονται στα TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 1, είναι το παλμιτικό οξύ (16:0), το στεατικό οξύ (18:0), το ελαϊκό οξύ (18:1cis), λινελαϊκό οξύ (18:2), εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA, 20:5) και το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA, 22:6), με συγκεντρώσεις 11,95 mg/kg, 8,63 mg/kg, 5,39 mg/kg, 8,80 mg/kg, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκαν σε μικρότερες συγκεντρώσεις.

Αντίστοιχα, για τα TPL Σολομού 1 σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν τα ίδια λιπαρά οξέα που ανιχνεύτηκαν για την ιχθυοτροφή. Τα υψηλά επίπεδα αυτών των λιπαρών οξέων οφείλονται στη μεγάλη συγκέντρωση των ίδιων λιπαρών οξέων στην ιχθυοτροφή. Παρατηρώντας σε ένα γενικότερο πλαίσιο τα δεδομένα, καταλήγουμε ότι οι τιμές των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στα TPL Σολομού 1, είναι αρκετά μεγαλύτερες από αυτές της ιχθυοτροφής.

8.1.5.2.2. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Σολομού 2 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 2

Πίνακας 8.31: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Σολομού 2 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 2 σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

		TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 2	TPL Σολομός 2
ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ		Χρόνος έκλουσης	
14:0	Μυριστικό οξύ	16,02 ± 0,04	15,89 ± 0,32
16:0	Παλμιτικό οξύ	18,40 ± 0,03	18,42 ± 0,11
16:1 (ω-7)	Παλμιτελαϊκό οξύ	18,82 ± 0,02	18,91 ± 0,00
17:0	Δεκαεπταενοϊκό οξύ	19,39 ± 0,45	19,80 ± 0,01
18:0	Στεατικό οξύ	21,10 ± 0,02	21,19 ± 0,01
18:1 cis	Ελαϊκό οξύ	21,61 ± 0,02	21,71 ± 0,00
18:1 trans	Ελαϊδικό οξύ	21,40 ± 0,44	21,80 ± 0,01
18:2 (ω-6)	Λινελαϊκό οξύ	22,56 ± 0,02	22,33 ± 0,44
18:3 (ω-3)	α- λινολενικό οξύ	23,76 ± 0,02	23,78 ± 0,16
20:4 (ω-6)	Αραχιδονικό οξύ	28,54 ± 0,02	28,72 ± 0,01
20:5 (ω-3)	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA)	30,87 ± 0,02	31,05 ± 0,01
22:5 (ω-3)	Εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ	40,50 ± 0,02	40,83 ± 0,01
22:6 (ω-3)	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA)	41,62 ± 0,09	42,14 ± 0,00

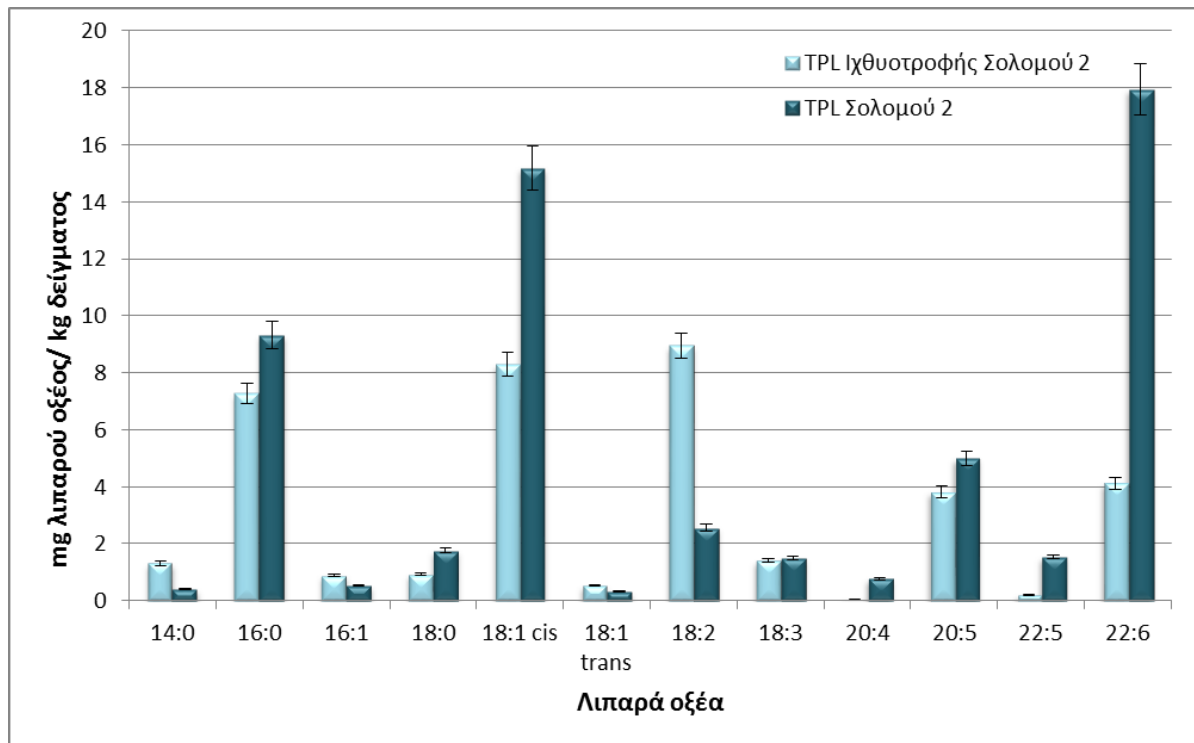
* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

Από τα εμβαδά των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς ($y=0,0021x + 0,0210$), προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL τω δειγμάτων Σολομού 2 και Ιχθυοτροφής Σολομού 2. Η συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων καθώς και τα αθροίσματα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 8.32.

Πίνακας 8.32: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Σολομού 2 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 2

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/kg δείγματος)	
	TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 2	TPL Σολομού 2
14:0	1,31 ± 0,17	0,40 ± 0,05
16:0	7,27 ± 0,24	9,33 ± 0,90
16:1 (ω-7)	0,89 ± 0,13	0,53 ± 0,01
18:0	0,93 ± 0,03	1,76 ± 0,02
18:1 cis	8,29 ± 1,99	15,19 ± 4,87
18:1 trans	0,53 ± 0,07	0,32 ± 0,04
18:2 (ω-6)	8,94 ± 1,43	2,56 ± 3,66
18:3 (ω-3)	1,42 ± 0,93	1,49 ± 0,07
20:4 (ω-6)	0,06 ± 0,03	0,78 ± 0,51
20:5 (ω-3)	3,82 ± 1,29	5,01 ± 0,22
22:5 (ω-3)	0,19 ± 0,05	1,54 ± 0,17
22:6 (ω-3)	4,13 ± 0,17	17,96 ± 1,18
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΩΝ Λ.Ο.	9,51 ± 0,27	11,49 ± 0,97
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-7 Λ.Ο.	0,89 ± 0,13	0,53 ± 0,01
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-9 Λ.Ο.	8,82 ± 2,06	15,51 ± 4,91
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΜΟΝΟΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	9,71 ± 2,36	16,04 ± 4,92
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	18,56 ± 3,9	29,34 ± 5,81
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-3 Λ.Ο.	9,56 ± 2,44	26,00 ± 1,64
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-6 Λ.Ο.	9,00 ± 1,46	3,34 ± 4,17

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 8.21: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 2 και Σολομού 2, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις για τα TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 2 ανιχνεύτηκαν για τα λιπαρά οξέα: παλμιτικό οξύ (16:0), ελαϊκό οξύ (18:1cis), λινελαϊκό οξύ (18:2), εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA, 20:5) και το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA, 22:6), με συγκεντρώσεις 7,27 mg/kg, 8,29 mg/kg, 8,94 mg/kg, 3,82 mg/kg και 4,13 mg/kg, αντίστοιχα. Ενώ τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα ανιχνεύτηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

Για τα TPL Σολομού 2 οι υψηλότερες συγκεντρώσεις ανιχνεύτηκαν για το παλμιτικό οξύ (16:0), τα ελαϊκό οξύ (18:1cis), το εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA, 20:5) και το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA, 22:6), με συγκεντρώσεις 9,33 mg/kg, 15,19 mg/kg, 501 mg/kg, 17,19 mg/kg. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ακολουθούν τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα.

Συγκριτικά, τα TPL Σολομού 2 εμφανίζουν υψηλότερες συγκεντρώσεις για το σύνολο σχεδόν των λιπαρών οξέων σε σχέση με τα TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 2. Γεγονός το οποίο σημαίνει ότι η σύσταση της ιχθυοτροφής σε λιπαρά οξέα επιδρά καταλυτικά στη σύσταση του ιστού του ψαριού.

8.1.5.2.3. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Σολομού 3 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 3

Πίνακας 8.33: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Σολομού 3 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 3 σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

		TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 3	TPL Σολομός 3
ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ		Χρόνος έκλουσης	
14:0	Μυριστικό οξύ	16,02 ± 0,03	16,02 ± 0,14
16:0	Παλμιτικό οξύ	18,38 ± 0,01	18,42 ± 0,16
16:1 (ω-7)	Παλμιτελαϊκό οξύ	18,80 ± 0,01	18,83 ± 0,16
17:0	Δεκαεπταενοϊκό οξύ	19,68 ± 0,01	19,72 ± 0,16
18:0	Στεατικό οξύ	21,07 ± 0,00	21,12 ± 0,16
18:1 cis	Ελαϊκό οξύ	21,57 ± 0,00	21,63 ± 0,16
18:1 trans	Ελαϊδικό οξύ	21,08 ± 0,01	21,73 ± 0,16
18:2 (ω-6)	Λινελαϊκό οξύ	22,53 ± 0,01	22,55 ± 0,16
18:3 (ω-3)	α- λινολενικό οξύ	23,74 ± 0,01	23,82 ± 0,17
20:4 (ω-6)	Αραχιδονικό οξύ	28,52 ± 0,01	28,67 ± 0,15
20:5 (ω-3)	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA)	30,78 ± 0,01	31,04 ± 0,16
22:5 (ω-3)	Εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ	40,41 ± 0,01	40,84 ± 0,14
22:6 (ω-3)	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA)	41,49 ± 0,03	42,03 ± 0,12

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

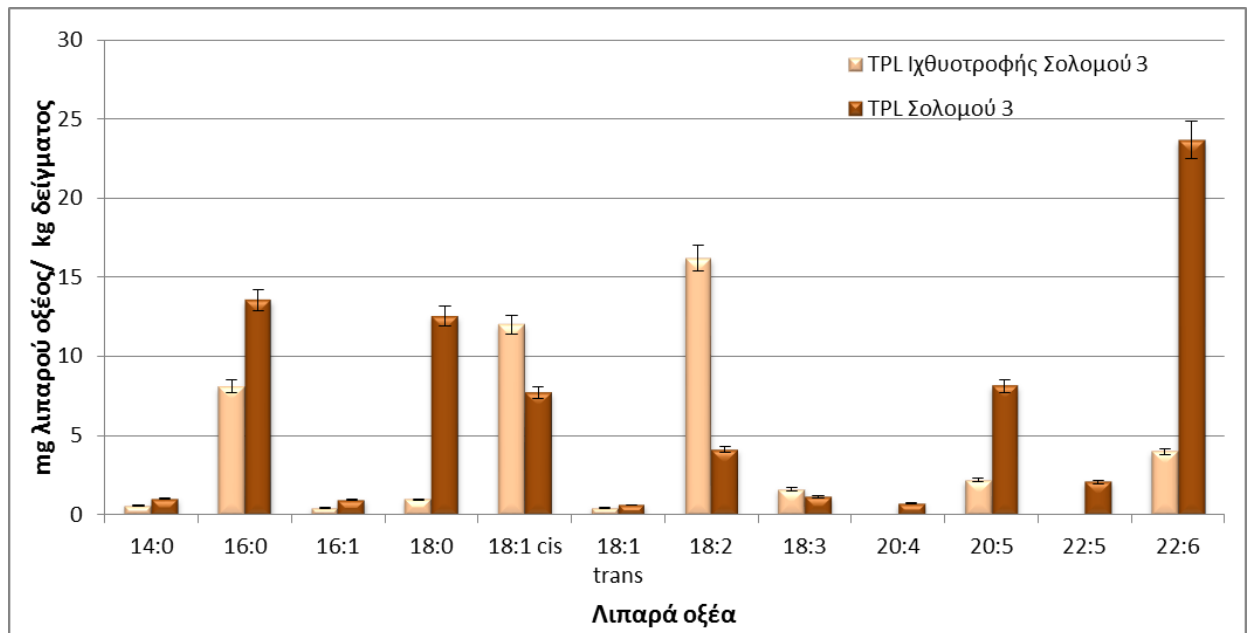
Από τα εμβαδά των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς ($y=0,0021x + 0,0210$), προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL τω δειγμάτων Σολομού 3 και Ιχθυοτροφής Σολομού 3. Η συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων καθώς και τα αθροίσματα αυτών παρατίθενται στον Πίνακα 8.34.

Πίνακας 8.34: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL των δειγμάτων Σολομού 3 και της Ιχθυοτροφής Σολομού 3

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/kg δείγματος)	
	TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 3	TPL Σολομού 3
14:0	0,55 ± 0,01	0,99 ± 0,09
16:0	8,09 ± 0,20	13,57 ± 1,29
16:1 (ω-7)	0,43 ± 0,00	0,94 ± 0,04
18:0	0,96 ± 0,01	12,55 ± 0,41
18:1 cis	12,02 ± 0,17	7,70 ± 0,24
18:1 trans	0,41 ± 0,01	0,61 ± 0,00
18:2 (ω-6)	16,19 ± 0,23	4,12 ± 0,01
18:3 (ω-3)	1,60 ± 0,03	1,11 ± 0,14
20:4 (ω-6)	M.A.	0,70 ± 0,04
20:5 (ω-3)	2,18 ± 0,13	8,14 ± 0,22
22:5 (ω-3)	M.A.	2,07 ± 0,17
22:6 (ω-3)	3,99 ± 0,30	23,67 ± 1,55
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΩΝ Λ.Ο	9,60 ± 0,22	27,11 ± 1,79
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-7 Λ.Ο.	0,43 ± 0,00	0,94 ± 0,04
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-9 Λ.Ο.	12,42 ± 0,18	8,31 ± 0,24
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΜΟΝΟΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	12,85 ± 0,18	9,25 ± 0,28
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	23,96 ± 0,69	39,78 ± 2,13
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-3 Λ.Ο.	7,77 ± 0,46	34,96 ± 2,08
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-6 Λ.Ο.	16,19 ± 0,23	4,82 ± 0,05

* M.A. : Μη Ανιχνεύσιμο

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

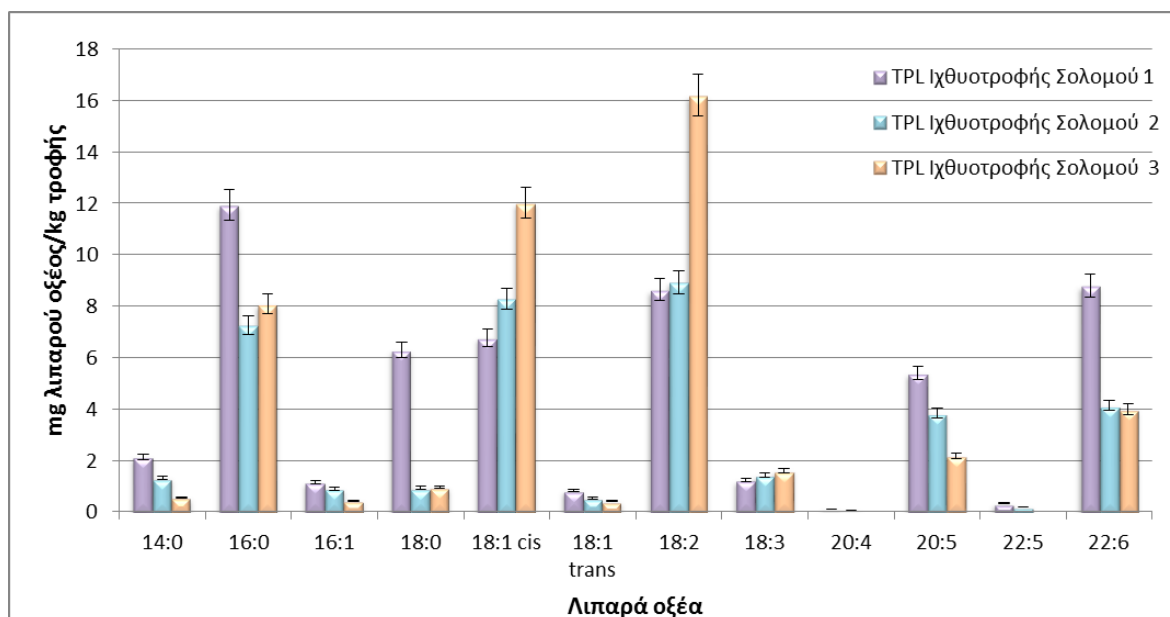


Σχήμα 8.22: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιπιδειδικό κλάσμα των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 3 και Σολομού 3, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα και του Σχήματος, από την ανάλυση των TPL Ιχθυοτροφής Σολομού 3, παρατηρούμε ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στο παλμιτικό οξύ (16:0), στο ελαϊκό οξύ (18:1cis) και στο λινελαϊκό οξύ (18:2), με τιμές 8,09 mg/kg, 12,02 mg/kg και 16,09 mg/kg, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα εμφανίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

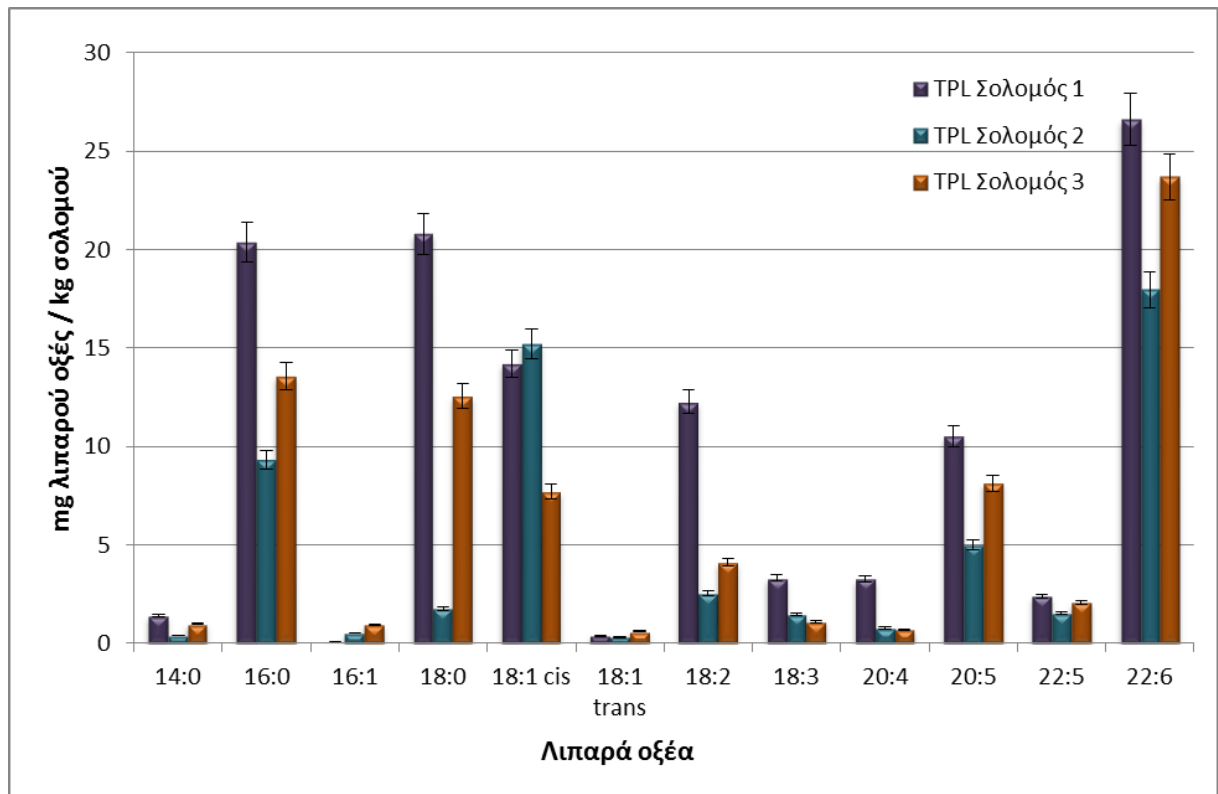
Από την ανάλυση των TPL Σολομού 3, παρατηρούμε ότι οι υψηλότερες συγκεντρώσεις αντιστοιχούν στο παλμιτικό οξύ (16:0), στο στεατικό (18:0), στο ελαϊκό οξύ (18:1cis), εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA, 20:5) και το εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA, 22:6), με τιμές 13,57 mg/kg, 12,55 mg/kg, 7,70 mg/kg, 8,14 mg/kg, 23,67 mg/kg, αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που αναλύθηκαν εμφανίζονται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις.

8.1.5.2.4. Σύγκριση των αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL των Σολομών και των Ιχθυοτροφών



Σχήμα 8.23: Σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL των τριών Ιχθυοτροφών Σολομού, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω σχήματος για τις τρεις διαφορετικές ιχθυοτροφές, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στα TPL της Ιχθυοτροφής Σολομού 1, είναι ως επί το πλείστον υψηλότερα από αυτά που ανιχνεύτηκαν στα TPL των δυο άλλων ιχθυοτροφών. Εξαιρεση αποτελούν τα λιπαρά οξέα: ελαϊκό (18:1 cis) και λινελαϊκό οξύ (18:2), οι συγκεντρώσεις των οποίων είναι υψηλότερες για την Ιχθυοτροφή Σολομού 3. Οι διαφορές αυτές οφείλονται κυρίως στη διαφορετική σύσταση των πρώτων υλών των ιχθυοτροφών. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.16, η Ιχθυοτροφή Σολομού 1 αποτελείται σε μεγάλο ποσοστό από ιχθυέλαιο και ιχθυάλευρο, ενώ για την Ιχθυοτροφή Σολομού 2 και 3, ένα μέρος έχει αντικατασταθεί από έλαιο κράμβης. Επομένως, η παρουσία μεγαλύτερου ποσοστού ιχθυελαίου και ιχθυαλεύρου στην ιχθυοτροφή, συμβάλλει στην ανίχνευση υψηλότερων τιμών λιπαρών οξέων στους ιστούς των ιχθύων.



Σχήμα 8.24: Σύγκριση των συγκεντρώσεων των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL των τριών Σολομών, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Με βάση τα δεδομένα του παραπάνω σχήματος για τις τρεις διαφορετικές ομάδες σολομών, παρατηρούμε ότι τα επίπεδα των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν στα TPL του Σολομού 1 είναι αρκετά υψηλότερα σε σχέση με τις ομάδες 2 και 3. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στη διαφορετική σύσταση των ιχθυοτροφών. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Ιχθυοτροφή 1 αποτελείται κυρίως από ιχθυέλαιο, έτσι τα υψηλά επίπεδα των λιπαρών οξέων οφείλονται στη μεγάλη συγκέντρωση των ίδιων λιπαρών οξέων της ιχθυοτροφής. Μάλιστα, όπως φαίνεται από τα πειραματικά δεδομένα, η αντικατάσταση του ιχθυελαίου με κραμβέλαιο (Ιχθυοτροφή 2 και 3) δεν έχει επηρεάσει θετικά την σύσταση των λιπαρών οξέων των ψαριών, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνεται και από την βιβλιογραφία.^{93,94}

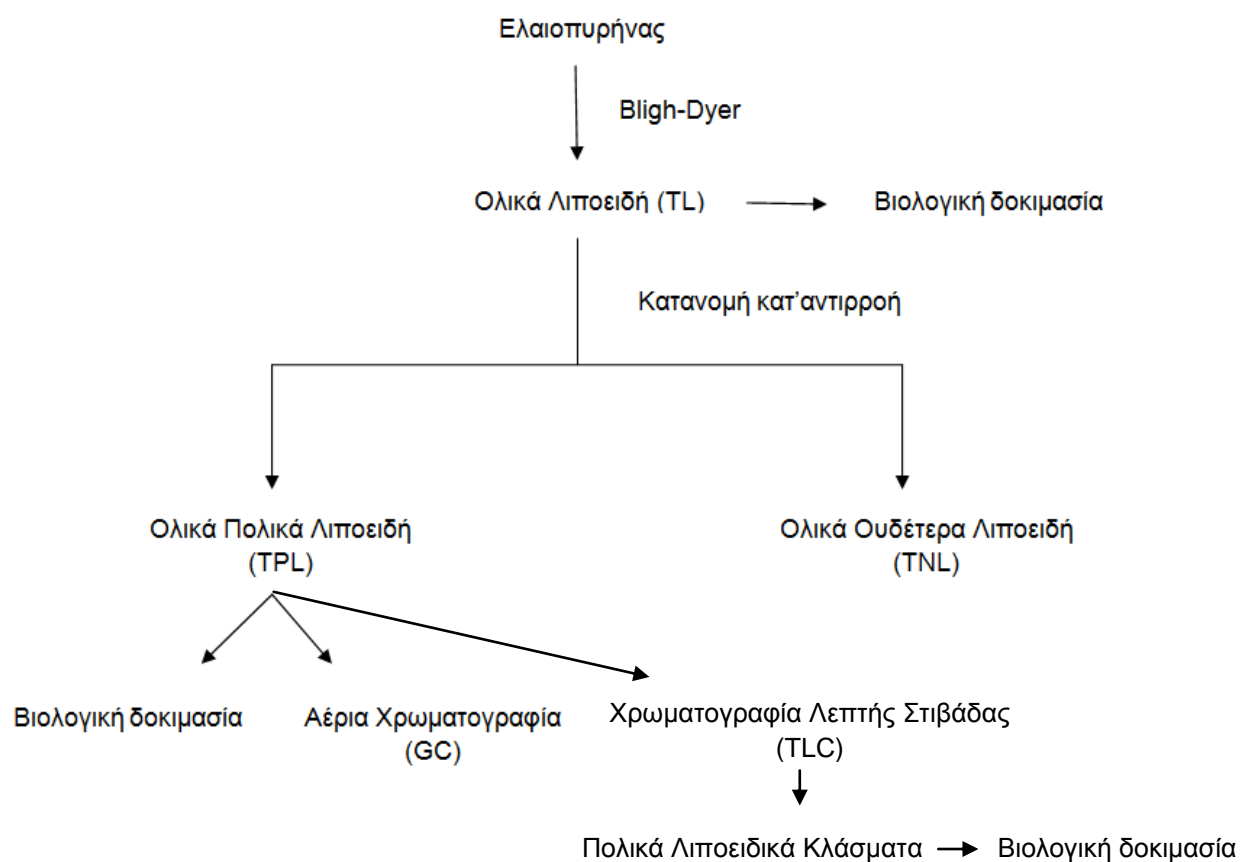
8.2. Ελαιοπυρήνας

8.2.1. Δειγματοληψία ελαιοπυρήνα

Ο ελαιοπυρήνας που χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση της εν λόγω πειραματικής εργασίας προέρχεται από την εταιρεία Sparta Life A.E..

8.2.2. Πειραματική πορεία

Αρχικά πραγματοποιήθηκε απομόνωση των ολικών λιποειδών (TL) του δείγματος του ελαιοπυρήνα με τη μέθοδο Bligh-Dyer. Ακολούθως έγινε διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε ολικά πολικά (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL) με κατανομή κατά αντιρροή (CCD). Ακολούθως, πραγματοποιήθηκε βιολογική δοκιμασία στα TL και TPL. Παράλληλα έγινε και ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) στα TPL. Η πειραματική πορεία απεικονίζεται και σχηματικά στο Σχήμα 8.25.



Σχήμα 8.25: Σχηματική απόδοση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε

8.2.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, TPL και TNL

Τα ολικά (TL), τα ολικά πολικά (TPL) και τα ολικά ουδέτερα (TNL) λιποειδή ζυγίστηκαν και η ποσότητα τους εκφρασμένη σε g/100g δείγματος φαίνεται στον παρακάτω πίνακα.

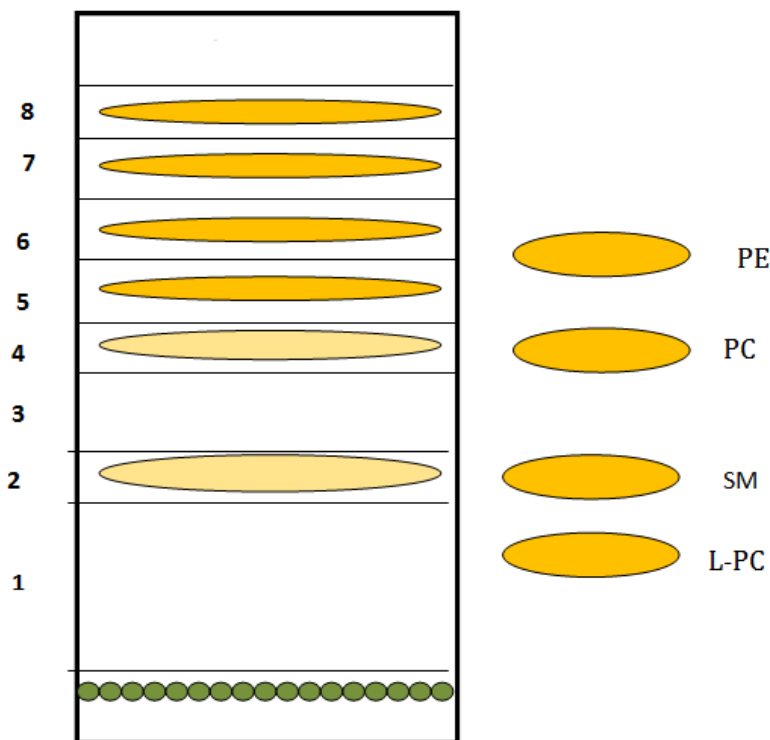
Πίνακας 8.35: Ποσότητα ολικών (TL), ολικών πολικών (TPL) και ολικών ουδέτερων (TNL) λιποειδών Ελαιοπυρήνα, (g/100g δείγματος)

	TL g/100g δείγματος	TPL g/100g δείγματος	TNL g/100g δείγματος
Ελαιοπυρήνας	6,19 ± 0,30	3,03 ± 0,09	3,50 ± 0,09

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

8.2.4. Αποτελέσματα της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Για τη Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν 20mg πολικών λιποειδών (TPL) Ελαιοπυρήνα. Συνολικά στρώθηκαν 10 πλάκες TLC και συλλέχθηκαν τα επιμέρους λιποειδικά κλάσματα. Τα TPL του ελαιοπυρήνα εμφάνισαν 8 ζώνες. Οι ζώνες που είχαν τα ίδια Rf από τις 10 πλάκες ενώθηκαν και ζυγίστηκαν ώστε να ακολουθήσει βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Το προφίλ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Οι φωτογραφίες των χρωματογραφικών πλακών μετά από TLC παρατίθενται στο Παράρτημα.



Σχήμα 8.26: Σχηματική απεικόνιση των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Ελαιοπυρήνα. (L-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφιγγομυελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, LPE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη). Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των πολικών λιποειδών ήταν χλωροφόρμιο-μεθανόλη-νερό (65:35:6 v/v/v)

8.2.5. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας του Ελαιοπυρήνα

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της βιολογικής δραστηριότητας των TL και TPL του Ελαιοπυρήνα καθώς και των πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψαν από την TLC, σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Μ' αυτό τον τρόπο τα δείγματα ελέγχτηκαν αν προκαλούν αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης ή συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Αφού βρέθηκαν οι τιμές συσσώρευσης και αναστολής για τα TL, TPL καθώς και των πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψαν από την TLC του Ελαιοπυρήνα, υπολογίστηκαν οι τιμές 'ανάλογο της EC_{50} ' και IC_{50} αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές φαίνονται στους πίνακες και σχηματικά διατυπώνονται στα αντίστοιχα ραβδογράμματα.

Πίνακας 8.36: Βιολογική δραστικότητα (τιμές IC₅₀) των TL, TPL Ελαιοπυρήνα

Δείγμα	IC₅₀ (μg)
Ελαιοπυρήνα TL	22,09
Ελαιοπυρήνα TPL	11,61

Σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα του Πίνακα, τα TL του Ελαιοπυρήνα, προκάλεσαν αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων (IC₅₀=22,09μg), δηλαδή δρουν ως αναστολείς του PAF. Τα TPL του Ελαιοπυρήνα παρουσίασαν, επίσης, ανασταλτική δράση του PAF (IC₅₀=11,61μg), δηλαδή εμφάνισαν βιολογική δράση αναστολέων (ανταγωνιστών) του PAF. Παρατηρούμε ότι τα TPL του Ελαιοπυρήνα έδωσαν χαμηλότερες τιμές IC₅₀, γεγονός το οποίο σημαίνει ότι αποτελούν ισχυρότερους ανταγωνιστές του PAF, κι επομένως εμφανίζουν ισχυρή βιολογική δράση.

Πίνακας 8.37: Βιολογική δραστικότητα (τιμές IC₅₀) των πολικών λιπιδικών κλασμάτων του Ελαιοπυρήνα

Δείγμα	IC₅₀ (μg)
Ζώνη 1	6,89
Ζώνη 2	75,63
Ζώνη 3	51,34
Ζώνη 4	47,45
Ζώνη 5	16,13
Ζώνη 6	25,54
Ζώνη 7	179,91
Ζώνη 8	22,23

Σύμφωνα με τα πειραματικά αποτελέσματα του Πίνακα, συμπεραίνουμε ότι όλες οι ζώνες των λιπιδικών κλασμάτων εμφάνισαν ανασταλτική δράση.

Καλύτερη αναστολή της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων, προκαλούν οι ζώνες 1, 5, 6 και 8 καθώς παρουσιάζουν τις χαμηλότερες τιμές IC₅₀. Συνεπώς μικρή ποσότητα από τα αντίστοιχα λιποειδικά κλάσματα προκαλούν ισχυρή αναστολή της δράσης του PAF. Μάλιστα όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.26, οι ζώνες 1, 5 και 6 έχουν όμοια Rf με την L-PC (λυσωφωσφατιδυλοχολίνη), την PE (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) αντίστοιχα, ενώσεις που οι έρευνες δείχνουν ότι δεν έχουν ανάλογη δράση με αυτή του PAF, άρα θα πρόκειται για άλλες ενώσεις ή ανάλογα αυτών.

8.2.6. Αποτελέσματα Αέριας Χρωματογραφίας (GC) των TPL του Ελαιοπυρήνα

Πίνακας 8.38: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL του Ελαιοπυρήνα σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ		Χρόνος έκλουσης
14:0	Μυριστικό οξύ	16,11 ± 0,01
16:0	Παλμικό οξύ	18,44 ± 0,05
16:1 (ω-7)	Παλμιτελαϊκό οξύ	18,86 ± 0,05
17:0	Δεκαεπταενοϊκό οξύ	19,79 ± 0,01
18:0	Στεατικό οξύ	21,16 ± 0,01
18:1 cis	Ελαϊκό οξύ	21,69 ± 0,01
18:1 trans	Ελαιϊδικό οξύ	21,78 ± 0,00
18:2 (ω-6)	Λινελαϊκό οξύ	22,38 ± 0,30
18:3 (ω-3)	α- λινολενικό οξύ	23,89 ± 0,01
20:4 (ω-6)	Αραχιδονικό οξύ	29,05 ± 0,01
20:5 (ω-3)	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA)	30,73 ± 0,30
22:5 (ω-3)	Εικοσιδυπενταενοϊκό οξύ	40,39 ± 0,01
22:6 (ω-3)	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ (DHA)	41,70 ± 0,00

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.

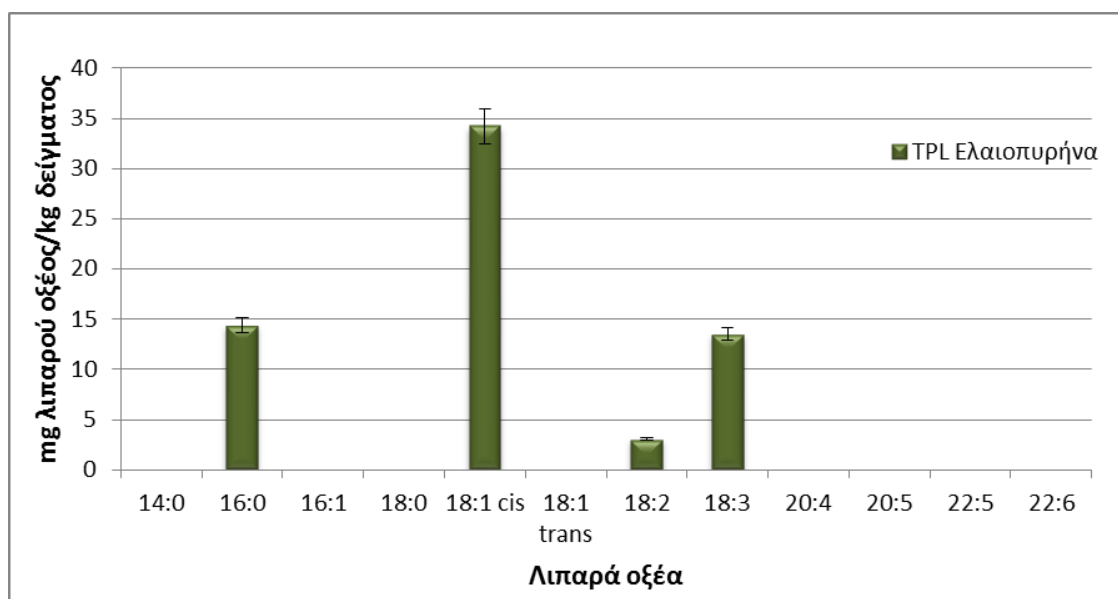
Από τα εμβαδά των κορυφών και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς ($y=0,0021x + 0,0210$), προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL του Ελαιοπυρήνα. Η συγκέντρωση των κυριότερων λιπαρών οξέων καθώς και τα αθροίσματα τους παρατίθενται στον Πίνακα 8.39.

Πίνακας 8.39: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων (και αθροίσματα αυτών) των TPL του Ελαιοπυρήνα

	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mg/kg δείγματος)
ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	TPL Ελαιοπυρήνα
14:0	M.A.
16:0	14,40 ± 6,09
16:1 (ω-7)	M.A.
18:0	M.A.
18:1 cis	34,22 ± 4,88
18:1 trans	M.A.
18:2 (ω-6)	3,06 ± 6,38
18:3 (ω-3)	13,54 ± 0,34
20:4 (ω-6)	M.A.
20:5 (ω-3)	M.A.
22:5 (ω-3)	M.A.
22:6 (ω-3)	M.A.
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΚΟΡΕΣΜΕΝΩΝ Λ.Ο	14,40 ± 6,09
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-7 Λ.Ο.	M.A.
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-9 Λ.Ο.	34,22 ± 4,88
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΜΟΝΟΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	34,22 ± 4,88
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΠΟΛΥΑΚΟΡΕΣΤΩΝ Λ.Ο.	16,60 ± 6,72
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-3 Λ.Ο.	43,73 ± 1,65
ΑΘΡΟΙΣΜΑ ΤΩΝ ω-6 Λ.Ο.	120,56 ± 1,54

* Μ.Α. : Μη Ανιχνεύσιμο

* Τα αποτελέσματα αποτελούν το μέσο όρο και την τυπική απόκλιση τριών επαναλήψεων.



Σχήμα 8.27: Συγκεντρώσεις των κυριότερων λιπαρών οξέων που περιέχονται στο λιποειδικό κλάσμα των TPL Ελαιοπυρήνα, εκφρασμένες σε mg/kg δείγματος (ppm)

Σύμφωνα με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα, συμπεραίνουμε ότι τα TPL του δείγματος του Ελαιοπυρήνα περιέχουν παλμιτικό οξύ (16:0), το ελαϊκό οξύ (18:1 cis), λινελαϊκό (18:2) και α-λινολενικό οξύ (18:3), σε συγκεντρώσεις 14,40 mg/kg, 34,22 mg/kg, 3,06 mg/kg, 13,54 mg/kg, αντίστοιχα. Μάλιστα η συκέντρωση του ελαϊκού οξέος, εμφανίζεται σε αρκετά υψηλή τιμή σε σχέση με βιβλιογραφικά δεδομένα. Τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα που εξετάστηκαν δεν ανιχνεύτηκαν στα TPL του Ελαιοπυρήνα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

Συμπεράσματα – Επίλογος

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας, είναι δυο είδη της οικογένειας των σολομοειδών, η Ιριδίζουσα Πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) και τρεις ομάδες Σολομού Ατλαντικού (*Salmo salar*), όπως επίσης και οι τροφές τους. Σκοπός της παρούσα εργασίας είναι η μελέτη τη επίδρασης της διατροφής των ιχθύων ιχθυοτροφείου, όσον αφορά τη συγκέντρωση των λιπαρών οξέων των ιχθύων και των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων τους. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της μελέτης της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών τους ενάντια στην αθηροσκλήρωση. Πιο συγκεκριμένα, αξιολογήθηκε η επίδραση της ιχθυοτροφής στα λιποειδή της πέστροφας με ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών και των ουδέτερων λιποειδών των δειγμάτων και με μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών. Επιπλέον, αξιολογήθηκε η επίδραση της ιχθυοτροφής στα λιποειδή του σολομού με ποσοτικό προσδιορισμό των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών λιποειδών των δειγμάτων και με μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών. Πραγματοποιήθηκε, επίσης, σύγκριση μεταξύ των τριών διαφορετικών ιχθυοτροφών, καθώς και των αντίστοιχων σολομών. Σε ένα επόμενο στάδιο, κρίθηκε αναγκαίο να μελετηθεί ένα φυτικής προέλευσης προϊόν, ως συστατικό αντικατάστασης μέρους των ιχθυελαίων των ιχθυοτροφών. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκαν τα πολικά λιποειδή, όπως επίσης και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα ελαιοπυρήνα για την πιθανή δράση των συστατικών του έναντι της αθηρογένεσης. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των πολικών λιποειδών του.

Κατά την πειραματική διαδικασία εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή από δείγματα της Ιριδίζουσας Πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) και τριών ομάδων Σολομού Ατλαντικού (*Salmo salar*), όπως επίσης και των τροφών τους. Έπειτα, με κατανομή κατά αντιρροή διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών και των ολικών

ουδέτερων λιποειδών των δειγμάτων της Ιριδίζουσας Πέστροφας και της τροφής της, όπως επίσης και των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών των τριών Σολομών Ατλαντικού και των τροφών τους. Τα ολικά, τα ολικά πολικά και τα ολικά ουδέτερα λιποειδή εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί με βιολογικό προσδιορισμό σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού η ικανότητά τους να αναστέλλουν ή όχι την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι όλα τα δείγματα ιχθύων και ιχθυοτροφών εμφανίζουν βιολογική δραστικότητα αναστολής του PAF, δρώντας είτε ανταγωνιστές στην επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων, είτε ως συναγωνιστές στην επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων. Συγκεκριμένα, τα TL και TPL της τροφής της Ιριδίζουσας Πέστροφας εμφάνισαν ανασταλτική δράση του PAF, ενώ τα TL της Ιριδίζουσας Πέστροφας εμφάνισαν διπλή δράση και τα TPL συσσωρευτική. Όσον αφορά τα δείγματα των Σολομών Ατλαντικού, στα TL, TPL και TNL της Ιχθυοτροφής Σολομού 1 και του Σολομού 1 παρατηρήθηκε ανασταλτική δράση του PAF, εκτός των TPL του Σολομού 1 που παρατηρήθηκε έντονη συσσωρευτική δράση. Τα TL, TPL και TNL της Ιχθυοτροφής Σολομού 2 και του Σολομού 2 εμφάνισαν ανασταλτική δράση του PAF, εκτός των TPL του Σολομού 2 που παρατηρήθηκε διπλή δράση. Τα TL, TPL και TNL της Ιχθυοτροφής Σολομού 3 και του Σολομού 3, εμφάνισαν δράση αναστολέων του PAF. Συγκρίνοντας, τώρα, τις τρεις ιχθυοτροφές Σολομού και τους Σολομούς μεταξύ τους, παρατηρούμε ότι η Ιχθυοτροφή Σολομού 1 καθώς και ο Σολομός 1 εμφανίζει πιο έντονη ανασταλτική δράση σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Το γεγονός αυτό οφείλεται κυρίως στη διαφορετική σύσταση των ιχθυοτροφών.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των λιπαρών οξέων των TPL της ιχθυοτροφής της Πέστροφας έδειξαν υψηλές συγκεντρώσεις για το 16:0, 18:1-cis, 18:2 και 22:6, ενώ σαφώς χαμηλότερες τιμές έδειξε το δείγμα της Πέστροφας. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για τα TNL της ιχθυοτροφής της Πέστροφας και της Πέστροφας. Σε ένα γενικό πλαίσιο, παρατηρήθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις για τα λιπαρά οξέα 16:0, 18:0, 18:1-cis, 18:2 και 22:6 σε όλα τα δείγματα Ιχθυοτροφών Σολομού και Σολομών. Συγκριτικά, η Ιχθυοτροφή 1, όπως και ο Σολομός 1 έδειξαν υψηλότερα

επίπεδα λιπαρών οξέων σε σχέση με τα υπόλοιπα δείγματα. Η Ιχθυοτροφή 1 αποτελείται κυρίως από ιχθυέλαιο, έτσι τα υψηλά επίπεδα των λιπαρών οξέων οφείλονται στη μεγάλη συγκέντρωση των ίδιων λιπαρών οξέων της ιχθυοτροφής. Από τα πειραματικά δεδομένα φαίνεται ότι η αντικατάσταση του ιχθυελαίου με κραμβέλαιο (Ιχθυοτροφή 2 και 3) δεν έχει επηρεάσει θετικά την σύσταση των λιπαρών οξέων των ψαριών. Γεγονός που ερμηνεύεται και βιβλιογραφικά.⁸⁹

Σε επόμενο στάδιο, εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή από δείγμα ελαιοπυρήνα και με κατανομή κατά αντιρροή διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών λιποειδών του. Τα ολικά πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν περαιτέρω με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε επιμέρους λιποειδικά κλάσματα. Τέλος, τα ολικά, τα ολικά πολικά και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί με βιολογικό προσδιορισμό σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού η ικανότητά τους να αναστέλλουν ή όχι την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Το γεγονός ότι η μερική αντικατάσταση του ιχθυελαίου των ιχθυοτροφών με κραμβέλαιο δεν κατέδειξε τόσο καλά αποτελέσματα και με δεδομένο την υπεραλίευση και υπερκατανάλωση ιχθυελαίων για τη σύνθεση ιχθυοτροφών, αποτέλεσε κίνητρο για τη μελέτη νέων φυτικών παραπροϊόντων ως προς τη βιολογική τους δράση. Εξετάζοντας τα TL, TPL και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα του Ελαιοπυρήνα, παρατηρήθηκε ισχυρή ανασταλτική δράση, γεγονός το οποίο υπογραμμίζει την καλή βιολογική τους δραστηριότητα. Επιπλέον, το δείγμα των TPL του Ελαιοπυρήνα παρουσίασε υψηλή συγκέντρωση (34,22 mg/kg) για το ελαϊκό οξύ (18:1 cis).

Πρόταση για περαιτέρω έρευνα αποτελεί η περαιτέρω επεξεργασία των λιποειδών των δειγμάτων με ακριβέστερες τεχνικές διαχωρισμού όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσεως (HPLC), μία μέθοδος που παρουσιάζει τεράστια ευαισθησία ως προς τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος. Έτσι, θα παραληφθούν λιποειδικά κλάσματα τα οποία θα εξεταστούν ως προς την βιολογική τους δραστηριότητα. Σε επόμενο στάδιο, προκειμένου να

διαπιστωθεί αν τα βιολογικά δραστικά λιποειδή των δειγμάτων είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο, δρώντας δηλαδή με τέτοιο τρόπο, έτσι ώστε να συμβάλουν στην αναστολή της δράσης του PAF με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η συσσώρευση των αιμοπεταλίων, είναι απαραίτητο να μελετηθούν σε *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα. Μ' αυτό τον τρόπο θα διαπιστώσουμε ποια λιποειδικά κλάσματα μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών στις αρτηρίες.

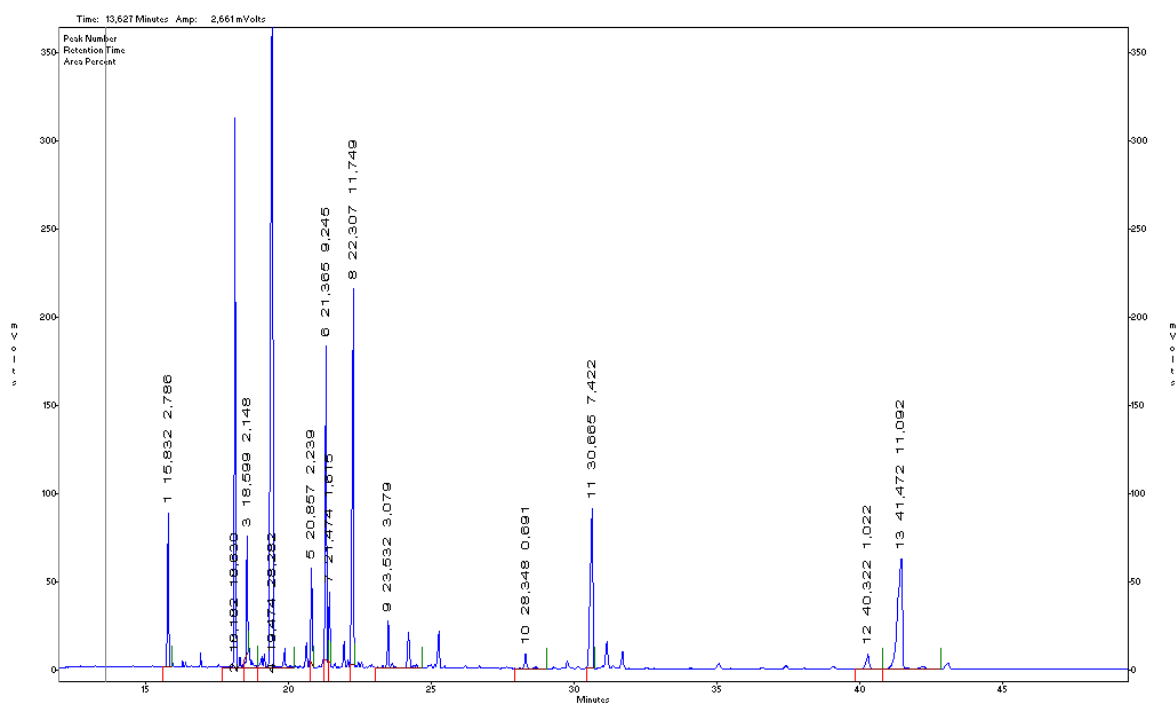
Επίσης, κρίνεται απαραίτητη η χρήση ενόργανων τεχνικών ανάλυσης, όπως συζευγμένη αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), με σκοπό την πιστοποίηση της δομής των βιολογικά δραστικών κλασμάτων.

Τέλος, σύμφωνα με τα πειραματικά δεδομένα της παρούσας εργασίας, προτείνεται το δείγμα Ελαιοπυρήνα να χρησιμοποιηθεί για τον μερικό εμπλουτισμό της ιχθυοτροφής ψαριών ιχθυοτροφείου.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

BSA	Αλβουμίνη βοδινού ορού
Ox-LDL	Οξειδωμένη μορφή λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας
TL	Ολικά λιποειδή
TPL	Ολικά πολικά λιποειδή
TNL	Ολικά ουδέτερα λιποειδή
FO	Ιχθυέλαιο
RO	Κραμβέλαιο
SFA's	Κορεσμένα λιπαρά οξέα
MUFA's	Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
PUFA's	Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
PAF	Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PPP	Πλάσμα φτωχό σε αιμοπετάλια
EPA	Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
DHA	Εικοσιδυεξαενοϊκό οξύ
L-PC	Λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη
PC	Φωσφατιδυλοχολίνη
SM	Σφιγγομυελίνη
L-PE	Λυσο-φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PE	Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PI	Φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη
CARD	Καρδιολιπίνη
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης
GC	Αέρια χρωματογραφία

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Εικόνα Α: Τυπικό Χρωματογράφημα GC



Εικόνα Β: Χρωματογραφική Πλάκα μετά από TLC. Πρώτη στήλη: TPL Ελαιοπυρήνα, Δεύτερη στήλη: Πρότυπο δείγμα λιποειδών από στούκι

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Tardivo A.P., Nahas-Neto J., Nahas EA, Maesta N., Rodrigues M.A., Orsatti F.L., Associations between healthy eating patterns and indicators of metabolic risk in postmenopausal women, *Nutrition Journal* (2010);9:64.
2. Kok, F.J. and D. Kromhout, Atherosclerosis-epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet, *European Journal of Nutrition*, (2004) 43 Suppl 1: p. 1/2-5.
3. Ζαμπέλας, Α., *Η διατροφή στα στάδια της ζωής*, (2003), Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα.
4. Kastorini C.M., Millionis H.J., Goudevenos J.A., Panagiotakos D.B., Mediterranean diet and coronary heart disease: Is obesity a link? A systematic review, *Metabolism & Cardiovascular Diseases* (2010) 20, 536-55.
5. Keys A., Coronary heart disease in seven countries, *Circulation* (1970) 41, 1-211.
6. Keys A., Menotti A., Aravanis C., Blackburn H., Djordevic B.S., Buzina R., Dontas A.S., Fidanza F., Karvonen M.J., Kimura N., Mohacek I., Nedeljkovic S., Puddu V., Punsar S., Taylor H.L., Conti S., Kromhout D. and Toshima H., The Seven Countries Study: 2,289 deaths in 15 years, *Preventive Medicine* (1984) 13, 141-154.
7. Keys A., Menotti A., Karvonen M.J., Aravanis C., et al., The diet and 15 - year death rate in the Seven Countries Study, *American Journal of Epidemiology* (1986) 124, 903-915.
8. William B. Kannel, MD, FACC Daniel McGee Tavia Gordon, A General Cardiovascular Risk Profile: The Framingham Study, *The American Journal of Cardiology* (1976) 38, 46-51.
9. Leaf A., Dietary Prevention of Coronary Heart Disease, the Lyon Diet Heart Study, *Circulation* (1999) 99, 6, 733-735.
10. Urpi-Sarda M., Casas R., Chiva-Blanch G., et al., Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis, *Pharmacological Research* (2012) 65, 577-583

11. Covas M.I., Olive oil and the cardiovascular system, *Pharmacological Research* (2007) 55, 175-186
12. Gardener H, Wright CB, Gu Y., et al., Mediterranean-style diet and risk of ischemic stroke, myocardial infarction, and vascular death: the Northern Manhattan Study, *Journal of the American Dietetic Association* (2011); 94(6):1458-64.
13. Spence JD, Nutrition and stroke prevention, *Stroke* (2006); 37(9):2430-5.
14. Brown S.M., and Goldstein J.L., A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis, *Science* (1986) 232, 34–47.
15. Saravanan P., Davidson N.C., Schmidt E.B., Calder P.C., Cardiovascular effects of marine omega-3 fatty acids, *Lancet* (2010), 376(9740): 540-50.
16. Hannah Gardener, Clinton B. Wright , Digna Cabral , Nikolaos Scarmeas , Yian Gub , Ken Cheung, Mitchell S.V. Elkinde, Ralph L. Sacco, Tatjana Rundek, Mediterranean diet and carotid atherosclerosis in the Northern, Manhattan Study, *Atherosclerosis* (2014) 234, 303-310.
17. Demopoulos, C. A., Pinckard, R. N., and Hanahan, D. J. Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine as the active component. (A new class of lipid chemical mediators), *Journal of Biological Chemistry* (1979) 254, 9355-9358.
18. Nordoy A., Marchioli R., Arnesen H., and Videbaek J., n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. To whom, how much, preparations, *Lipids* (2001) 36, 1, 127-129.
19. Zabetakis I., Antonopoulou S., Demopoulos C.A., The Prevention of Atherosclerosis by Food Components: Polar Lipids versus Omega-3 PUFAs, Commentary, (2013).
20. Nasopoulou C., Karantonis H.C., Perrea D.N., Theocharis S.E., Iliopoulos D.G., Demopoulos C.A., Zabetakis I., In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits, *Food Chemistry* (2010), 120:831-6.
21. Nasopoulou C., Tsoupras A.B., Karantonis H.C., Demopoulos C.A., Zabetakis I., Fish polar lipids retard atherosclerosis in rabbits by down regulating PAF biosynthesis and up-regulating PAF catabolism. *Lipids in Health and Disease* (2011), 10:213.

22. Hajar Kiai, Abdellatif Hafidi, Chemical composition changes in four green olive cultivars during spontaneous fermentation, *LWT - Food Science and Technology* (2014), 57, 663-670.
23. Owen, R.W., et al., Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants, *Lancet Oncology* (2000) 1, 107-112.
24. Martín-Peláez, S., et al., Health effects of olive oil polyphenols: Recent advances and possibilities for the use of health claims, *Molecular Nutrition & Food Research* (2013) 57(5): 760-771.
25. Karantonis C.A., Tsantila N., Stamatakis G., Samiotaki M., Panayotou G., Antonopoulou S., and Demopoulos C.A., Bioactive polar lipids in Olive Oil, Pomace and Waste Byproducts, *Journal of Food Biochemistry* (2008) 32, 4, 443-459.
26. Nasopoulou C., Gogaki V., Stamatakis G., Papaharisis L., Demopoulos C.A., Zabetakis I., Evaluation of the in Vitro Anti-Atherogenic Properties of Lipid Fractions of Olive Pomace, Olive Pomace Enriched Fish Feed and Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Fed with Olive Pomace Enriched Fish Feed, *Marine Drugs* (2013) 11, 3676-3688.
27. Visioli F., Wolfram R., Richard D., Muhammad B.A. Imran Chong, Crea R., Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2009), 57, 5, 1793-1796.
28. Νασοπούλου Κ., Σύγκριση Λιποειδών με Αντιαθηρωματική Δραστικότητα στα Ψάρια: Τσιπούρα (*Sparus aurata*) και Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) Ιχθυοτροφείου και Ελεύθερης Αλιείας, Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, (2005).
29. Lippincott Williams and Wilkins, *Stedman's Medical Dictionary*, 27th ed., Kluwer, Baltimore, (2000).
30. Ross, R. and Glomset, J. A., The pathogenesis of atherosclerosis, *New England Journal of Medicine* (1976), 295, 369-377.
31. Ross, R. and Glomset, J. A., The pathogenesis of atherosclerosis. *New England Journal of Medicine*, (1976), 295, 420-425.
32. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis – An update, *New England Journal of Medicine* (1986), 314, 488-500.

33. Nathan C. and Sporn M., Cytokines in context, *Journal of Cell Biology*, (1991), 113, 981-986.
34. Holvoet, P. and Collen, D., Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, (1998) 137 Suppl., S33-S38.
35. Becker B.F., Heindl B., Kupatt C., Zahler S., Endothelial function and hemostasis, *Zeitschrift für Kardiologie* (2000), 89, 160-167.
36. Fuster, V., *Platelets and atherosclerosis* (1981), 1-20.
37. Toborec, M. and Kaiser, S., Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis, *Basic Research in Cardiology* (1999), 94, 295-314.
38. Consigny P.M., Pathogenesis of Atherosclerosis, *Advances in Clinical Medicine*, (1995), 164, 553-558.
39. Η χημική ένωση του μήνα: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) (Οκτώβριος 2009), Κων/νος Δημόπουλος, Βαλαβανίδης Θανάσης, Ευσταθίου Κων/νος, http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_PAF.htm
40. Wissler, R. W., Update on the pathogenesis of atherosclerosis, *American Journal of Medicine* (1991), 91, 18-35.
41. Geng, J. G., Bevilacqua, M. P., Moore, K. L., McIntyre, T. M., Prescott S. M., et al, Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140, *Nature* (1990), 343, 757-760.
42. Quin M. T., Parthasarathy S., Fong L. G and Steinberg D., Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis, *Proceedings of the National Academy of Science, USA* (1987), 84, 2995-8
43. Brown, M.S. and Goldstein, J.L., Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, *Annual Review of Biochemistry* (1983), 52, 223-261.
44. Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Wheeler, M.E., Cortan, R.S., Gimbrone, M.A., Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion, *American Journal of Pathology* (1985), 121, 394-403.
45. Pober J.S., Bevilacqua M.P., Medrick D.L., Lapierre L.A., Fiers W., Gimbrone, M.A., *Journal of Immunology* (1986), 136, 1680.

46. Rodriguez R., Fountoulaki E., Grigorakis K., et al., Season and size effects: changes in the quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.), *Mediterranean Marine Science* (2010), 11, 1, 117-131.
47. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature* (1993), 362, 801-809.
48. Μ. Ντετοπούλου, Βιώσιμη λειτουργία ιχθυοκαλλιέργειας: Αντικατάσταση ιχθυελαίου με παραπροϊόν ελαιουργίας (ελαιοπυρήνα) σε ιχθυοτροφές και μελέτη των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων των παραχθέντων ψαριών, Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, (2014).
49. Ninio, E. and Joly, F., Transmembrane signalling and paf-acether biosynthesis, *Lipids* (1991), 26, 1034-1037.
50. Benveniste, J., Nunez, D., Duriez, P., Korth, R., Bidault, J. and Fruchart, J. C., Preformed paf-acether and lyso paf-acether are bound to blood lipoproteins, *FEBS Letters* (1988), 226, 371-376.
51. Δημόπουλος Κ., Αντωνοπούλου Σ. "Βασική Βιοχημεία" 2η Έκδοση, Αθήνα 2009.
52. Tselepis T.A., Dentan C., Karabina S.A., Chapman M.J. and Ninio, E., PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VLDL-1 in human plasma: catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme, *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* (1995), 15, 1764-1773.
53. Feliste, R., Perret, B., Braquet, P. and Chap, H., Protective effect of BN 52021, a specific antagonist of platelet-activating factor (paf-acether) against diet-induced cholesteryl ester deposition in rabbit aorta, *Atherosclerosis*, (1989), 78, 151-158.
54. Rouis, M., Nigon, F., Lafuma, C., Hornebeck, W. and Chapman, M. J., *Arteriosclerosis*, 1990, 10, 246-255.
55. O'Flaherty J.T., Salzer, W.L., Cousart, S., McCall, C.E., Piantadosi, C., Surles, J.R., Hammett, M.J. and Wykle, R. L., *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharm* (1983), 39, 291-309.
56. O'Flaherty, J.T., Tessner, T., Greene, D., Redman, J. R. and Wykle, R. L., Comparison of 1-O-alkyl-1-O-alk-1'-enyl-, and 1- O-acyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamines and 3-phosphocholines as agonists of

- platelet-activating factor family, *Biochimica et Biophysica Acta* (1994), 1210, 209-216.
57. Brown, M.S., Goldstein, J.L., Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis, *Annual Review of Biochemistry* (1983), 52, 223-261.
 58. Marathe G.K., Davies S.S., Harrison K.A., Silva A.R., Murphy R.C., Castro-Faria-Neto H., Prescott S.M., Zimmerman G. A. and McIntyre, T. M., Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines, *Journal of Biological Chemistry* (1999), 274, 28395-28404.
 59. Tsoukatos D.C., Liapikos, T.A., Tselepis A.D., Chapman M.J. and Ninio E., *Atherosclerosis* (1999), ΙΣΤ.V.46, 123.
 60. Antonopoulou, S., Demopoulos, C.A., On the Mediterranean diet. *INFORM* (1997), 8(7), 776-777.
 61. Fragopoulou, E., Nomikos, T., Antonopoulou, S., Mitsopoulou, C.A., and Demopoulos, C.A., Separation of biologically active lipids from red wine. *Journal of Agricultural Food Chemistry* (2000), 48, 1234-1238.
 62. Heery J.M., Kozak M., Stafforini D.M., Jones D.A., Zimmerman G.A., McIntyre T.M. And Prescott S.M., Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells, *Journal of Clinical Investigation* (1995), 96: 2322-2330.
 63. Prescott S.M., McIntyre T.M., Zimmerman G.A. and Stafforini M.D., Inflammation as an early component of atherosclerosis and vascular damage - A role for P-selectin and platelet-activating factor, *Japanese Circulation Journal* (1996), 60, 137-140.
 64. Stafforini, D. M., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., *Trans, Assoc. Am. Physic.*, 1992, 105, 44-63.
 65. Liapikos T.A., Antonopoulou S., Karabina S.-A., Tsoukatos D.C., Demopoulos C.A. and Tselepis A.D., Platelet-activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated, *Biochimica et Biophysica Acta* (1994), 1212(3): p. 353-60.

66. Simões T., Carvalho J., Sousa A., Lemos M.F., Gil M.M., Pedrosa R., Tecelão C., Seasonal Variation in Proximate Composition and Fatty Acid Profile of Grey Triggerfish (*Balistes capriscus*) Captured Along the Coast of Portugal, *Journal of Food Science* (2013), 78(5): C691-C695.
67. Sekar, V.R., V.; Dhinakaran, A.; Rajasekaran, R.; Ilayaraja, C., Nutritive profiles in different size groups and body parts of common whelk *Hemifusus pugilinus* (born, 1778) from Pazhayar, southeast coast of India. *Online Journal of Animal and Feed Research (OJAFR)* (2012), 2(2):189-196.
68. Vranić Danijela, Đinović-Stojanović Jasna, Spirić Aurelija, Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) from aquaculture– meat quality and importance in the diet, *Tehnologija mesa*, 52 (2011) 1, 122–133.
69. Bunji Yoshitomi, Masatoshi Aoki, Syun-ichirou Oshima, Kazuhiko Hata, Evaluation of krill (*Euphausia superba*) meal as a partial replacement for fish meal in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) diets. *Aquaculture* (2006), 261 440–446.
70. Παπουτσόγλου Σ., *Διατροφή Ιχθύων*, Εκδόσεις Σταμούλη, (2008).
71. Shearer, K. D., Factors affecting the proximate cultured fishes with emphasis composition of on salmonids, *Aquaculture* (1994), 119, 63-88.
72. Belitz H.-D., Grosch W., Schieberle P., *Χημεία Τροφίμων*, 3^η Έκδοση, Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη (2004).
73. Liaset, B., Julshamn, K. and Espe, M., Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™, *Process Biochemistry* (2003), 38(12), 1747-1759.
74. Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Marchioli R, Harris WS, Omega-3fatty acids for cardio protection, *Mayo Clinic Proceedings* (2008);83:324 –32.
75. Roos N., Chamnan C., Loeung D., Jakobsen J, Haraksingh S. Freshwater fish as a dietary source of vitamin A in Cambodia, *Food Chemistry* (2007), 103(4): p. 1104-1111.
76. Παπαναστασίου Δ.Π., *Τεχνολογία και Ποιοτικός Έλεγχος Αλιευμάτων*, Τόμος Α, Εκδόσεις ΙΩΝ, Αθήνα, (1990).
77. Le Guen, S., Prost, C. and Demaimay, M., *J. Of Chromatography*, 2000, A896, 361-371.

78. Linsday, R. C., *Food Rev. Int.* (1990), 6, 437-455.
79. Josephson, D. B., Seafood, in *Volatile Compounds in Food and Beverages*, Ed. by Maarse H., Marcel Dekker, New York, 1991, 179-202.
80. Kawai, T., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* (1996), 36, 257-298.
81. Νεοφύτου Χ., *Ιχθυολογία*, University Studio Press, Θεσσαλονίκη (1997).
82. Κλαουδάτος Σ., Κλαουδάτος Δ., *Καλλιέργειες φυτικών και εκτροφές υδρόβιων ζωικών οργανισμών*, Εκδόσεις Προπομπός, Αθήνα (2012), 54-86.
83. Nasopoulou, C. and I. Zabetakis, Benefits of fish oil replacement by plant originated oils in compounded fish feeds. A review, *LWT - Food Science and Technology* (2012), 47(2):217-224.
84. Χώτος, Γ., Ρογδάκης, Ι. 1992. Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών – Λαβράκι και Τσιπούρα (Τεχνικές της Αναπαραγωγής και Πάχυνσης), Εκδόσεις Ίων, Αθήνα.
85. Framian B.V. (2009) Review of the EU aquaculture sector and results of costs and earnings survey. Reference No. FISH/2006/15 - Lot 6, 170.
86. Douglas R. Tocher, Eldar Å. Bendiksen, Patrick J. Campbell, J. Gordon Bell, The role of phospholipids in nutrition and metabolism of teleost fish, *Aquaculture* (2008), 280 21–34.
87. Caballero M.J., Obach A., Rosenlund G., Montero D., Gisvold M., & Izquierdo M. S., Impact of different dietary lipid sources on growth, lipid digestibility, tissue fatty acid composition and histology of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *Aquaculture* (2002), 214(1-4), 253-271.
88. Mourente G., & Bell J. G., Partial replacement of dietary fish oil with blends of vegetable oils (rapeseed, linseed and palm oils) in diets for European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) over a long term growth study: effects on muscle and liver fatty acid composition and effectiveness of a fish oil finishing diet, *Comparative Biochemistry and Physiology e B Biochemistry and Molecular Biology* (2006), 145(3-4), 389-399.
89. Pratoomyot J., Bendiksen E.Å., Bell J.G., Tocher D.R., Comparison of effects of vegetable oils blended with southern hemisphere fish oil and decontaminated northern hemisphere fish oil on growth performance,

- composition and gene expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *Aquaculture* (2008), 280 170–178.
90. Hart Steven D., Bharadwaj Anant S., Brown Paul B., Soybean lectins and trypsin inhibitors, but not oligosaccharides or the interactions of factors, impact weight gain of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture* (2010), 306 310–314.
91. Panserat S., Hortopan G.A., Plagnes-Juan E., Kolditz C., Lansard M., Skiba-Cassy S., D. Esquerré, I. Geurden, F. Médale, S. Kaushik, G. Corraze., Differential gene expression after total replacement of dietary fish meal and fish oil by plant products in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver, *Aquaculture* (2009), 294 123–131.
92. Teskeredzic Z., Higgs D.A., Dosanjh B.S., McBride J.R., Hardy R.W., Beames R.M., Jones J.D., Sirnell M., Vaara T., Bridges R.B., Assessment of undephytinized and dephytinized rapeseed protein concentrate as sources of dietary protein for juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Aquaculture* (1995), 131 261-277.
93. J. Gordon Bell, Fiona McGhee, Patrick J. Campbell, John R. Sargent, Rapeseed oil as an alternative to marine fish oil in diets of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*): changes in flesh fatty acid composition and effectiveness of subsequent fish oil “wash out”, *Aquaculture* (2003) 218, 515–528.
94. Matthew P. Bransden, Chris G. Carter, Peter D. Nichols, Replacement of fish oil with sunflower oil in feeds for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): effect on growth performance, tissue fatty acid composition and disease resistance, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* (2003), 135, 611–625.
95. Maïke Timm-Heinrich, Sylvie Eymard, Caroline P. Baron, Henrik Hauch Nielsen, Charlotte Jacobsen, Oxidative changes during ice storage of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed different ratios of marine and vegetable feed ingredients, *Food Chemistry* (2013), 136 1220–1230.
96. Vlyssides, A.G., M. Loizides, and P.K. Karlis, Integrated strategic approach for reusing olive oil extraction by-products, *Journal of Cleaner Production*, (2004), 12(6): 603-611.

97. Alburquerque J.A., Gonzalvez J., Garcia D., Cegarra J., Agrochemical characterization of “alperujo”, a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction, *Bioresource Technology* (2004), 91(2):195-200.
98. Bligh, E. G. and Dyer, W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* (1959), 37, 911-917.
99. Galanos D. S., and Kapoulas, V. M., Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *Journal of Lipid Research* (1962), 3, 134-137.
100. Nasopoulou, C., Nomikos, T., Demopoulos, C. A., Zabetakis, I. Comparison of antiatherogenic properties of lipids obtained from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Food Chemistry* (2007), 100, 560-567.
101. Κωνσταντίνα Νασοπούλου, *Μελέτη των δραστικών λιποειδών ψαριών ιχθυοτροφείου και ελεύθερης αλιείας ως προς τα καρδιαγγειακά νοσήματα*, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009.
102. Καραντώνης Χ.Χ., *Μελέτη βιολογικά δραστικών λιποειδών σε παραδοσιακά τρόφιμα της Μεσογειακής διαίτας και διερεύνηση της προστατευτικής δράσης αυτών στην αθηροσκλήρωση*, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2004.