



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ  
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ



ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**  
**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**  
**«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**Μελέτη της βιολογικής δραστικότητας των**  
**πολικών λιποειδών του μουρουνέλαιου**

**ΚΥΡΙΑΖΟΠΟΥΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΑΘΗΝΑ**  
**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2013**



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΚΥΡΙΑΖΟΠΟΥΛΟΥ ΑΓΓΕΛΙΚΗ  
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**A.M: 111308**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

Δημόπουλος Κωνσταντίνος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

Οικονόμου Αναστάσιος, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

**ΑΘΗΝΑ**

**ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2013**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μουρουνέλαιο, δηλαδή το ιχθυέλαιο που προέρχεται από το ήπαρ της μουρούνας, χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής. Ο λόγος είναι η σημαντική διαθρεπτική του αξία που οφείλεται στο ευρύ φάσμα ουσιών που περιλαμβάνει, όπως τριακυλογλυκερόλες (TAG), μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της σύστασης του μουρουνέλαιου σε λιπαρά οξέα καθώς και η αξιολόγηση της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών του που συνδέεται με την προστατευτική του ιδιότητα έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω της επίδρασης τους στη δημιουργία των αθηρωματικών πλακών. Πιο συγκεκριμένα, επικεντρωθήκαμε στη βιολογική δραστηριότητα των πολικών λιποειδικών κλασμάτων διότι, από προηγούμενες *in vivo* έρευνες, έχει αποδειχτεί ότι τα πολικά λιποειδικά κλάσματα είναι αυτά που μπορούν να αναστείλουν την αθηρογένεση και να μειώσουν το πάχος των ήδη σχηματισμένων αθηροσκληρωτικών πλακών σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια. Αρχικά τα ολικά λιποειδή (TL) του μουρουνέλαιου διαχωρίστηκαν σε πολικά (PL) και ουδέτερα λιποειδή (NL) με χρωματογραφία κατανομής κατ' αντιρροή. Τα πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε λιποειδικά κλάσματα με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μελετήθηκε η ικανότητά των ολικών πολικών, των ολικών ουδέτερων και των πολικών λιποειδικών κλασμάτων να προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή να αναστέλλουν την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς και η περιεκτικότητα των ολικών πολικών και ολικών ουδέτερων λιποειδών σε λιπαρά οξέα με αέρια χρωματογραφία (GC).

Τα αποτελέσματα έδειξαν καταρχήν ότι στο μουρουνέλαιο τα ουδέτερα λιποειδή βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα πολικά λιποειδή. Όλα τα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα του μουρουνέλαιου καθώς και τα ολικά πολικά λιποειδή του παρουσίασαν *in vitro* βιολογική

δράση έναντι του PAF, γεγονός που αποτελεί άλλη μια ένδειξη της σημαντικής συμβολής των πολικών λιποειδών κατά των καρδιαγγειακών νοσημάτων.

**ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ:** Μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών του μουρουνέλαιου και της σύστασης του σε λιπαρά οξέα.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** μουρουνέλαιο, παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, συσσώρευση αιμοπεταλίων, πολικά λιποειδή.

## ABSTRACT

«Study of the biological activity of the polar lipids of cod liver oil»

Aggeliki Kyriazopoulou

Cod liver oil, i.e. the fish oil derived from the liver of cod, is widely used as a food supplement. The reason is its important nutritional value which is due to the wide range of substances it contains, such as triacylglycerols (TAGs), mono- and di-acylglycerols, free fatty acids, vitamins and  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids.

The scope of this study is the investigation of the fatty acid composition of cod liver oil and also the evaluation of the biological activity of its lipids which is related to its protective capacity against cardiovascular diseases through its impact on the creation of atherosclerotic plaques. More specifically, we focused on the biological activity of the polar lipid fractions since in previous *in vivo* studies it has been proved that it is the polar lipid fractions that can reduce the thickness of the already formed atherosclerotic plaques in hypercholesterolemic rabbits and / or cause their retreat. At first, the total lipids (TL) of cod liver oil were separated into polar (PL) and neutral lipids (NL) by counter-current distribution method. The polar lipids were further separated into polar lipid fractions by preparative thin layer chromatography (TLC). Total polar lipids, total neutral lipids and polar lipid fractions were tested for their ability to aggregate platelets or inhibit the platelet-activating factor (PAF)-induced aggregation, while the fatty acid composition of total polar and total neutral lipids was investigated by gas chromatography (GC).

The results showed that in cod liver oil the levels of neutral lipids are by far higher than the levels of polar lipids. All polar lipid fractions and total polar lipids (TPL) of cod liver oil exhibited *in vitro* biological activity against PAF, which constitutes another evidence of the significant contribution of polar lipids against cardiovascular diseases.

**SUBJECT AREA:** Investigation of the biological activity of cod liver oil lipids and of its fatty acid composition.

**KEYWORDS:** cod liver oil, platelet-activating factor (PAF), cardioprotective properties, platelet aggregation, polar lipids.



## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία Μεταπτυχιακής Ειδίκευσης εκπονήθηκε την περίοδο 2012-2013 στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Με την περάτωσή της, μου δίνεται η ευκαιρία να ευχαριστήσω ολόψυχα τους ανθρώπους που γνώρισα, συνεργάστηκα και με βοήθησαν να φτάσω ως εδώ. Πρώτα απ' όλα, ευχαριστώ τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Ιωάννη Ζαμπετάκη για την ανάθεση του θέματος, τη στήριξη, τη σημαντική βοήθεια του και την καθοδήγηση στην προσπάθειά μου στο δύσκολο και επίπονο δρόμο για την πραγματοποίηση και τη συγγραφή του έργου αυτού.

Παράλληλα, επιθυμώ να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Χημείας Τροφίμων και ιδιαίτερα στην υποψήφια διδάκτορα Ελένη Σιορίκη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Ντετοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά τους, τις συμβουλές τους και το αμείωτο ενδιαφέρον τους κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης του πειραματικού έργου της παρούσας εργασίας.

Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο και την ομάδα του για την πολύτιμη βοήθεια τους στην περάτωση της εργασίας μου.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ηθική, ψυχολογική και οικονομική στήριξη. Χωρίς τη βοήθεια τους δε θα μπορούσα να φτάσω ως εδώ.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΡΟΛΟΓΟΣ.</b>	<b>.20</b>
<b>1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ιχθυέλαια- Μουρούνα- Μουρουνέλαιο.</b>	<b>22</b>
1.1. Ιχθυέλαια.	22
1.1.1. Ο ρόλος των ψαριών και των ιχθυελαίων σε σχέση με την αθηρογένεση.	22
1.1.2. Παραγωγή ιχθυελαίων.	24
1.1.3. Εξαγωγή ιχθυελαίων.	25
1.1.3.1. Συμβατική διαδικασία παραγωγής ιχθυαλεύρων.	25
1.1.3.2. Υδρόλυση.	26
1.1.3.3. Εκχύλιση με διαλύτη.	28
1.1.4. Καθαρισμός και αποθήκευση ελαίων.	29
1.1.4.1. Αλκαλική/όξινη επεξεργασία.	29
1.1.4.2. Υδρόλυση με λιπάση.	30
1.1.4.3. Ραφινάρισμα με ρητίνη.	30
1.1.5. Ιχθυέλαια από ήπαρ.	31
1.1.6. Τεχνικές για την παραλαβή πολύτιμων συστατικών από τα ιχθυέλαια.	31
1.1.7. Διάφορες παρενέργειες των ιχθυελαίων.	32
1.2. Μουρούνα.	33
1.2.1. Είδη μουρούνας.	34
1.2.1.1. <i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod)- Γάδος του Ατλαντικού.	35
1.2.1.2. <i>Gadus macrocephalus</i> (Pacific cod)- Γάδος του Ειρηνικού.	38

1.2.1.3. Gadus ogac (Greenland cod)- Γάδος της Γροιλανδίας. . . . .	40
1.2.2. Χημική σύσταση. . . . .	42
1.3. Μουρουνέλαιο. . . . .	44
1.3.1. Μερικές ωφέλιμες δράσεις του μουρουνέλαιου. . . . .	44
1.3.2. Μουρουνέλαιο SEVEN SEAS. . . . .	46
<b>2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ – Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PAF ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ. . . . .</b>	<b>48</b>
2.1. Αθηροσκλήρωση – Εισαγωγή. . . . .	48
2.2. Δομή αρτηρίας. . . . .	49
2.3. Βλάβες αθηροσκλήρυνσης. . . . .	50
2.4. Θεωρίες για την αθηρογένεση. . . . .	51
2.4.1. Η θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό (response-to-injury hypothesis) . . . . .	52
2.4.1.1. Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου. . . . .	54
2.4.2. Η θεωρία της απάντησης στην κατακράτηση (response-to-retention hypothesis) . . . . .	55
2.4.3. Η θεωρία της οξειδωτικής τροποποίησης (Oxidative modification hypothesis) . . . . .	56
2.5. Παράγοντες κινδύνου της αθηροσκλήρωσης. . . . .	59
2.6. Ο ρόλος του PAF στην αθηρογένεση- Εισαγωγή. . . . .	63
2.7. Χημική δομή του PAF. . . . .	64
2.8. Μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης του PAF. . . . .	65
2.9. Η σχέση του PAF με την ox-LDL. . . . .	66
2.10. Ο ρόλος της ακετυλουδρολάσης. . . . .	67

2.11. Μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας. . . . .	69
<b>3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΛΙΠΟΕΙΔΗ. . . . .</b>	<b>73</b>
3.1. Λιποειδή – Εισαγωγή. . . . .	73
3.2. Λιπαρά οξέα. . . . .	74
3.3. Πολικά λιποειδή. . . . .	76
<b>4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ. . . . .</b>	<b>80</b>
4.1. Γενική περιγραφή της χρωματογραφίας. . . . .	80
4.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) . . . . .	80
4.3. Αεριοχρωματογραφία. . . . .	81
4.3.1. Όργανα για τη χρωματογραφία αερίου-υγρού. . . . .	82
4.3.1.1. Τροφοδοσία φέροντος αερίου. . . . .	83
4.3.1.2. Σύστημα έγχυσης δείγματος. . . . .	83
4.3.1.3. Φούρνοι στηλών. . . . .	84
4.3.1.4. Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID) . . . . .	85
<b>5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΚΟΠΟΣ. . . . .</b>	<b>87</b>
<b>6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ -ΜΕΘΟΔΟΙ. . . . .</b>	<b>88</b>
6.1. Κατανομή κατ' αντιρροή. . . . .	88
6.2. Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) Λιποειδών. . . . .	89
6.3. Αέρια Χρωματογραφία (G.C) λιπαρών οξέων ψαριών. . . . .	91
6.3.1. Μέθοδος εστεροποίησης λιπαρών οξέων. . . . .	91

6.3.2. Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μεθυλεστέρων των Λιπαρών Οξέων από Τσιπούρα με Αέρια Χρωματογραφία (G.C) . . . . .	93
6.4. Βιολογική Δοκιμασία Συσσώρευσης Πλυμένων Αιμοπεταλίων Κουνελιού. . . . .	95
<b>7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ. . . . .</b>	<b>103</b>
7.1. Δείγμα. . . . .	103
7.2. Πειραματική πορεία. . . . .	103
7.3. Αποτελέσματα ζυγίσεων των TL, PL, NL. . . . .	105
7.4. Αποτελέσματα της ποιοτικής και ποσοτικής μελέτης των PL και NL του δείγματος με αέρια χρωματογραφία. . . . .	106
7.4.1. PL μουρουνέλαιου . . . . .	106
7.4.2. NL μουρουνέλαιου. . . . .	108
7.5. Αποτελέσματα βιολογικής δοκιμασίας πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού. . . . .	114
7.5.1. Βιολογική δραστικότητα των ολικών πολικών και ολικών ουδέτερων λιπιδίων του μουρουνέλαιου. . . . .	114
7.5.2. Βιολογική δραστικότητα των πολικών λιπιδικών κλασμάτων του μουρουνέλαιου. . . . .	117
7.5.3. Σύγκριση της βιολογικής δραστικότητας των ολικών πολικών λιπιδίων του μουρουνέλαιου με τη βιολογική δραστικότητα άλλων ψαριών. . . . .	123
<b>8. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΕΠΙΛΟΓΟΣ. . . . .</b>	<b>127</b>
<b>9. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ. . . . .</b>	<b>130</b>
<b>10. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. . . . .</b>	<b>131</b>

<b>11. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. . . . .</b>	<b>132</b>
<b>12. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ. . . . .</b>	<b>135</b>

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 1.1.</b> Γενική πορεία υδρόλυσης. . . . .	28
<b>Σχήμα 2.1.</b> Η χημική δομή του PAF. . . . .	64
<b>Σχήμα 2.2.</b> Πορεία βιοσύνθεσης του PAF . . . . .	66
<b>Σχήμα 3.1.</b> Διάκριση λιποειδών . . . . .	74
<b>Σχήμα 3.2.</b> Δομές κυριότερων ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων. . . . .	75
<b>Σχήμα 3.3.</b> Μετατροπή ω-6 λιπαρών οξέων σε ω-3. . . . .	75
<b>Σχήμα 3.4.</b> Γενικός τύπος γλυκερινούχων φωσφολιποειδών. . . . .	77
<b>Σχήμα 3.5.</b> Φωσφολιποειδές και λυσο-(lyso-) μορφή φωσφολιποειδούς. .78	
<b>Σχήμα 4.1.</b> Διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου . . . . .	82
<b>Σχήμα 4.2.</b> Διατομή στομίου άμεσης έγχυσης δείγματος με σύστημα ταχέως μικροεξατμιστή. . . . .	84
<b>Σχήμα 4.3.</b> Ένας τυπικός ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας. . . . .	84
<b>Σχήμα 6.1.</b> Τρανσεστεροποίηση των τριαλογλυκερολών καταλυόμενη από βάση. . . . .	92
<b>Σχήμα 6.2.</b> Ενεργοποίηση και συσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και απόδοση της καταγραφόμενης καμπύλης ως αύξησης της διαπερατότητας με το χρόνο. Α) Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση, Β) Αιμοπετάλια μετά από προσθήκη PAF, Γ) Συσώρευση αιμοπεταλίων. . .	98
<b>Σχήμα 7.1.</b> Γενική Πειραματική Διαδικασία. . . . .	104
<b>Σχήμα 7.2.</b> Συγκεντρώσεις (σε ppm) των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των PL και NL των δειγμάτων μουρουνέλαιου αντίστοιχα. . . . .	110

**Σχήμα 7.3.** Συγκεντρώσεις (σε mg Λ.Ο./mg PL ή NL) των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των PL και NL μουρουνέλαιου αντίστοιχα. . . . . 113

**Σχήμα 7.4.** Πολικά λιποειδικά κλάσματα μουρουνέλαιου μετά από διαχωρισμό με TLC. (L-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφιγγομυελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, PI: φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη, L-PE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PA: φωσφατιδικό οξύ, CL: καρδιολιπίνη). Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό τους ήταν χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό 65: 35: 6 (v/v/v) . . . . . 118

**Σχήμα 7.5.** Γράφημα πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψαν μετά από TLC. . . . . 121



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1.</b> Τα 3 είδη του γένους <i>Gadus</i> . . . . .	35
<b>Εικόνα 1.2.</b> <i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod) - Γάδος του Ατλαντικού. . . .	36
<b>Εικόνα 1.3.</b> Γεωγραφική κατανομή του <i>Gadus morhua</i> (Atlantic cod) . .	36
<b>Εικόνα 1.4.</b> <i>Gadus macrocephalus</i> (Pacific cod) - Γάδος του Ειρηνικού. .38	
<b>Εικόνα 1.5.</b> Γεωγραφική κατανομή του <i>Gadus macrocephalus</i> (Pacific cod) . . . . .	39
<b>Εικόνα 1.6.</b> <i>Gadus ogac</i> (Greenland cod) - Γάδος της Γροιλανδίας. . . .41	
<b>Εικόνα 1.7.</b> Γεωγραφική κατανομή του <i>Gadus ogac</i> (Greenland cod) . .	41
<b>Εικόνα 1.8.</b> Μουρουνέλαιο SEVEN SEAS. . . . .	46
<b>Εικόνα 2.1.</b> Δομή φυσιολογικής αρτηρίας. . . . .	49
<b>Εικόνα 2.2.</b> Θεωρία απάντησης στον τραυματισμό (response-to-injury hypothesis). (A) Η αθηροσκλήρωση οφείλεται στον τραυματισμό ή τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και εναπόθεση LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο. Συνοδεύεται από την προσκόλληση λευκοκυττάρων και τη μετακίνησή τους διαμέσου του ενδοθηλίου. (B) Στο ενδιάμεσο στάδιο, η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και από μια φλεγμονώδη απάντηση, η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, την προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, την περαιτέρω είσοδο λευκοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα και τη μετακίνηση λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα. (C) Σε προχωρημένο στάδιο, η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από τη συνεχιζόμενη συσσώρευση μακροφάγων, το σχηματισμό ινώδους κάψας και νέκρωση του πυρήνα της αλλοίωσης. . . . .	53
<b>Εικόνα 2.3.</b> Θεωρία «απάντησης στην κατακράτηση» (response-to-retention hypothesis). Σύμφωνα με την αρχική θεωρία, η ήπια με μέτρια	

υπερλιπιδαιμία προκαλεί την ανάπτυξη αλλοίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις των αρτηριών που χαρακτηρίζονται από την τοπική σύνθεση μορίων που κατακρατούν την apo-B100. Στο σχήμα απεικονίζονται τα αρχικά βήματα (1-5), τα οποία είναι η παραγωγή LDL σωματιδίων μέσω λιπόλυσης, η μετακίνηση αυτών διαμέσου της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας, η δέσμευση και κατακράτησή τους από ειδικά μόρια του στηρικτικού ιστού του έσω χιτώνα, η εκροή και συσσώρευσή τους. Η συσσώρευση των σωματιδίων LDL θεωρείται ότι πυροδοτεί μια φλεγμονώδη απάντηση που χαρακτηρίζεται από τη χημειοταξία, την έκφραση μορίων προσκόλλησης επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, την προσκόλληση λευκοκυττάρων και την είσοδό τους στον υποενδοθηλιακό χώρο, τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, την πρόσληψη οξειδωμένης LDL, το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων. . . . . 55

**Εικόνα 2.4.** Θεωρία της οξειδωτικής τροποποίησης (Oxidative modification hypothesis). Τα σωματίδια της LDL εγκλωβίζονται στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου υφίστανται οξείδωση από κύτταρα του αγγείου, όπως λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα. Η ox-LDL, η οποία θεωρείται ότι έχει πρωταρχικό ρόλο, (A) διεγείρει τη χημειοταξία των μονοκυττάρων, (B) εμποδίζει την είσοδο των μονοκυττάρων από τον υποενδοθηλιακό χώρο στην κυκλοφορία του αίματος και (C) συμβάλλει στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Επίσης, η ox-LDL (D) επάγει τον τραυματισμό και τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και (E) επέρχεται η νέκρωση των αφρωδών κυττάρων εξαιτίας της συσσώρευσης ox-LDL. . . . . 57

**Εικόνα 2.5.** Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας με τον PAF ως γενεσιουργό αίτιο. . . . . 70

**Εικόνα 7.1.** Ενδεικτική πλάκα TLC. . . . . 117

**Εικόνα A1.** Χρωματογράφημα των PL του δείγματος μουρουνέλαιου. . 131

**Εικόνα A2.** Χρωματογράφημα των NL του δείγματος μουρουνέλαιου. .131

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1.</b> Μέσος όρος τιμών σχετικά με τη χημική σύσταση της μουρούνας. . . . .	43
<b>Πίνακας 1.2.</b> Μέσος όρος τιμών μεταλλικών στοιχείων. . . . .	43
<b>Πίνακας 1.3.</b> Μέσος όρος τιμών βιταμινών. . . . .	44
<b>Πίνακας 1.4.</b> Διατροφική ανάλυση μουρουνέλαιου SEVEN SEAS. . .	47
<b>Πίνακας 6.1.</b> Συγκέντρωση των λιπαρών οξέων 17:0 και 21:0 στα πρότυπα διαλύματα. . . . .	94
<b>Πίνακας 7.1.</b> Ποσότητες των TL, PL, NL. . . . .	105
<b>Πίνακας 7.2.</b> Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των PL του δείγματος μουρουνέλαιου. . . . .	107
<b>Πίνακας 7.3.</b> Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των NL του δείγματος μουρουνέλαιου. . . . .	109
<b>Πίνακας 7.4.</b> <i>In vitro</i> βιολογικές δραστηριότητες των ολικών πολικών και ολικών ουδέτερων λιποειδών του μουρουνέλαιου. . . . .	116
<b>Πίνακας 7.5.</b> <i>In vitro</i> βιολογικές δραστηριότητες των πολικών λιποειδικών κλασμάτων μουρουνέλαιου μετά από παρασκευαστική TLC. . . . .	120
<b>Πίνακας 7.6.</b> <i>In vitro</i> βιολογικές δραστηριότητες των ολικών πολικών λιποειδών του μουρουνέλαιου και κάποιων ακόμα ψαριών. . . . .	124
<b>Πίνακας B1.</b> Ταυτοποίηση των κορυφών των PL του δείγματος μουρουνέλαιου σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης. . . . .	132
<b>Πίνακας B2.</b> Ταυτοποίηση των κορυφών των NL του δείγματος μουρουνέλαιου σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης. . . . .	133

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η αθηροσκλήρωση είναι μια χρόνια φλεγμονώδης πάθηση που προκαλείται από την εναπόθεση χοληστερόλης στον έσω χιτώνα των μεγάλων και μεσαίων αρτηριών και μπορεί να οδηγήσει σε οξείες κλινικές περιπτώσεις όπως θρόμβωση ή και ρήξη της αθηρωματικής πλάκας, στην οποία ο PAF (παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων) διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο. Αν και η κλινική εκδήλωση των καρδιαγγειακών νοσημάτων συμβαίνει στη μέση ηλικία, οι βλάβες στο εσωτερικό τμήμα των αρτηριών κάνουν την εμφάνισή τους ήδη από την παιδική και εφηβική ηλικία, ενώ οι πρώτες αθηρωματικές βλάβες είναι δυνατόν να σχηματιστούν ακόμα και από την εμβρυϊκή ηλικία. Τα παιδιά που διατρέχουν αυξημένο κίνδυνο να αναπτύξουν αθηροσκλήρωση κατά την ενήλικη ζωή τους είναι εκείνα που εμφανίζουν μη φυσιολογικά επίπεδα λιπιδίων και ιδιαίτερα όσα πάσχουν από παχυσαρκία, ένα φαινόμενο που γίνεται όλο και πιο συχνό.

Τα ψάρια κατέχουν υψηλή θέση ως προς την ιδιότητα τους να προστατεύουν έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Έχει διαπιστωθεί ότι η ισχυρή αυτή καρδιοπροστατευτική τους δράση οφείλεται στα λιποειδή που περιέχονται στον ιστό τους. Οι τελευταίες έρευνες έχουν ερμηνεύσει την αντιφλεγμονώδη και προστατευτική δράση μέσα από την εξής προσέγγιση σε δύο επίπεδα: α) Με έμμεσο τρόπο. Δηλαδή, η κατανάλωση ω-3 λιπαρών οξέων μεταβάλλει τη σύσταση των λιποειδών των μεμβρανών των κυττάρων που αποτελούν τις πρόδρομες ενώσεις για τη βιοσύνθεση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF), τον κύριο προφλεγμονώδη παράγοντα σε διάφορες παθήσεις, αναστέλλοντας δηλαδή τη παραγωγή του από τα κύτταρα, προστατεύοντας κατά συνέπεια τον οργανισμό από φλεγμονές που προκαλούν φθορά στο καρδιαγγειακό σύστημα. β) Με άμεσο τρόπο. Δηλαδή, επειδή περιέχει λιποειδή που αναστέλλουν την δράση αλλά και την βιοσύνθεση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF).

Τα παραπάνω έχουν αποτελέσει έναυσμα για μελέτη πάνω στις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες των ψαριών και των ιχθυελαίων τους, κάνοντας ένα βήμα επιπλέον για την κατανόηση και διαλεύκανση του τρόπου

δράσης των συστατικών τους, που τα καθιστά τόσο σημαντικά και ισχυρά όπλα για την προστασία της καρδιάς και γενικότερα της υγείας του ανθρώπινου οργανισμού. Στην παρούσα εργασία έχει επιλεγθεί το μουρουνέλαιο για μελέτη των καρδιοπροστατευτικών του ιδιοτήτων, το οποίο προέρχεται από το ήπαρ της μουρούνας και χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΙΧΘΥΕΛΑΙΑ – ΜΟΥΡΟΥΝΑ - ΜΟΥΡΟΥΝΕΛΑΙΟ

## 1.1. ΙΧΘΥΕΛΑΙΑ

Το ενδιαφέρον γύρω από τα ιχθυέλαια έχει αυξηθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια λόγω της διαθρεπτικής τους αξίας και πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί ώστε να αποδειχθεί ότι η κατανάλωση των ιχθυελαίων καθώς και των λιπαρών ψαριών προσφέρει πολλές ευεργετικές ιδιότητες. Τα ιχθυέλαια παράγονται κυρίως από τη σάρκα λιπαρών ψαριών και είναι μοναδικά ανάμεσα σε όλα τα βρώσιμα έλαια και λίπη καθώς αποτελούν τη μόνη τόσο σημαντική πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μακράς αλυσίδας, όπως τα EPA και DHA. Τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα αποτελούν το 30 με 40% του συνόλου των λιπαρών τους οξέων, ενώ, από την άλλη πλευρά, τα ω-6 λιπαρά οξέα συνιστούν λιγότερο από το 10%<sup>1</sup>. Έλαια που προέρχονται από ήπαρ μουρούνας, ιππόγλωσσας (είδος βακαλάου) ή καρχαρία, ή από το σώμα των ψαριών, τυπικά περιέχουν περίπου 200 mg / ml ω-3 λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Τα ιχθυέλαια και κυρίως τα έλαια από το ήπαρ ψαριών όπως ο βακαλάος έχουν το πρόσθετο χαρακτηριστικό γνώρισμα ότι είναι σημαντικές φυσικές πηγές βιταμινών A και D<sup>2,3</sup>.

### 1.1.1. Ο ρόλος των ψαριών και των ιχθυελαίων σε σχέση με την αθηρογένεση

Τα ψάρια και τα ιχθυέλαια, βασικά συστατικά της μεσογειακής διατροφής, αποτελούν μία πολύτιμη πηγή πρωτεϊνών καθώς και ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και κυρίως του εικοσιδυεξαενοϊκού (DHA, C22:6) και εικοσιπενταενοϊκού οξέος (EPA, C20:5), 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.<sup>4</sup>.

Σύμφωνα με μελέτες, τα λιποειδή των ψαριών έχουν προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων<sup>5</sup>, 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 τριακυλογλυκερολών στο αίμα, αυξάνουν τα επίπεδα της «καλής» χοληστερόλης HDL και ελαττώνουν τα επίπεδα της «κακής» χοληστερόλης LDL στο αίμα. Επίσης, προϊόντα του μεταβολισμού των λιπαρών οξέων έχουν ισχυρή δράση έναντι της αρτηριοσκλήρυνσης και των θρομβώσεων.

Σημαντικός αριθμός μελετών, επιδημιολογικών και κλινικών, έχουν γίνει όσον αφορά στο ρόλο που παίζουν τα ψάρια και τα ιχθυέλαια, ως συστατικά της διατροφής του ανθρώπου, στην αθηρογένεση. Τα ω-3 λιπαρά οξέα έχουν σχετιστεί με μειωμένο κίνδυνο στεφανιαίας νόσου, καθώς και με μείωση στη θνησιμότητα λόγω της ασθένειας<sup>6,7</sup>.

Αποτελέσματα της μελέτης δευτερογενούς πρόσληψης Lyon Diet Heart Study συσχέτισαν την πρόσληψη α- λινολενικού οξέος με μικρότερο αριθμό στεφανιαίων επεισοδίων<sup>8</sup>, ενώ η μελέτη DART<sup>9</sup> (Diet And Refraction Trial) στην οποία πήραν μέρος 2033 άντρες με πρόσφατο έμφραγμα του μυοκαρδίου, έδειξε ότι οι ασθενείς που κατανάλωναν δύο γεύματα ψαριού την εβδομάδα ή κάψουλες ιχθυελαίου, που αντιστοιχούν σε 1.5 g ψαριού / ημέρα, εμφάνισαν σχετική μείωση της ολικής θνησιμότητας κατά 29%, η οποία οφειλόταν κυρίως στη μείωση των θανάτων από καρδιαγγειακές παθήσεις.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η διατροφή του ανθρώπου με ιχθυέλαια στην υποτριγλυκεριδαιμία, δηλαδή στην ικανότητα να ελαττώνει τα τριγλυκερίδια στο αίμα, να μειώνει την πίεση του αίματος σε υπερτασικούς καθώς και το ιξώδες του αίματος, προτείνοντας ότι τα ιχθυέλαια έχουν αντιαθηρογενετικές ιδιότητες<sup>10</sup>.

Άλλη *in vivo* μελέτη με πειραματόζωα που βρίσκεται σε συμφωνία με τις προηγούμενες κλινικές μελέτες για τα οφέλη των ιχθυελαίων στην αντιμετώπιση των καρδιαγγειακών νοσημάτων, είναι της Nasoroulou *et al*<sup>11</sup>. Συγκεκριμένα, κουνέλια τα οποία τρέφονταν για 45 μέρες με αθηρογόνο δίαιτα εμπλουτισμένη με πολικά λιποειδή τσιπούρας, εμφάνισαν σε σημαντικό βαθμό μειωμένο πάχος και έκταση της αθηρωματικής πλάκας, σε σχέση με τα ζωικά πρότυπα που τρέφονταν μόνο με αθηρογόνο δίαιτα, καθώς και

αναστολή της ανάπτυξης της αθηρωματικής πλάκας κατά 75% ως προς το πάχος της βλάβης και 73% ως προς την έκταση της βλάβης.

### **1.1.2. Παραγωγή ιχθυελαίων<sup>12</sup>**

Προτού αναγνωριστεί η μεγάλη διαθρεπτική αξία των ιχθυελαίων, ακατέργαστα, δύσοσμα, οξειδωμένα ιχθυέλαια, γνωστά ως «μουρουνέλαιο», χρησιμοποιούνταν ως συμπληρώματα βιταμίνης A και D. Αργότερα, μερικώς εξευγενισμένα και υδρογονωμένα ιχθυέλαια χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή μαργαρίνης. Όμως, τα περισσότερα χρησιμοποιούνται για βιομηχανικούς σκοπούς, όπως ως συστατικά σε βαφές, βερνίκια και λιπαντικά. Πλέον, όπου έχει αναγνωριστεί η σημαντική επίδραση τους στο καρδιαγγειακό και νευρολογικό σύστημα, υπάρχει μεγάλη ζήτηση για εξαιρετικά εξευγενισμένα ιχθυέλαια. Από τη στιγμή που εγκρίθηκε το ιχθυέλαιο για ανθρώπινη κατανάλωση, υπάρχει ανάγκη για καλύτερο έλεγχο ποιότητας στην παραγωγή του. Μεγάλες βελτιώσεις έχουν γίνει, και εξακολουθούν να γίνονται, όσον αφορά τη διατήρηση των πρώτων υλών και των πρωτογενών προϊόντων σε τέτοια κατάσταση, έτσι ώστε το ιχθυέλαιο να μην έχει σημαντικά προβλήματα οξείδωσης προτού εκχυλιστεί και ραφινारιστεί για ανθρώπινη κατανάλωση.

Το ψάρι, για να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ελαίου, πρέπει να ψυχθεί και να αποθηκευτεί σε θερμοκρασία ψυγείου για την ελαχιστοποίηση της ενζυματικής διάσπασης ορισμένων συστατικών. Σε περίπτωση που δε γίνει αυτό, όπως συμβαίνει σε αρκετές τροπικές περιοχές, λαμβάνονται έλαια μειωμένης ποιότητας, που έχουν υποστεί αλλοίωση και οξείδωση, ενώ έχουν σχηματιστεί ενώσεις όπως το θείο, που δρα ως δηλητήριο καταλυτών.

### **1.1.3. Εξαγωγή ιχθυελαίων**

Τα περισσότερα ιχθυέλαια παράγονται ως παραπροϊόντα της συμβατικής διαδικασίας παραγωγής ιχθυαλεύρων, μια τεχνική υγρής απόδοσης (wet rendering). Άλλες πιθανές διεργασίες εξαγωγής είναι η τεχνική



ξηρής απόδοσης (dry rendering), η υδρόλυση, η ενσίρωση (διαδικασία ζύμωσης φυτικών προϊόντων με υψηλό περιεχόμενο υγρασίας και υπό αναερόβιες συνθήκες, με σκοπό τη διατήρηση του προϊόντος αλλά και τη βελτίωση της θρεπτικής του αξίας για χρήση ως ζωοτροφή), η εκχύλιση με διαλύτη, η ανταλλαγή ιόντων.

#### **1.1.3.1. Συμβατική διαδικασία παραγωγής ιχθυαλεύρων**

Μέχρι πρόσφατα, ένα μεγάλο μέρος της παγκόσμιας παραγωγής ιχθυαλεύρων γινόταν στο Περού και τη Χιλή. Όμως, λόγω της όλο και αυξανόμενης ζήτησης για υψηλής ποιότητας ιχθυέλαια και της μείωσης του αριθμού των άγριων ψαριών στη νότιο Αμερική, υπάρχει μια σταθερά αυξανόμενη ποσότητα ελαίου που παράγεται σε άλλες περιοχές. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει 1) μαγείρεμα του ωμού ψαριού που είναι απαραίτητο ώστε να πήξουν οι πρωτεΐνες και να είναι εφικτός ο διαχωρισμός του ελαίου από τα στερεά, 2) πίεση για να διαχωριστεί η υγρή φάση από τα στερεά και 3) ξήρανση των στερεών για να απομακρυνθεί η υγρασία. Η υγρή φάση που προκύπτει μετά την πίεση περιλαμβάνει νερό, έλαιο, υδατοδιαλυτές ενώσεις και αιωρούμενα στερεά. Το έλαιο απομακρύνεται από το μίγμα με φυγοκέντρηση, μετά από την οποία αντλείται και αποθηκεύεται σε μεγάλες δεξαμενές μέχρι να βγει στην αγορά. Από αυτή τη διαδικασία, το ιχθυάλευρο είναι το κύριο προϊόν ενώ το έλαιο θεωρείται παραπροϊόν που διαφέρει σε σύσταση και απόδοση.

Διαχωρισμός ελαίου από την υγρή φάση: Το έλαιο διαχωρίζεται από την υγρή φάση, αφού πρώτα διέλθει από μια δονούμενη επιφάνεια και στη συνέχεια φυγοκεντρηθεί. Η επιφάνεια αυτή απομακρύνει τα στερεά που έχουν προέλθει από την επεξεργασία, τα οποία προστίθενται στα υπόλοιπα στερεά που προορίζονται για ξήρανση. Συχνά λαμβάνει χώρα και “στίλβωση”, μια διεργασία που περιλαμβάνει τη χρήση ατμού ή ζεστού νερού για να “εκπλύνει” ή να αφαιρέσει το έλαιο. Η τελική έκπλυση και φυγοκέντρηση απομακρύνει πολλές από τις προσμίξεις που συνεισφέρουν στην υποβάθμιση του κατά την αποθήκευση. Όσο είναι ακόμα ζεστό από τη διαδικασία του μαγειρέματος, το έλαιο διοχετεύεται σε μεγάλες δεξαμενές. Η εναπομένουσα υγρή φάση συχνά

αποχύνεται πάνω στο ψάρι που προορίζεται για ξήρανση. Με τον τρόπο αυτό γίνεται ανάκτηση των διαλυμένων στερεών και ταυτόχρονα μειώνονται οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις λόγω απόχυσης της υγρής φάσης στα λύματα.

Λαμβάνοντας υπόψη τη μεγάλη σημασία της πρόληψης της οξειδωσης των ω-3 λιπαρών οξέων, τα οποία είναι σημαντικά για τη διατροφή και την υγεία των ανθρώπων, το έλαιο θα έπρεπε να ψύχεται πριν την αποθήκευσή του και θα έπρεπε να εισάγεται στη δεξαμενή κοντά στον πάτο και να απομακρύνεται από την κορυφή. Όντως, η ποιότητα των συμβατικών ιχθυαλεύρων μπορεί να βελτιωθεί σημαντικά αν το έλαιο ψύχεται αμέσως μετά την εξαγωγή του από το ζεστό μαγειρεμένο ψάρι και πριν διοχετευτεί στις δεξαμενές αποθήκευσης. Για να διατηρηθεί το έλαιο κατά την αποθήκευσή του, χαμηλής περιεκτικότητας σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, η λάσπη που δημιουργείται στον πάτο της δεξαμενής και περιέχει βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς, καθώς και το νερό στην επιφάνεια θα πρέπει να απομακρύνονται ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Επίσης, συνήθως προστίθεται κάποιο αντιοξειδωτικό μετά τη φυγοκέντρηση ή σε κάποια άλλη φάση της δοκιμασίας ώστε να μειωθεί περαιτέρω η οξειδωτική υποβάθμιση κατά τη αποθήκευση.

### **1.1.3.2. Υδρόλυση**

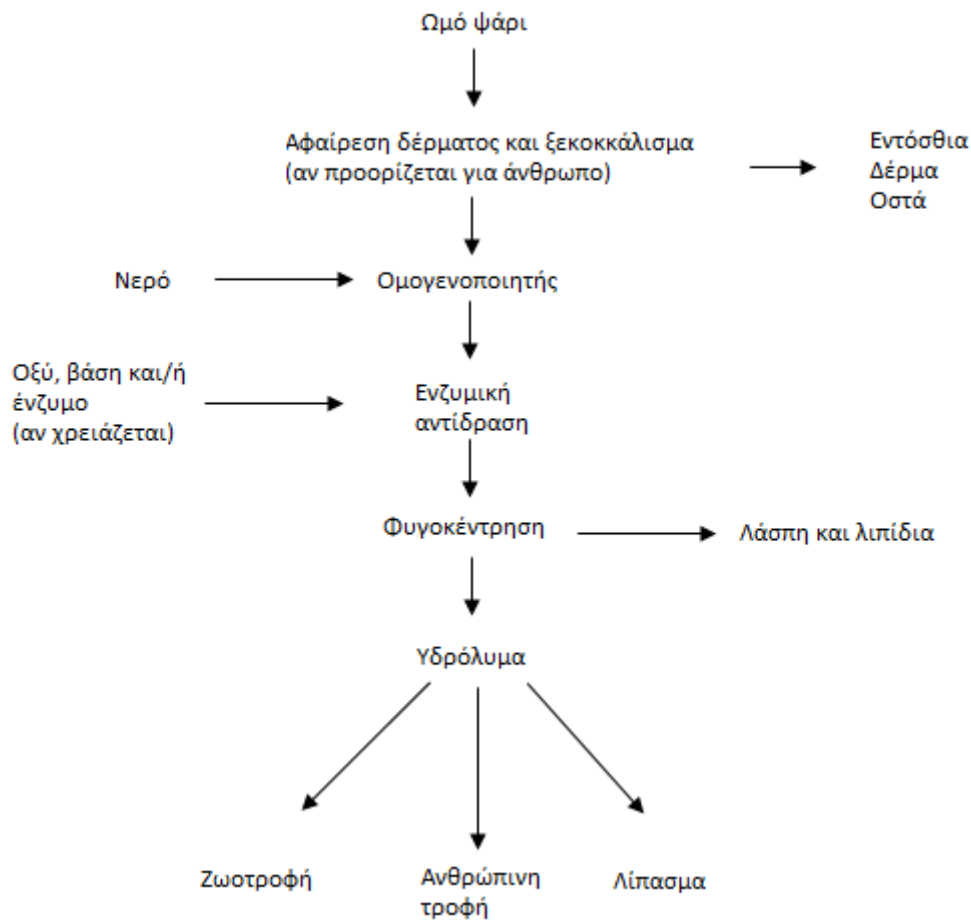
Η σάρκα του ψαριού μπορεί να υδρολυθεί από πρωτεολυτικά ένζυμα είτε ενδογενή είτε προστιθέμενα, ώστε να προκύψει ένα υψηλής ποιότητας λειτουργικό πρωτεϊνικό προϊόν. Η γενική πορεία της διαδικασίας αυτής φαίνεται στο Σχήμα 1.1. Το μεγαλύτερο μέρος του ελαίου απομακρύνεται με φυγοκέντρηση, ή, για τα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά ψάρια, μέρος του ελαίου έρχεται στην επιφάνεια και μπορεί να μεταγγιστεί. Υπάρχει μια ποσότητα ελαίου που απομένει στο τελικό προϊόν, και πιο συγκεκριμένα, έως και 5% του ελαίου παραμένει στο πρωτεϊνικό υδρόλυμα εξαιτίας του σχηματισμού γαλακτώματος νερού-ελαίου. Αν το υδρόλυμα ξηρανθεί για να απομακρυνθεί το νερό, το έλαιο απομένει στο αποξηραμένο προϊόν.

Ανάλογα με το επιλεγόμενο πρωτεολυτικό ένζυμο, η διαδικασία διεξάγεται είτε κάτω από όξινες είτε κάτω από βασικές συνθήκες. Η διαδικασία

της υδρόλυσης που διεξάγεται από ενδογενή ένζυμα σε ένα χαμηλό pH (π.χ. 2-4) έχει το πλεονέκτημα ότι το προκύπτον προϊόν είναι αρκετά σταθερό ως προς την αλλοίωσή του από μικροοργανισμούς. Ωστόσο, η αντίδραση μπορεί να είναι βραδεία και ανεξέλεγκτη, ανάλογα με την πηγή και τα τμήματα των ψαριών που χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα. Η υδρόλυση από ενδογενή ένζυμα ποικίλλει ευρέως, ανάλογα με την ποσότητα της τροφής στα στομάχια των ψαριών. Αυτό οφείλεται στην ενεργοποίηση των ενζύμων του στομάχου από την ποσότητα και τον τύπο της τροφής που έχει καταναλωθεί.

Όταν τα ενδογενή ένζυμα χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση, με την προσθήκη οξέως που διατηρεί το pH στο 4 ή και παρακάτω, το προϊόν που παράγεται είναι γνωστό ως “ενσίρωση ψαριών” (fish silage). Το ακατέργαστο προϊόν που προκύπτει από αυτή τη μορφή υδρόλυσης χρησιμοποιείται για ζωοτροφές ή λιπάσματα. Ως λίπασμα, το προϊόν έχει πολλά πλεονεκτήματα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ένα αποτελεσματικό σπρέι για το φύλλωμα. Το προκύπτον υδρολυμένο προϊόν, όταν η επεξεργασία του ολοκληρωθεί σωστά μέχρι το τέλος, έχει πολύ διακριτική οσμή ψαριού και είναι πολύ πιο αποτελεσματικό από τα πετροχημικά λιπάσματα, καθώς επίσης και φιλικό προς το περιβάλλον.

Η υδρόλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε υψηλότερες τιμές pH με τη χρήση ενζύμων που προέρχονται από λαχανικά ή παρασκευάζονται από μικροβιακή δράση. Μερικά από αυτά τα ένζυμα είναι πολύ πιο αποτελεσματικά από τα ενδογενή ένζυμα στο ότι οι διαδικασίες μπορούν να ελέγχονται με μεγαλύτερη ακρίβεια και να ολοκληρώνονται σε πολύ λιγότερο χρόνο. Ωστόσο, υπάρχει ένας αρνητικός παράγοντας στη χρήση διαδικασιών που απαιτούν σχεδόν ουδέτερες ή βασικές συνθήκες, διότι τα προϊόντα έχουν μικρή διάρκεια ζωής εκτός εάν σταθεροποιηθούν μετά το πέρας της υδρόλυσης.



**Σχήμα 1.1.** Γενική πορεία υδρόλυσης.

### 1.1.3.3. Εκχύλιση με διαλύτη

Παλαιότερα είχαν γίνει προσπάθειες για την εκχύλιση ιχθυελαίων με χρήση διαλυτών. Η αλκοόλη είχε χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο πρόγραμμα ανάπτυξης κατά τη διάρκεια του 1960 και του 1970 η οποία είχε υποστηριχθεί από την Εθνική Υπηρεσία Θαλάσσιας Αλιείας των ΗΠΑ και την Εθνική Ωκεανογραφική και Ατμοσφαιρική Διοίκηση. Το πρόγραμμα αυτό, που ήταν μια προσπάθεια να φτιαχτεί ένα συμπύκνωμα πρωτεϊνών από ψάρια για ανθρώπινη κατανάλωση, εξελίχθηκε σε αποτυχία λόγω οικονομικών προβλημάτων. Η αλκοόλη, ένας πολικός διαλύτης, δεν είναι αποτελεσματική για την εκχύλιση λίπους, δεδομένου ότι, λόγω πολικότητας, απομακρύνει το

νερό και δημιουργεί την ανάγκη να ακολουθήσουν πολλές εκχύλισεις ώστε να εξασφαλιστεί η ανάκτηση του ελαίου. Το κόστος της απομάκρυνσης του νερού με διαλύτη και της εν συνεχεία ανάκτησης του διαλύτη από το γαλακτωματοποιημένο υπόλειμμα νερού, ελαίου και υδατοδιαλυτών σωματιδίων είναι οικονομικά ασύμφορο.

Η εκχύλιση με μη πολικούς διαλύτες είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για την απομάκρυνση ελαίου από ζωικές πρώτες ύλες. Μία διεργασία, όπου γινόταν χρήση 1,2- διχλωροαιθανίου ως διαλύτη, χρησιμοποιήθηκε για τη διατροφή ζώων. Αυτή είναι μια αποτελεσματική και ασφαλής διαδικασία, εφόσον γίνεται υπό κατάλληλη εποπτεία και είναι ελεγχόμενη. Ωστόσο, τα προβλήματα που αφορούσαν στη χρήση ενός τοξικού διαλύτη και οι επακόλουθοι κυβερνητικοί περιορισμοί εμπόδισαν την εκτεταμένη χρήση αυτού του διαλύτη για την παρασκευή συμπυκνώματος πρωτεϊνών από ψάρια για ανθρώπινη κατανάλωση.

Πολλές διεργασίες που περιελάμβαναν τη χρήση διαλυτών εκχύλισης για την ανάκτηση υψηλής ποιότητας ελαίου, έχουν αποδειχθεί προβληματικές. Οι διαλύτες απομακρύνουν, εκτός των άλλων, πολλές χρωστικές ουσίες και άλλα συστατικά που δεν είναι επιθυμητό να υπάρχουν στο έλαιο. Το οικονομικό πρόβλημα της ανάκτησης καθαρού ελαίου από τον διαλύτη δεν έχει επιλυθεί ικανοποιητικά. Ωστόσο, καινούριες τεχνικές αναπτύσσονται<sup>140</sup>.

#### **1.1.4. Καθαρισμός και αποθήκευση ελαίων**

##### **1.1.4.1. Αλκαλική / όξινη επεξεργασία**

Ο καθαρισμός ή ραφινάρισμα των ιχθυελαίων περιλαμβάνει μια σειρά από αλκαλικές και όξινες επεξεργασίες για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων προϊόντων. Η αλκαλική επεξεργασία απομακρύνει τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα προϊόντα αποσύνθεσης του ελαίου, τα οποία προσδίδουν ισχυρή γεύση και οσμή τάγγισης. Επίσης, προκαλεί πήξη της πρωτεΐνης για να απελευθερωθεί το έλαιο. Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάδευση του ελαίου με βάση αρκετές φορές, ανάλογα με τη θερμοκρασία και το περιεχόμενο του σε λιπαρά οξέα. Στη συνέχεια, συχνά μετά από 12 ή και

περισσότερες ώρες ανακίνησης και καθίζησης, το διαυγές έλαιο εκπλένεται με ζεστό νερό για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων και των εναπομεινάντων καυστικών ενώσεων. Οι χρωστικές ουσίες πρέπει να απομακρυνθούν με λεύκανση, συνήθως με φυσικό ή ενεργοποιημένο άργιλο.

#### **1.1.4.2. Υδρόλυση από λιπάση**

Κατά την τελευταία δεκαετία, έχει μελετηθεί η χρήση μικροβιακών λιπασών για την παραγωγή συμπυκνώματος ω-3 λιπαρών οξέων. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της τεχνολογίας είναι ότι δεν υπάρχουν ακραίες τιμές pH ή υψηλές θερμοκρασίες, τα οποία έχουν αρνητικές επιπτώσεις στα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα των ιχθυελαίων (εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το εικοσιδυεξανοϊκό οξύ (DHA)). Αυτή η τεχνολογία έχει τεράστιες προοπτικές όσον αφορά την αύξηση της εκλεκτικότητας συγκεκριμένων προϊόντων. Επιπλέον, το προκύπτον μίγμα ακυλογλυκερόλης / αιθυλεστέρα μπορεί να αποστάζεται με πολύ μικρότερη αρνητική επίδραση από ότι όταν αποστάζεται το ιχθυέλαιο.

#### **1.1.4.3. Ραφινάρισμα με ρητίνη**

Μια εν ψυχρώ διαδικασία όπου χρησιμοποιούνται μακροπορώδεις ρητίνες κατιόντων έχει αναπτυχθεί για τη βελτίωση των χημικών, φυσικών και οργανοληπτικών ποιοτικών χαρακτηριστικών των ιχθυελαίων. Οι ρητίνες περιλαμβάνουν τόσο ασθενείς όσο και ισχυρές κατιοντικές και ανιοντικές ρητίνες. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι μια διαδικασία που περιλαμβάνει τη χρήση άκρως όξινης κατιοντικής ρητίνης έχει ως αποτέλεσμα πολλά χαρακτηριστικά που είναι ανώτερα από την μοριακή απόσταση.

### **1.1.5. Ιχθυέλαια από ήπαρ**

Η χημική δομή των ιχθυελαίων τους προσδίδει ορισμένες επιθυμητές ιδιότητες για ανθρώπινη κατανάλωση και άλλες χρήσεις. Ορισμένα είδη ψαριών με σάρκα χαμηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, όπως ο βακαλάος, αποθηκεύουν το μεγαλύτερο μέρος του ελαίου τους στο αναλογικά μεγάλο συκώτι τους. Το έλαιο αυτό αποτελούσε μια πολύτιμη πηγή βιταμινών Α και D, μέχρις ότου η ανάπτυξη των λιγότερο ακριβών συνθετικών μορφών των βιταμινών αυτών στα τέλη του 1940 να καταστρέψει την αγορά των ιχθυελαίων από ήπαρ. Το έλαιο από ήπαρ διαχωρίζεται με ήπια θέρμανση με ατμό. Στη συνέχεια, εκπλένεται και φυγοκεντρείται.

### **1.1.6. Τεχνικές για την παραλαβή πολύτιμων συστατικών από τα ιχθυέλαια**

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την εκχύλιση ορισμένων συστατικών από τα ιχθυέλαια για την ιατρική ή θρεπτική αξία τους. Αυτές οι τεχνικές επεξεργασίας περιλαμβάνουν απόσταξη, κρυστάλλωση, διάφορες χρωματογραφικές μεθόδους και εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό. Η φαρμακευτική αξία των συστατικών των ιχθυελαίων εξαρτάται από τη διατήρηση της φυσικής τους μορφή και δομής. Για παράδειγμα, είναι σημαντικό να διατηρηθούν τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας (HUFA) εφόσον είναι πολύτιμα για την υγεία του ανθρώπου. Τα κλασματοποιημένα έλαια αποτελούν πολύτιμη πηγή συμπυκνωμένων επιθυμητών λιπαρών οξέων όπως τα EPA και DHA.

Μοριακή απόσταξη: Μοριακοί αποστακτήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό του ελαίου στα συστατικά του βάσει του μοριακού βάρους κάθε συστατικού και της τάσης ατμών του. Η μεγάλη διαφορά στο μοριακό βάρος των βιταμινών Α και D επιτρέπει τον καλό διαχωρισμό των δύο συστατικών στα ιχθυέλαια από ήπαρ ψαριών. Αντίστροφα, η μικρή διαφορά στο μοριακό βάρος μεταξύ πολλών λιπαρών οξέων του ελαίου καθιστούν δύσκολη την επίτευξη αποτελεσματικού διαχωρισμού ή τον εμπλουτισμό ενός συγκεκριμένου λιπαρού οξέος.

Χρωματογραφικές τεχνικές: Τα λιπαρά οξέα στα ιχθυέλαια μπορούν να υποστούν κλασματική κρυστάλλωση σε χαμηλές θερμοκρασίες με ανάμιξη αυτών με διαλύτες στους οποίους ορισμένα λιπαρά οξέα είναι περισσότερο διαλυτά. Διαχωρισμός των συστατικών στο ιχθυέλαιο μπορεί να γίνει με χρωματογραφικές τεχνικές στις οποίες κάθε συστατικό θα κατανεμηθεί σε διαφορετικό ποσοστό σε ένα σύστημα δύο φάσεων.

Εκχύλιση με υπερκρίσιμο ρευστό: Το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) είναι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για τρόφιμα και φαρμακευτικά προϊόντα, δεδομένου ότι δεν υπάρχουν προβλήματα όσον αφορά την τοξικότητα, την αναφλεξιμότητα ή τη ρύπανση του περιβάλλοντος. Σε πίεση 7384 kPa (1071 psi) και σε θερμοκρασία 31.1 °C, το διοξείδιο του άνθρακα γίνεται υπερκρίσιμο ρευστό και ενεργεί ως διαλύτης ικανός να εμπλουτίσει ένα έλαιο σε ορισμένα συστατικά. Συμπλέκοντας το ιχθυέλαιο με ορισμένες χημικές ενώσεις (π.χ. ουρία για τη συγκέντρωση EPA και DHA), η εν συνεχεία κατανομή κατ'αντιρροή θα αποδώσει υψηλά εμπλουτισμένα προϊόντα. Για παράδειγμα, με τη μέθοδο αυτή, τα EPA και DHA μπορούν να διαχωριστούν σε ιχθυέλαιο συμπλοκοποιημένο με ουρία και να προκύψει προϊόν πολύ εμπλουτισμένο σε EPA.

### 1.1.7. Διάφορες παρενέργειες των ιχθυελαίων

**Αναπνευστικό:** Τα ιχθυέλαια μπορεί να προκαλέσουν έξαρση άσθματος σε ασθενείς ευαίσθητους στην ασπιρίνη<sup>13</sup>. Τα συμπληρώματα μουρουνέλαιου μπορεί να προκαλέσουν λιπιδαιμική πνευμονία<sup>14</sup>.

**Μεταβολισμός:** Σε υψηλή δοσολογία, τα ιχθυέλαια μπορεί να προκαλέσουν αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο αίμα σε ασθενής με μη ινσουλινοεξαρτώμενο σακχαρώδη διαβήτη<sup>15</sup>.

**Αιματολογικά:** Οι χρόνοι αιμορραγίας μπορεί να αυξηθούν σε ασθενείς που λαμβάνουν ιχθυέλαια<sup>16</sup>, οδηγώντας σε πιο παρατεταμένες και συχνές ρινορραγίες<sup>17</sup>. Τα συμπληρώματα ιχθυελαίων θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή από ασθενείς με αιμοφιλία και όσους λαμβάνουν υψηλές δόσεις αντιπηκτικών ή ασπιρίνης.



**Γαστρεντερικά:** Από 39 ασθενείς που έπασχαν από τη νόσο του Crohn και έλαβαν θεραπεία με ιχθυέλαιο σε εντεροδιαλυτή μορφή, 4 αποσύρθηκαν εξαιτίας της διάρροιας, η μόνη αναφερόμενη αρνητική επίπτωση στην έρευνα αυτή<sup>18</sup>. Σε 814 ασθενείς στους οποίους τυχαία διατέθηκαν ιχθυέλαια για 18 εβδομάδες για τη μείωση της εκ νέου στένωσης μετά από διαδερμική διαυλική στεφανιαία αγγειοπλαστική, ανεπιθύμητες γαστρεντερικές επιδράσεις, πιο συχνό φούσκωμα και ρέψιμο αναφέρθηκαν στο 37% των ασθενών που λάμβαναν ιχθυέλαια έναντι του 31% εκείνων που έλαβαν εικονικό σκεύασμα (placebo)<sup>19</sup>.

**Εγκυμοσύνη:** Κατά τα πρώιμα στάδια της κύησης, υψηλές δόσεις βιταμίνης A (που συναντώνται στα έλαια από ήπαρ ιππόγλωσσας και καρχαρία) μπορεί να οδηγήσουν σε γενετικές ανωμαλίες<sup>20</sup>. Ως εκ τούτου, συμπληρώματα ιχθυελαίων πλούσια σε βιταμίνη A θα πρέπει να αποφευχθούν από γυναίκες στο πρώτο τρίμηνο της εγκυμοσύνης καθώς και από γυναίκες που μπορεί να μείνουν έγκυες.

## 1.2. ΜΟΥΡΟΥΝΑ

Η οικογένεια του γάδου (μουρούνα ή βακαλάος) είναι μια από τις μεγαλύτερες οικογένειες ψαριών που συναντώνται σε όλους τους ωκεανούς του κόσμου. Υπάρχουν πάνω από 90 είδη γάδου, τα 40 εκ των οποίων είναι εμπορικά διαθέσιμα ως έλαια. Ακόμα και στα ίδια ύδατα διαφορετικά είδη της οικογένειας του γάδου μπορεί να έχουν μεγάλη ποικιλία στο προφίλ των λιπαρών τους οξέων<sup>21</sup> και στο περιεχόμενο τους σε βιταμίνη A και D<sup>27</sup>.

Γενικά, η περιεκτικότητα των ψαριών σε λίπη παρουσιάζει σημαντικές διακυμάνσεις, ανάλογα με το είδος και την εποχή του έτους. Έτσι τα ψάρια, ανάλογα με την περιεκτικότητά τους σε λίπος διακρίνονται σε λιπαρά, ημιλιπαρά και άπαχα. Έχουμε ψάρια με υψηλή περιεκτικότητα λίπους με ποσοστό > 15% με κύριους αντιπρόσωπους τη σαρδέλα, την πέστροφα και τα χέλια, ψάρια με μέτρια περιεκτικότητα λίπους με ποσοστό 5 - 15% με κύριους αντιπρόσωπους το σολομό, το σκουμπρί, τον κέφαλο και τη ρέγγα και με χαμηλή περιεκτικότητα λίπους με ποσοστό < 5% με κύριους αντιπρόσωπους

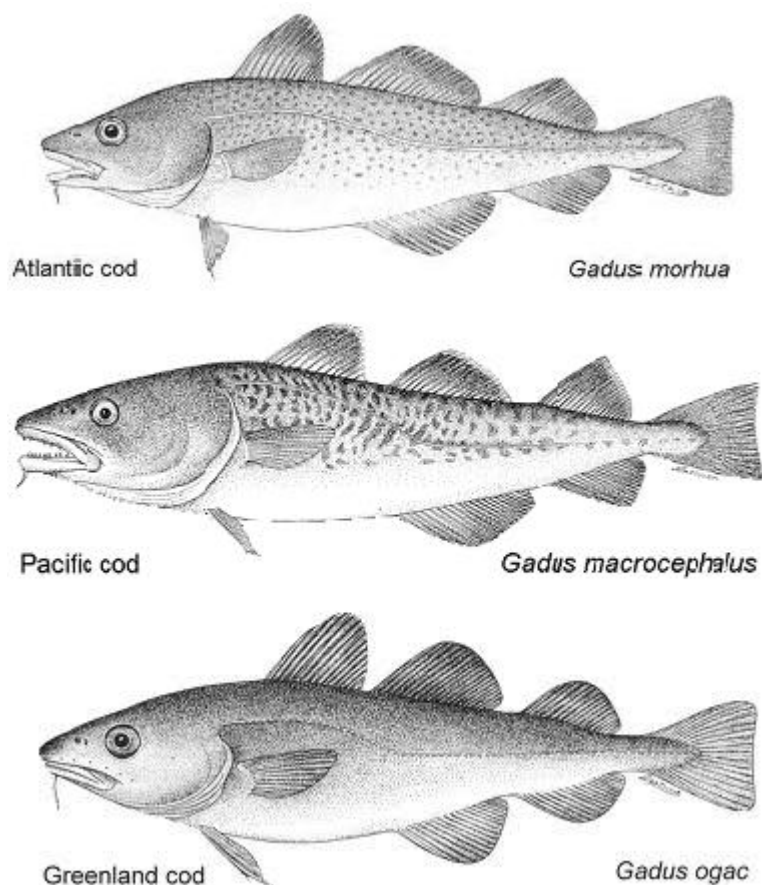
τον τόνο, την πέρκα, τη γλώσσα και την τσιπούρα, καθώς και τη μουρούνα. Η μουρούνα είναι άπαχο ψάρι που αποθηκεύει τα λίπη του ως τριακυλογλυκερόλες στο ήπαρ του<sup>22,23</sup>. Το ήπαρ του περιέχει το 50 - 60% του λίπους του και αποτελεί το 8 - 12% του συνολικού του βάρους<sup>24</sup>.

Ο γάδος (γένος *Gadus*) υπάρχει στη διατροφή του ανθρώπου εδώ και πάρα πολλά χρόνια. Η συμβολή του στην υγεία του ανθρώπου είναι ευρέως αναγνωρισμένη, δεδομένου ότι αποτελεί σημαντική πηγή ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, λιποδιαλυτών βιταμινών και υψηλής ποιότητας πρωτεΐνης.

Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην ανίχνευση ενώσεων που υπάρχουν στα τρόφιμα και εμφανίζουν δράση παρόμοια μεν αλλά πολύ ασθενή με αυτή του PAF ή δράση κατά του PAF (ανασταλτική), η παρουσία των οποίων τα καθιστά σημαντικούς «συμμάχους» κατά της αθηροσκλήρωσης. Όπως έχει ήδη αποδειχτεί, στο φρέσκο γάδο (γένος *Gadus morhua*) υπάρχουν ενώσεις που εμφανίζουν ισχυρή δραστικότητα παρόμοια με αυτή του PAF αλλά και δραστικότητα κατά του PAF. Όλα τα πολικά λιποειδικά κλάσματα του φρέσκου γάδου αναστέλλουν, με δοσοεξαρτώμενο τρόπο, την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση ή προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων κουνελιού<sup>122</sup>.

### 1.2.1. Είδη μουρούνας<sup>25</sup>

Ο βακαλάος είναι η κοινή ονομασία για το γένος Γάδος (*Gadus*), που ανήκει στην οικογένεια των Γαδιδών (*Gadidae*). Το γένος *Gadus*, όπως αρχικά είχε προταθεί από τον Linnaeus (1758) και τους πρώτους ιχθυολόγους, περιελάμβανε πολλά είδη. Με την πάροδο των ετών, τα είδη του γένους *Gadus* μειώθηκαν σημαντικά με αποτέλεσμα σήμερα να αναγνωρίζεται ότι στο γένος αυτό ανήκουν συνολικά 3 είδη: (1) το γένος *Gadus morhua*, (2) το γένος *Gadus macrocephalus* και (3) το γένος *Gadus ogac* (Εικόνα 1.1.). Αυτό συνέβη γιατί τα αρχικά πολυάριθμα είδη κατατάχθηκαν σε άλλα γένη ή αναγνωρίστηκαν ως μορφές ενός από τα τρία αυτά είδη.

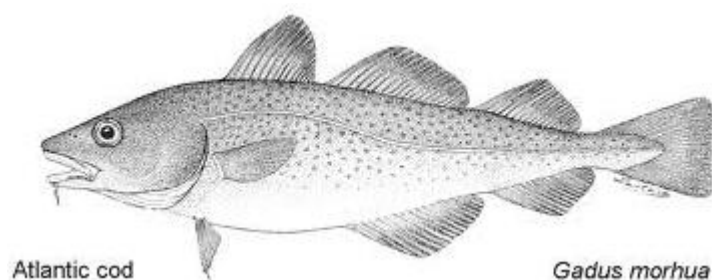


**Εικόνα 1.1.** Τα 3 είδη του γένους *Gadus*.

#### **1.2.1.1. *Gadus morhua* (Atlantic cod) – Γάδος του Ατλαντικού**

Ο γάδος του Ατλαντικού έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον από τότε που ο άνθρωπος άρχισε να ψαρεύει στις θάλασσες της Ευρώπης και θεωρείται προνομιακό τρόφιμο. Περιλαμβάνει μια σειρά από φυλές που διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθος, το χρώμα, τη μορφολογία της νηκτικής κύστης (όργανο συνδεδεμένο με το πεπτικό σύστημα που μοιάζει με ασκό ο οποίος γεμίζει με αέρια και βοηθάει το ψάρι να ρυθμίζει την πλευστότητά του), τις θερμοκρασιακές του προτιμήσεις καθώς και τις προτιμήσεις του στην αλατότητα, τη μεταναστευτική του συμπεριφορά και τη γεωγραφική του κατανομή.

Διαγνωστικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.2.): Κεφάλι σχετικά στενό, η απόσταση μεταξύ των ματιών του αποτελεί το 15 με 22% του μήκους του κεφαλιού, προραχιαία απόσταση μικρότερη από το 33% του μήκους, χρώμα: μεταβλητό, καφέ προς πράσινο ή γκρι στη ράχη και στην άνω πλευρά, κοιλιά ανοιχτού χρώματος. Ασημί περιτόναιο.



**Εικόνα 1.2.** *Gadus morhua* (Atlantic cod) - Γάδος του Ατλαντικού.

Γεωγραφική κατανομή (Εικόνα 1.3.): Από το ακρωτήριο Hatteras έως τον κόλπο Ungava κατά μήκος των ακτών της Βόρειας Αμερικής. Στις ανατολικές και δυτικές ακτές της Γροιλανδίας, όπου μπορεί να εκτείνεται και προς τα βόρεια σε διάφορες αποστάσεις ανάλογα με τις κλιματικές τάσεις. Γύρω από την Ισλανδία. Στις ακτές της Ευρώπης από το Βισκαϊκό κόλπο έως τη Θάλασσα του Μπάρεντς, συμπεριλαμβανομένης και της περιοχής γύρω από το Bear Island.



**Εικόνα 1.3.** Γεωγραφική κατανομή του *Gadus morhua* (Atlantic cod).

Φυσικό Περιβάλλον και Βιολογία: Το είδος *Gadus morhua* γενικά θεωρείται βενθικό (μεγάλου βάθους) ψάρι, αν και το περιβάλλον του μπορεί να γίνει πελαγικό, κάτω από ορισμένες υδρογραφικές συνθήκες, για λόγους σίτισης ή αναπαραγωγής. Η παρουσία του γάδου συνήθως εξαρτάται κυρίως από την κατανομή της λείας του παρά από τη θερμοκρασία. Ωστόσο, μεγαλύτερα ψάρια βρίσκονται σε ψυχρότερα νερά στις περισσότερες περιοχές (0-5 °C). Ζει σχεδόν σε κάθε αλατότητα από σχεδόν γλυκό έως πλήρως ωκεάνιο νερό, και σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από εξαιρετικά παγωμένο έως τους 20 °C.

Αυτό το είδος είναι κατανεμημένο σε μια ποικιλία φυσικών περιβαλλόντων από την ακτογραμμή έως την ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα, σε βάθη άνω των 600 μέτρων. Όμως, ως επί το πλείστον, συναντάται εντός της ηπειρωτικής υφαλοκρηπίδας από 150 έως 200 μέτρα. Ο γάδος είναι ουσιαστικά ένα ψάρι της ανοιχτής θάλασσας, όμως εμφανίζεται τακτικά στις εκβολές ποταμών στο Μείν και στη Μασαχουσέτη κατά τα τέλη του φθινοπώρου και το χειμώνα. Ζει σε αγέλες κατά τη διάρκεια της ημέρας, σχηματίζοντας ομάδες που κολυμπούν 30 με 80 μέτρα πάνω από τον πυθμένα και σκορπίζουν το βράδυ. Παρά το γεγονός ότι ορισμένες ομάδες μικρών γάδων είναι σχετικά σταθερές, κάποια μέλη ή ομάδες μπορεί να εκτελέσουν εξαιρετικά μεγάλες μεταναστεύσεις, της τάξεως των 5 χιλιομέτρων ανά ημέρα. Παρόλο που το ψάρι αυτό έχει δύο ξεχωριστά φύλα, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις ερμαφρόδιτων δειγμάτων. Η αναλογία των φύλων είναι περίπου 1:1, με μια μικρή υπεροχή των θηλυκών. Είναι ένα από τα πιο γόνιμα ψάρια του κόσμου, με μέση παραγωγή 1 εκατομμύριο αυγά ανά θηλυκό. Αν και η περίοδος αναπαραγωγής ποικίλλει μεταξύ των υποπληθυσμών του Βόρειου Ατλαντικού, οι γάδοι στις ανατολικές και δυτικές περιοχές του ωκεανού αναπαράγονται από το Δεκέμβριο έως τον Ιούνιο, κοντά στον πυθμένα όταν οι θερμοκρασίες είναι κατάλληλες. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες αναπαραγωγής κυμαίνονται από 0 °C έως 12 °C. Ο ρυθμός ανάπτυξης τους είναι μάλλον υψηλός, με τα θηλυκά να αναπτύσσονται ελαφρώς ταχύτερα από τα αρσενικά, και διαφοροποιείται από τη μία περιοχή στην άλλη. Ζουν μέχρι και 20 χρόνια.

Ο γάδος του Ατλαντικού είναι παμφάγο είδος. Οι προνύμφες και μεταπρονύμφες τρέφονται με πλαγκτόν, τα νεαρά ψάρια κυρίως με

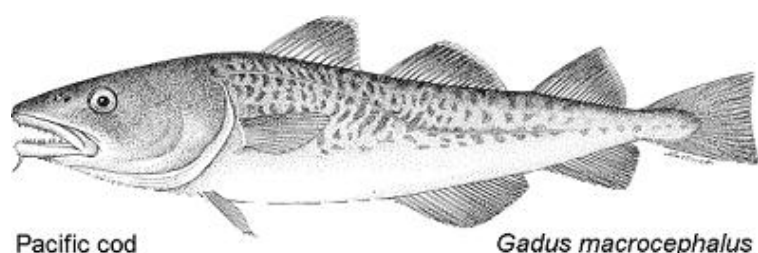
ασπόνδυλα και τα μεγαλύτερα ψάρια με ασπόνδυλα και ψάρια, συμπεριλαμβανομένων και των νεότερων γάδων. Άλλες ομάδες παίζουν μικρότερο ρόλο στη διατροφή τους είναι οι πολυχαίτες (λιγότερο από 10%), τα εχινόδερμα και άλλοι βενθικοί οργανισμοί (σε μικρές ποσότητες) και περιστασιακά τα φύκια. Η σίτισή τους λαμβάνει χώρα την αυγή και το σούρουπο, ενώ τα μικρότερα ψάρια (έως 20 εκατοστά) τρέφονται συνεχώς.

Το μέγεθος τους ποικίλει ανάλογα με τη φυλή. Ο ωκεανικός βακαλάος συχνά φτάνει το 1 μέτρο, ενώ μπορεί να φτάσει και τα 2 μέτρα.

#### 1.2.1.2. *Gadus macrocephalus* (Pacific cod) – Γάδος του Ειρηνικού

Ο γάδος του Ειρηνικού περιλαμβάνει μια σειρά από πληθυσμούς με διαφορετικές συμπεριφορές και είναι συνολικά ένα βιολογικά είδος αρκετά διαφορετικό από το γάδο του Ατλαντικού.

Διαγνωστικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.4.): Κεφάλι σχετικά πλατύ, η απόσταση μεταξύ των ματιών του αποτελεί το 18 με 25% του μήκους του κεφαλιού, προραχιαία απόσταση μεγαλύτερη από το 33% του μήκους, στο πρόσθιο τμήμα της νηκτικής κύστης υπάρχουν δύο σχετικά κοντές προεκτάσεις, χρώμα: στη ράχη καφέ προς γκρι με κηλίδες ή κυματιστές γραμμές, με κοιλιά πιο ανοιχτού χρώματος.



**Εικόνα 1.4.** *Gadus macrocephalus* (Pacific cod) - Γάδος του Ειρηνικού.

Γεωγραφική κατανομή (Εικόνα 1.5.): Συναντώνται γύρω από το χείλος του Βόρειου Ειρηνικού, από την Κίτρινη Θάλασσα στο Βερίγγειο Πορθμό, κατά μήκος του αρχιπελάγους Aleutians και νότια του Λος Άντζελες.



**Εικόνα 1.5.** Γεωγραφική κατανομή του *Gadus macrocephalus* (Pacific cod).

Φυσικό Περιβάλλον και Βιολογία: Ζει κυρίως κατά μήκος της ηπειρωτικής υφαλοκρηπίδας και του υφαλοπρανούς του Βόρειου Ειρηνικού στις περιοχές που συνορεύουν με την Κορέα και τη δυτική χερσόνησο Chukchi στα δυτικά, και το Norton Sound και το Όρεγκον στα ανατολικά. Συναντάται από ρηχά νερά (10 m) έως περίπου τα 550 μέτρα, αλλά ως επί το πλείστον βρίσκεται μεταξύ των 100 και 400 μέτρων στον Κόλπο της Αλάσκα και τη Βερίγγειο Θάλασσα. Η κατανομή του στην Ανατολική Βερίγγειο Θάλασσα ποικίλη ανάλογα με τα χρόνια και τις εποχές, κυρίως λόγω της θερμοκρασίας του νερού.

Η μετανάστευση λόγω αναπαραγωγής συνδέεται άμεσα με ετήσιες μεταβολές της θερμοκρασίας του ωκεανού. Ο γάδος του Ειρηνικού δεν πραγματοποιεί μεταναστεύσεις τόσο εκτεταμένες όσο ο γάδος του Ατλαντικού, αλλά κινείται μόνο για μικρές αποστάσεις, όπως προς και από την ακτή ή από τη μία όχθη στην άλλη μέσα σε μια περιορισμένη περιοχή. Το καλοκαίρι, οι ομάδες που σχηματίζουν είναι μικρές, εν αντιθέσει με τις μεγάλες ομάδες που σχηματίζονται από το γάδο του Ατλαντικού.

Η αναλογία των φύλων είναι περίπου 1:1, με τα αρσενικά να κυριαρχούν στις νεότερες ηλικιακές ομάδες, και τα θηλυκά στις μεγαλύτερες ηλικιακές

ομάδες. Η γονιμότητα τους κυμαίνεται στα 860.000 με 6.400.000 αυγά ανά θηλυκό, ανάλογα και με τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Τα θηλυκά γεννούν μόνο μια φορά κάθε σεζόν. Η αναπαραγωγική περίοδος εκτείνεται από τον χειμώνα έως νωρίς την άνοιξη. Συγκεκριμένα, στις θερμότερες περιοχές όπως η Ιαπωνία και η Κορέα, τα ψάρια παραμένουν σε μεγαλύτερα βάθη κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (μέχρι 200 μέτρα), και όταν η θερμοκρασία πέσει κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου, κινούνται προς πιο ρηχά νερά, και αναπαράγονται κατά τη διάρκεια του χειμώνα. Σε πιο βόρειες περιοχές όπου οι θερμοκρασίες των παράκτιων υδάτων είναι πολύ χαμηλές κατά τη διάρκεια του χειμώνα, ο γάδος καταφεύγει σε σημαντικά βάθη μέχρι το πέρας του χειμώνα και αναπαράγεται το Μάρτιο με Απρίλιο. Η βέλτιστη θερμοκρασία για επώαση και επιβίωση θεωρείται ότι είναι 5 °C. Θεωρητικά η αναπαραγωγή του γάδου του Ειρηνικού λαμβάνει χώρα σε μικρότερο χρονικό διάστημα από αυτήν του γάδου του Ατλαντικού, λόγω της μεγαλύτερης αστάθειας της θερμοκρασίας της θάλασσας του Ειρηνικού. Η ανάπτυξη του γάδου του Ειρηνικού είναι ταχεία κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του. Η διάρκεια ζωής του είναι συνήθως 8 με 9 χρόνια, αν και στο δυτικό Ειρηνικό, μπορούν να ζήσουν μέχρι και 12 χρόνια.

Η διατροφή των ενήλικων ψαριών περιλαμβάνει ψάρια, χταπόδια και μεγάλα βενθικά και βενθο-πελαγικά μαλακόστρακα, όπως καβούρια και γαρίδες. Τα είδη ψαριών που καταναλώνουν περιλαμβάνουν κίτρινο γάδο, αθερίνα, ρέγκα, καθώς επίσης και ιππόγλωσσα, σολομό και σαρδέλα. Τρέφονται πολύ λίγο όταν πλησιάζει η περίοδος αναπαραγωγής τους.

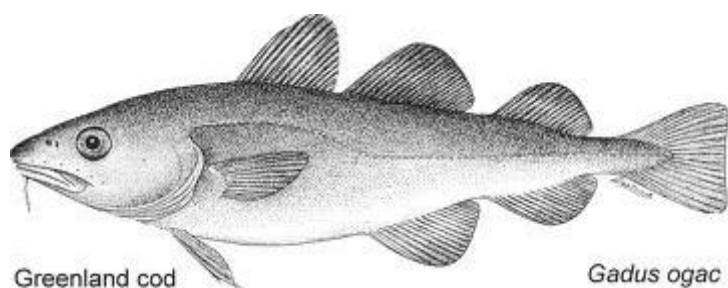
Το μέγεθος τους φτάνει το 1 μέτρο σε μήκος.

### **1.2.1.3. *Gadus ogac* (Greenland cod) – Γάδος της Γροιλανδίας**

Το συγκεκριμένο είδος, αυτή τη στιγμή, είναι μικρής, κυρίως τοπικής σημασίας. Παλιότερα, υπήρχε σε αφθονία στα παράκτια ύδατα της Γροιλανδίας, αλλά το απόθεμα έχει μειωθεί σημαντικά τα τελευταία χρόνια. Πιθανόν να υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ αυτού του είδους και του γάδου του Ατλαντικού.



Διαγνωστικά χαρακτηριστικά (Εικόνα 1.6.): Κεφάλι σχετικά πλατύ, η απόσταση μεταξύ των ματιών του αποτελεί το 18 με 25% του μήκους του κεφαλιού, προραχιαία απόσταση μικρότερη από το 33% περίπου του μήκους, χρώμα: γενικά σκούρο γκρί και πιο ανοιχτόχρωμο στην κοιλιά, με δυσδιάκριτες κηλίδες στη ράχη και στα πλευρά. Χρώμα:, δυσδιάκριτα σημεία στη ράχη. Σκούρο περιτόναιο.



**Εικόνα 1.6.** *Gadus ogac* (Greenland cod) - Γάδος της Γροιλανδίας.

Γεωγραφική κατανομή (Εικόνα 1.7.): Από το λιμάνι Barrow, στην Αλάσκα και τη Δυτική Γροιλανδία. Νότια κατά μήκος της ακτής του Καναδά έως το Miramichi, τον Κόλπο του Αγίου Λαυρεντίου και το Νησί Cape Breton. Υπάρχει ένας απομονωμένος πληθυσμός στη Λευκή Θάλασσα.



**Εικόνα 1.7.** Γεωγραφική κατανομή του *Gadus ogac* (Greenland cod).

Φυσικό Περιβάλλον και Βιολογία: Συνήθως ζει κοντά στην ακτή, σε βάθος από 0 έως 200 μέτρα, και σπάνια συναντάται σε βαθύτερα νερά. Προτιμά τη χαμηλή αλατότητα, αλλά δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι εισέρχεται και σε γλυκά νερά.

Αναπαράγεται σε ρηχά νερά, από το Φεβρουάριο έως το Μάιο. Σπάνια ζει πάνω από 9 χρόνια και υπερβαίνει τα 60 εκατοστά ολικού μήκους. Στα ύδατα της Γροιλανδίας, το ανώτατο όριο ηλικίας είναι περίπου 11 χρόνια.

Η διατροφή του είναι παρόμοια με εκείνη του γάδου του Ατλαντικού και περιλαμβάνει μικρές ιππόγλωσσες, γαρίδες, καβούρια, καλαμάρια, πολυχαίτες και εχινόδερμα.

Το μέγεθος του φθάνει περίπου τα 70 εκατοστά ενώ είναι κάπως μικρότερο στη Λευκή Θάλασσα.

### **1.2.2. Χημική σύσταση**

Η χημική σύσταση της μουρούνας, και των ψαριών γενικότερα, συνεπώς και των αντίστοιχων ιχθυελαίων, επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του ψαριού όπως η ηλικία, η σεξουαλική του ωρίμανση και το μέγεθος του, η θρεπτική σύνθεση και το ενεργειακό περιεχόμενο της διατροφής του, οι εποχιακές αλλαγές και η περιοχή αιχμαλωσίας του<sup>141</sup>.

Κάποιοι μέσοι όροι των τιμών που αναμένονται σχετικά με τη χημική σύνθεση της μουρούνας παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν (Πίνακας 1.1., Πίνακας 1.2., Πίνακας 1.3.)<sup>26</sup>.

**Πίνακας 1.1.** Μέσος όρος τιμών σχετικά με τη χημική σύσταση της μουρούνας.

Μουρούνα		Νερό %	Πρωτεΐνη %	Λίπος %	Άλας %	Τέφρα %	Θερμιδική Αξία Cal/100 g
Σάρκα	Μέσος όρος	81	18	0.1	0.2	1	70
	Εύρος	80-83	16-19	0.0-0.4	0.0-0.4	1.0-1.4	
Ήπαρ	Μέσος όρος	30	6	64	0-4		515
	Εύρος	27-32	5-7	55-65			

**Πίνακας 1.2.** Μέσος όρος τιμών μεταλλικών στοιχείων.

Μεταλλικά στοιχεία (mg / 100 g)				
Μουρούνα	Ασβέστιο	Φωσφόρος	Σίδηρος	Ιώδιο
Σάρκα	20	200	0.6	0.5
Ήπαρ	30	100	3.6	0.5

**Πίνακας 1.3.** Μέσος όρος τιμών βιταμινών.

Μουρούνα	A	B					D
		Θιαμίνη B <sub>1</sub>	Ριβοφλαβίνη B <sub>2</sub>	Νιασίνη	Παντοθενικό οξύ	B <sub>12</sub>	
	IU/g	μg/100g	μg/100g	mg/100g	μg/100g	μg/100g	IU/g
<b>Σάρκα</b>		50	23	2.5	110-180	0.5-0.8	
<b>Ήπαρ</b>	600		340	1.5	430	11	6000

### 1.3. ΜΟΥΡΟΥΝΕΛΑΙΟ

Το μουρουνέλαιο χρησιμοποιείται ευρέως ως συμπλήρωμα διατροφής. Στο ευρύ φάσμα των ουσιών που περιέχει συμπεριλαμβάνονται οι τριακυλογλυκερόλες (TAG), μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα<sup>27</sup>. Συγκεκριμένα, μια έρευνα σχετικά με τη σύνθεση των λιπαρών οξέων των πολικών λιπιδίων του μουρουνέλαιου έδειξε ότι τα λιπαρά του οξέα μειώνονται με την ακόλουθη σειρά: πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (50%) > μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (24.7%) > κορεσμένα λιπαρά οξέα (23.7%)<sup>22</sup>. Επίσης, το μουρουνέλαιο παρέχει 50 mg / ml Βιταμίνης A και 2 mg / ml Βιταμίνης D<sup>3</sup>.

#### 1.3.1. Μερικές ωφέλιμες δράσεις του μουρουνέλαιου

- Αρθρίτιδα

Η συμβολή του μουρουνέλαιου κατά της καταστροφής του χόνδρου σε αρθρικές ασθένειες έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες<sup>28</sup>. Σαράντα τρεις ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα έλαβαν 1 g μουρουνέλαιο/ημέρα για 3 μήνες. Εμφάνισαν βελτίωση στην πρωινή δυσκαμψία, τον πόνο και το

πρήξιμο των αρθρώσεων. Έντεκα ασθενείς ανέφεραν ότι δεν υπήρξαν σοβαρές ανεπιθύμητες παρενέργειες κατά τη διάρκεια της λήψης του μουρουνέλαιου<sup>29</sup>. Κατά συνέπεια, πιστεύεται ότι η λήψη μουρουνέλαιου ως συμπλήρωμα διατροφής ωφελεί τα άτομα που πάσχουν από αρθρίτιδα.

- Καρκίνος

Η βιταμίνη D έχει αναφερθεί ότι βοηθά στην αποφυγή πολλών τύπων καρκίνου, όπως το λέμφωμα, ο προστάτης, ο καρκίνος του πνεύμονα και του δέρματος<sup>30</sup>. Η λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης D και ω-3 πολυακόρεστων λιπαρών οξέων μέσω του μουρουνέλαιου μπορεί να έχει επιπρόσθετες και ενδεχομένως συνεργιστικές αντικαρκινικές ιδιότητες<sup>31</sup>.

- Σακχαρώδης Διαβήτης

Γενικά πιστεύεται ότι το μουρουνέλαιο ωφελεί τα άτομα που πάσχουν από διαβήτη με διάφορους τρόπους. Οι λιπιδικές διαταραχές και το αυξημένο οξειδωτικό stress μπορεί να επιδεινώσει κάποιες επιπλοκές του σακχαρώδους διαβήτη. Ορισμένα συστατικά του μουρουνέλαιου, όπως τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (EPA και DHA) μπορεί να συνεισφέρουν στην προστασία των κυττάρων από την καταστροφική επίδραση των αυξημένων λιπιδίων και προϊόντων υπεροξειδωσης των λιπιδίων. Διαβητικοί αρουραίοι χωρίστηκαν τυχαία σε δύο ομάδες, όπου η μία ομάδα λάμβανε μουρουνέλαιο για 12 εβδομάδες ενώ η άλλη όχι. Η γλυκόζη του πλάσματος, οι τριακυλογλυκερόλες και τα επίπεδα χοληστερόλης ήταν σημαντικά αυξημένα στους αρουραίους που δεν λάμβαναν μουρουνέλαιο. Η θεραπεία με μουρουνέλαιο παρείχε καλύτερο έλεγχο του μεταβολισμού των λιπιδίων και της γλυκόζης, καθώς και ομαλότερη αύξηση του σωματικού βάρους<sup>32</sup>.

- Ψυχιατρικές διαταραχές

Τα ω-3 λιπαρά οξέα χρησιμοποιήθηκαν στη θεραπεία ψυχιατρικών νόσων όπως η διπολική διαταραχή. Η Na<sup>(+)</sup>, K<sup>(+)</sup>-ATPάση αποτελεί ένα γνωστό στόχο αυτών των λιπαρών οξέων. Η λήψη μουρουνέλαιου, που περιέχει DHA και EPA, είχε ευεργετική επίδραση που σχετίστηκε με

ομαλοποίηση της ενσωμάτωσης των λιπαρών οξέων σε φωσφολιπιδικές μεμβράνες και μερική αποκατάσταση της δράσης της  $\text{Na}^{(+)}$ ,  $\text{K}^{(+)}$ -ΑΤΡάσης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μουρουνέλαιο μπορεί να βελτιώσει τη σύνθεση λιπαρών οξέων και να ενισχύσει τη δράση της  $\text{Na}^{(+)}$ ,  $\text{K}^{(+)}$ -ΑΤΡάσης<sup>33</sup>.

### 1.3.2. Μουρουνέλαιο SEVEN SEAS

Παρακάτω παραθέτονται τα χαρακτηριστικά του μουρουνέλαιου της εταιρίας SEVEN SEAS (Πίνακας 1.4.), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία (Εικόνα 1.8.):



**Εικόνα 1.8.** Μουρουνέλαιο SEVEN SEAS.

- Συστατικά: Μουρουνέλαιο,  $\omega$ -3 (EPA & DHA) λιπαρά οξέα, Βιταμίνη E, Βιταμίνη A, Βιταμίνη D.
- Συνιστώμενη ημερήσια δόση: ½ κουταλάκι του γλυκού (2.5 ml) μια φορά την ημέρα.

**Πίνακας 1.4.** Διατροφική ανάλυση μουρουνέλαιου SEVEN SEAS.

	Περιεχόμενο ανά 2.5 ml	Ποσοστό % της Συνιστώμενης Ημερήσιας Δόσης
Ενέργεια	86.75 kJ (20.75 Kcal)	~
Βιταμίνη Α	280 μg RE	40
Βιταμίνη D	2.5 μg	50
Βιταμίνη Ε	1.7 mg TE	17
Μουρουνέλαιο	2.3 g	~
EPA (ω-3)	207 mg	~
DHA (ω-3)	184 mg	~

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ - Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ ΡΑΦ ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

### 2.1. ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες οι καρδιαγγειακές ασθένειες (CVDs) αποτελούν τη βασικότερη αιτία θνησιμότητας, κυρίως στις δυτικές χώρες<sup>34</sup>. Συγκεκριμένα, ευθύνονται για 2 εκατομμύρια θανάτους (το 40% περίπου) κάθε χρόνο ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως ετησίως, το 1/6 των ανθρώπων που χάνουν τη ζωή τους βρίσκεται πριν την ηλικία των 65 ετών<sup>35</sup>.

Οι όροι αθήρωμα και αθηροσκλήρωση είναι ελληνικής προέλευσης. Η λέξη αθήρωμα χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Έλληνα ιατρό Κλαύδιο Γαληνό (130-201 μ.Χ.) από την Πέργαμο της Μικράς Ασίας και προέρχεται από τις λέξεις *αθήρη* που σημαίνει χυλός από αλεσμένο σιτάρι (μπλιγούρι) και *όμα* που σημαίνει μάζα και σκληρός<sup>36</sup>. Η λέξη μάλιστα *αθήρωμα*, σήμαινε υδαρής σάκος και αναφερόταν για παράδειγμα σε δέρμα που περιείχε κάποιο υγρό π.χ. κρασί ή τυρί.

Ο όρος αρτηριοσκλήρωση ή αρτηριοσκληρυνση αναφέρεται σε μια ομάδα παθήσεων που έχουν ως χαρακτηριστικό τους την πάχυνση και την απώλεια ελαστικότητας των αρτηριακών τοιχωμάτων. Εμφανίζεται με τρεις μορφές: (α) την αθηροσκλήρωση κατά την οποία σχηματίζονται αθηρώματα μεταξύ του έσω και του μέσου χιτώνα των μεγάλων και μέσου μεγέθους αρτηριών, (β) την αρτηριοσκλήρωση Moekenberg που χαρακτηρίζεται από εναπόθεση ασβεστίου στον μέσο χιτώνα των μικρών και μέσων αρτηριών και (γ) την αρτηριοσκλήρωση που αναφέρεται στη βλάβη μικρών αρτηριδίων.

Λιποειδή, κύτταρα και συστατικά της εξωκυττάριας ύλης συσσωρεύονται στα αρτηριακά τοιχώματα και οδηγούν στο σχηματισμό αθηρωματοδών βλαβών. Η διαδικασία έναρξης του σχηματισμού αυτών των αθηρωματοδών βλαβών αποτελεί την αθηρογένεση<sup>37</sup>.

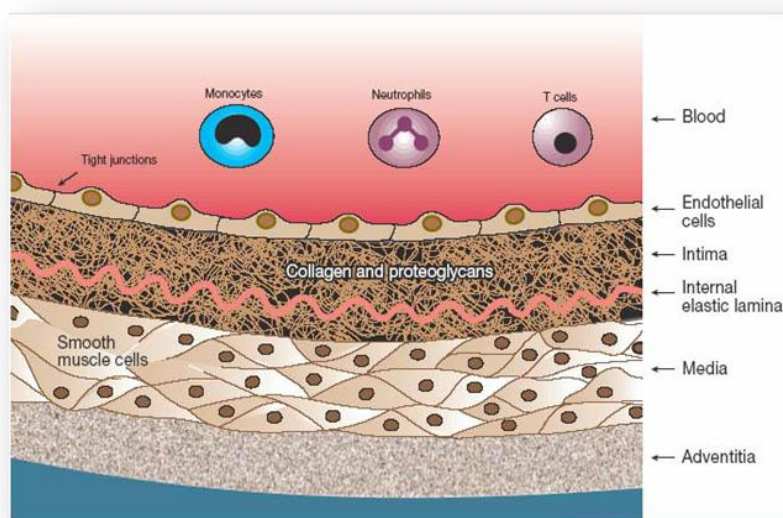
Οι όροι αρτηριοσκληρυνση και αθηροσκλήρωση συχνά συγχέονται. Η αρτηριοσκληρυνση δεν είναι τίποτα άλλο παρά η απώλεια της ελαστικότητας των αρτηριών, με αποτέλεσμα την αύξηση της αρτηριακής πίεσης. Η αθηροσκλήρωση αφορά στην ανάπτυξη βλαβών στα τοιχώματα των αρτηριών



που ονομάζονται αθηρώματα. Πάντως οι δύο περιπτώσεις δεν είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους. Η δημιουργία αθηρωμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία στενώσεων που περιορίζουν σε μεγάλο βαθμό τη ροή του αίματος και, ανάλογα με τα αγγεία που προσβάλλει η νόσος, προκαλούν χαρακτηριστικές κλινικές εκδηλώσεις. Για παράδειγμα, η δημιουργία αθηρωμάτων στις στεφανιαίες αρτηρίες ονομάζεται στεφανιαία νόσος και προκαλεί ισχαιμικά καρδιακά επεισόδια όπως σταθερή ή ασταθή στηθάγχη, οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου και αιφνίδιο θάνατο.

## 2.2. ΔΟΜΗ ΑΡΤΗΡΙΑΣ

Το τοίχωμα μιας φυσιολογικής αρτηρίας αποτελείται από 3 στοιβάδες: τον έξω χιτώνα (adventitia), το μέσο χιτώνα (media) τον έσω χιτώνα (intima) (Εικόνα 2.1.).



**Εικόνα 2.1.** Δομή φυσιολογικής αρτηρίας.

Ο έξω χιτώνας (adventitia), αποτελείται από μια χαλαρή ύλη με μικρό ποσό ινών ελαστίνης, λεία μυϊκά κύτταρα, ινοβλάστες και κολλαγόνο. Ο χιτώνας αυτός έχει θεωρηθεί ότι έχει παθητικό ρόλο και είναι ανενεργός.

Διαχωρίζεται από το μέσο χιτώνα από ένα στρώμα ελαστίνης, το έξω ελαστικό πέταλο (external elastic lamina).

Ο μέσο χιτώνας (media) είναι ο χιτώνας με το μεγαλύτερο πάχος και αποτελείται από λεία μυϊκά κύτταρα (smooth muscle cells). Όταν αναπτύσσεται αθηρωματική πλάκα υπενδοθηλιακά, το πάχος του μειώνεται κατά πολύ και σε πολύ σοβαρές βλάβες η πλάκα καταλαμβάνει πλήρως το χώρο του μέσου χιτώνα. Ο μέσο χιτώνας διαχωρίζεται από τον έσω χιτώνα από ακόμα ένα στρώμα ελαστίνης, το έσω ελαστικό πέταλο (internal elastic lamina). Ο έσω χιτώνας (intima) αποτελείται από ενδοθηλιακά κύτταρα, που συνδέονται το ένα με το άλλο με μια σειρά κυτταρικών συνδέσμων, πρωτεογλυκάνες και τον υποστηρικτικό υπενδοθηλιακό ιστό. Ο υπενδοθηλιακός ιστός είναι πλούσιος σε κολλαγόνο και κύτταρα, όπως ινοβλάστες και τα λεία μυϊκά κύτταρα του έσω χιτώνα, τα οποία διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην πορεία της αθηροσκλήρωσης. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποτελούν έναν διαπερατό φραγμό μεταξύ του αίματος και του αρτηριακού τοιχώματος, ο οποίος επιτρέπει, με υψηλή εκλεκτικότητα, την ανταλλαγή ουσιών<sup>38</sup>.

### **2.3. ΒΛΑΒΕΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΥΝΣΗΣ**

Οι βλάβες της αθηροσκλήρωσης συχνά υποδιαιρούνται σε 3 κατηγορίες: τη λιπώδη γράμμωση, την ινώδη πλάκα και την προχωρημένη βλάβη. Η λιπώδης γράμμωση σχηματίζεται από τη συσσώρευση μακροφάγων πλούσιων σε λιπίδια και λείων μυϊκών κυττάρων και μπορεί να είναι επίπεδη ή να προεξέχει ελαφρώς. Εμφανίζεται στον άνθρωπο ήδη από τα πρώτα χρόνια της ζωής του, όμως η παρουσία της δεν γίνεται αισθητή διότι σπανίως εμποδίζει τη ροή του αίματος. Η λιπώδης γράμμωση μπορεί να εξελιχθεί σε ινώδη πλάκα χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα. Η ινώδης πλάκα είναι το αποτέλεσμα της προοδευτικής συσσώρευσης λιπιδίων και της μετανάστευσης και του πολλαπλασιασμού των λείων μυϊκών κυττάρων. Τα λεία μυϊκά κύτταρα ευθύνονται για την εναπόθεση εξωκυττάρου συνδετικού ιστού και το σχηματισμό ινώδους κάψας. Η ινώδης πλάκα αποτελείται από έναν πυρήνα εστέρων χοληστερόλης, υπολείμματα κυττάρων και κρυστάλλους

χοληστερόλης, καθώς και από την ινώδη κάψα που συντίθεται από λεία μυϊκά κύτταρα, αφρώδη κύτταρα, κολλαγόνο και λιπίδια. Προεξέχει προς το εσωτερικό του αυλού του αγγείου και συχνά παρακωλύει τη ροή του αίματος. Η ρήξη της ινώδους πλάκας μπορεί να οδηγήσει σε σχηματισμό θρόμβου και απόφραξη της αρτηρίας. Η ινώδης πλάκα συχνά εξελίσσεται σε προχωρημένη βλάβη η οποία αποφράσσει τον αυλό της αρτηρίας είτε εν μέρει είτε σε πλήρη βαθμό, με συνέπεια την ισχαιμία ή το έμφραγμα<sup>39</sup>.

#### **2.4. ΘΕΩΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ**

Τα τελευταία 150 χρόνια έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις στην προσπάθεια της επεξήγησης της εξέλιξης της αθηρωματικής πλάκας. Όμως, ο μηχανισμός της αθηρογένεσης δεν έχει διευκρινιστεί μέχρι σήμερα, λόγω της εξαιρετικής πολυπλοκότητας της νόσου αυτής.

Συνοπτικά, η σειρά των γεγονότων που διέπουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας σύμφωνα με τα μέχρι τώρα δεδομένα είναι η εξής:

- I. Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου
- II. Μετανάστευση μονοκυττάρων υπενδοθηλιακά και διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα
- III. Κατακράτηση LDL υπενδοθηλιακά, οξειδωση, φαγοκυττάρωση της LDL από τα μακροφάγα και σχηματισμός αφρωδών κυττάρων
- IV. Μετανάστευση λείων μυϊκών κυττάρων υπενδοθηλιακά
- V. Νέκρωση υπερκορεσμένων αφρωδών κυττάρων, ελευθέρωση οξειδωμένης LDL, βλάβη ενδοθηλίου, προσκόλληση και συσσώρευση

Οι θεωρίες για την αθηρογένεση είναι:

- 1) Της φλεγμονής ή απάντηση στον τραυματισμό (response-to-injury)
- 2) Της κατακράτησης (response-to-retention)
- 3) Της οξειδωτικής τροποποίησης (oxidative modification)

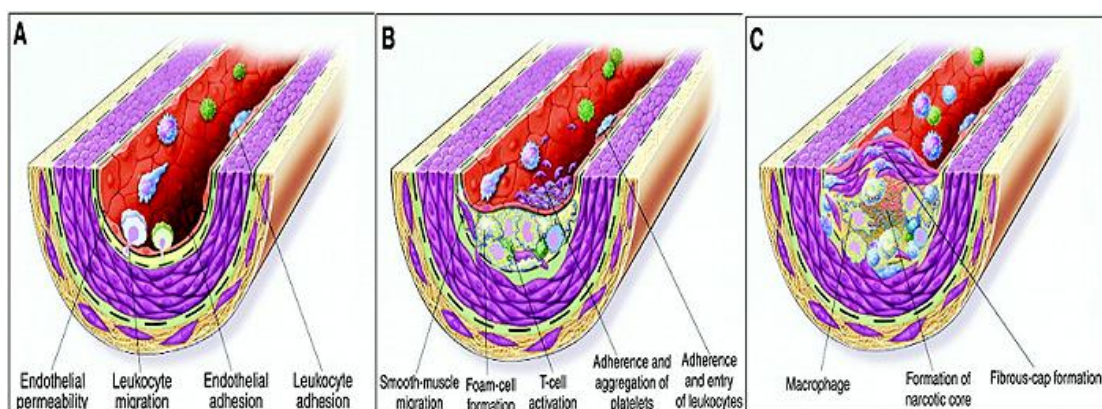
Κάθε μια από αυτές τις θεωρίες δίνει έμφαση σε διαφορετικά γεγονότα τα οποία είναι αναγκαία και επαρκή για να υποστηρίξουν και να δικαιολογήσουν την ανάπτυξη αθηροσκληρωτικής πλάκας, χωρίς να αλληλοαναιρούνται.

#### **2.4.1. Η θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό (response-to-injury hypothesis)**

Η θεωρία αυτή προτάθηκε από τους Ross και Glomsset το 1976. Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η «απογύμνωση του ενδοθηλίου» είναι το αρχικό προτεινόμενο βήμα για την αθηρογένεση. Η «απογύμνωση του ενδοθηλίου» οδηγεί σε μια σειρά αντισταθμιστικών απαντήσεων οι οποίες μεταβάλλουν τις φυσιολογικές ομοιοστατικές ιδιότητες των αγγείων. Για παράδειγμα, μετά από ένα τραυματισμό ενισχύεται η ικανότητα του ενδοθηλίου να προσκολλά λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια και προάγονται οι προθρομβωτικές ιδιότητές του. Τα προσκολλημένα λευκοκύτταρα και αιμοπετάλια απελευθερώνουν κυτταροκίνες, αγγειοδραστικούς και αυξητικούς παράγοντες που προάγουν μια φλεγμονώδη απάντηση, η οποία χαρακτηρίζεται από τη μετακίνηση λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα και τον πολλαπλασιασμό τους ώστε να σχηματιστεί μια ενδιάμεση αθηροσκληρωτική αλλοίωση.

Ένα άλλο συστατικό της φλεγμονώδους απάντησης είναι η συγκέντρωση μακροφάγων στο αρτηριακό τοίχωμα, τα οποία προσλαμβάνουν τα λιποειδή των LDL που έχουν εναποτεθεί στο αρτηριακό τοίχωμα και μετατρέπονται σε αφρώδη κύτταρα, το πρώτο στάδιο της αθηροσκληρωτικής αλλοίωσης. Η διαδικασία της συσσώρευσης λιπιδίων και του σχηματισμού αφρωδών κυττάρων διαιωνίζει μια φλεγμονώδη απάντηση η οποία με τη σειρά της διαιωνίζει τη συσσώρευση μακροφάγων και λεμφοκυττάρων<sup>40,41</sup>. Η συνεχιζόμενη φλεγμονή οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση με απελευθέρωση κυτταροκινών, αυξητικών παραγόντων και πρωτεολυτικών ενζύμων που, με τη σειρά τους, επιτρέπουν την εξάπλωση της βλάβης. Καθώς η αλλοίωση επεκτείνεται, αρχίζει να καταλαμβάνει το χώρο του αρτηριακού αυλού, με αποτέλεσμα να περιορίζεται σταδιακά η ροή του αίματος (Εικόνα 2.2.).

Η θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό (response-to-injury hypothesis) βασίστηκε αρχικά στην αντίληψη της απόπτωσης των κυττάρων του ενδοθηλίου ως πρωταρχικού γεγονότος στην αθηρογένεση<sup>42,43</sup>. Πιο πρόσφατα, έχει καταστεί σαφές ότι η απόπτωση των κυττάρων του ενδοθηλίου δεν είναι συνήθης και ότι η αναπτυσσόμενη αθηροσκληρωτική αλλοίωση χαρακτηρίζεται από την παρουσία ανέπαφης ενδοθηλιακής στοιβάδας. Αυτό το εύρημα, μεταξύ άλλων, οδήγησε σε τροποποίηση της αρχικής θεωρίας. Ως εκ τούτου, η νέα εκδοχή προτείνει ότι η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου είναι επαρκής για την έναρξη της αθηρογένεσης, μέσω της αυξημένης ενδοθηλιακής διαπερατότητας σε αθηρογόνες λιποπρωτεΐνες<sup>44</sup>. Αυτός ο ισχυρισμός παρουσιάζει επίσης προβλήματα, καθώς έχει βρεθεί ότι η είσοδος των αθηρογόνων λιποπρωτεϊνών στο αρτηριακό τοίχωμα ενδέχεται να μην εξαρτάται από τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου.



**Εικόνα 2.2.** Θεωρία απάντησης στον τραυματισμό (response-to-injury hypothesis). (A) Η αθηροσκλήρωση οφείλεται στον τραυματισμό ή τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου, η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη διαπερατότητα του ενδοθηλίου και εναπόθεση LDL στον υποενδοθηλιακό χώρο. Συνοδεύεται από την προσκόλληση λευκοκυττάρων και τη μετακίνησή τους διαμέσου του ενδοθηλίου. (B) Στο ενδιάμεσο στάδιο, η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και από μια φλεγμονώδη απάντηση, η οποία περιλαμβάνει την ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων, την προσκόλληση και συσσώρευση αιμοπεταλίων, την περαιτέρω είσοδο λευκοκυττάρων στο αρτηριακό τοίχωμα και τη μετακίνηση

λείων μυϊκών κυττάρων στον έσω χιτώνα. (C) Σε προχωρημένο στάδιο, η αθηροσκλήρωση χαρακτηρίζεται από τη συνεχιζόμενη συσσώρευση μακροφάγων, το σχηματισμό ινώδους κάψας και νέκρωση του πυρήνα της αλλοίωσης<sup>45</sup>.

#### 2.4.1.1. Δυσλειτουργία του ενδοθηλίου

Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου πιθανολογείται πως είναι το πρώτο από μια σειρά γεγονότων που διέπουν το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Μπορεί να προκληθεί ως απάντηση σε ποικίλα ερεθίσματα, όπως η οξειδωμένη LDL, οι ελεύθερες ρίζες που προέρχονται από το κάπνισμα, ο διαβήτης, η υπέρταση, οι γενετικές μεταβολές, οι αυξημένες συγκεντρώσεις ομοκυστεΐνης στο πλάσμα και οι λοιμώδεις μικροοργανισμοί. Η διατάραξη της ομοιοστασίας του ενδοθηλίου επηρεάζει τη διαπερατότητα, την αγγειοσυστολή, τη θρόμβωση και πυροδοτεί φλεγμονώδεις και ανοσολογικές απαντήσεις<sup>46</sup>.

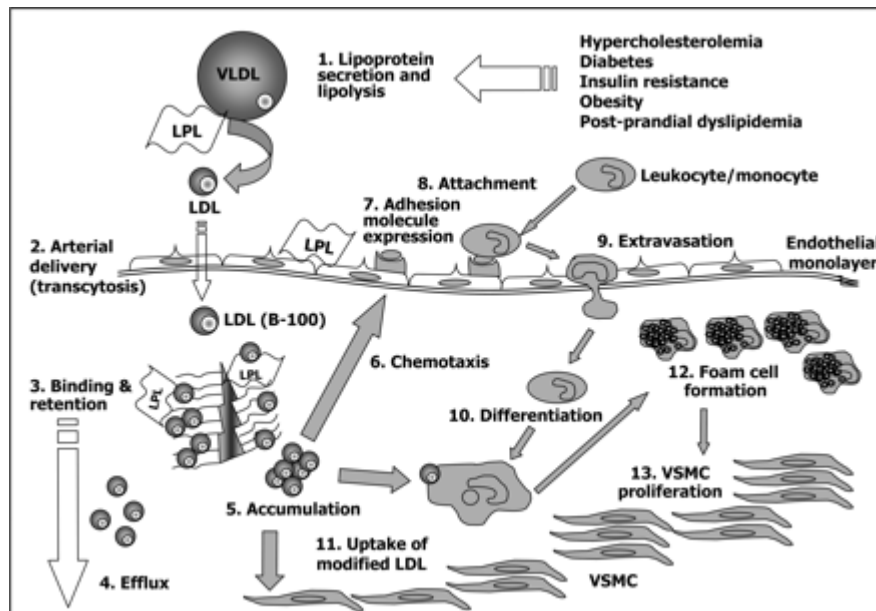
Η δυσλειτουργία του ενδοθηλίου στον άνθρωπο μπορεί να αξιολογηθεί με βιοχημικό τρόπο μέσω διαφόρων δεικτών του αίματος, όπως τα μόρια προσκόλλησης, οι κυτταροκίνες και τα προστανοειδή, ή μέσω λειτουργιών όπως μέτρηση της ενδοθηλιοεξαρτώμενης διαστολής *in vitro* (δηλαδή σε απομονωμένες αρτηρίες) και *in vivo* ως απάντηση είτε σε αγωνιστές είτε σε μεταβολές της ροής του αίματος στην κυκλοφορία των στεφανιαίων ή στην περιφερική κυκλοφορία<sup>47</sup>.

Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι το οξειδωτικό στρες είναι ο κυρίαρχος μηχανισμός στην πρόκληση της δυσλειτουργίας του ενδοθηλίου και, ως εκ τούτου, παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μια διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ οξειδωτικών και αντιοξειδωτικών παραγόντων κατά τέτοιο τρόπο ώστε να ευνοούνται οι πρώτοι με πιθανό αποτέλεσμα την πρόκληση βλάβης<sup>45</sup>. Επάγει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, την υπερτροφία, την απόπτωση και τη φλεγμονή μέσω ενεργοποίησης αντιδράσεων μεταγωγής σήματος και μεταγραφικών παραγόντων. Η περίσσεια δραστικών ριζών οξυγόνου, ιδιαίτερα των ελευθέρων ριζών, προκαλεί την οξείδωση διαφόρων μορίων και

σε συνδυασμό με τη μειωμένη αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού, θα μπορούσε ένα συμβάλει στα καρδιαγγειακά νοσήματα<sup>48</sup>.

### 2.4.2. Η θεωρία της απάντησης στην κατακράτηση (response-to-retention hypothesis)

Σύμφωνα με τη θεωρία αυτή, η αθηρογένεση υποκινείται από την κατακράτηση των λιποπρωτεϊνών (Εικόνα 2.3.). Για παράδειγμα, σε διάστημα 2 ωρών από τη στιγμή της ένεσης LDL σε κουνέλια, παρατηρείται αρτηριακή κατακράτηση LDL και μικροσυσσωματωμάτων της<sup>49</sup>. Η κατακράτηση λιποπρωτεϊνών εντός του αρτηριακού τοιχώματος φαίνεται ότι συνδέεται στενά με τα συστατικά της εξωκυτταρικής μήτρας. Σημαντικό ρόλο φαίνεται να παίζουν οι πρωτεογλυκάνες στην κατακράτηση των λιποπρωτεϊνών που φέρουν την απολιποπρωτεΐνη Β, στα πρώιμα στάδια της αθηροσκλήρωσης.



**Εικόνα 2.3.** Θεωρία «απάντησης στην κατακράτηση» (response-to-retention hypothesis). Σύμφωνα με την αρχική θεωρία, η ήπια με μέτρια υπερλιπιδαιμία προκαλεί την ανάπτυξη αλλοίωσης σε συγκεκριμένες θέσεις των αρτηριών που χαρακτηρίζονται από την τοπική σύνθεση μορίων που

κατακρατούν την apo-B100. Στο σχήμα απεικονίζονται τα αρχικά βήματα (1-5), τα οποία είναι η παραγωγή LDL σωματιδίων μέσω λιπόλυσης, η μετακίνηση αυτών διαμέσου της ενδοθηλιακής μονοστοιβάδας, η δέσμευση και κατακράτησή τους από ειδικά μόρια του στηρικτικού ιστού του έσω χιτώνα, η εκροή και συσσώρευσή τους. Η συσσώρευση των σωματιδίων LDL θεωρείται ότι πυροδοτεί μια φλεγμονώδη απάντηση που χαρακτηρίζεται από τη χημειοταξία, την έκφραση μορίων προσκόλλησης επί των ενδοθηλιακών κυττάρων, την προσκόλληση λευκοκυττάρων και την είσοδό τους στον υποενδοθηλιακό χώρο, τη διαφοροποίηση των μονοκυττάρων, την πρόσληψη οξειδωμένης LDL, το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων και τον πολλαπλασιασμό λείων μυϊκών κυττάρων<sup>45</sup>.

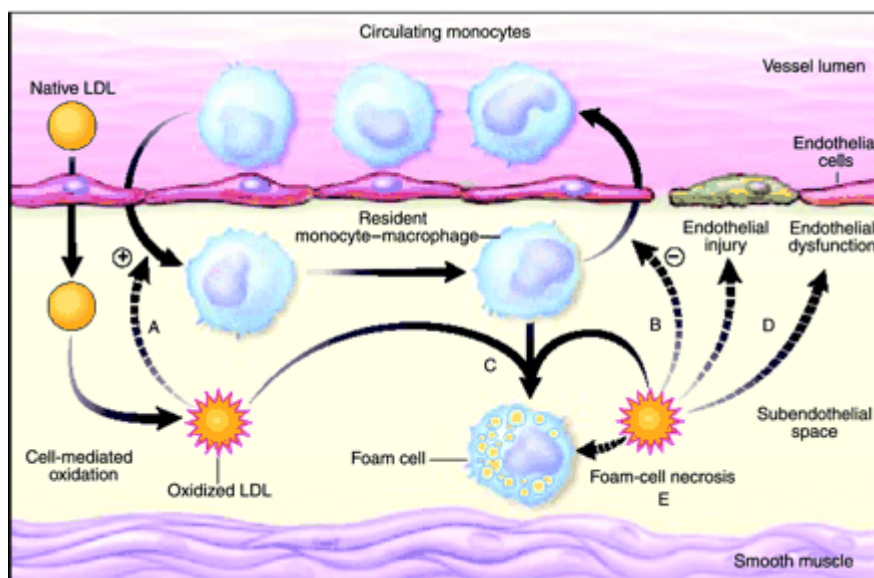
Επιπλέον, ένζυμα που προάγουν τη λιπόλυση καθώς και λυσοσωμικά ένζυμα στην εξοκυτταρική μήτρα φαίνεται να παίζουν ρόλο. Για παράδειγμα, η λιποπρωτεϊνική λιπάση ενισχύει την προσκόλληση της LDL in vitro<sup>50</sup> και αυτή η επίδραση είναι ανεξάρτητη της ενζυμικής δραστηριότητας<sup>51</sup>. Μόλις συκρατηθεί εντός του αρτηριακού τοιχώματος, η LDL μπορεί να σχηματίσει μικροσυσσωματώματα<sup>49,52</sup>, ίσως μέσω της δράσης της εκκριτικής σφιγγομυελινάσης<sup>53</sup>. Μάλιστα, η συσσωρευμένη LDL προσλαμβάνεται σε μεγάλη ποσότητα από τα μακροφάγα και τα λεία μυϊκά κύτταρα<sup>54</sup> και με τον τρόπο αυτό, υποστηρίζουν το σχηματισμό αφρωδών κυττάρων<sup>55</sup>. Έτσι, πολλά χαρακτηριστικά της αθηροσκλήρωσης μπορούν να αποδοθούν στην ενισχυμένη κατακράτηση της LDL εντός του αρτηριακού τοιχώματος και τη σύνδεσή της με πρωτεογλυκάνες.

#### **2.4.3. Η θεωρία της οξειδωτικής τροποποίησης (oxidative modification hypothesis)**

Η θεωρία αυτή τονίζει τον πρωταρχικό ρόλο της οξειδωμένης LDL. Συγκεκριμένα, εστιάζει στην αντίληψη ότι η LDL δεν είναι αθηρογόνος στην αρχική της μορφή. Ωστόσο, όταν η LDL τροποποιείται χημικά προσλαμβάνεται γρήγορα από τα μακροφάγα μέσω υποδοχέων –



εκκαθαριστών<sup>56</sup>. Είναι πλέον σαφές ότι ένας μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα *in vitro* καθιστούν την LDL υπόστρωμα για αυτούς τους υποδοχείς είναι η οξείδωση των λιποειδών της LDL και η συνακόλουθη τροποποίηση της απολιποπρωτεΐνης B-100<sup>57</sup>. Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία (Εικόνα 2.4.), η LDL διέρχεται τον υποενδοθηλιακό χώρο των θέσεων της αρτηρίας που είναι επιρρεπής σε αλλοίωση. Κατά τη διάρκεια αυτής της δοκιμασίας, τα λιπίδια της LDL υπόκεινται σε οξείδωση, με αποτέλεσμα οι ομάδες λυσίνης της απολιποπρωτεΐνης B-100 να τροποποιούνται και το καθαρό αρνητικό φορτίο του σωματιδίου της απολιποπρωτεΐνης να αυξάνει<sup>58</sup>. Αυτή η τροποποίηση της απολιποπρωτεΐνης B-100 καθιστά την LDL επιρρεπή στην πρόσληψή της από τα μακροφάγα μέσω υποδοχέων – εκκαθαριστών, παράγοντας αφρώδη κύτταρα γεμάτα με εστέρες χοληστερόλης<sup>59</sup>.



**Εικόνα 2.4.** Θεωρία της οξειδωτικής τροποποίησης (*Oxidative modification hypothesis*). Τα σωματίδια της LDL εγκλωβίζονται στον υποενδοθηλιακό χώρο όπου υφίστανται οξείδωση από κύτταρα του αγγείου, όπως λεία μυϊκά κύτταρα, ενδοθηλιακά κύτταρα και μακροφάγα. Η ox-LDL, η οποία θεωρείται ότι έχει πρωταρχικό ρόλο, (A) διεγείρει τη χημειοταξία των μονοκυττάρων, (B) εμποδίζει την είσοδο των μονοκυττάρων από τον υποενδοθηλιακό χώρο στην κυκλοφορία του αίματος και (C) συμβάλλει στο σχηματισμό αφρωδών κυττάρων. Επίσης, η ox-LDL (D) επάγει τον

τραυματισμό και τη δυσλειτουργία του ενδοθηλίου και (E) επέρχεται η νέκρωση των αφρωδών κυττάρων εξαιτίας της συσσώρευσης ox-LDL<sup>45</sup>.

Η διαδικασία οξειδωσης της LDL σχετίζεται με μια σειρά από άλλες προαθηρογόνες εκδηλώσεις. Για παράδειγμα, κατά τα αρχικά στάδια της *in vitro* οξειδωσης της LDL, μπορεί να παρατηρηθεί τροποποίηση των λιπιδίων της LDL απουσία οποιασδήποτε αλλαγής στην απολιποπρωτεΐνη B-100. Αυτή η τροποποιημένη LDL έχει ονομαστεί «ελάχιστα τροποποιημένη LDL» και έχει αποδειχθεί *in vitro* ότι προκαλεί τη σύνθεση χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων (MCP-1) τόσο σε λεία μυϊκά όσο και ενδοθηλιακά κύτταρα<sup>60,61</sup>, με αποτέλεσμα την πρόσληψη φλεγμονωδών κυττάρων<sup>62</sup>. Το συγκεκριμένο βήμα φαίνεται κρίσιμο καθώς τα ποντίκια, που στερούνται τον υποδοχέα της χημειοτακτικής πρωτεΐνης των μονοκυττάρων (MCP-1) είναι ανθεκτικά στην αθηροσκλήρωση<sup>63,64</sup>. Η οξειδωμένη LDL, που κοινώς ονομάζεται "ox-LDL", αποτελεί χημειοτακτικό παράγοντα για τα μονοκύτταρα<sup>65</sup> και τα T-λεμφοκύτταρα<sup>66</sup>, ίσως λόγω της λυσοφωσφατιδυλοχολίνης που σχηματίζεται κατά τη διάρκεια της οξειδωσης<sup>57</sup>. Επίσης διεγείρει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων<sup>67</sup> και οδηγεί στην παραγωγή αυτοαντισωμάτων<sup>68,69</sup> και στο σχηματισμό ανοσοσυμπλεγμάτων που διευκολύνουν την πρόσληψη της LDL από τα μακροφάγα<sup>70,71</sup>. Η συγκέντρωση φλεγμονωδών κυττάρων μπορεί να οδηγήσει στη συνεχιζόμενη οξειδωση της LDL και την καταλυτική επέκταση της αθηροσκληρωτικής βλάβης.

Οι παραπάνω θεωρίες έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά, αν και η κάθε μια εστιάζει σε διαφορετικά αρχικά γεγονότα για να δικαιολογήσει την ανάπτυξη αθηροσκληρωτικής πλάκας.

1) Κάθε θεωρία έχει ως κεντρικό στοιχείο την οξειδωμένη LDL (oxLDL) και η μείωση της LDL χοληστερόλης αποτελεί σημαντικό μέσο για τη θεραπεία της αθηροσκλήρωσης.

2) Σε κάθε θεωρία η φλεγμονή αποτελεί χαρακτηριστικό στοιχείο της αθηροσκλήρωσης.

Ο Rudolf Virchow ήταν ο πρώτος που πρότεινε το μηχανισμό της φλεγμονής ως βάση της αθηρογένεσης στα μέσα του 19<sup>ου</sup> αιώνα<sup>72</sup>. Όμως, η υπόθεση που έχει επικρατήσει, ως θεωρία πλέον, είναι η «θεωρία της απάντησης στον τραυματισμό» των R. Ross και J. Glomset που διατυπώθηκε αρχικά το 1976<sup>42,43,73</sup>, η οποία υφίσταται βελτιώσεις και προσθήκες συνεχώς μέχρι σήμερα.

## **2.5. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΗΣ ΑΘΗΡΟΣΚΛΗΡΩΣΗΣ**

Η αθηρογένεση είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία. Μεγάλος αριθμός παραγόντων, που καλούνται παράγοντες κινδύνου συνδέονται με αυτή.

Οι παράγοντες κινδύνου διακρίνονται στους τροποποιήσιμους και στους μη τροποποιήσιμους. Στους τροποποιήσιμους παράγοντες, δηλαδή στους παράγοντες που μπορούμε να επέμβουμε, κατατάσσονται ο σακχαρώδης διαβήτης ή η μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη (IGT), η υπέρταση, το κάπνισμα, η δυσλιπιδαιμία (υψηλές συγκεντρώσεις LDL / χαμηλές συγκεντρώσεις HDL στον ορό, η υψηλή πρόσληψη υδατανθράκων, η παχυσαρκία και η κακή φυσική κατάσταση λόγω έλλειψης άσκησης. Στους μη τροποποιήσιμους παράγοντες ανήκουν η ηλικία, το φύλο και το βεβαρημένο οικογενειακό ιστορικό<sup>74</sup>.

Παρακάτω αναπτύσσονται οι σημαντικότεροι από τους παράγοντες αυτούς:

- **ΗΛΙΚΙΑ**

Η ηλικία, ένας μη τροποποιήσιμος παράγοντας, συγκαταλέγεται ανάμεσα στους κυριότερους παράγοντες κινδύνου για την πρόβλεψη καρδιαγγειακών νοσημάτων και απεικονίζεται σαφέστερα αν αναλογιστεί κανείς τον κίνδυνο ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου σε μια περίοδο 10 ετών. Βάσει στατιστικών στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο μέσος όρος του κινδύνου ανάπτυξης καρδιαγγειακής νόσου σε άνδρες από 30 έως 34 ετών είναι περίπου 3% (1040). Ο αριθμός αυτός αυξάνεται κατά επτά φορές και φτάνει

στο 21% για ένα συγκρίσιμο άτομο ηλικίας 60 έως 64 ετών. Η εκτίμηση του ηλικιακού κινδύνου εκδήλωσης της ασθένειας μέσα σε μια δεκαετία, σε σύγκριση με άλλους παράγοντες κινδύνου, βασίζεται σε ένα σύστημα βαθμολόγησης 14 σημείων που προέκυψε από πληθυσμιακή μελέτη (Framingham Heart Study). Στο σύστημα αυτό, όσο αυξάνεται ο κίνδυνος αυξάνεται και η βαθμολογία και μέχρι τους 7 βαθμούς μπορεί να αποδοθεί στην ηλικία και μόνο<sup>50</sup>.

- ΦΥΛΟ

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι οι άνδρες παρουσιάζουν υπερβολικά μεγαλύτερο κίνδυνο για εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου σε σύγκριση με γυναίκες ίδιας ηλικίας<sup>75</sup>. Οι διαφορές αυτές σχετίζονται με τον «προστατευτικό» ρόλο των οιστρογόνων προς τις γυναίκες, παρόλο που μετά την εμμηνόπαυση οι γυναίκες γίνονται περισσότερο ευάλωτες στη στεφανιαία νόσο. Ωστόσο, η θεωρία αυτή ήταν δύσκολο να τεκμηριωθεί, καθώς η θεραπεία με οιστρογόνα δεν μείωσε τη συχνότητα εμφάνισης της καρδιαγγειακής νόσου σε γυναίκες μετά την εμμηνόπαυση<sup>76</sup>. Εναλλακτικά, αυτή η προφανής προστασία θα μπορούσε να οφείλεται σε ένα βαθμό στο γεγονός ότι οι γυναίκες εμφανίζουν σχετικά υψηλότερες συγκεντρώσεις HDL χοληστερόλης σε σχέση με άνδρες ίδιας ηλικίας. Παρόλα αυτά, τα περιστατικά καρδιαγγειακών παθήσεων είναι επίσης λιγότερο συχνά σε γυναίκες πριν την εμμηνόπαυση σε σχέση με άνδρες ίδιας ηλικίας.

- ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

Πλέον υπάρχει μια αυξανόμενη εκτίμηση ότι η παχυσαρκία, που ορίζεται ως το υπερβολικό σωματικό βάρος με μια αφύσικα υψηλή υπεροχή του λίπους του σώματος, είναι μια κατάσταση που αυξάνει τον ενδεχόμενο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακής νόσου. Ο ακριβής μηχανισμός για την επεξήγηση αυτού του φαινομένου, όμως, είναι αμφιλεγόμενος. Μια σειρά από άλλους παράγοντες κινδύνου, όπως η υπέρταση, η χαμηλή συγκέντρωση HDL χοληστερόλης και ο σακχαρώδης διαβήτης συχνά συνυπάρχουν με την παχυσαρκία<sup>77</sup>. Αυτή η σχέση μεταξύ της παχυσαρκίας και των καρδιαγγειακών παθήσεων έχει αποτελέσει μεγάλη ανησυχία, καθώς τα

φαινόμενα παχυσαρκίας στον ανεπτυγμένο κόσμο αυξάνονται με ανησυχητικό ρυθμό.

- ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Η συσχέτιση μεταξύ καπνίσματος και εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων έκανε την εμφάνισή της ήδη από τη δεκαετία του '40 και του '50, όπου μια σειρά μελετών συνέδεσε το κάπνισμα με την συχνότητα εμφάνισης εμφράγματος του μυοκαρδίου<sup>78,79,80</sup>. Πιο πρόσφατα, έχει αποδειχθεί ότι το κάπνισμα αυξάνει την αθηρωμάτωση σε ποσοστό που κυμαίνεται στο 50% με συνέπεια να διπλασιάζονται τα περιστατικά καρδιαγγειακών παθήσεων<sup>81</sup>. Πλέον υπάρχει η σχετική βεβαιότητα ότι το κάπνισμα σχετίζεται αιτιολογικά με τη στεφανιαία νόσο, όπως επίσης και ότι η διακοπή του καπνίσματος είναι αρκετά αποτελεσματική στη μείωση του κινδύνου για μελλοντική εμφάνιση της νόσου. Στην πραγματικότητα, διαπιστώθηκε πως ο κίνδυνος στους πρώην καπνιστές μειώνεται βαθμιαία και μέσα σε 2 χρόνια ο κίνδυνος φτάνει στα επίπεδα των μη καπνιστών<sup>82</sup>.

- ΥΠΕΡΤΑΣΗ

Η υπέρταση ορίζεται ως η συστολική αρτηριακή πίεση άνω των 140 mm Hg ή η διαστολική αρτηριακή πίεση άνω των 90 mm Hg. Εκτιμάται ότι οι ηλικιωμένοι εμφανίζουν μεγάλη προδιάθεση για υπέρταση, σε ποσοστό έως και 75% για άτομα άνω των 75 ετών<sup>83</sup>. Φαίνεται να υπάρχει μια κατά προσέγγιση γραμμική σχέση μεταξύ της αύξησης της αρτηριακής πίεσης και της αυξημένης συχνότητας εμφάνισης αθηροσκλήρωσης<sup>84</sup>. In vivo πειράματα δείχνουν ότι η αύξηση της αρτηριακής πίεσης από μόνη της δεν οδηγεί σε αθηρωμάτωση αλλά μόνο σε συνδυασμό με αύξηση των λιποπρωτεϊνών του πλάσματος. Στις περισσότερες δυτικές κοινωνίες το επίπεδο λιποπρωτεϊνών του πλάσματος είναι αρκετό για να επιτρέψει στην υπέρταση να προάγει την αθηρογένεση.

- ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Περίπου 17 εκατομμύρια άνθρωποι στις Ηνωμένες Πολιτείες, ή το 6.2% του πληθυσμού, πάσχει από σακχαρώδη διαβήτη<sup>85</sup>. Σε ασθενείς με διαβήτη, ο κίνδυνος της αθηροσκλήρωσης είναι τρεις έως πέντε φορές μεγαλύτερος από ότι σε μη διαβητικούς, παρά τον έλεγχο των υπολοίπων παραγόντων κινδύνου<sup>86,87</sup>. Σε διαβήτη προχωρημένου σταδίου, έχουν βρεθεί αυξημένα επίπεδα LDL χοληστερόλη και μειωμένα επίπεδα HDL χοληστερόλη στο πλάσμα, γεγονός που μπορεί να θεωρηθεί ότι συμβάλλει στο πρόβλημα της επιταχυνόμενης αθηροσκλήρωσης στο διαβήτη<sup>88</sup> και τον καθιστά σημαντικό παράγοντα κινδύνου.

- ΧΟΛΗΣΤΕΡΟΛΗ ΤΟΥ ΟΡΟΥ

Η συσχέτιση μεταξύ της LDL χοληστερόλης και της αθηροσκλήρωσης έχει καθιερωθεί βασιζόμενη, εν μέρει, σε ένα πείραμα της φύσης. Η οικογενειακή υπερχοληστερολαιμία είναι μια αυτοσωματική επικρατούσα διαταραχή με μεγάλη συχνότητα εμφάνισης στο γενικό πληθυσμό (1 στους 500 ανθρώπους). Οι ετεροζυγώτες της ασθένειας αυτής εκδηλώνουν μία αύξηση στη χοληστερόλη του πλάσματος κατά 2 με 5 φορές, που σχετίζεται άμεσα με τα αυξημένα επίπεδα LDL. Σε αυτό το σημείο εμπλέκεται και ο υποδοχέας της LDL. Στους ομοζυγώτες έχει παρατηρηθεί αύξηση της χοληστερόλης του πλάσματος κατά 4 με 6 φορές περισσότερο<sup>89</sup>.

Στους ετεροζυγώτες, το 85% των ατόμων έχουν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου μέχρι την ηλικία των 60 ετών, ηλικία που μειώνεται κατά 15 χρόνια στους ομοζυγώτες<sup>90</sup>. Ο κίνδυνος για καρδιαγγειακά νοσήματα από την αυξημένη LDL χοληστερόλη υποστηρίζεται από πειραματικά δεδομένα όπου η θεραπεία με στόχο την μείωση της χοληστερόλης, έχει ως αποτέλεσμα να μειώνει σημαντικά τα κλινικά συμπτώματα της αθηροσκλήρωσης, ειδικότερα ύστερα από χορήγηση αναστολέων ρεδοκτάσης του 3-υδροξυμεθυλογλουταρυλο-CoA (HMG-CoA), δηλαδή στατινών που έχουν την ικανότητα να μειώνουν σημαντικά την LDL χοληστερόλη<sup>89</sup>. Αντίστροφη όμως είναι η δράση της HDL χοληστερόλης σε σύγκριση με την LDL, όπως αποδεικνύεται από τη νόσο Tangier<sup>91</sup>. Αυτή η αυτοσωμική κατάσταση χαρακτηρίζεται από την απουσία HDL, αφού αυτή δεν εκκρίνεται από τα

κύτταρα, λόγω βλάβης στον δεσμευόμενο με ATP μεταφορέα-1. Σε αυτή τη περίπτωση, οι ασθενείς διαθέτουν ιστούς στους οποίους έχει συσσωρευτεί χοληστερόλη, καθώς και πρησμένες αμυγδαλές, νεφροπάθεια και πρόωρη στεφανιαία νόσο.

Σήμερα όμως οι απόψεις αυτές αμφισβητούνται και υπάρχουν μελέτες που αποδεικνύουν ότι η χοληστερόλη σχετίζεται με την αθηρογένεση αλλά δεν αποτελεί το αίτιο της αθηρογένεσης. Έχει αποδειχθεί ότι μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης του πλάσματος δεν οδηγεί απαραίτητα σε προστασία έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Η «Υπόθεση του Μεβαλονικού» υποστηρίζει ότι κατά τη διέγερση της μεβαλονικής οδού στα ενδοθηλιακά κύτταρα από φλεγμονώδεις παράγοντες, τα κύτταρα αυτά παράγουν χοληστερόλη και ελεύθερες ρίζες. Οι ελεύθερες ρίζες είναι αυτές που διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην αιτιολογία της αθηροσκλήρωσης, συμβάλλοντας στο σχηματισμό οξειδωμένης χοληστερόλης. Με τον τρόπο αυτό εξηγείται η συσχέτιση μεταξύ των καρδιαγγειακών παθήσεων και των επιπέδων χοληστερόλης στο πλάσμα<sup>92</sup>.

## **2.6. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ PAF ΣΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

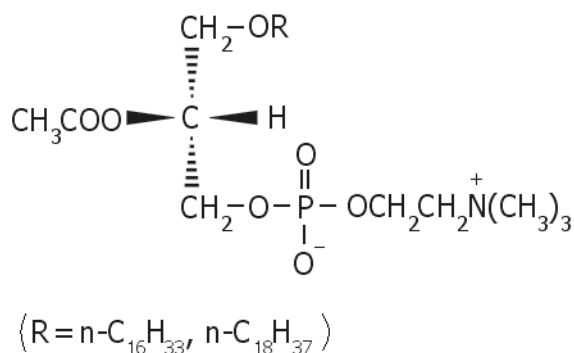
Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF) αποτελεί μια ενδογενώς συντιθέμενη λιποειδική ένωση που ανήκει στην τάξη των φωσφολιποειδών<sup>93</sup>. Η ονομασία της ένωσης κατά IUPAC είναι 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφο-χολίνη και προσδιορίζει δομικά την ένωση ως ένα γλυκεριναιθερικό ανάλογο της φωσφατιδυλοχολίνης. Είναι ένας ισχυρός φλεγμονώδης διαμεσολαβητής<sup>94,95</sup>, με κρίσιμο ρόλο στον κυρίαρχο μηχανισμό της αθηροσκλήρωσης<sup>96</sup>.

Σήμερα έχει αναπτυχθεί μια νέα παγκόσμια θεωρία για τον τρόπο σχηματισμού των αθηρωματικών πλακών, μέσα από την οποία δίνεται και η βιοχημική εξήγηση της προστατευτικής δράσης που ασκεί η Μεσογειακή δίαιτα έναντι των καρδιοπαθειών. Η θεωρία αυτή υποδεικνύει σαν αίτιο για την αθηρωμάτωση και την αρτηριοσκλήρυνση το φλεγμονώδη Παράγοντα Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) και όχι τη χοληστερόλη και τα κορεσμένα λιποειδή. Τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης

και κορεσμένων λιποειδών στο αίμα εντείνουν την οξειδωση της LDL και την παραγωγή οξειδωμένης LDL στην οποία τα οξειδωμένα λιποειδή της περιλαμβάνουν PAF και άλλα ανάλογα του PAF με βιολογική δράση PAF. Κατά συνέπεια υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και κορεσμένων λιποειδών στο αίμα αυξάνουν την παραγωγή PAF. Η προστασία μας από τα υψηλά επίπεδα χοληστερόλης και κορεσμένων λιποειδών μπορεί να γίνεται με αναστολείς του PAF από τη μεσογειακή δίαιτα<sup>97</sup>.

## 2.7. ΧΗΜΙΚΗ ΔΟΜΗ ΤΟΥ PAF

Το μόριο του PAF ανακαλύφθηκε και διαλευκάνθηκε η δομή του το 1979 από τους K. A. Δημόπουλο, R.N. Pinckard και D.J. Hanahan<sup>137</sup> (Σχήμα 2.1.).



**Σχήμα 2.1.** Η χημική δομή του PAF.

Πρόκειται για ένα φωσφολιποειδές (πολικό λιποειδές) με σκελετό γλυκερόλης. Η ανθρακική αλυσίδα στη θέση *sn*-1 ενώνεται με το σκελετό γλυκερόλης με αιθερικό δεσμό (-CH<sub>2</sub>OR). Αυτό είναι ένα ασυνήθιστο χαρακτηριστικό του PAF καθώς, για τα φωσφολιποειδή, ο κανόνας είναι η ύπαρξη εστερικού δεσμού (-CH<sub>2</sub>OCOR), αντί αιθερικού. Το υδροξύλιο του άνθρακα στη θέση *sn*-2 της γλυκερόλης είναι εστεροποιημένο με οξικό οξύ (>CHOCOCH<sub>3</sub>), κάτι το οποίο είναι επίσης ακόμα πιο ασυνήθιστο λόγω του μικρού μεγέθους του οξέος. Στη θέση *sn*-3 βρίσκεται η ομάδα της φωσφοχολίνης<sup>137</sup>.



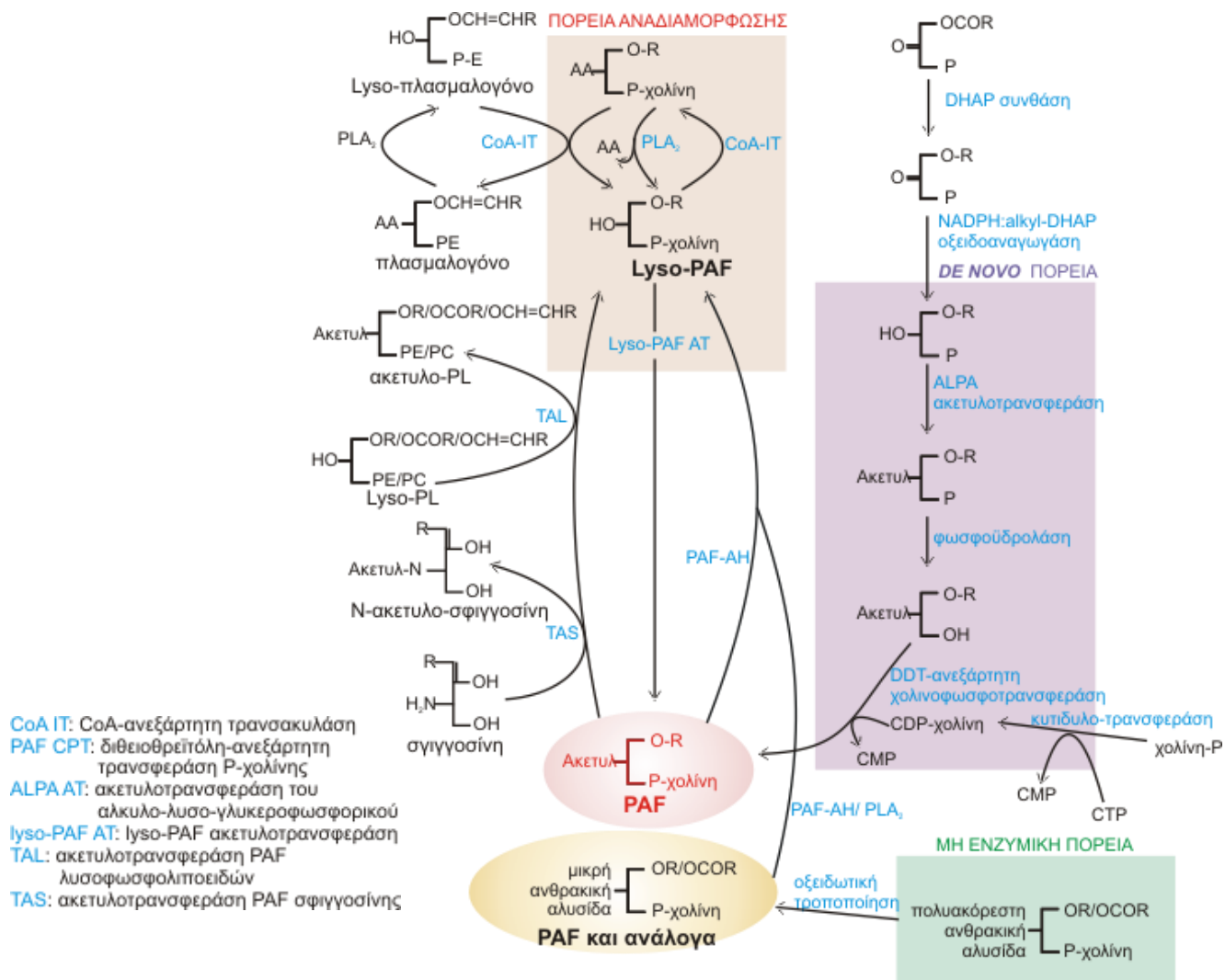
Η παραπάνω δομή αντιπροσωπεύει την πιο δραστική μορφή του PAF όχι όμως και τη μοναδική αφού στη φύση ο PAF αποτελεί μέλος μιας οικογένειας μορίων, δηλαδή έχει βρεθεί μια μεγάλη ποικιλία μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF με παρόμοιες βιολογικές δράσεις, όπου ο PAF είναι το δραστικότερο μόριο<sup>98</sup>.

## 2.8. ΜΕΤΑΒΟΛΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΟΥ PAF

Υπάρχουν δύο διαφορετικές ενζυμικές πορείες μέσω των οποίων μπορεί να συντεθεί ο PAF: 1) η πορεία ανασχηματισμού ή αλλιώς remodeling και 2) η εξ' υπαρχής ή αλλιώς *de novo* πορεία βιοσύνθεσης.

Η κύρια πορεία βιοσύνθεσης του PAF είναι η πορεία ανασχηματισμού, που είναι η πρώτη πορεία βιοσύνθεσης PAF που περιγράφηκε και ενεργοποιείται σε απόκριση φλεγμονωδών και αλλεργικών ερεθισμάτων, με σκοπό την άμεση παραγωγή του από τα κύτταρα. Περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της ακετυλοτρανσφεράσης, η οποία ακετυλιώνει τον λυσο-PAF (1-Ο-αλκυλο-*sn*-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) προς PAF<sup>99,100</sup> (Σχήμα 2.2.). 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 πλάσματος<sup>99</sup>.

Η *de novo* πορεία βιοσύνθεσης του PAF δεν ενεργοποιείται από φλεγμονώδη ερεθίσματα και είναι υπεύθυνη για την συνεχή, σταθερή παραγωγή PAF από τα κύτταρα με σκοπό τη διατήρηση των φυσιολογικών επιπέδων του στο αίμα και στους ιστούς<sup>101</sup>. Όλα τα ένζυμα της *de novo* πορείας είναι μεμβρανικά και διαφέρουν στα βιοχημικά χαρακτηριστικά τους από τα αντίστοιχα ένζυμα που είναι υπεύθυνα για την *de novo* σύνθεση των άλλων μεμβρανικών γλυκεριναιθερικών φωσφολιποειδών.



Σχήμα 2.2. Πορεία βιοσύνθεσης του PAF.<sup>102</sup>

## 2.9. Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ PAF ΜΕ ΤΗΝ ox-LDL

Η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL) έχει αποδειχτεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης. Η ox-LDL προσλαμβάνεται με γρήγορους ρυθμούς μέσω του εκκαθαριστή υποδοχέα των μακροφάγων του υποενδοθηλιακού χώρου του αρτηριακού τοιχώματος και τα μετατρέπει σε αφρώδη κύτταρα που είναι χαρακτηριστικά της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Επιπλέον, η ox-LDL είναι κυτταροτοξική και μεταβάλλει τις λειτουργίες διάφορων κυττάρων<sup>103,99</sup>.

Κατά την οξειδωση της ανθρώπινης LDL παράγονται προφλεγμονώδεις μεσολαβητές οι οποίοι ενεργοποιούν τα πολυμορφοπύρρηνα λευκοκύτταρα καθώς και κύτταρα που εκτός σωστής θέσης και χρόνου εκφράζουν τον υποδοχέα του PAF. Με τον τρόπο αυτό, οι μεσολαβητές αυτοί εμπλέκονται στα πρώιμα στάδια της αθηρογένεσης<sup>104,99</sup>.

Η απόδειξη της παραγωγής PAF κατά την οξειδωση της LDL αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα για την εξήγηση των βιολογικών της ιδιοτήτων. 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 και αυτή υπάρχει στην LDL. Ο μηχανισμός για την παραγωγή PAF στην ox-LDL, πέρα από τη μη ενζυματική οξειδωση της ανθρακικής αλυσίδας στην sn-2 θέση, περιλαμβάνει τη δράση μίας τρανσακετυλάσης, η οποία μεταφέρει ακετυλομάδα από την sn-2 θέση της 1-ακυλο-2-ακετυλο-γλυκερο-3-φωσφοχολίνης στην sn-2 θέση του λυσο-PAF, ο οποίος αποτελεί αναστολέα της ακετυλοϋδρολάσης<sup>105</sup>. Μετά την απομόνωση και τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του κλάσματος αποδείχθηκε ότι η ένωση με χρωματογραφική συμπεριφορά PAF και βιολογική δράση PAF παρουσιάζει στο φάσμα μάζας τα χαρακτηριστικά θραύσματα του PAF<sup>99</sup>.

Έρευνες, με τη βοήθεια φασμάτων MS, έχουν δείξει 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<sup>106,99</sup>. Οι ενώσεις αυτές είναι αγωνιστές του PAF με 10 φορές μικρότερη δραστηριότητα, απαντούν όμως στην ox-LDL σε ποσότητα 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του PAF. Προκαλούν υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων<sup>109</sup>. Ακόμη, είναι υπεύθυνες όπως και ο PAF, για την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και την πρόκληση φλεγμονής<sup>99</sup>.

## 2.10. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΑΚΕΤΥΛΟΥΔΡΟΛΑΣΗΣ

Οι PAF ακετυλοϋδρολάσες ανήκουν στην ευρύτερη οικογένεια των PLA<sub>2</sub>. Η PAF-AH του πλάσματος (γνωστή και ως λιποπρωτεϊνική φωσφολιπάση A<sub>2</sub>,

LpPLA<sub>2</sub>) του ανθρώπου αποικοδομεί τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιπιδίδια, τα οποία είναι ανάλογα του PAF, στην *sn*-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Είναι ένα ένζυμο ανεξάρτητο ασβεστίου που υδρολύει τον PAF μετατρέποντας τον σε λυσο-PAF. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αθηροσκλήρωση γιατί σταματάει τη διαδικασία της φλεγμονής.

Η ενζυμική δραστικότητα της PAF-AH είναι ανεξάρτητη μετάλλων και εντοπίζεται κατά τα 2/3 στις LDL λιποπρωτεΐνες και κατά το 1/3 στις HDL λιποπρωτεΐνες. Η περισσότερο δραστική μορφή της ακετυλοϋδρολάσης στο πλάσμα συνδέεται με τα σωματίδια της LDL, ενώ η μορφή του ενζύμου που συνδέεται με τα σωματίδια της HDL είναι πολύ λιγότερο δραστική όσον αφορά στην υδρόλυση της ακετυλομάδας του PAF. Η παραπάνω διαφορά φαίνεται ότι οφείλεται στο γεγονός ότι ο PAF κατανέμεται κατά κύριο λόγο στα σωματίδια της LDL<sup>107</sup>. Έχει αποδειχτεί ότι η ακετυλοϋδρολάση εμποδίζει τις οξειδωτικές αλλαγές της LDL, εμποδίζοντας έτσι και την παραγωγή του PAF και των αναλόγων του, τα οποία συνδέονται με αυξημένη αθηρογόνο δράση. Ενώ όμως η ακετυλοϋδρολάση προστατεύει τον οργανισμό από τον PAF και τα ανάλογά του κατά τα πρώτα στάδια οξείδωσης της LDL, δεν φαίνεται να συνεχίζει να έχει την ίδια δράση σε προχωρημένα στάδια οξείδωσης της LDL, επειδή τότε καταστρέφεται. Φαίνεται λοιπόν ότι η δραστικότητα του ενζύμου είναι αντιστρόφως ανάλογη της οξειδωτικής κατάστασης της LDL, σε αντίθεση με την ακετυλοϋδρολάση της HDL που φαίνεται να έχει συνεχώς προστατευτική δράση<sup>108,109</sup>.

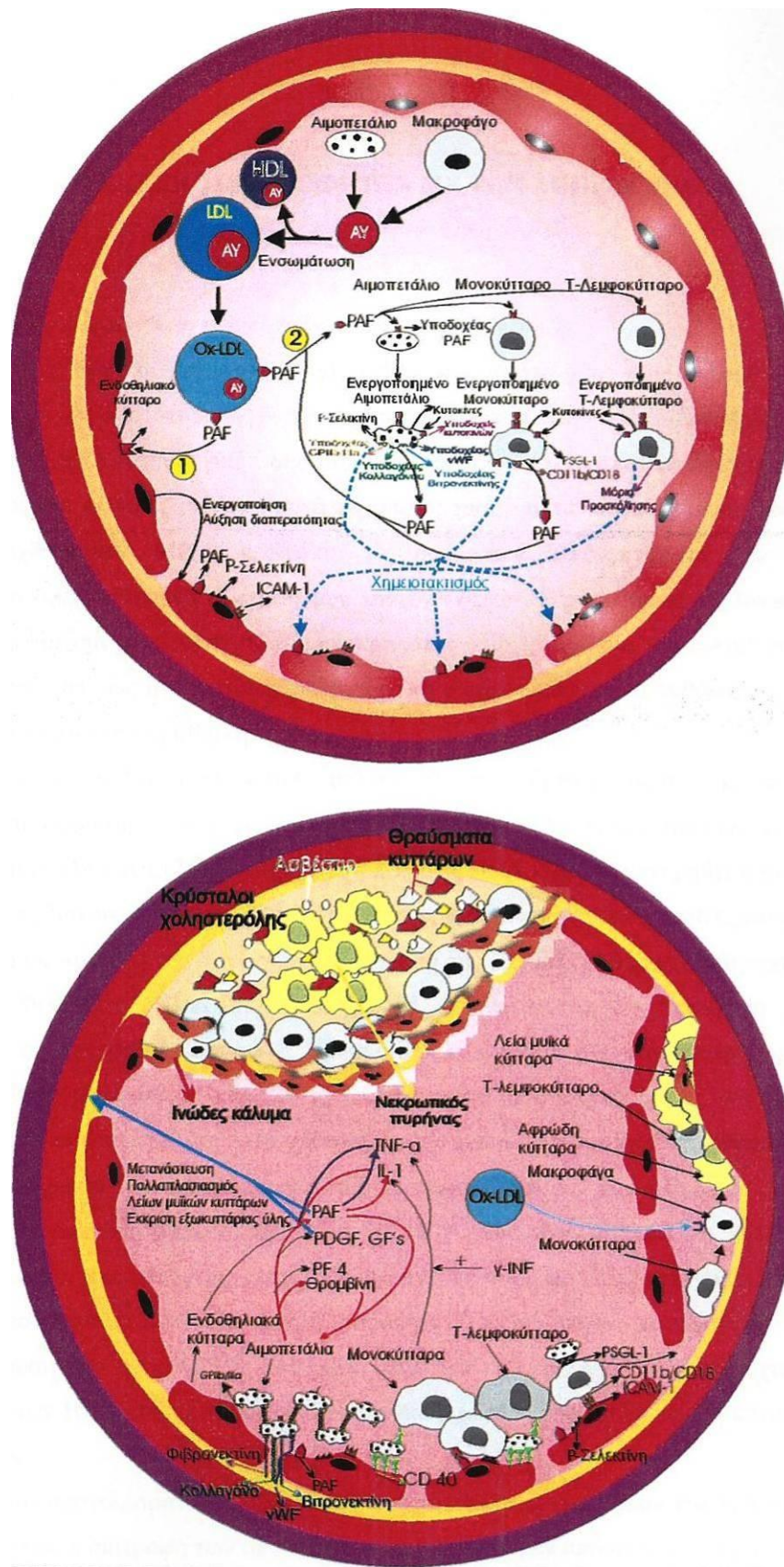
Κυτταρική πηγή της PAF-AH του πλάσματος είναι κυρίως τα λευκοκύτταρα του αίματος, όπως τα μακροφάγα αλλά και τα ηπατοκύτταρα. Η δραστικότητα της πλασματικής PAF-AH μπορεί να διαφέρει μέχρι και 5 φορές σε ένα πληθυσμό υγιών ανθρώπων. Το 60% αυτών των διαφορών οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες.

## 2.11. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΤΗΣ ΑΘΗΡΩΜΑΤΙΚΗΣ ΠΛΑΚΑΣ

Ο πιθανός μηχανισμός για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας δίνεται στην Εικόνα 2.5. Σύμφωνα με την εικόνα αυτή, 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 PAF. Σημαντικό ρόλο στην έκταση της οξείδωσης της LDL διαδραματίζουν τα αντιοξειδωτικά του αίματος, τα οποία προέρχονται κυρίως από την τροφή.

Αν όμως η οξείδωση της LDL για κάποιο λόγο επεκταθεί σε μη φυσιολογικά επίπεδα, τότε και ο PAF παράγεται άκαιρα και άτοπα 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 τελικά τα επίπεδα του PAF αυξηθούν πάνω από τα φυσιολογικά 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 κυτοκίνες, όπως είναι οι IL και εκφράζονται μόρια προσκόλλησης, όπως η P-σελεκτίνη, η E-σελεκτίνη και ο vWF. Συγχρόνως, ο PAF που παράγεται από την οξείδωση της LDL διεγείρει την παραγωγή κυτοκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα κύτταρα του αίματος που εμπλέκονται στο μηχανισμό της αθηρωμάτωσης.



Εικόνα 2.5. Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας με τον PAF ως γενεσιουργό αίτιο<sup>99</sup>.

Ο PAF είναι ικανός να προκαλέσει χημειοτακτισμό στα παρακάτω 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. Οι διεργασίες που ακολουθούν στη συνέχεια είναι εξαιρετικά πολύπλοκες, διότι λαμβάνει χώρα ένα δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων, όπου το αρχικό σήμα συνεχώς ενισχύεται μέσω ανάδρομων μηχανισμών.

Τα κύτταρα του αίματος μετά 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. Τα διάφορα αυτά κύτταρα είναι ικανά να συνδέονται όχι μόνο στο ενδοθήλιο αλλά και μεταξύ τους, μέσω συμπληρωματικών μορίων προσκόλλησης.

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 προκαλεί τη μετανάστευση των 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, επιπλέον κάτω από αυτό το στρώμα των κυττάρων νεκρώνονται διάφορα είδη κυττάρων που βρίσκονται σε αυτό το σημείο και συσσωρεύονται θραύσματα κυττάρων, χοληστερόλη,

ασβέστιο και λίγα αφρώδη κύτταρα δημιουργώντας έναν πυρήνα, το νεκρωτικό πυρήνα.

Ο σχηματισμός λοιπόν από το ινώδες κάλυμμα έως και τον νεκρωτικό πυρήνα αποτελεί την αθηρωματική πλάκα. Η ρήξη της αθηρωματικής πλάκας μπορεί να οδηγήσει σε αιμορραγία και σχηματισμό θρόμβου με τελικό αποτέλεσμα το έμφραγμα του μυοκαρδίου<sup>99</sup>.



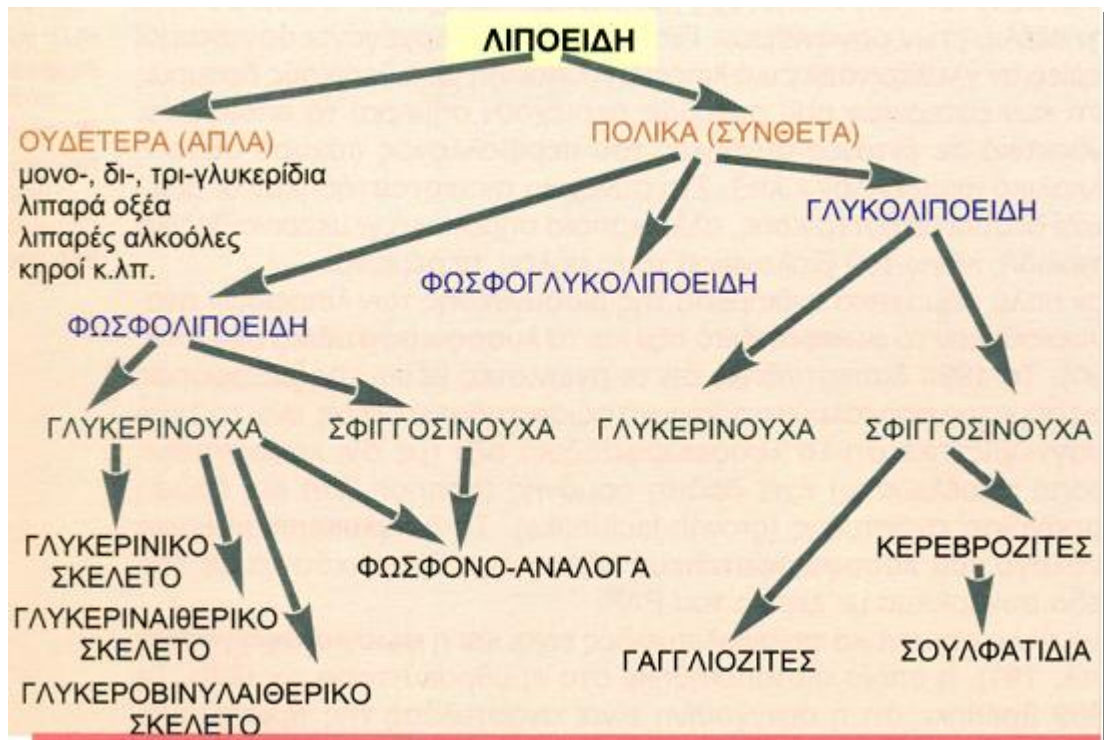
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΛΙΠΟΕΙΔΗ

### 3.1. ΛΙΠΟΕΙΔΗ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ<sup>110</sup>

Η διατύπωση ορισμού για τα λιποειδή (lipids) είναι δύσκολη γιατί, σε αντίθεση με άλλες ομάδες όπως οι πρωτεΐνες ή οι υδατάνθρακες που αποτελούνται από παρόμοιες δομικές μονάδες (αμινοξέα και μονοσάκχαρα αντίστοιχα), τα λιποειδή δεν έχουν ομοιογενείς δομικές μονάδες. Για παράδειγμα, έχουν λιπαρά οξέα, λιπαρές αλκοόλες, γλυκερίνη, στερόλες, σάκχαρα, υδρογονάνθρακες. Τα λιποειδή είναι πολύ διαδεδομένα στη φύση και περιλαμβάνουν ένα πολύ μεγάλο αριθμό ενώσεων, που για τα φωσφολιποειδή μόνο έχουν περιγραφεί περισσότερα από 1000 είδη.

Τα λιποειδή κατατάσσονται ανάλογα με τη δομή του σκελετού τους (Σχήμα 3.1.). Διακρίνονται σε:

- Ουδέτερα λιποειδή (ή απλά ή μη πολικά), τα οποία αποτελούνται από μη σαπωνοποιήσιμες ενώσεις (π.χ. υδρογονάνθρακες, λιπαρά οξέα, αλκοόλες) ή απλούς εστέρες (π.χ. τριγλυκερίδια, κηρούς, εστέρες χοληστερόλης) και σε
- Πολικά λιποειδή (ή σύνθετα), τα οποία με υδρόλυση δίνουν περισσότερα από δύο προϊόντα υδρόλυσης. Για παράδειγμα, τα φωσφολιποειδή με υδρόλυση δίνουν γλυκερίνη, λιπαρά οξέα, φωσφορικό οξύ και κάποια βάση, όπως χολίνη ή αιθανολαμίνη.



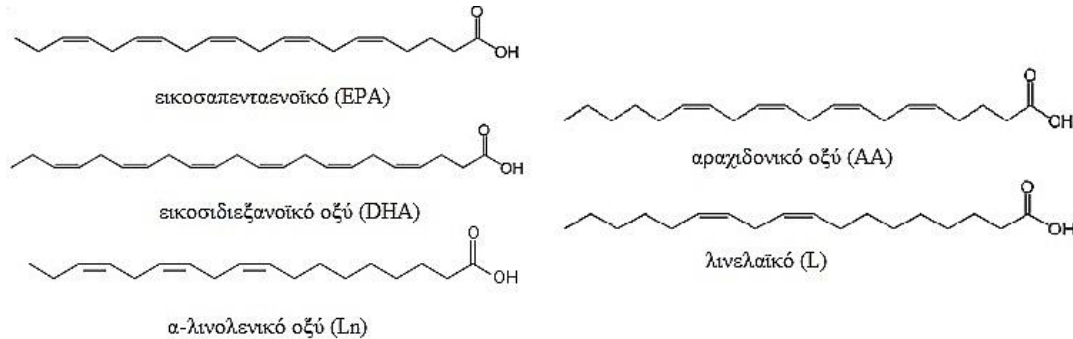
Σχήμα 3.1. Διάκριση λιποειδών.

### 3.2. ΛΙΠΑΡΑ ΟΞΕΑ

Τα λιπαρά οξέα είναι αλυσίδες υδρογονανθράκων διαφόρων μηκών και βαθμών κορεσμού, οι οποίες απολήγουν σε καρβοξυλικές ομάδες. Τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) αποτελούνται από κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ανάλογα με το αν η αλειφατική τους αλυσίδα είναι κορεσμένη, περιέχει έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς, αντίστοιχα. Η διαμόρφωση του διπλού δεσμού στα περισσότερα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι *cis*.

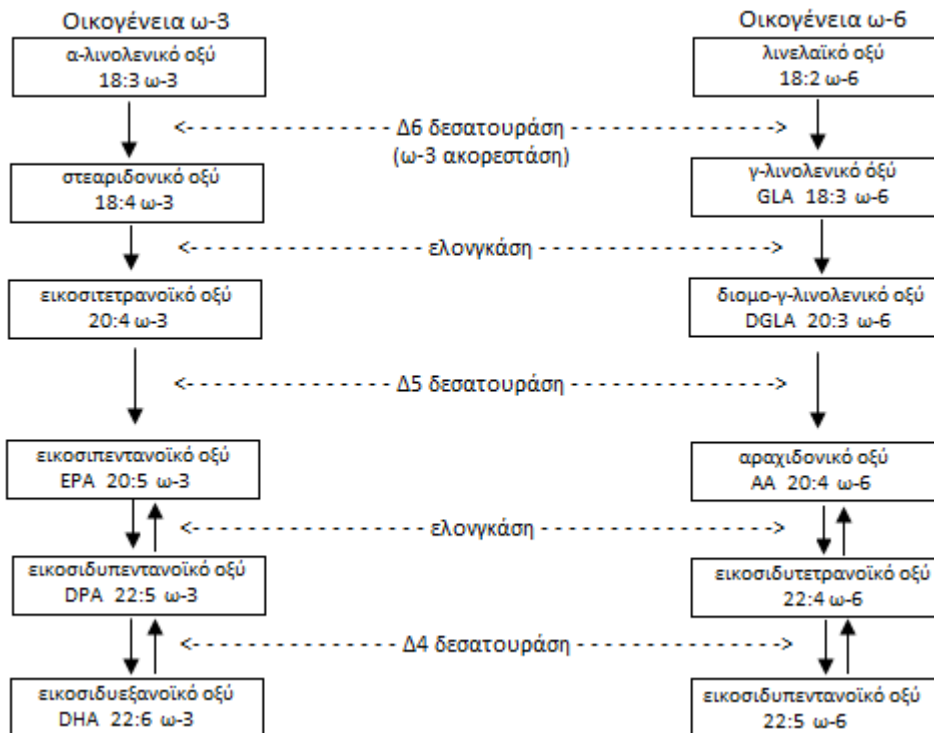
Τα κυριότερα  $\omega$ -3 λιπαρά οξέα είναι το εικοσαπενταενοϊκό (EPA), το εικοσιδι-εξανοϊκό οξύ (DHA) και το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ (Ln). Ενώ τα κυριότερα  $\omega$ -6 λιπαρά οξέα είναι το λινελαϊκό (L) και το αραχιδονικό οξύ (AA) (Σχήμα 3.2.). Το  $\alpha$ -λινολενικό οξύ μπορεί να μετατραπεί από τον οργανισμό σε εικοσιπενταενοϊκό οξύ (EPA) και εικοσιδυεξανοϊκό οξύ (DHA). Στα ζώα και στον άνθρωπο, τα οξέα αυτά μειώνουν την παραγωγή πολλών ενώσεων που σχετίζονται με τη φλεγμονή και τη θρόμβωση, όπως τα εικοσανοειδή

(προσταγλανδίνες, θρομβοξάνες, προστακυκλίνες και λευκοτριένια) και οι κυτταροκίνες (ιντερλευκίνη II-1)<sup>111</sup>. Η διαδικασία μετατροπής φαίνεται ότι παρεμποδίζεται από υψηλή πρόσληψη λινελαϊκού οξέος<sup>112</sup>.



**Σχήμα 3.2.** Δομές κυριότερων ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων.

Η σημασία της πρόσληψης ω-3 λιπαρών οξέων είναι πολύ μεγάλη γιατί τα κύτταρα των θηλαστικών δεν μπορούν να μετατρέψουν τα ω-6 σε ω-3, λόγω έλλειψης του ενζύμου ω-3 ακορεστάση (Σχήμα 3.3.). Γι' αυτό και προσλαμβάνονται μόνο μέσω της διατροφής<sup>113</sup>.



**Σχήμα 3.3.** Μετατροπή ω-6 λιπαρών οξέων σε ω-3.

Η σημασία του λόγου ω-6/ω-3: Η συνήθης διατροφή δυτικού τύπου είναι πλούσια σε ω-6 λιπαρά οξέα και ο λόγος των ω-6 προς τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι 10-20:1. Έχει προταθεί ότι ο λόγος 1-2:1 στη διατροφή θα οδηγούσε σε μετατόπιση της ισορροπίας από τις συνθήκες που ευνοούν τη θρόμβωση και την αγγειοσύσπαση σε εκείνες που προστατεύουν από τη θρόμβωση και τη φλεγμονή και ευνοούν την αγγειοδιαστολή<sup>114,115</sup>.

Πολλές επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποδείξει τον προστατευτικό ρόλο των ω-3 λιπαρών οξέων απέναντι σε πολλές ασθένειες, όπως οι καρδιαγγειακές<sup>113,116,117</sup>. Το ενδιαφέρον για τα ω-3 λιπαρά οξέα αυξήθηκε σημαντικά από τη στιγμή που διαπιστώθηκε ο πολύ μικρός αριθμός περιστατικών καρδιαγγειακών παθήσεων στους Εσκιμώους της Γροιλανδίας, οι οποίοι τρέφονται κυρίως με λιπαρά ψάρια<sup>118</sup>. Όμως, δεν είναι ακόμα ξεκάθαρος ο τρόπος με τον οποίο δρουν τα ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Οι επικρατέστεροι μηχανισμοί, σχετικά με την πρόληψη της αθηροσκλήρωσης θα μπορούσαν να είναι μέσω της μείωσης των επιπέδων της τριακυλογλυκερόλης, της πρόληψης των αρρυθμιών, της μείωσης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων ή της μείωσης της αρτηριακής πίεσης<sup>119</sup>.

Παρόλα αυτά, οι ευεργετικές επιδράσεις των ω-3 λιπαρών οξέων στη λειτουργία των αιμοπεταλίων είναι αμφισβητήσιμες, καθώς αν και έχει αποδειχθεί ότι αναστέλλουν διάφορα στάδια της αθηρογένεσης, δεν έχει αποδειχθεί ότι τα ω-3 λιπαρά οξέα είναι σε θέση να μειώσουν την αθηρογένεση *in vivo*<sup>120</sup>.

### 3.3. ΠΟΛΙΚΑ ΛΙΠΟΕΙΔΗ

Τα πολικά λιποειδή, ανάλογα με το αν η πολικότητα οφείλεται στην ύπαρξη φωσφορικής ομάδας ή υδατανθράκων, διακρίνονται σε φωσφολιποειδή και γλυκολιποειδή.

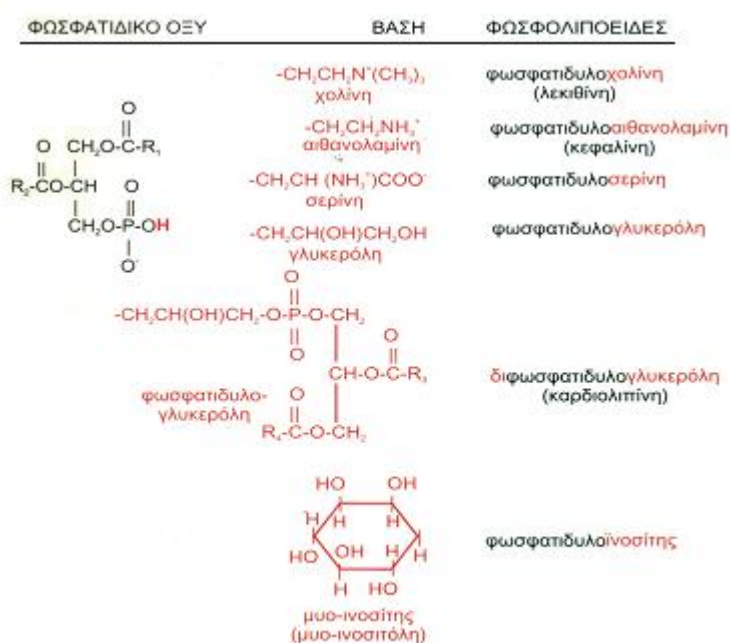
- Φωσφολιποειδή

Τα φωσφολιποειδή αποτελούνται από τέσσερα συστατικά: λιπαρά οξέα, μια εξέδρα στην οποία προσδένονται τα λιπαρά οξέα, μια φωσφορική ομάδα και μια αλκοόλη προσδεδεμένη στη φωσφορική ομάδα. Ο σκελετός (εξέδρα) μπορεί να είναι

γλυκερόλη ή σφιγγοσίνη και διακρίνονται σε γλυκερινούχα και σφιγγοσινούχα φωσφολιποειδή, αντίστοιχα.

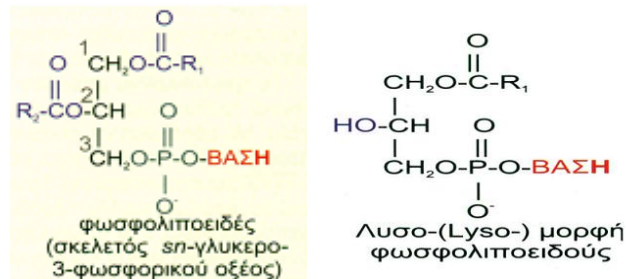
### 1. Γλυκερινούχα φωσφολιποειδή

Έχουν σκελετό γλυκερόλης και θεωρούνται παράγωγα του φωσφατιδικού οξέος (Σχήμα 3.4.). Εδώ πρέπει να αναφερθούν τα γλυκεριναιθερικά και τα γλυκεροβινυλαιθερικά ανάλογα των φωσφολιποειδών, τα οποία θεωρούνται ότι έχουν σημαντικές βιολογικές δράσεις, όπως αντικαρκινική, δράση μεσολαβητών-ορμονών κλπ. Ο πιο σημαντικός εκπρόσωπος των γλυκεριναιθερικών λιποειδών είναι ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), ο οποίος είναι ένας μεσολαβητής-ορμόνη, από τις πιο δραστικές ενώσεις που υπάρχουν, με ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, όπως συσσώρευση αιμοπεταλίων και πρόκληση αλλεργίας.



**Σχήμα 3.4.** Γενικός τύπος γλυκερινούχων φωσφολιποειδών.

Τα φωσφολιπιδίδια που στη δεύτερη θέση της γλυκερόλης έχουν ελεύθερο υδροξύλιο λέγονται λυσο(lyso)-μορφές, γιατί προκαλούν λύση στις μεμβράνες (Σχήμα 3.5.).



**Σχήμα 3.5.** Φωσφολιπιδίδες και λυσο-(lyso-) μορφή φωσφολιπιδιού.

Μια άλλη κατηγορία φωσφολιπιδίων είναι και τα φωσφονολιπιδίδια, στα οποία ο φωσφόρος είναι ενωμένος με τον άνθρακα, χωρίς την παρεμβολή οξυγόνου. Ο ρόλος τους δεν έχει ακόμη διευκρινισθεί.

## 2. Σφιγγοσινούχα φωσφολιπιδίδια

Τα λιπιδίδια αυτά έχουν το σκελετό μιας από τις 30 και πλέον αμιναλκοόλες, με μακριά ανθρακική αλυσίδα με 16-20 C. Στα θηλαστικά οι αμιναλκοόλες που απαντούν είναι κυρίως η σφιγγοσίνη και η διυδροσφιγγοσίνη. Στα σφιγγοσινούχα φωσφολιπιδίδια η αμινομάδα της σφιγγοσίνης δεν είναι ελεύθερη, αλλά είναι συνδεδεμένη με αμιδικό δεσμό με ένα λιπαρό οξύ. Η ένωση που προκύπτει λέγεται κηραμίδιο και αποτελεί μητρική ένωση όλων των σφιγγολιπιδίων. Το κηραμίδιο μπορεί να έχει συνδεδεμένες στην ακραία υδροξυλομάδα μια φωσφορική ομάδα και κάποια βάση, π.χ. χολίνη. Επειδή τα σφιγγοσινούχα αυτά λιπιδίδια απαντούν στα μυελινικά έλυτρα των νεύρων λέγονται σφιγγομυελίνες.

- Γλυκολιποειδή  
Ανάλογα με το αν έχουν σκελετό γλυκερίνης ή σφιγγοσίνης διακρίνονται σε γλυκερινούχα, που απαντούν κυρίως σε βακτήρια, και σφιγγοσινούχα γλυκολιποειδή.

Η ανακάλυψη του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) το 1980 άλλαξε τα δεδομένα και άνοιξε νέες κατευθύνσεις στην έρευνα των λιποειδών. Μέχρι τη δεκαετία του 1970, η ιδέα ύπαρξης φωσφολιποειδών σαν αγωνιστών δεν αποτελούσε θέμα ενδιαφέροντος, γιατί θεωρείτο απίθανη μια τέτοια περίπτωση.

Πρόσφατες μελέτες που διεξήχθησαν στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων σχετικά με τα κλάσματα λιποειδών των ψαριών, απέδειξαν την ύπαρξη μικρομορίων με συσσωρευτική καθώς και με αντισυσσωρευτική δράση προς τα αιμοπετάλια<sup>121,122,123</sup>. Αυτά τα λιποειδικά μικρομόρια που συναντώνται σε συγκεκριμένα τρόφιμα, έχουν βρεθεί να έχουν σημαντική *in vitro* βιολογική δραστηριότητα, δηλαδή αντιφλεγμονώδη και αντιθρομβωτική δράση η οποία αναστέλλει τη δράση του PAF. Τέτοια λιποειδικά μικρομόρια έχουν βρεθεί σε ένα ευρύ φάσμα τροφίμων, όπως το κόκκινο και το λευκό κρασί<sup>124</sup>, το γιαούρτι<sup>125</sup>, τα ψάρια<sup>121,123,126</sup>, το μέλι<sup>127</sup> και το ελαιόλαδο<sup>128</sup>. Περαιτέρω *in vivo* μελέτες στο ελαιόλαδο<sup>129</sup>, τον ελαιοπυρήνα<sup>130,131</sup> και τα ψάρια<sup>132,133</sup> έχουν επιβεβαιώσει ότι τα πολικά λιποειδικά κλάσματα αυτών των τροφίμων είναι υπεύθυνα για τη μείωση του πάχους και την υποχώρηση των αθηροσκληρωτικών βλαβών σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια. Επίσης, έχει ήδη αποδειχθεί ότι ενώσεις με ισχυρή δράση παρόμοια με αυτή του PAF καθώς και δράση κατά του PAF είναι παρούσες στο φρέσκο βακαλάο (είδος *Gadus morhua*). Όλα τα πολικά λιποειδικά κλάσματα νωπού γάδου φαίνεται ότι αναστέλλουν, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, τη συσσώρευση που προκαλείται από τον PAF ή προκαλούν τα ίδια συσσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού, η οποία αξιολογείται θετικά<sup>122</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

### 4.1. ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Ο όρος Χρωματογραφία αποδίδεται σε μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων, οι οποίες βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μια κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης (stationary phase), η οποία είναι καθηλωμένη σε μια στήλη ή σε μια στερεά επιφάνεια. Οι δυο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, όπου στη συνέχεια τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιορισθούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά.

### 4.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας είναι μια μέθοδος επίπεδης χρωματογραφίας. Τυπικοί διαχωρισμοί λεπτής στιβάδας γίνονται με επίπεδες υάλινες ή πλαστικές πλάκες που καλύπτονται με ένα λεπτό και ισχυρά προσκολλημένο στρώμα από λεπτοκοκκιοποιημένα σωματίδια, που παίζουν το ρόλο της στατικής φάσης. Η κινητή φάση διέρχεται μέσα από τη σταθερή φάση με τριχοειδή φαινόμενα.

Για την ανάπτυξη της πλάκας, η πλάκα τοποθετείται σε ένα κλειστό δοχείο κορεσμένο με ατμούς του διαλύτη ανάπτυξης. Το ένα άκρο της πλάκας βυθίζεται στο διαλύτη ανάπτυξης με προσοχή, ώστε να μην έρθει σε άμεση



επαφή το δείγμα με το υγρό ανάπτυξης. Ο διαλύτης ανάπτυξης μετακινείται προς το επάνω μέρος της πλάκας ανυψούμενος με τη βοήθεια της τριχοειδούς δράσης των λεπτότατων σωματιδίων. Όταν ο διαλύτης μετακινείται από το σημείο τοποθέτησης του δείγματος, το διαλύει και το μεταφέρει προς το επάνω μέρος της πλάκας, ενώ το δείγμα κατανέμεται μεταξύ του κινούμενου διαλύτη και της στατικής φάσης.

Η πλάκα μετά την απομάκρυνσή της από το δοχείο ανάπτυξης, ξηραίνεται. Μια μέθοδος για τον εντοπισμό της θέσης των διαφόρων συστατικών του δείγματος πάνω στην πλάκα είναι ο ψεκασμός με ένα διάλυμα ιωδίου ή θειικού οξέος (ενώσεις που αντιδρούν με οργανικά μόρια και δίνουν σκουρόχρωμα προϊόντα). Μια άλλη μέθοδος εντοπισμού βασίζεται στην ενσωμάτωση μιας φθορίζουσας ουσίας στη στατική φάση. Μετά την ανάπτυξη, η πλάκα εξετάζεται με υπεριώδες φως. Τα συστατικά του δείγματος αποσβάνουν το φθορισμό στα σημεία της πλάκας που βρίσκονται και έτσι εντοπίζονται.

### **4.3. ΑΕΡΙΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ**

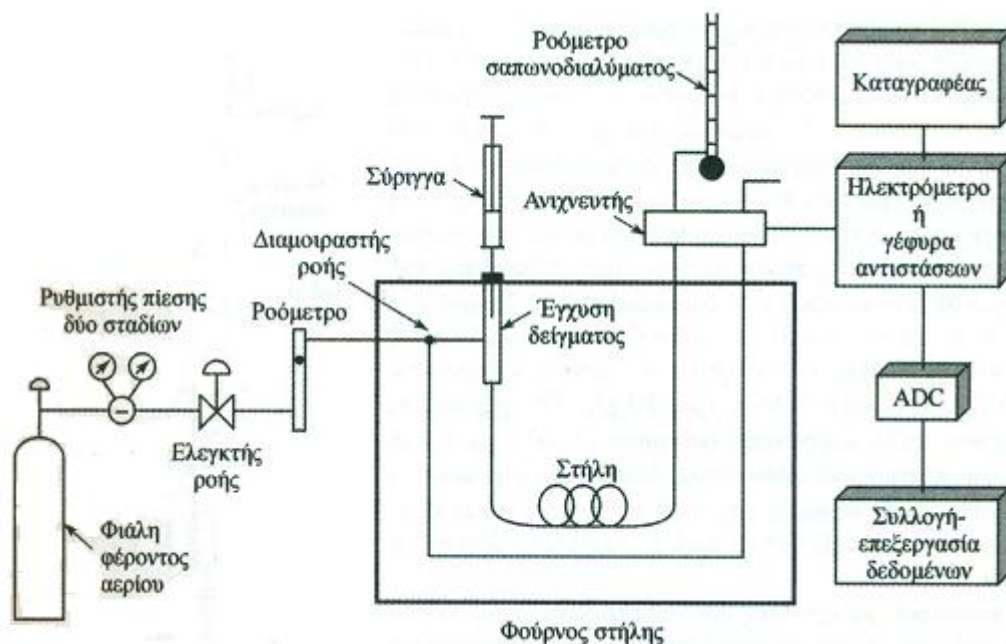
Στην αεριοχρωματογραφία το δείγμα εξατμίζεται και εγχέεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης. Η έκλουση πραγματοποιείται με ροή αδρανούς αερίου, το οποίο αποτελεί την κινητή φάση. Σε αντίθεση με τους περισσότερους τύπους χρωματογραφίας, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο ρόλος της είναι η διακίνηση του αναλύτη κατά μήκος της στήλης. Υπάρχουν δυο τύποι αεριοχρωματογραφίας: η χρωματογραφία αερίου-στερεού (gas-solid chromatography, GSC) και η χρωματογραφία αερίου-υγρού (gas-liquid chromatography, GLC).

Η χρωματογραφία αερίου-στερεού βασίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης, όπου η κατακράτηση των αναλυτών είναι αποτέλεσμα φυσικής προσρόφησης. Οι εφαρμογές της είναι περιορισμένες λόγω της σχεδόν μόνιμης κατακράτησης δραστικών ή πολικών μορίων και της έντονης εμφάνισης ουράς στις κορυφές έκλουσης (ως συνέπεια του μη γραμμικού χαρακτήρα του μηχανισμού προσρόφησης).

Η χρωματογραφία αερίου-υγρού βασίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. Χρησιμοποιείται ευρύτατα σε όλους τους κλάδους των θετικών επιστημών και συχνότερα αναφέρεται ως αεριοχρωματογραφία (gas chromatography, GC).

#### 4.3.1. Όργανα για τη χρωματογραφία αερίου-υγρού

Τα βασικά τμήματα ενός αεριοχρωματογράφου απεικονίζονται στο Σχήμα 4.1. Στο σχήμα φαίνεται ότι η ροή του αερίου διαμοιράζεται πριν από την εισαγωγή του στη στήλη. Η διευθέτηση αυτή χρησιμοποιείται όταν ο ανιχνευτής μετρά μια ιδιότητα του ρεύματος αερίου, που διαφοροποιείται παρουσία μορίων της προσδιοριζόμενης ουσίας. Κανονικά με άλλους τύπους ανιχνευτών δεν είναι απαραίτητη η χρήση διαμοιραστή ροής (flow splitter).



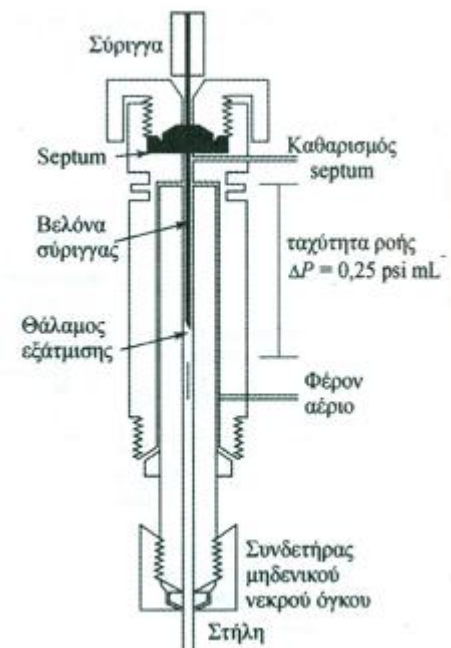
Σχήμα 4.1. Διάγραμμα ενός αεριοχρωματογράφου.

#### **4.3.1.1. Τροφοδοσία φέροντος αερίου**

Στα φέροντα αέρια (carrier gases), τα οποία πρέπει να είναι χημικώς αδρανή, περιλαμβάνονται το ήλιο, το άζωτο και το υδρογόνο. Η επιλογή του φέροντος αερίου καθορίζεται συχνά από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου ανιχνευτή. Το σύστημα παροχής του αερίου περιλαμβάνει ρυθμιστές πίεσης, μανόμετρα και ροόμετρα. Επιπλέον μπορεί να περιλαμβάνει και μοριακά κόσκινα για την απομάκρυνση υδρατμών ή άλλων ρύπων.

#### **4.3.1.2. Σύστημα έγχυσης δείγματος**

Για αποτελεσματικό διαχωρισμό πρέπει κατάλληλη ποσότητα δείγματος να εισαχθεί σαν «βύσμα» (plug) ατμού. Η βραδεία εισαγωγή υπερβολικής ποσότητας δείγματος οδηγεί σε διεύρυνση των ζωνών και σε κακό διαχωρισμό. Η συνηθέστερη τεχνική έγχυσης είναι η ένεση του υγρού ή αερίου δείγματος με μικροσύριγγα, μέσω ενός αυτοσφραγιζόμενου ελαστικού διαφράγματος σιλικόνης, γνωστού ως septum. Το δείγμα εισέρχεται από το στόμιο εισόδου στο χώρο ταχείας εξάτμισης, που βρίσκεται στην κεφαλή της στήλης (η θερμοκρασία του χώρου αυτού είναι συνήθως 50 °C πάνω από το σημείο βρασμού του λιγότερο πτητικού συστατικού του δείγματος). Για τις κοινές αναλυτικές στήλες η ποσότητα δείγματος κυμαίνεται από λίγα δέκατα του μικρόλιτρου έως 20  $\mu\text{L}$ . Οι τριχοειδείς στήλες απαιτούν πολύ μικρότερα δείγματα ( $10^{-3}$   $\mu\text{L}$ ). Για την περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται σύστημα διαμοιραστή για την εισαγωγή στην κεφαλή της στήλης μικρού μόνο κλάσματος του εγχεόμενου δείγματος, ενώ το υπόλοιπο οδηγείται στα απόβλητα (Σχήμα 4.2.).



**Σχήμα 4.2.** Διατομή στομίου άμεσης έγχυσης δείγματος με σύστημα ταχέος μικροεξατμιστή.

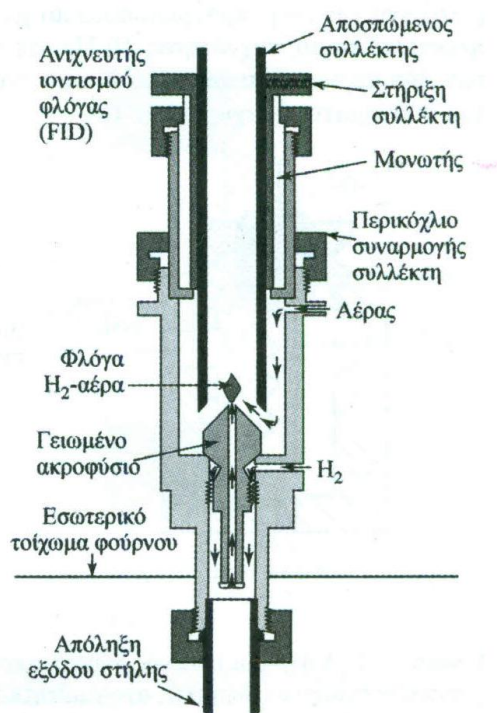
#### 4.3.1.3. Φούρνοι στηλών

Στην αεριοχρωματογραφία χρησιμοποιούνται δυο γενικοί τύποι στηλών: οι πληρωμένες (ή πακεταρισμένες) (packed) και οι στήλες ανοικτού σωλήνα (open tubular) ή τριχοειδείς (capillary). Το μήκος των χρωματογραφικών στηλών κυμαίνεται από 2 m (ή και μικρότερο) έως και περισσότερο από 50 m. Κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, ύαλο, τηγμένη πυριτιά ή Teflon. Η θερμοκρασία της στήλης πρέπει να ελέγχεται με ακρίβεια μερικών δεκάτων του βαθμού, αν απαιτούνται αναπαραγωγίμα αποτελέσματα. Για το λόγο αυτό, η στήλη τοποθετείται σε ένα θερμοστατούμενο φούρνο. Γενικά μια θερμοκρασία ίση ή λίγο μεγαλύτερη από το μέσο σημείο βρασμού του δείγματος οδηγεί σε λογικούς χρόνους έκλουσης (2 έως 30 min). Για δείγματα με συστατικά των οποίων τα σημεία βρασμού καλύπτουν ευρεία περιοχή τιμών συχνά απαιτείται προγραμματισμός θερμοκρασίας, κατά τον οποίο η θερμοκρασία της στήλης αυξάνει συνεχώς ή σε βήματα κατά τη διάρκεια του

διαχωρισμού. Ο άριστος διαχωρισμός προϋποθέτει εφαρμογή της ελάχιστης δυνατής θερμοκρασίας. Ωστόσο χαμηλή θερμοκρασία οδηγεί σε αύξηση του χρόνου έκλουσης και επομένως του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση του προσδιορισμού.

#### **4.3.1.4. Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID)**

Ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) είναι ο πιο διαδεδομένος και γενικότερης χρήσης ανιχνευτής. Σε ένα καυστήρα, όπως αυτόν που απεικονίζεται στο Σχήμα 4.3., το έκλουσμα από τη στήλη αναμιγνύεται με υδρογόνο και αέρα και στη συνέχεια αναφλέγεται με ηλεκτρικά μέσα. Οι περισσότερες οργανικές ενώσεις, όταν πυρολυθούν στη θερμοκρασία της φλόγας υδρογόνου/αέρα, παράγουν ιόντα και ηλεκτρόνια, τα οποία άγουν τον ηλεκτρισμό μέσω της φλόγας. Μεταξύ του ακροφυσίου του καυστήρα και ενός ηλεκτροδίου-συλλέκτη πάνω ακριβώς από τη φλόγα εφαρμόζεται μια διαφορά δυναμικού μερικών εκατοντάδων volt. Το παραγόμενο ηλεκτρικό ρεύμα ( $\approx 10^{-12}$  A) εισάγεται σε τελεστικό ενισχυτή υψηλής εμπέδησης για μέτρηση.



**Σχήμα 4.3.** Ένας τυπικός ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας.

Στον ιοντισμό των ενώσεων του άνθρακα σε φλόγα, ο αριθμός των παραγόμενων ιόντων είναι χονδρικά ανάλογος προς τον αριθμό των ανηγμένων ατόμων άνθρακα στη φλόγα. Επειδή ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας αποκρίνεται προς τον αριθμό των ατόμων άνθρακα που εισάγονται στον ανιχνευτή ανά μονάδα χρόνου, θεωρείται ως ανιχνευτής ευαίσθητος προς τη μάζα και όχι ως προς τη συγκέντρωση. Χαρακτηριστικές ομάδες, όπως το καρβονύλιο, το αλκοολικό υδροξύλιο, το αλογόνο και η αμινομάδα, παράγουν λιγότερα ή και καθόλου ιόντα. Επιπλέον ο ανιχνευτής δεν αποκρίνεται καθόλου σε μη καύσιμα αέρια, όπως τα  $H_2O$ ,  $CO_2$ ,  $SO_2$  και  $NO_x$ . Οι ιδιότητες αυτές τον καθιστούν πολύ χρήσιμο γενικό ανιχνευτή για ανάλυση των περισσότερων οργανικών δειγμάτων, περιλαμβανομένων κι εκείνων που έχουν μολυνθεί με ύδωρ και με οξείδια του αζώτου και του θείου.

Χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία ( $\approx 10^{-13}g/s$ ), μεγάλη γραμμική περιοχή ( $\approx 10^7$ ) και χαμηλό θόρυβο. Γενικά είναι ανθεκτικός και εύχρηστος. Το μειονέκτημά του είναι ότι καταστρέφει το δείγμα<sup>134</sup>.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5. ΣΚΟΠΟΣ

Σύμφωνα με τη θεωρία της φλεγμονής και της πρόκλησης της αθηροσκλήρωσης, ο PAF φαίνεται να παίζει κυρίαρχο ρόλο στο ξεκίνημα της αθηρογένεσης. Η δράση των ω-3 λιπαρών οξέων είναι γνωστό ότι εμφανίζει ανασταλτική δράση στα διάφορα στάδια της αθηροσκλήρωσης. Από μελέτες όμως που αφορούν την αντίστοιχη δράση ιχθυελαίων, τα πολικά λιποειδή των ιχθυελαίων φαίνεται να δίνουν καλύτερα αποτελέσματα από αυτά των ω-3 λιπαρών οξέων.

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της σύστασης του μουρουνέλαιου σε λιπαρά οξέα και κατ' επέκταση της διατροφικής του αξίας, καθώς και η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών του που συνδέεται με την προστατευτική του ιδιότητα έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω της επίδρασης τους στη δημιουργία των αθηρωματικών πλακών.

Στη συγκεκριμένη εργασία επικεντρωθήκαμε στα πολικά λιποειδή του μουρουνέλαιου και ο λόγος είναι ότι από προηγούμενες έρευνες στο ελαιόλαδο, τον ελαιοπυρήνα και κάποια ψάρια έχει αποδειχτεί ότι τα πολικά λιποειδικά κλάσματα είναι αυτά που μπορούν να μειώσουν το πάχος σχηματισμού αθηροσκληρωτικών πλακών σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια και / ή να προκαλέσουν την υποχώρησή τους. Για το λόγο αυτό, τα ολικά πολικά λιποειδή του μουρουνέλαιου απομονώθηκαν, διαχωρίστηκαν στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα και στη συνέχεια μελετήθηκαν ως προς την ικανότητά τους να εκδηλώνουν ανασταλτική ή ανταγωνιστική δράση ως προς τον PAF σε μοντέλο πλυμένων αιμοπεταλίων.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

### 6.1. ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΚΑΤ' ΑΝΤΙΡΡΟΗ<sup>135</sup>

#### Αντιδραστήρια-Όργανα

• Οργανικοί διαλύτες (πετρελαϊκός αιθέρας,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) 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.

#### 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. Στη συνέχεια, τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται και αναδιαλύονται σε 4,5 mL προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα. Προστίθενται 1,5 mL προεξισορροπημένης  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  87 % και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η κάτω φάση, που είναι η αιθανολική φάση, παραλαμβάνεται με υάλινη πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει 4,5 mL πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθεί εκ νέου ισχυρή



ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα και παραλαβή της αιθανολικής φάσης η οποία τοποθετείται σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 1,5 mL προεξισορροπημένης αιθανόλης 87 % για να επαναληφθεί η ανωτέρω διαδικασία. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά 8 φορές. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αιθανολική φάση (8 × 1,5 mL) που περιέχει τα πολικά λιποειδή, εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύεται σε μικρό όγκο διαλύτη CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1/1 (v/v). Οι φάσεις του πετρελαϊκού αιθέρα (2×4,5 mL) που βρίσκονται στους πρώτους δύο δοκιμαστικού σωλήνες, περιέχουν τα ουδέτερα λιποειδή, και αφού ενωθούν σε έναν υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε μικρό όγκο διαλύτη CHCl<sub>3</sub>/MeOH 1/1 (v/v).

## **6.2. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΛΕΠΤΗΣ ΣΤΙΒΑΔΑΣ (TLC) ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ<sup>136,125</sup>**

### **Αντιδραστήρια – Όργανα**

- Οργανικοί διαλύτες (ακετόνη, μεθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα λιποειδή: Merck, Supelco, Sigma
- Προσοροφητικό υλικό: πηκτή SiO<sub>2</sub> (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**

Όταν στην TLC χρησιμοποιείται ως στατική φάση πυριτική πηκτή, ο διαχωρισμός ενός μίγματος λιπιδίων στα συστατικά του οφείλεται στη διαφορετική προσρόφηση της κάθε ομάδας λιπιδίων στην πηκτή. Με την 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 130°C για 1 ώρα.

### Προετοιμασία του θαλάμου χρωματογραφίας

Προετοιμάζεται ο θάλαμος χρωματογραφίας με το εξής σύστημα ανάπτυξης:

- Χλωροφόρμιο-Μεθανόλη-Νερό (65:35:6 v/v/v) για την ανάλυση των πολικών λιπιδίων (PL)

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

### Τοποθέτηση των δειγμάτων και ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων

Η πλάκα χωρίζεται 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 της πλάκας έχει χωριστεί σε επιμέρους ισοπαχείς ζώνες και εκεί τοποθετούνται επίσης με μορφή κηλίδας τα πρότυπα δείγματα λιπιδίων. (Μετά την ανάπτυξη, η σύγκριση των R<sub>f</sub> των προτύπων και των αγνώστων λιπιδίων εξυπηρετεί την ταυτοποίηση των τελευταίων). Χρησιμοποιούνται ως πρότυπα διαλύματα

διάλυμα φωσφατιδυλοχολίνης (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE), σφιγγομυελίνης (SM), φωσφατιδυλοϊνσιτόλης (PI), φωσφατιδυλοσερίνης (PS), φωσφατιδικού οξέος (PA) και καρδιολιπίνης (CL) για την ανάλυση των πολικών λιπιδίων (PL). Μετά την τοποθέτηση του δείγματος, η πλάκα εισάγεται στο χρωματογραφικό θάλαμο και αναπτύσσεται. Απομακρύνεται δε από αυτόν όταν ο διαλύτης φτάσει σε προκαθορισμένο σημείο στο πάνω μέρος της πλάκας.

#### Εμφάνιση των χρωματογραφημάτων

Όταν η πλάκα στεγνώσει, τοποθετείται στο θάλαμο ιωδίου. Τα διαχωρισμένα λιπίδια εμφανίζονται ως κίτρινες κηλίδες μετά από περίπου 5 λεπτά. Η πλάκα φωτογραφίζεται, 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.

### **6.3. ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ (G.C) ΛΙΠΑΡΩΝ ΟΞΕΩΝ ΨΑΡΙΩΝ<sup>136</sup>**

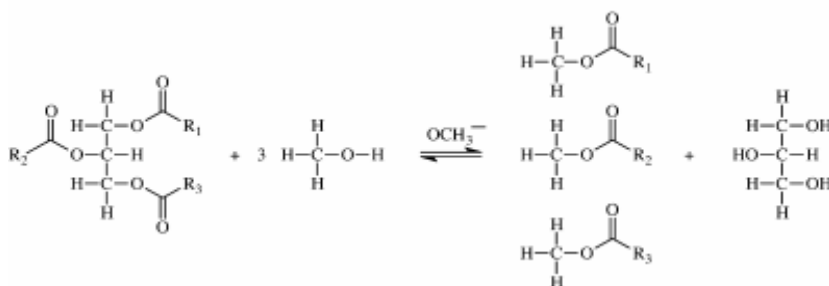
#### **6.3.1. Μέθοδος εστεροποίησης λιπαρών οξέων**

##### **Αντιδραστήρια – Όργανα**

- Διάλυμα KOH σε MeOH 0,5%N 90%.
- Κανονικό εξάνιο.
- Διάλυμα HCL 6N.
- Άνυδρο Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>.
- Πεχαμετρικό χαρτί.

## 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 6.1.).



**Σχήμα 6.1.** 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<sup>136</sup>.

## Αναλυτική πορεία

Συγκεκριμένη ποσότητα λιποειδούς φέρεται σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα σε μορφή διαλύματος από το οποίο εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού σε ρεύμα Ν<sub>2</sub>. Στη συνέχεια προστίθεται στο δοκιμαστικό σωλήνα 1 ml κανονικού εξανίου, γίνεται ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα προκειμένου να διαλυτοποιηθούν τα λιποειδή και τέλος προστίθεται 4 ml διαλύματος ΚΟΗ σε MeOH 0,5N 90%. Ακολουθεί ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH=7 με διάλυμα ΗCΛ 6N, προσθέτονται 2ml νερό και 2 ml κανονικό εξάνιο, ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της στιβάδας του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια προστίθενται στο δοκιμαστικό σωλήνα επιπλέον 2 ml κανονικού εξανίου,

ανάδευση και παραλαβή της στιβάδας του εξανίου. Η συνολική ποσότητα του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίζονται με 2 ml νερό και τελικά η στιβάδα του εξανίου ξηραίνεται με άνυδρο στερεό  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ . Ακολουθεί διήθηση και εξάτμιση της περίσσειας του διαλύτη και διαλυτοποίηση των μεθυλεστέρων σε μικρό όγκο κανονικού εξανίου.

### 6.3.2. Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων από μουρουνέλαιο με αέρια χρωματογραφία (G.C)<sup>136</sup>

#### Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φέρον αέριο  $\text{H}_2$ .
- Φέρον αέριο He.
- Φέρον αέριο αέρος.
- Πρότυπα διαλύματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων:
  - α) παλμιτικού οξέος (16:0).
  - β) παλμιτελαϊκού οξέος (16:1).
  - γ) (17:0).
  - δ) ελαϊκού οξέος (18:0).
  - ε) ελαϊδικού οξέος (18:1).
  - στ) λινελαϊκού οξέος (18:2).
  - ζ) α-λινολενικού οξέος (18:3).
  - η) αραχιδονικού οξέος (20:4).
  - θ) εικοσιπεντανοϊκού οξέος (EPA) (20:5).
  - ι) (21:0) και
  - κ) εικοσιδυεξανοϊκού οξέος (DHA) (22:6).
- Εξάνιο.
- Πολική τριχοειδής στήλη DB-23 (Agilent J & W) (60 m x 0,25 I mm ID x 0,25  $\mu\text{m}$ ) και θερμοκρασιών 40 °C-250 °C.
- Αέριος χρωματογράφος Shimadzu CLASS-VP (GC-17A) (Kyoto, Japan) με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID).

## Αναλυτική πορεία

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ξεκινούσε από τους 120 °C και παρέμενε εκεί για 5 min, 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 εκεί για 40 min. Η θερμοκρασία εισόδου του δείγματος και του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας ήταν 240 °C και 250 °C αντίστοιχα, ενώ η ροή του φέροντος αερίου είναι 1 ml/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 παρακάτω πίνακα (Πίνακας 6.1.).

**Πίνακας 6.1.** Συγκέντρωση των λιπαρών οξέων 17:0 και 21:0 στα πρότυπα διαλύματα.

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

Στη συνέχεια έγινε ένεση 1,5 μl από κάθε δείγμα στον αέριο χρωματογράφο και καταγράφηκαν τα εμβαδά κορυφών των δύο λιπαρών οξέων. Η διαδικασία αυτή γίνεται 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:

$$y = 0,0021x + 0,0210 \quad (1)$$

Από την εξίσωση αυτή 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 500 ppm.

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

#### **6.4. ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ<sup>137</sup>**

##### **Αντιδραστήρια – Όργανα**

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1 %) ελεύθερος πυρετογόνων.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) 10x Tyrodes : Σε 1 L νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O και 10 g γλυκόζης.
- Διάλυμα φύλαξης 100 x CaCl<sub>2</sub>: Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,911 g CaCl<sub>2</sub>.
- 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 τήξη στο σημείο βρασμού. Ακολούθως, διαλύονται 0,2030 g NaHCO<sub>3</sub> 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<sub>2</sub> 100x και αμέσως μετά 2,5 mL διαλύματος NaHCO<sub>3</sub> που παρασκευάζεται εκείνη τη στιγμή διαλύοντας 0,2030 g NaHCO<sub>3</sub> 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 βοείας αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL: Ποσότητα 100 mg BSA (Sigma) ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων. Φυλάσσεται στους -20 °C.

- Διάλυμα εργασίας βοείας 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.
- 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 υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 25  $\mu\text{L}$  από το διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης  $10^{-4}$  M τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 400  $\mu\text{L}$  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**

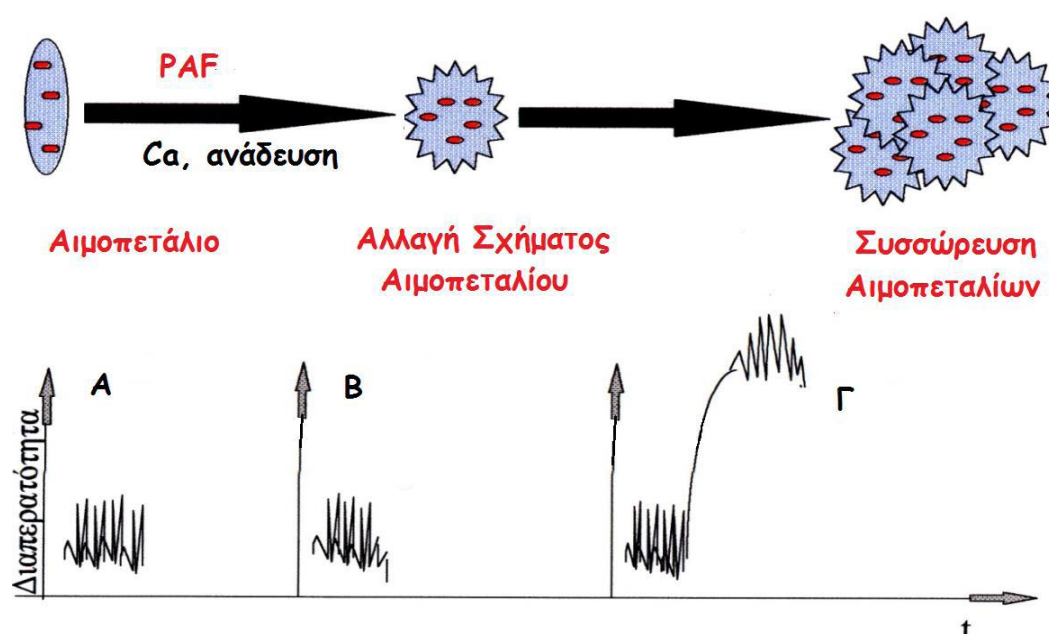
Ποσότητα των ολικών ουδέτερων λιποειδών, των ολικών πολικών λιποειδών και των κλασμάτων των ολικών πολικών λιποειδών που προέκυψαν από τη Χρωματογραφία Λεπτής Στοιβάδας (TLC), ελέγχθηκαν ως προς τη βιολογική δραστηριότητά τους με κατάλληλη βιολογική μέθοδο, που αποτελεί διεθνώς το δόκιμο τρόπο μελέτης ενός συστατικού για το αν έχει ανάλογη δράση του PAF ή αν δρα ως αναστολέας αυτού.

Έτσι ελέγχθηκε: α) Η ικανότητά τους να προκαλούν συσσώρευση των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού και β) Η ικανότητά τους να αναστέλλουν τη συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού που προκαλείται από τον PAF.

Στην περίπτωση της αναστολής της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης των αιμοπεταλίων τα αποτελέσματα αποδίδονται με τον όρο  $\text{IC}_{50}$ , ο οποίος εκφράζει την ανασταλτική ικανότητα μιας ποσότητας λιποειδούς, η οποία αναστέλλει κατά 50% την προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Στην περίπτωση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα λιποειδικά κλάσματα του δείγματος τα αποτελέσματα αποδίδονται με τον όρο  $\text{EC}_{50}$ , ο οποίος εκφράζει την συσσωρευτική ικανότητα μιας ποσότητας λιποειδούς, η οποία προκαλεί συσσώρευση ίση με το 50% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης που προκαλεί το αντίστοιχο δείγμα.

Σε συγκεκριμένη ποσότητα αιμοπεταλίων προστίθεται ο PAF ή το δείγμα που εξετάζεται διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα αλβουμίνης βοδινού (BSA) και ελέγχεται από τον καταγραφέα του οργάνου η αλλαγή της διαπερατότητας. Όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται, το περιεχόμενο της κυψελίδας διαυγάζεται, η οπτική διαπερατότητα αυξάνει απότομα και λαμβάνεται η παρακάτω καμπύλη (Σχήμα 6.2.). Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα της συσσώρευσης, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.



**Σχήμα 6.2.** Ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και απόδοση της καταγραφόμενης καμπύλης ως αύξησης της διαπερατότητας με το χρόνο. Α) Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση, Β) Αιμοπετάλια μετά από προσθήκη PAF, Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Η εμφάνιση αναστολής της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης ή η εμφάνιση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα λιποειδή των εξεταζόμενων δειγμάτων, υποδεικνύει την ύπαρξη ανταγωνιστών του PAF. Οι ανταγωνιστές του PAF εμποδίζουν τη δράση του είτε ως αναστολείς είτε ως αγωνιστές με πολύ μικρότερη βιολογική δραστηριότητα.

Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού.

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 mL προστίθενται 7 mL αντιπηκτικού ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού. Ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50 mL και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 500×g. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 mL Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος που είναι πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) με πλαστικό σιφώνιο των 20 mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Το πλάσμα το πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), τοποθετείται πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό PRP τα 9 mL για κάθε 2 mL Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι PRP σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Οι πλαστικοί σωλήνες κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm) και φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24 °C στα 750×g. Μετά τη φυγοκέντρηση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος του φτωχού σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma) και του στρώματος του Ficoll. Το PPP αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστικό σιφώνιο των 20 mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται.

A) 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.

B) 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 750×g.

Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Ακολούθως προστίθενται 0,8 mL Tg pH = 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με ήπιο τρόπο. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH = 6,5 που να περιέχει  $1,25 \times 10^8$  κύτταρα/mL. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μL τα οποία αραιώνονται με 990 μL Tg pH = 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μL δίνεται από τον τύπο:

$$\text{Αριθμός κυττάρων} / 10 \mu\text{L} = A \times 1,25 \times 10^8$$

όπου A είναι η απορρόφηση.

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

#### Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου των 0,5 mL προστίθενται 50 μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει  $1,25 \times 10^8$  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 συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση

των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100 % συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική δραστικότητα. Εξετάζεται επίσης, αν η μορφή της καμπύλης συσσώρευσης που δίνει το δείγμα ομοιάζει με εκείνη της καμπύλης συσσώρευσης του PAF (γρήγορη συσσώρευση με αντιστρεπτή μορφή σε μικρές συγκεντρώσεις και μη αντιστρεπτή σε μεγάλες συγκεντρώσεις). Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και σαν συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει το 50% της μέγιστης συσσώρευσης που καλείται EC<sub>50</sub> (Equivalent Concentration for 50% aggregation).

#### 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 μεγέθους συσσώρευση. Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη του ίδιου συσσωρευτικού παράγοντα και τις δύο φορές.

Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων  
κουνελιού

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

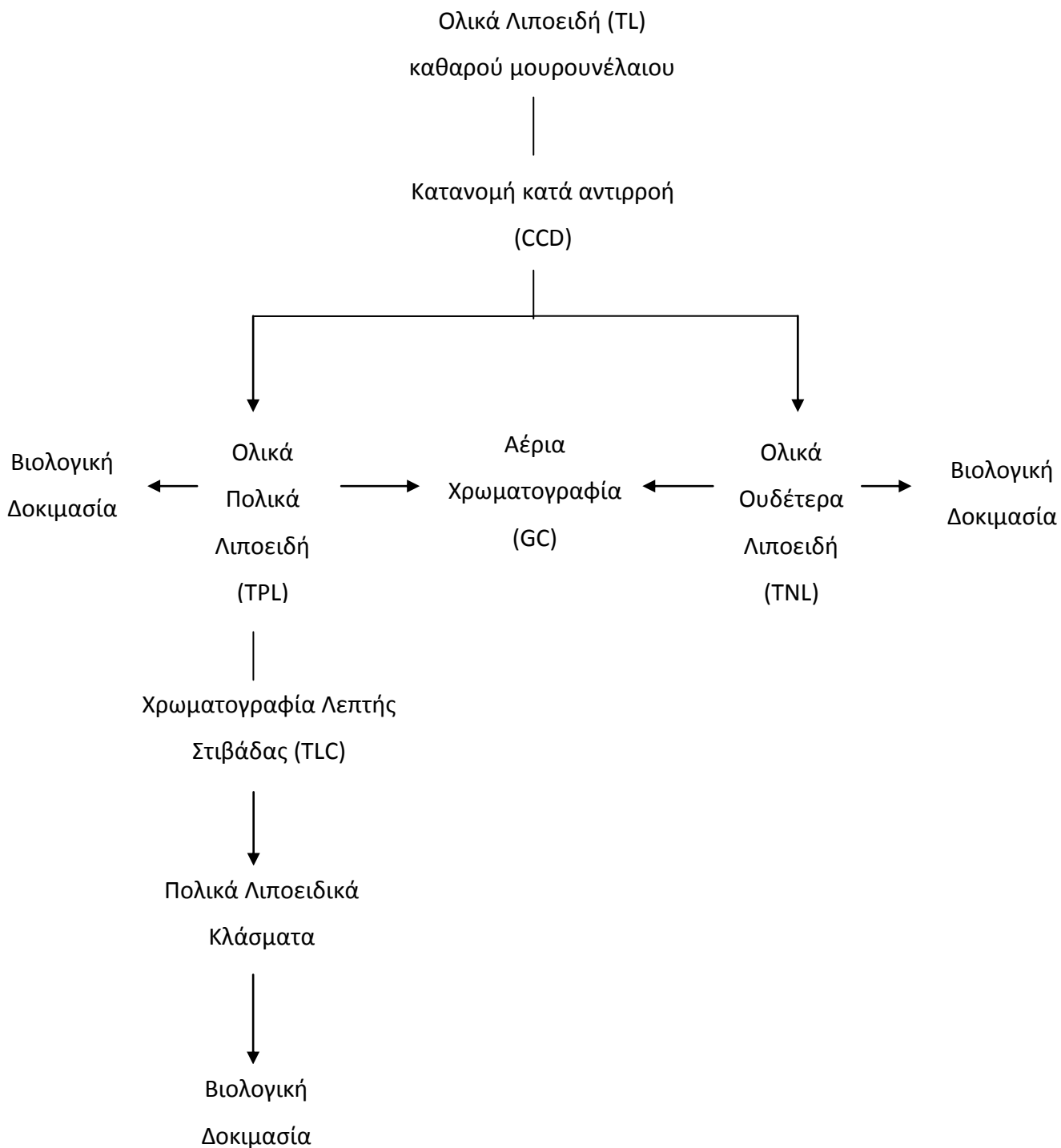
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

### 7.1. ΔΕΙΓΜΑ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε μουρουνέλαιο το οποίο είναι διαθέσιμο στα φαρμακεία ως συμπλήρωμα διατροφής. Πρόκειται για καθαρό μουρουνέλαιο που παρασκευάζεται στην Αγγλία από την εταιρία SEVEN SEAS, της οποίας μητρική εταιρία είναι η MERCK και αποκλειστικός αντιπρόσωπος για την Ελλάδα είναι τα Φαρμακευτικά Εργαστήρια CANA ΑΕ, τα οποία και μας παραχώρησαν τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

### 7.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Τα ολικά λιποειδή (TL) του μουρουνέλαιου ήταν ήδη εκχυλισμένα από το ήπαρ της μουρούνας. Μια ποσότητα των 30 ml ζυγίστηκε και ακολούθησε διαχωρισμός σε ολικά πολικά (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL) με τη μέθοδο της κατανομής κατ'αντιρροή<sup>138</sup> (Πίνακας 7.1). Στα πολικά λιποειδή έγινε περαιτέρω διαχωρισμός με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων του δείγματος με αέρια χρωματογραφία (G.C) έγινε στα ολικά πολικά λιποειδή (TPL) καθώς και στα ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL). Βιολογική δοκιμασία έγινε στα ολικά πολικά λιποειδή (TPL), στα ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL) καθώς και στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα που προέκυψαν από το διαχωρισμό με TLC. Η γενική πειραματική διαδικασία φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 7.1.).



**Σχήμα 7.1.** Γενική Πειραματική Διαδικασία.



### 7.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΖΥΓΙΣΕΩΝ ΤΩΝ TL, PL, NL

Πίνακας 7.1. Ποσότητες των TL, PL, NL.

Δείγμα	Ολικά Λιποειδή TL (g)	Ολικά Πολικά Λιποειδή TPL (ως εκατοστιαίο ποσοστό των TL)	Ολικά Ουδέτερα Λιποειδή TNL (ως εκατοστιαίο ποσοστό των TL)
Μουρουνέλαιο	26.49	1.002 ± 0.026	93.61 ± 2.812

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 7.1., η ποσότητα των ουδέτερων λιποειδών (NL) είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την ποσότητα των πολικών λιποειδών (1% PL - 93.6% NL). Ο Zeng και οι συνεργάτες του το 2010 έδειξαν ότι στο ήπαρ της μουρούνας, συγκεκριμένα στο γένος *Gadus Morhua*, τα ουδέτερα λιποειδή βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα πολικά λιποειδή ( $33.5 \pm 7.5\%$  NL και  $2.4 \pm 0.6\%$  PL)<sup>22</sup>. Επίσης, η αυξημένη ποσότητα των ουδέτερων λιποειδών πιθανόν να οφείλεται στη χρήση μη πολικών διαλυτών για την εκχύλιση του μουρουνέλαιου. Οι πολικοί διαλύτες δεν εκχυλίζουν επαρκή ποσότητα ελαίου καθώς, λόγω πολικότητας, απομακρύνουν σημαντική ποσότητα νερού. Αυτό έχει ως άμεσο επακόλουθο να πρέπει να ακολουθήσουν πολλές εκχυλίσεις ώστε να διασφαλιστεί η ανάκτηση του ελαίου, γεγονός που αυξάνει σημαντικά το κόστος<sup>139</sup>. Η προτίμηση σε μεθόδους που εκχυλίζουν μικρά ποσοστά πολικών λιποειδών, όπως η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (SFE), οφείλεται και στο γεγονός ότι, με τις μεθόδους αυτές, αποφεύγεται η συνεκχύλιση ορισμένων πολικών ακαθαρσιών, όπως τα βαρέα μέταλλα<sup>140</sup>.

Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι το λιποειδικό περιεχόμενο της μουρούνας, και των ψαριών γενικότερα, συνεπώς και των αντίστοιχων ιχθυελαίων, επηρεάζεται από χαρακτηριστικά του ψαριού όπως η ηλικία, η σεξουαλική του ωρίμανση και το μέγεθος του, η θρεπτική σύνθεση και το ενεργειακό περιεχόμενο της διατροφής του, οι εποχιακές αλλαγές και η περιοχή αιχμαλωσίας του<sup>141</sup>.

## 7.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΤΗΣ ΠΟΙΟΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΩΝ PL ΚΑΙ NL ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.

### 7.4.1. PL μουρουνέλαιου

Στην Εικόνα A1 (Παράρτημα A) φαίνεται το χρωματογράφημα των PL του δείγματος μουρουνέλαιου στο οποίο 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 στον Πίνακα B1 (Παράρτημα B).

Οι σημαντικότερες κορυφές των λιπαρών οξέων που ταυτοποιήθηκαν στο λιποειδικό κλάσμα των PL του δείγματος ήταν το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0), το παλμιτελαϊκό (16:1,  $\omega$ -7), το στεατικό (18:0), το ελαϊκό (18:1 cis,  $\omega$ -9), το ελαϊδικό (18:1 trans,  $\omega$ -9), το λινελαϊκό (18:2,  $\omega$ -6), το  $\alpha$ -λινολενικό (18:3,  $\omega$ -3), το αραχιδονικό (20:4,  $\omega$ -6), το εικοσιπεντανοϊκό (20:5,  $\omega$ -3), γνωστό και ως EPA, το εικοσιδυπεντανοϊκό (22:5,  $\omega$ -3), και το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6,  $\omega$ -3) οξύ, γνωστό και ως DHA. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι στο λιποειδικό κλάσμα των PL του δείγματος περιέχονται κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως είναι το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0) και το στεατικό (18:0) οξύ, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το παλμιτελαϊκό (16:1,  $\omega$ -7), το ελαϊκό (18:1 cis,  $\omega$ -9) και το ελαϊδικό (18:1 trans,  $\omega$ -9) οξύ και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως τα  $\omega$ -3 λιπαρά οξέα:  $\alpha$ -λινολενικό (18:3,  $\omega$ -3), εικοσιπεντανοϊκό (20:5,  $\omega$ -3) (EPA), εικοσιδυπεντανοϊκό (22:5,  $\omega$ -3), και το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6,  $\omega$ -3) οξύ, (DHA) και τα  $\omega$ -6 λιπαρά οξέα: λινελαϊκό (18:2,  $\omega$ -6) και αραχιδονικό (20:4,  $\omega$ -6) οξύ.

Από τα εμβαδά των κορυφών των λιπαρών οξέων και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονταν στα PL του δείγματος και συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.2.).

**Πίνακας 7.2.** Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των PL του δείγματος μωρουνέλαιου.

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ppm)
14:0	33 ± 1,0
16:0	69 ± 0,8
16:1 (ω-7)	53 ± 0,9
18:0	13 ± 0,1
18:1 cis	70 ± 0,2
18:1 trans	8,5 ± 1,4
18:2 (ω-6)	11 ± 0,6
18:3 (ω-3)	7,2 ± 0,7
20:4 (ω-6)	1,5 ± 0,1
20:5 (ω-3)	71 ± 0,4
22:5 (ω-3)	5,0 ± 0,2
22:6 (ω-3)	65 ± 1,9
<b>Άθροισμα των κορεσμένων λιπαρών οξέων</b>	<b>115 ± 1,9</b>
Άθροισμα των ω-7 λιπαρών οξέων	53 ± 0,9
Άθροισμα των ω-9 λιπαρών οξέων	78,5 ± 1,6
<b>Άθροισμα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων</b>	<b>131,5 ± 2,5</b>
<b>Άθροισμα των ω-3 λιπαρών οξέων</b>	<b>148,2 ± 3,2</b>
<b>Άθροισμα των ω-6 λιπαρών οξέων</b>	<b>12,5 ± 0,7</b>
<b>Αναλογία ω-6/ω-3</b>	<b>0,08</b>

#### 7.4.2. NL μουρουνέλαιου

Στην Εικόνα A2 (Παράρτημα A) φαίνεται το χρωματογράφημα των NL του δείγματος μουρουνέλαιου στο οποίο είναι σημειωμένοι οι χρόνοι έκλουσης καθώς και τα εμβαδά της κάθε κορυφής.

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων μεθυλεστέρων ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των λιπαρών οξέων με βάση τους χρόνους έκλουσης όπως φαίνονται στον Πίνακα B2 (Παράρτημα B).

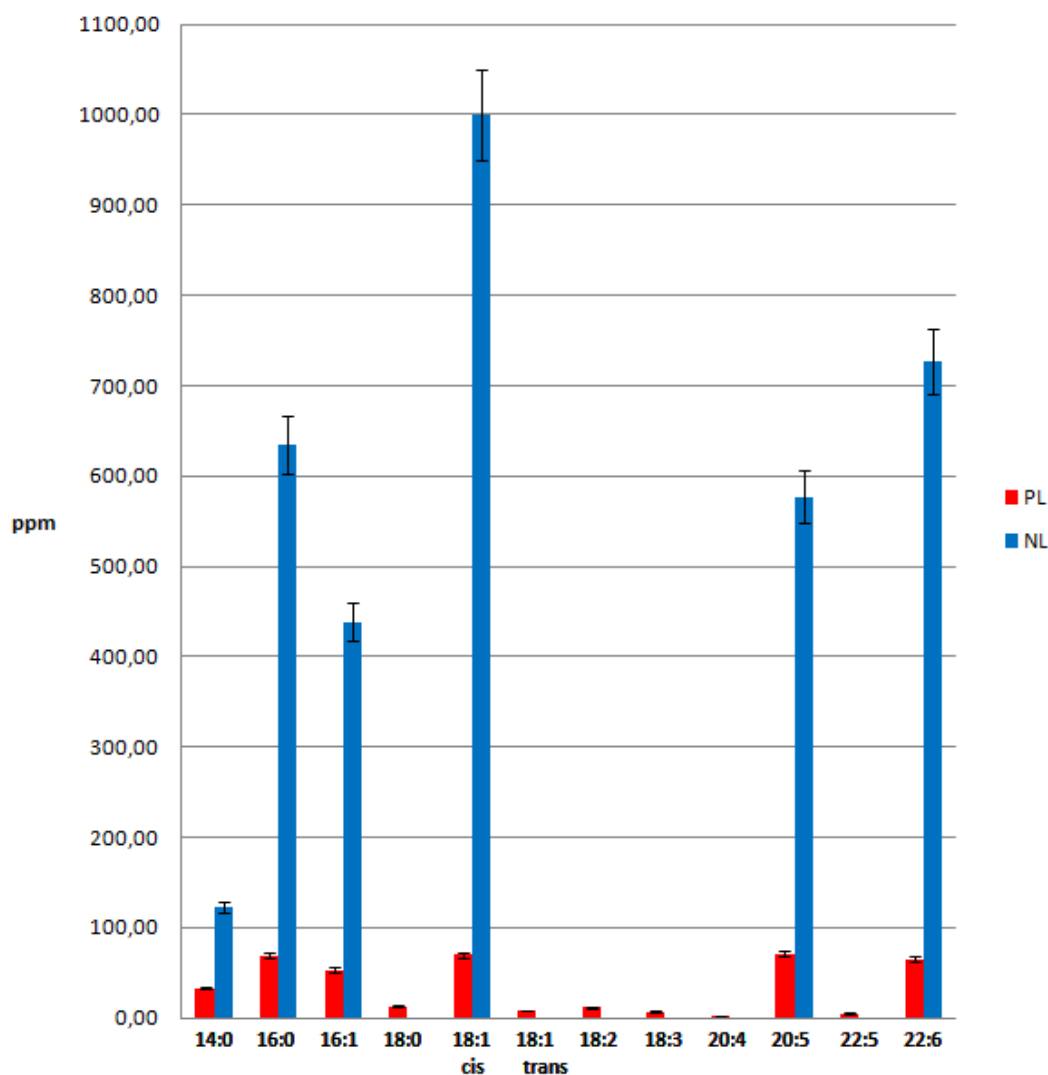
Οι σημαντικότερες κορυφές των λιπαρών οξέων που ταυτοποιήθηκαν στο λιποειδικό κλάσμα των NL του δείγματος μουρουνέλαιου ήταν ίδιες με εκείνες που ταυτοποιήθηκαν και στην περίπτωση των PL του δείγματος μουρουνέλαιου, ήταν δηλαδή το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0), το παλμιτελαϊκό (16:1,  $\omega$ -7), το στεατικό (18:0), το ελαϊκό (18:1 cis,  $\omega$ -9), το ελαϊδικό (18:1 trans,  $\omega$ -9), το λινελαϊκό (18:2,  $\omega$ -6), το  $\alpha$ -λινολενικό (18:3,  $\omega$ -3), το αραχιδονικό (20:4,  $\omega$ -6), το εικοσιπεντανοϊκό (20:5,  $\omega$ -3), (EPA), το εικοσιδυπεντανοϊκό (22:5,  $\omega$ -3), και το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6,  $\omega$ -3) οξύ, (DHA). Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι στο λιποειδικό κλάσμα των NL του δείγματος μουρουνέλαιου περιέχονται κορεσμένα λιπαρά οξέα, όπως είναι το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0) και το στεατικό (18:0) οξύ, μονοακόρεστα λιπαρά οξέα όπως το παλμιτελαϊκό (16:1,  $\omega$ -7), το ελαϊκό (18:1 cis,  $\omega$ -9), και το ελαϊδικό (18:1 trans,  $\omega$ -9) οξύ και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα όπως τα  $\omega$ -3 λιπαρά οξέα:  $\alpha$ -λινολενικό (18:3,  $\omega$ -3), εικοσιπεντανοϊκό (20:5,  $\omega$ -3) (EPA), εικοσιδυπεντανοϊκό (22:5,  $\omega$ -3), και το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6,  $\omega$ -3) οξύ, (DHA) και τα  $\omega$ -6 λιπαρά οξέα: λινελαϊκό (18:2,  $\omega$ -6) και αραχιδονικό (20:4,  $\omega$ -6) οξύ.

Από τα εμβαδά των κορυφών των λιπαρών οξέων και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς προσδιορίστηκαν ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονταν στα NL του δείγματος μουρουνέλαιου και συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 7.3.).

**Πίνακας 7.3.** Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των NL του δείγματος μουρουνέλαιου.

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (ppm)
14:0	123 ± 25
16:0	635 ± 16
16:1 (ω-7)	439 ± 95
18:0	Αμελητέα ποσότητα
18:1 cis	999 ± 33
18:1 trans	Αμελητέα ποσότητα
18:2 (ω-6)	Αμελητέα ποσότητα
18:3 (ω-3)	Αμελητέα ποσότητα
20:4 (ω-6)	Αμελητέα ποσότητα
20:5 (ω-3)	577 ± 27
22:5 (ω-3)	Αμελητέα ποσότητα
22:6 (ω-3)	728 ± 41
<b>Άθροισμα των κορεσμένων λιπαρών οξέων</b>	<b>758 ± 41</b>
Άθροισμα των ω-7 λιπαρών οξέων	439 ± 95
Άθροισμα των ω-9 λιπαρών οξέων	999 ± 33
<b>Άθροισμα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων</b>	<b>1438 ± 128</b>
Άθροισμα των ω-3 λιπαρών οξέων	<b>1305 ± 68</b>
Άθροισμα των ω-6 λιπαρών οξέων	<b>Αμελητέα ποσότητα</b>
<b>Αναλογία ω-6/ω-3</b>	<b>0,0</b>

Τα αποτελέσματα των Πινάκων 7.2. και 7.3. παρουσιάζονται σχηματικά στο παρακάτω ραβδόγραμμα (Σχήμα 7.2.).



**Σχήμα 7.2.** Συγκεντρώσεις (σε ppm) των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των PL και NL των δειγμάτων μουρουνέλαιου αντίστοιχα.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 7.2. και τους Πίνακες 7.2. και 7.3., τα λιπαρά οξέα που γενικά βρέθηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα στα λιποειδικά κλάσματα των PL και NL του μουρουνέλαιου είναι το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0), το παλμιτελαϊκό (16:1, ω-7), το ελαϊκό (18:1 cis, ω-9), το εικοσιπεντανοϊκό (20:5, ω-3), (EPA), και το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6, ω-3) οξύ, (DHA).

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά στα πολικά λιποειδή (PL), σε μεγαλύτερη ποσότητα βρέθηκε το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (20:5, ω-3) με συγκέντρωση 71 ( $\pm$  0,4) ppm ενώ ακολούθησαν το ελαϊκό (18:1 cis, 70  $\pm$  0,2 ppm), το παλμιτικό (16:0, 69  $\pm$  0,8 ppm), το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6, 65  $\pm$  1,9 ppm), το παλμιτελαϊκό (16:1, 53  $\pm$  0,9 ppm) και το μυριστικό οξύ (14:0, 33  $\pm$  1,0 ppm). Σε αρκετά μικρότερες ποσότητες ανιχνεύτηκαν το στεατικό (18:0), το λινελαϊκό (18:2, ω-6), το ελαϊδικό (18:1 trans, ω-9), το α-λινολενικό (18:3, ω-3), το εικοσιδυπεντανοϊκό (22:5, ω-3) και το αραχιδονικό (20:4, ω-6). Από τον Πίνακα 7.2. διαπιστώνεται επίσης ότι στα πολικά λιποειδή (PL), τα ω-3 και τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχονται σε μεγαλύτερες ποσότητες (άθροισμα ω-3 λιπαρών οξέων 148,2  $\pm$  3,2 ppm και άθροισμα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων 131,5  $\pm$  2,5 ppm), ακολουθούν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (άθροισμα κορεσμένων λιπαρών οξέων 115  $\pm$  1,9 ppm) και τέλος τα ω-6 λιπαρά οξέα (άθροισμα ω-6 λιπαρών οξέων 12,5  $\pm$  0,7 ppm). Ανάλογα αποτελέσματα όσον αφορά την κατάταξη των παραπάνω ομάδων λιπαρών οξέων στα PL του μωρουνέλαιου βρέθηκαν και από άλλους ερευνητές<sup>22</sup>. Η αναλογία ω-6/ω-3 λιπαρά οξέα είναι μικρότερη της μονάδας (0,08) γεγονός που αποδεικνύει ότι τα πολικά λιποειδή του μωρουνέλαιου είναι κύρια πηγή ω-3 λιπαρών οξέων, όπως τα DHA και EPA. Σύμφωνα με μια παλιά αντίληψη, όταν η αναλογία αυτή είναι μικρότερη της μονάδας διατηρούνται χαμηλά επίπεδα πρόσληψης κορεσμένου λίπους και trans λιπαρών οξέων<sup>142,143,144</sup>.

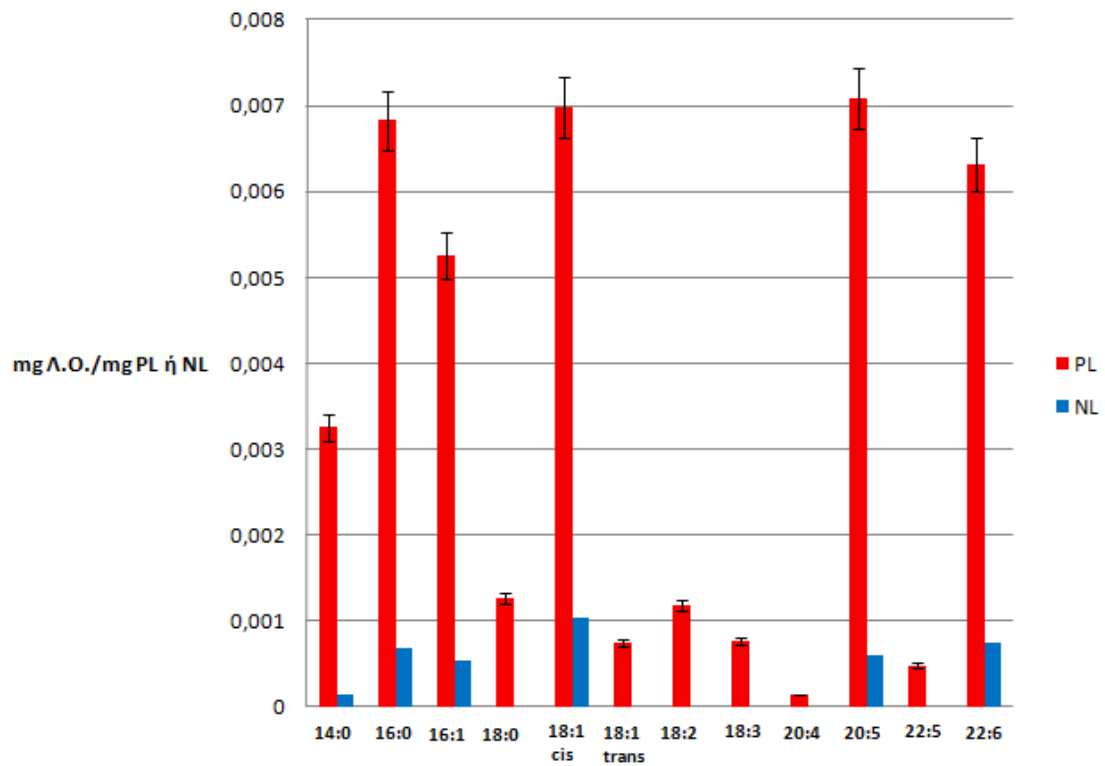
Όσον αφορά στα ουδέτερα λιποειδή (NL), σε μεγαλύτερη ποσότητα βρέθηκε το ελαϊκό οξύ (18:1 cis, ω-9) με συγκέντρωση 999 ( $\pm$  33) ppm ενώ ακολούθησαν το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6, 728  $\pm$  41 ppm), το παλμιτικό (16:0, 635  $\pm$  16 ppm), το εικοσιπεντανοϊκό (20:5, 577  $\pm$  27 ppm), το παλμιτελαϊκό (16:1, 439  $\pm$  95 ppm) και το μυριστικό οξύ (14:0, 123  $\pm$  25 ppm). Το στεατικό (18:0), το ελαϊδικό (18:1 trans, ω-9), το λινελαϊκό (18:2, ω-6), το α-λινολενικό (18:3, ω-3), το αραχιδονικό (20:4, ω-6) και το εικοσιδυπεντανοϊκό οξύ (22:5, ω-3) ανιχνεύτηκαν σε αμελητέες ποσότητες. Από τον Πίνακα 7.3. διαπιστώνεται επίσης ότι στα ουδέτερα λιποειδή (NL) τα μονοακόρεστα και τα ω-3 λιπαρά οξέα περιέχονται σε μεγαλύτερες ποσότητες (άθροισμα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων 1438  $\pm$  128 ppm και άθροισμα ω-3 λιπαρών οξέων 1305  $\pm$  68 ppm), ακολουθούν τα κορεσμένα λιπαρά οξέα (άθροισμα κορεσμένων λιπαρών οξέων 758  $\pm$  41 ppm) και τέλος τα ω-6 λιπαρά οξέα

(όπου η ποσότητά τους είναι αμελητέα). Παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την κατάταξη των παραπάνω ομάδων λιπαρών οξέων στα NL του μωρουνέλαιου βρέθηκαν και από άλλους ερευνητές<sup>22</sup>. Η αναλογία ω-6/ω-3 λιπαρά οξέα είναι 0 (λόγω της αμελητέας ποσότητας των ω-6 λιπαρών οξέων) γεγονός που αποδεικνύει ότι τα ουδέτερα λιποειδή του μωρουνέλαιου είναι κύρια πηγή ω-3 λιπαρών οξέων, όπως τα DHA και EPA. Σύμφωνα με μια παλιά αντίληψη, όταν η αναλογία αυτή είναι μικρότερη της μονάδας διατηρούνται χαμηλά επίπεδα πρόσληψης κορεσμένου λίπους και trans λιπαρών οξέων<sup>142,143,144</sup>.

Συγκριτικά παρατηρούμε ότι οι συγκεντρώσεις (σε ppm) των λιπαρών οξέων που ανιχνεύτηκαν τόσο στα πολικά (PL) όσο και στα ουδέτερα (NL) λιποειδή {δηλαδή το ελαϊκό (18:1 cis), το εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6), το παλμιτικό (16:0), το εικοσιπεντανοϊκό (20:5), το παλμιτελαϊκό (16:1) και το μυριστικό (14:0)} είναι με διαφορά μεγαλύτερες στα ουδέτερα λιποειδή (NL) σε σχέση με τα πολικά λιποειδή (PL). Αυτό είναι λογικό εφόσον στο μωρουνέλαιο που εξετάστηκε διαπιστώθηκε ότι η ποσότητα των ουδέτερων λιποειδών (NL) είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την ποσότητα των πολικών λιποειδών (1% PL - 93.6% NL) (Πίνακας 7.1.). Από την άλλη μεριά, το στεατικό (18:0), το ελαϊδικό (18:1 trans, ω-9), το λινελαϊκό (18:2, ω-6), το αλινολενικό (18:3, ω-3), το αραχιδονικό (20:4, ω-6) και το εικοσιδυπεντανοϊκό οξύ (22:5, ω-3) ανιχνεύτηκαν σε υπολογίσιμες ποσότητες στα πολικά (PL) λιποειδή σε αντίθεση με τα ουδέτερα (NL) λιποειδή όπου ανιχνεύτηκαν σε αμελητέες, σχεδόν μηδενικές, ποσότητες.

Στο Σχήμα 7.3. απεικονίζονται οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των PL και NL του μωρουνέλαιου εκφρασμένες σε mg Λ.Ο. ανά mg PL ή NL αντίστοιχα. Είναι εμφανές ότι κάθε mg πολικού λιποειδούς (PL) του μωρουνέλαιου είναι με διαφορά πιο πλούσιο σε λιπαρά οξέα συγκριτικά με κάθε mg ουδέτερου λιποειδούς. Για παράδειγμα, όσον αφορά τα απαραίτητα λιπαρά οξέα, εικοσιπεντανοϊκό (20:5, ω-3), (EPA) και εικοσιδυεξαενοϊκό (22:6, ω-3) οξύ, (DHA), σε κάθε mg πολικών λιποειδών (PL) περιλαμβάνονται 0.007087 mg EPA και 0.006319 mg DHA, ενώ σε κάθε mg ουδέτερων λιποειδών (NL) περιλαμβάνονται 0.000596 mg EPA και 0.000746 mg DHA.





**Σχήμα 7.3.** Συγκεντρώσεις (σε mg Λ.Ο./mg PL ή NL) των λιπαρών οξέων που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των PL και NL μουρουνέλαιου αντίστοιχα.

## **7.5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑΣ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ**

### **7.5.1. Βιολογική δραστικότητα των ολικών πολικών και ολικών ουδέτερων λιποειδών του μουρουνέλαιου**

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκαν τα ολικά πολικά καθώς και τα ολικά ουδέτερα λιποειδή του μουρουνέλαιου. Η βιολογική δοκιμασία των ολικών λιποειδών έχει μεγάλη διατροφική αξία, όσον αφορά στη θεωρία που υποστηρίζει ότι ο PAF είναι γενεσιουργό αίτιο της αθηρωμάτωσης. Η εμφάνιση αναστολής της προκαλούμενης από τον PAF συσσώρευσης ή η εμφάνιση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων από τα λιποειδή των εξεταζόμενων δειγμάτων, υποδεικνύει την ύπαρξη ανταγωνιστών του PAF. Οι ανταγωνιστές του PAF εμποδίζουν τη δράση του είτε ως αναστολείς είτε ως αγωνιστές με πολύ μικρότερη βιολογική δραστικότητα.

Η συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τα λιποειδή προκαλείται από διάφορους παράγοντες, που τα ενεργοποιούν δρώντας μέσω κάποιων υποδοχέων στους οποίους δρουν ενώσεις που ονομάζονται αγωνιστές. Ένας καλά μελετημένος αγωνιστής είναι και ο PAF. Ένα δείγμα μπορεί να προκαλεί από μόνο του συσσώρευση των αιμοπεταλίων, δηλαδή δρα ως αγωνιστής, αλλά σε πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τον PAF, πιθανά δρώντας μέσω των υποδοχέων του PAF στα αιμοπετάλια. Σε αυτή την περίπτωση ο PAF δε μπορεί να δράσει γιατί έχουν δεσμευτεί οι υποδοχείς του από τον άλλο αγωνιστή. Στην περίπτωση που τα λιποειδή του δείγματος προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων μέσω των υποδοχέων του PAF, οι συσσωρευτικοί αυτοί παράγοντες αυξάνουν την αξία του γιατί ενδεχομένως ανταγωνίζονται τη δράση του PAF που είναι ο πλέον ισχυρός συσσωρευτικός παράγοντας στον οργανισμό. Δηλαδή, τελικά δρουν ως αναστολείς του PAF.

Άρα, τα λιποειδή του δείγματος που μπορεί να προκαλούν αναστολή της δράσης του PAF μέσω δέσμευσης και αναστολής της δράσης των υποδοχέων του ή δρώντας σαν πολύ ασθενής αγωνιστής στη συσσώρευση των

αιμοπεταλίων μέσω του υποδοχέα του PAF, υποδηλώνουν ότι στο δείγμα υπάρχουν αναστολείς του PAF.

Τα ολικά λιποειδικά κλάσματα αποτελούν ένα μίγμα λιποειδικών μορίων τα οποία παρουσιάζουν είτε συσσωρευτική είτε ανασταλτική ικανότητα. Η τελική τους δράση εξαρτάται από τη σχετική ικανότητα του κάθε μορίου να συσσωρεύει αιμοπετάλια ή να αναστέλλει την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και από την ποσότητα του κάθε μορίου στο μίγμα. Από αυτή την άποψη, ένα λιποειδικό κλάσμα που προκαλεί συσσώρευση αιμοπεταλίων μπορεί επίσης να περιέχει και μόρια με ανασταλτική ικανότητα και το αντίθετο.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 7.4., τα ολικά ουδέτερα λιποειδή του μουρουνέλαιου δεν παρουσίασαν ούτε συσσωρευτική ούτε ανασταλτική δράση. Αυτό πιθανόν να οφείλεται είτε στο ότι τα ολικά ουδέτερα λιποειδή δεν περιέχουν μόρια με συσσωρευτική ή ανασταλτική δράση, είτε στο γεγονός ότι τα λιποειδή αυτά μπορεί να περιέχουν μόρια με συσσωρευτική δράση καθώς και μόρια με ανασταλτική δράση, των οποίων όμως οι δράσεις αλληλοαναιρούνται.

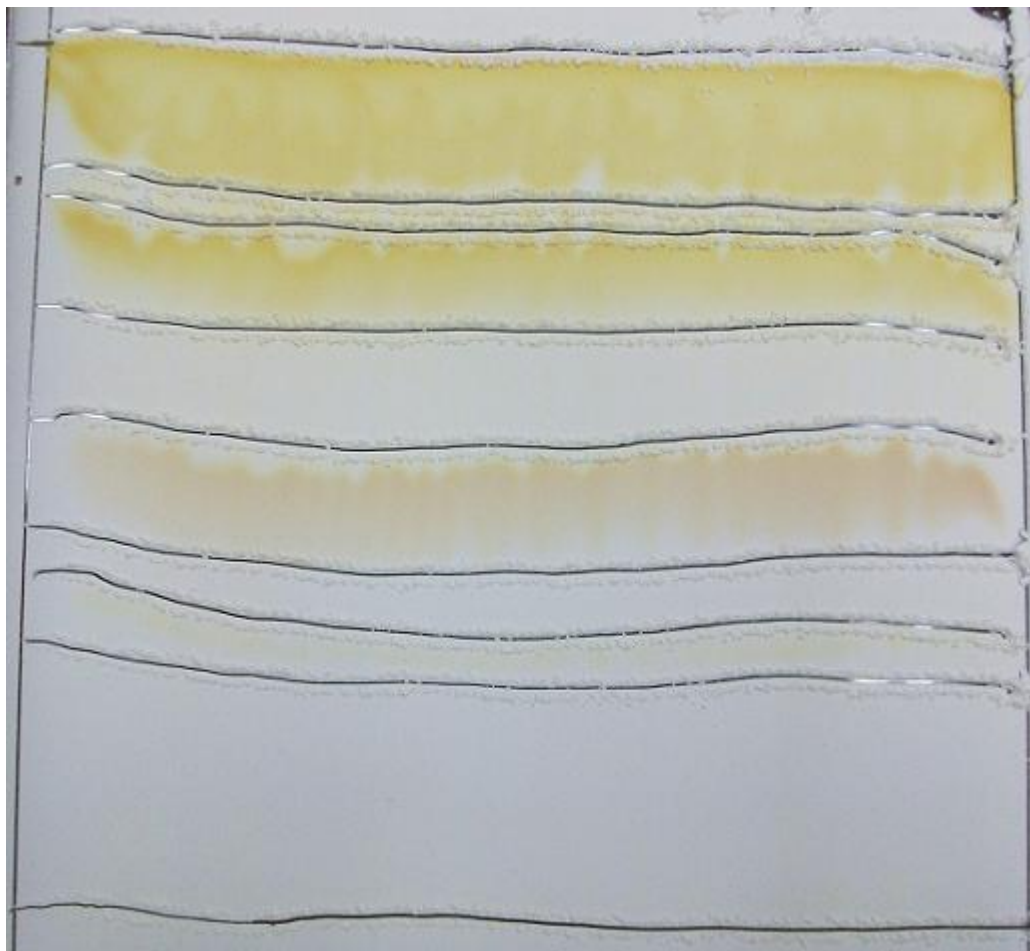
Από την άλλη μεριά, τα ολικά πολικά λιποειδή εμφάνισαν και συσσωρευτική και ανασταλτική δράση. Συγκεκριμένα, εμφάνισαν μια συσσωρευτική δράση με τιμή  $EC_{50}$  15.59  $\mu$ g. Σε μεγαλύτερη όμως ποσότητα δρούσαν ανασταλτικά στη δραστηριότητα του PAF και τιμή  $IC_{50}$  ίση με 78,47  $\mu$ g. Αποτελέσματα που συμφωνούν με όσα επεξηγηματικά έχουν αναφερθεί παραπάνω.

**Πίνακας 7.4.** *In vitro* βιολογικές δραστηριότητες των ολικών πολικών και ολικών ουδέτερων λιποειδών του μουρουνέλαιου.

Δείγμα	ΔΡΑΣΗ		ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΤΟΥ EC <sub>50</sub> ΤΟΥ PAF (μg)	ΤΙΜΕΣ IC <sub>50</sub> ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ [PAF]= 2,953x10 <sup>-11</sup> M (μg)
	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ		
Ολικά Πολικά Λιποειδή	50%	50%	15.59	78.47
Ολικά Ουδέτερα Λιποειδή	~	~	~	~

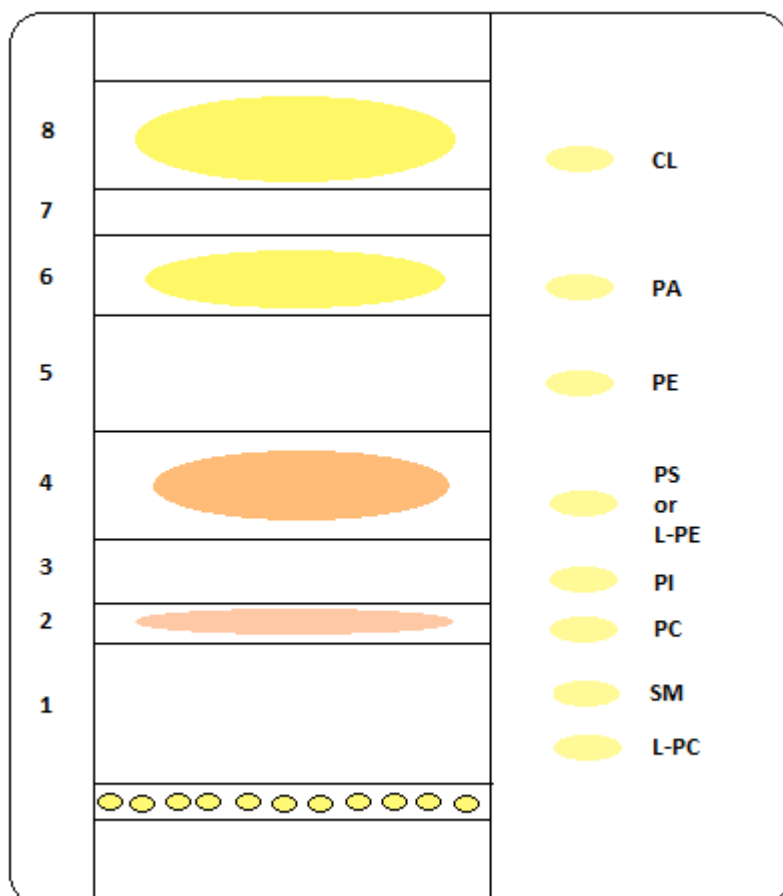
### 7.5.2. Βιολογική δραστικότητα των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του μουρουνέλαιου

Τα ολικά πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν (συνολικά 247.5 mg από το δείγμα μουρουνέλαιου) σε επιμέρους λιποειδικά κλάσματα με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Το σύστημα ανάπτυξης της πλάκας που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό τους ήταν χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό = 65: 35: 6. Στην Εικόνα 7.1. φαίνεται μια ενδεικτική πλάκα TLC.



**Εικόνα 7.1.** Ενδεικτική πλάκα TLC.

Το προφίλ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψε από τα PL μετά από TLC συγκριτικά με πρότυπα φωσφολιποειδή, με βάση τα Rf τους, φαίνεται στο Σχήμα 7.4.



**Σχήμα 7.4.** Πολικά λιποειδικά κλάσματα μουρουνέλαιου μετά από διαχωρισμό με TLC. (L-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφιγγομυελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, PI: φωσφατιδυλοϊνσιτόλη, L-PE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PS: φωσφατιδυλοσερίνη, PE: φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PA: φωσφατιδικό οξύ, CL: καρδιολιπίνη). Το σύστημα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό τους ήταν χλωροφόρμιο: μεθανόλη: νερό 65: 35: 6 (v/v/v).

Όλα τα πολικά λιποειδικά κλάσματα που προέκυψαν δοκιμάστηκαν για τη βιολογική τους ικανότητα να προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων ή να αναστέλλουν την επαγομένη από τον PAF συσσώρευση. Η μέγιστη προκαλούμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων (η οποία θεωρείται 100% συσσώρευση) εκφράζεται σε cm και βρέθηκε ίση με 9.5 cm. Συνεπώς, οι τιμές  $IC_{50}$  του δείγματος αντιστοιχούν στην ποσότητα του φωσφολιποειδούς σε  $\mu\text{g}$  η οποία αναστέλλει την συσσώρευση που προκαλεί ο PAF κατά 50% και τη μειώνει στα 4.75 cm. Οι τιμές αντίστοιχες του  $EC_{50}$  του PAF δείχνουν την ποσότητα του φωσφολιποειδούς σε  $\mu\text{g}$  η οποία προκαλεί συσσώρευση ίση με το 50% της μέγιστης αντιστρεπτής συσσώρευσης που προκαλεί ο PAF, δηλαδή προκαλούν συσσώρευση ίση με 4.75 cm. Όσο μικρότερες είναι οι τιμές των αντίστοιχων του  $EC_{50}$  του PAF και  $IC_{50}$  του δείγματος, τόσο πιο δραστικό θεωρείται το λιποειδές αφού έχει την ικανότητα να εκδηλώνει τη βιολογική του δράση σε μικρότερη ποσότητα.

Οι τιμές συσσώρευσης και αναστολής για το κάθε λιποειδικό κλάσμα του δείγματος μωρουνέλαιου φαίνονται στον Πίνακα 7.5.

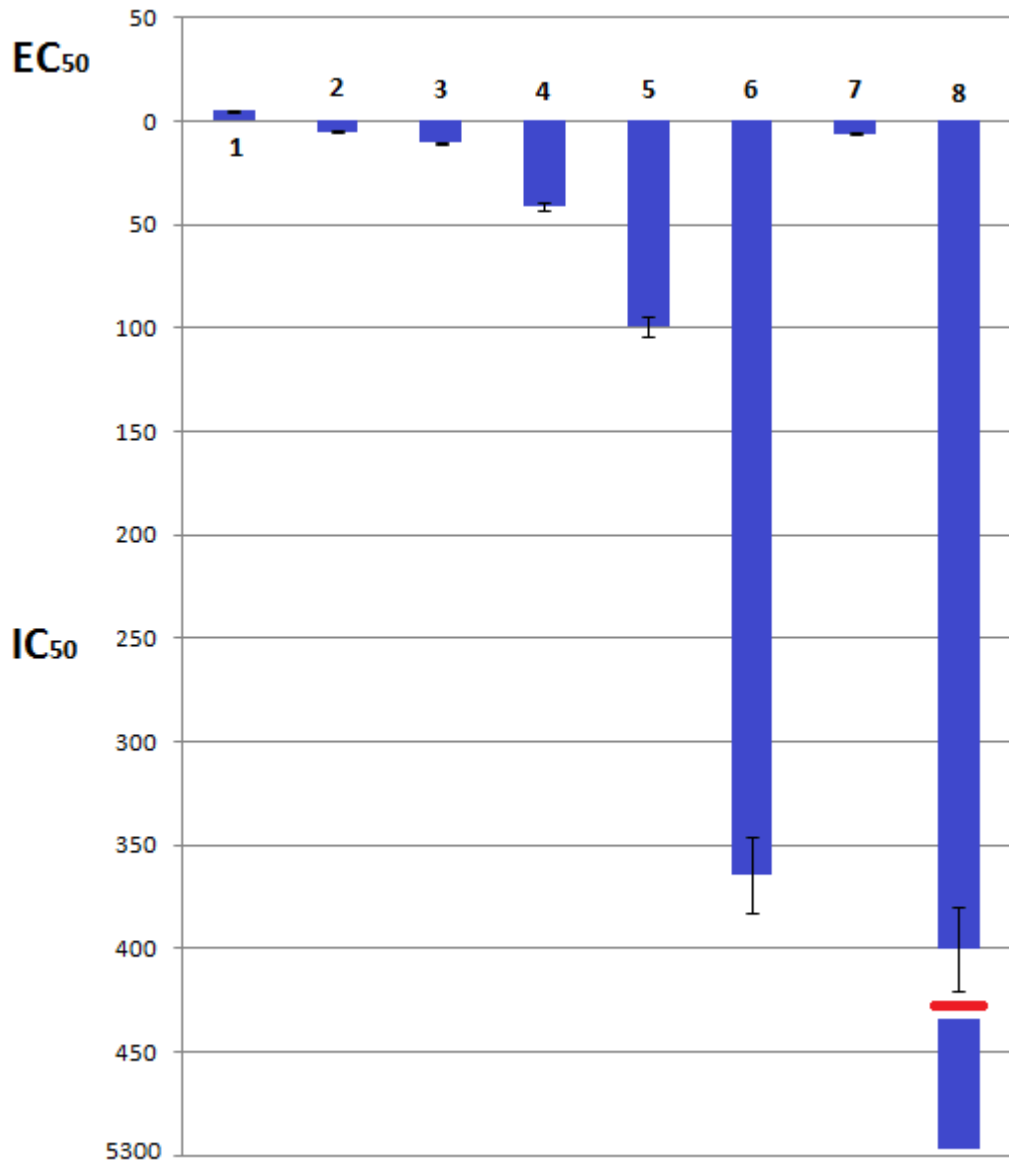
**Πίνακας 7.5.** *In vitro* βιολογικές δραστηριότητες των πολικών λιποειδικών κλασμάτων μουρουνέλαιου μετά από παρασκευαστική TLC.

ΖΩΝΕΣ	ΔΡΑΣΗ		ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΤΟΥ EC <sub>50</sub> ΤΟΥ PAF (μg)	ΤΙΜΕΣ IC <sub>50</sub> ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ [PAF]= 2,953x10 <sup>-11</sup> M (μg)
	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ		
Ζώνη 1	50%	~	4.850	~
Ζώνη 2	~	50%	~	4.928
Ζώνη 3	~	50%	~	10.32
Ζώνη 4	~	50%	~	40.92
Ζώνη 5	~	50%	~	99.00
Ζώνη 6	~	50%	~	364.3
Ζώνη 7	~	50%	~	6.020
Ζώνη 8	~	50%	~	5260

Έχει αποδειχτεί ότι οι ασθενείς αγωνιστές του PAF (με συσσωρευτική δράση) εμφανίζουν καλύτερη *in vivo* αντιαθηρωματική ικανότητα από τους αναστολείς του PAF. Συνεπώς, η ανίχνευση λιποειδών τόσο με συσσωρευτική όσο και με ανασταλτική ικανότητα αξιολογείται θετικά καθώς αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι αυτά τα κλάσματα αποτελούν βιολογικά ενεργές ενώσεις κατά του PAF και επομένως κατά της αθηρογένεσης.

Στο Σχήμα 7.5. απεικονίζονται σε γράφημα οι τιμές των πολικών λιποειδικών κλασμάτων που είναι αντίστοιχες του EC<sub>50</sub> του PAF και οι τιμές του IC<sub>50</sub> των πολικών λιποειδικών κλασμάτων.





**Σχήμα 7.5.** Γράφημα πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψαν μετά από TLC.

Από τον Πίνακα 7.5. και το Σχήμα 7.5. παρατηρούμε ότι όλα τα πολικά λιποειδικά κλάσματα του μουρουνέλαιου εμφάνισαν *in vitro* βιολογική δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, οι ζώνες 2, 3, 4, 5, 6, 7 και 8 εμφάνισαν ανασταλτική δράση ενώ μόνο η ζώνη 1 εμφάνισε συσσωρευτική δράση.

Το πολικό λιποειδικό κλάσμα 1 έχει παρόμοια τιμή R<sub>f</sub> με αυτή του PAF. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα ψάρια πιθανόν να περιέχουν PAF<sup>145,146</sup>.

Συνεπώς η εμφάνιση συσσωρευτικής δράσης ίσως να οφείλεται στην ύπαρξη του PAF. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βιολογική δράση του λιποειδικού αυτού κλάσματος είναι σημαντική καθώς η τιμή  $EC_{50}$  είναι ιδιαίτερα χαμηλή (4.850  $\mu\text{g}$ ).

Τα πολικά λιποειδικά κλάσματα 2 (4.928  $\mu\text{g}$ ) και 7 (6.020  $\mu\text{g}$ ) εμφάνισαν τις χαμηλότερες τιμές  $IC_{50}$  σε σχέση με τα υπόλοιπα κλάσματα με ανασταλτική δράση. Η βιολογική τους δράση είναι πολύ σημαντική γιατί εκδηλώνεται σε ιδιαίτερα χαμηλές ποσότητες λιποειδούς και πιθανόν οφείλεται στο ότι περιέχουν περισσότερους αναστολείς του PAF.

Το πολικό λιποειδικό κλάσμα 3 (10.32  $\mu\text{g}$ ) εμφάνισε αξιόλογη τιμή  $IC_{50}$ . Το κλάσμα 4 (40.92  $\mu\text{g}$ ) εμφάνισε υψηλότερη τιμή  $IC_{50}$  ενώ τα κλάσματα 5 (99.00  $\mu\text{g}$ ) και 6 (364.3  $\mu\text{g}$ ) εμφάνισαν αρκετά υψηλές τιμές  $IC_{50}$ . Οι υψηλές αυτές τιμές πιθανόν αποδίδονται στο γεγονός ότι τα λιποειδή αυτά περιέχουν μικρή ποσότητα αναστολέων ή/και οι αναστολείς που περιέχουν είναι σχετικά ασθενείς.

Ιδιαίτερα ασθενή ανασταλτική δράση παρουσίασε το πολικό λιποειδικό κλάσμα 8 (5260  $\mu\text{g}$ ).

Συμπερασματικά, τα κλάσματα με την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση ήταν τα κλάσματα 2 και 7, με το κλάσμα 2 να έχει τη χαμηλότερη τιμή  $IC_{50}$ . Το κλάσμα 1 αποδείχτηκε επίσης ιδιαίτερα σημαντικό με πολύ χαμηλή τιμή  $EC_{50}$ . Η χαμηλή αυτή τιμή  $EC_{50}$  ίσως και να οφείλεται στο ότι τα κλάσμα 1 περιέχει ενώσεις με δράση παρόμοια με αυτή του PAF. Οι ενώσεις αυτές θα μπορούσαν να είναι ευεργετικές καθώς δρουν ως ασθενείς αγωνιστές του PAF και συναγωνίζονται μαζί του για την πρόσδεση σε υποδοχείς, προστατεύοντας έτσι από το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας. Η παρουσία των ενώσεων αυτών στα πολικά λιποειδικά κλάσματα του μουρουνέλαιου δε σημαίνει απαραίτητα ότι τα κλάσματα έχουν προθρομβωτικές ιδιότητες. Οι ενώσεις αυτές θα μπορούσαν να είναι λιγότερο δραστικές από τον PAF και η δράση τους να μην είναι η πλήρης αναστολή του αλλά η μείωση της θρομβωτικής του δράσης<sup>126</sup>. Τα κλάσματα με πολύ χαμηλές τιμές  $IC_{50}$  πιθανόν περιέχουν ενώσεις με δράση κατά του PAF. Οι ενώσεις αυτές αναστέλλουν την επαγόμενη από τον PAF συσώρευση οδηγώντας στην αναστολή του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας στις αρτηρίες. Δε σημαίνει απαραίτητα ότι τα κλάσματα αυτά περιέχουν μόνο ενώσεις με δράση κατά του

PAF. Μπορεί να περιέχουν και μόρια με δράση παρόμοια με αυτή του PAF αλλά τα μόρια με την ανασταλτική δράση να υπερκαλύπτουν τη δράση τους. Με άλλα λόγια και όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε ένα λιποειδικό κλάσμα, μπορεί να περιλαμβάνονται συγχρόνως μόρια με ανασταλτική δράση και μόρια με συσσωρευτική δράση. Η τελική δράση του κλάσματος εξαρτάται από τη σχετική ικανότητα του κάθε μορίου να συσσωρεύει αιμοπετάλια ή να αναστέλλει την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και από την ποσότητα του κάθε μορίου στο μίγμα.

### **7.5.3. Σύγκριση της βιολογικής δραστηριότητας των ολικών πολικών λιποειδών του μουρουνέλαιου με τη βιολογική δραστηριότητα άλλων ψαριών**

Στον Πίνακα 7.6. παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι *in vitro* βιολογικές δραστηριότητες των ολικών πολικών λιποειδών του μουρουνέλαιου και κάποιων ακόμα ψαριών: του μπακαλιάρου (*Melanogrammus aeglefinus*) και του μαύρου μπακαλιάρου (*Pollachius virens*) (νωπού και ψημένου)<sup>147</sup>, της σαρδέλας (*Sardina pilchardus*) (νωπής και ψημένης) (αδημοσίευτα αποτελέσματα), του σολομού (*Salmon salar*) (αδημοσίευτα αποτελέσματα), της τσιπούρας (*Sparus aurata*) (εκτρεφόμενης νωπής)<sup>148</sup>, του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) που έχει τραφεί με συμβατική ιχθυοτροφή από 100% έλαιο αντζούγιας και με ιχθυοτροφή από έλαιο αντζούγιας εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα κατά 4%<sup>149</sup>, καθώς και λαβρακίου του ίδιου γένους εκτρεφόμενου νωπού και ψημένου<sup>147</sup>, της χρυσής πέστροφας (*Onchorhynchus aquabonita*) (εκτρεφόμενης νωπής και ψημένης)<sup>147</sup>, της ιριδίζουσας πέστροφας (*Onchorhynchus mykiss*) (εκτρεφόμενης νωπής και ψημένης)<sup>147</sup> και της γλώσσας (*Pleuronectes platessus*) (νωπής και ψημένης)<sup>147</sup>.

Πίνακας 7.6. *In vitro* βιολογικές δραστηριότητες των ολικών πολικών λιπιδίων του μουρουνέλαιου και κάπποιων ακόμα ψαριών.

TPL	ΔΡΑΣΗ		ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΤΟΥ EC <sub>50</sub> ΤΟΥ ΡΑΦ (μg)	ΤΙΜΕΣ IC <sub>50</sub> ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΕΝΑΝΤΙ [ΡΑΦ]= 2,953x10 <sup>-11</sup> M (μg)
	ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ	ΑΝΑΣΤΟΛΗ		
ΜΟΥΡΟΥΝΕΛΑΙΟ	50%	50%	15.59	78.47
ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ (Melanogrammus aeglefinus) ΝΩΠΟΣ	~	50%	~	40.1
ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ (Melanogrammus aeglefinus) ΨΗΜΕΝΟΣ	~	50%	~	154
ΜΑΥΡΟΣ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ (Pollachius virens) ΝΩΠΟΣ	~	50%	~	84.5
ΜΑΥΡΟΣ ΜΠΑΚΑΛΙΑΡΟΣ (Pollachius virens) ΨΗΜΕΝΟΣ	~	50%	~	152
ΣΑΡΔΕΛΑ (Sardina pilchardus) ΝΩΠΗ	50%	~	21.66	~
ΣΑΡΔΕΛΑ (Sardina pilchardus) ΨΗΜΕΝΗ	50%	50%	17.05	9.17
ΣΟΛΟΜΟΣ (Salmon salar) ΝΩΠΟΣ	50%	~	2.56	~
ΤΣΙΠΟΥΡΑ (Sparus aurata) εκτρεφόμενη ΝΩΠΗ	50%	50%	1.00	92.00
ΛΑΒΡΑΚΙ (Dicentrarchus labrax) (FO diet) <sup>a</sup>	~	50%	~	3.6
ΛΑΒΡΑΚΙ (Dicentrarchus labrax) (OP diet) <sup>b</sup>	~	50%	~	3.8
ΛΑΒΡΑΚΙ (Dicentrarchus labrax) εκτρεφόμενο ΝΩΠΟ	50%	~	0.557	~
ΛΑΒΡΑΚΙ (Dicentrarchus labrax) εκτρεφόμενο ΨΗΜΕΝΟ	50%	~	0.122	~
ΧΡΥΣΗ ΠΕΣΤΡΟΦΑ (Onchorhynchus aguabonita) εκτρεφόμενη ΝΩΠΗ	50%	~	0.282	~
ΧΡΥΣΗ ΠΕΣΤΡΟΦΑ (Onchorhynchus aguabonita) εκτρεφόμενη ΨΗΜΕΝΗ	50%	~	0.456	~

<b>ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑ ΠΕΣΤΡΟΦΑ (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) εκτρεφόμενη ΝΩΠΗ</b>	50%	~	0.722	~
<b>ΙΡΙΔΙΖΟΥΣΑ ΠΕΣΤΡΟΦΑ (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) εκτρεφόμενη ΨΗΜΕΝΗ</b>	50%	~	1.04	~
<b>ΓΛΩΣΣΑ (<i>Pleuronectes platessus</i>) ΝΩΠΗ</b>	50%	~	0.295	~
<b>ΓΛΩΣΣΑ (<i>Pleuronectes platessus</i>) ΨΗΜΕΝΗ</b>	50%	~	2.03	~

<sup>a</sup>FO diet (Fish oil diet): έχει τραφεί με ιχθυοτροφή από 100% έλαιο αντζούγιας

<sup>b</sup>OP diet (Olive Pomace diet): έχει τραφεί με ιχθυοτροφή από έλαιο αντζούγιας εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα κατά 4%

Συγκριτικά, όσον αφορά στη συσσωρευτική δράση των ολικών πολικών λιποειδών (TPL) των ψαριών αυτών, τα ολικά πολικά λιποειδή του εκτρεφόμενου ψημένου λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) εμφανίζουν την πιο ισχυρή συσσωρευτική δράση με σημαντικά χαμηλή τιμή αντίστοιχη του EC<sub>50</sub> του PAF 0.122 µg. Ακολουθούν η εκτρεφόμενη νωπή χρυσή πέστροφα (*Onchorhynchus aguabonita*) με τιμή στα 0.282 µg και η νωπή γλώσσα (*Pleuronectes platessus*) με τιμή στα 0.295 µg. Μετά, η εκτρεφόμενη ψημένη χρυσή πέστροφα (*Onchorhynchus aguabonita*) με τιμή στα 0.456 µg και το εκτρεφόμενο νωπό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) με τιμή στα 0.557 µg. Τα ολικά πολικά λιποειδή της εκτρεφόμενης νωπής ιριδίζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) εμφανίζουν τιμή αντίστοιχη του EC<sub>50</sub> του PAF 0.722 µg και ακολουθούν η εκτρεφόμενη νωπή τσιπούρα (*Sparus aurata*) με τιμή στο 1.00 µg, η εκτρεφόμενη ψημένη ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*) με τιμή στα 1.04 µg, η ψημένη γλώσσα (*Pleuronectes platessus*) με τιμή στα 2.03 µg και ο νωπός σολομός (*Salmon salar*) με τιμή στα 2.56 µg. Σχετικά υψηλότερες τιμές αντίστοιχες του EC<sub>50</sub> του PAF εμφανίζουν τα ολικά πολικά λιποειδή του μουρουνέλαιου, το οποίο και μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, με τιμή στα 15.59 µg, και τέλος της σαρδέλας (*Sardina pilchardus*), με την ψημένη σαρδέλα να εμφανίζει τιμή στα 17.05 µg και τη νωπή σαρδέλα να εμφανίζει τιμή στα 21.66 µg. Τα ολικά πολικά λιποειδή του νωπού και ψημένου μπακαλιάρου (*Melanogrammus aeglefinus*), του νωπού και ψημένου

μαύρου μπακαλιάρου (*Pollachius virens*) και του λαβρακίου, είτε είχε τραφεί με συμβατική ιχθυοτροφή από 100% έλαιο αντζούγιας είτε με ιχθυοτροφή από έλαιο αντζούγιας εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα κατά 4%, δεν εμφάνισαν συσσωρευτική δράση.

Όσον αφορά στην ανασταλτική δράση των ολικών πολικών λιποειδών (TPL) των ανωτέρω ψαριών, τα ολικά πολικά λιποειδή του λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*) εμφανίζουν την πιο ισχυρή ανασταλτική δράση με σημαντικά χαμηλές τιμές  $IC_{50}$ , στα 3.6  $\mu\text{g}$  για το λαβράκι είχε τραφεί με συμβατική ιχθυοτροφή από 100% έλαιο αντζούγιας και στα 3.8  $\mu\text{g}$  για το λαβράκι που είχε τραφεί με ιχθυοτροφή από έλαιο αντζούγιας εμπλουτισμένη με ελαιοπυρήνα κατά 4%. Παρατηρούμε ότι η ανασταλτική δραστηριότητα του λαβρακίου δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την τροφή του. Ακολουθεί η ψημένη σαρδέλα (*Sardina pilchardus*) με αρκετά χαμηλή τιμή  $IC_{50}$  στα 9.17  $\mu\text{g}$ . Τα ολικά πολικά λιποειδή του νωπού μπακαλιάρου (*Melanogrammus aeglefinus*) εμφανίζουν τιμή  $IC_{50}$  στα 40.1  $\mu\text{g}$  και ακολουθούν το μουρουνέλαιο με τιμή  $IC_{50}$  στα 78.47  $\mu\text{g}$ , ο νωπός μαύρος μπακαλιάρος (*Pollachius virens*) με τιμή  $IC_{50}$  στα 84.5  $\mu\text{g}$  και η εκτρεφόμενη νωπή τσιπούρα (*Sparus aurata*) με τιμή  $IC_{50}$  στα 92.00  $\mu\text{g}$ . Αρκετά υψηλές τιμές  $IC_{50}$  εμφανίζουν τα ολικά πολικά λιποειδή του ψημένου μαύρου μπακαλιάρου (*Pollachius virens*) με τιμή  $IC_{50}$  στα 152  $\mu\text{g}$  και του ψημένου μπακαλιάρου (*Melanogrammus aeglefinus*) με τιμή  $IC_{50}$  στα 154  $\mu\text{g}$ . Τα ολικά πολικά λιποειδή της νωπής σαρδέλας (*Sardina pilchardus*), του νωπού σολομού (*Salmon salar*), του εκτρεφόμενου νωπού και ψημένου λαβρακίου (*Dicentrarchus labrax*), της εκτρεφόμενης νωπής και ψημένης χρυσής πέστροφας (*Onchorhynchus aguabonita*), της εκτρεφόμενης νωπής και ψημένης ιριδίζουσας πέστροφας (*Onchorhynchus mykiss*) και της νωπής και ψημένης γλώσσας (*Pleuronectes platessus*) δεν εμφάνισαν ανασταλτική δράση.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8. ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της σύστασης του μουρουνέλαιου σε λιπαρά οξέα και κατ' επέκταση της διατροφικής του αξίας, καθώς και η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών του που συνδέεται με την προστατευτική του ιδιότητα έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων μέσω της επίδρασης τους στη δημιουργία των αθηρωματικών πλακών. Αρχικά τα ολικά λιποειδή (TL) του μουρουνέλαιου διαχωρίστηκαν σε πολικά (PL) και ουδέτερα λιποειδή (NL) με κατανομή κατ' αντιρροή. Τα πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν περαιτέρω σε λιποειδικά κλάσματα με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC). Μελετήθηκε η ικανότητά των ολικών πολικών, των ολικών ουδέτερων και των πολικών λιποειδικών κλασμάτων να προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή να αναστέλλουν την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση των αιμοπεταλίων, καθώς και η περιεκτικότητα των ολικών πολικών και ολικών ουδέτερων λιποειδών σε λιπαρά οξέα με αέρια χρωματογραφία (GC).

Πρόσφατες μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο εργαστήριο μας πάνω σε λιποειδικά κλάσματα ψαριών έδειξαν την ύπαρξη μικροσυστατικών που προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων αλλά και μικροσυστατικών που αναστέλλουν τη συσσώρευση τους<sup>121,122,123</sup>. Αυτά τα μικροσυστατικά των λιποειδών αποδείχτηκε ότι έχουν σημαντική *in vitro* βιολογική δραστηριότητα κατά της δράσης του PAF. Τέτοια λιποειδή έχουν βρεθεί επίσης και σε άλλα τρόφιμα όπως το κόκκινο και το λευκό κρασί<sup>124</sup>, το γιαούρτι<sup>125</sup>, το μέλι<sup>127</sup> και το ελαιόλαδο<sup>128</sup>.

Ο λόγος που επιλέχθηκε το μουρουνέλαιο είναι η ευρεία χρήση του ως συμπλήρωμα διατροφής που οφείλεται στη σημαντική διαθρεπτική του αξία. Το μουρουνέλαιο περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των τριακυλογλυκερολών (TAG), μονο- και δι-ακυλογλυκερόλες, ελεύθερα λιπαρά οξέα, βιταμίνες και ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα<sup>27</sup>. Μελέτη που έχει γίνει σχετικά με το βιολογικό ρόλο του γάδου έχει ήδη αποδείξει ότι ενώσεις με ισχυρή δράση παρόμοια με του PAF καθώς και με δράση κατά του PAF είναι παρούσες στο ψάρι αυτό (είδος *Gadus morhua*). Όλα τα πολικά λιποειδικά κλάσματα του φρέσκου γάδου

αποδείχθηκε ότι αναστέλλουν, με δόσο-εξαρτώμενο τρόπο, την επαγόμενη από τον PAF συσώρευση ή προκαλούν τα ίδια συσώρευση αιμοπεταλίων κουνελιού<sup>122</sup>.

Στην παρούσα έρευνα επικεντρωθήκαμε στο πολικά λιποειδή του μουρουνέλαιου. Ο λόγος είναι ότι από προηγούμενες *in vivo* έρευνες στο ελαιόλαδο<sup>129</sup>, τον ελαιοπυρήνα<sup>131,150</sup> και κάποια ψάρια<sup>11,151</sup>, έχει αποδειχτεί ότι τα πολικά λιποειδικά κλάσματα είναι αυτά που μπορούν να μειώσουν το πάχος των ήδη σχηματισμένων αθηροσκληρωτικών πλακών σε υπερχοληστερολαιμικά κουνέλια και / ή να προκαλέσουν την υποχώρηση τους.

Χαρακτηριστική ήταν η διαφορά μεταξύ των ποσοτήτων των ολικών πολικών και των ολικών ουδέτερων λιποειδών. Συγκεκριμένα, η ποσότητα των ουδέτερων λιποειδών (NL) βρέθηκε κατά πολύ μεγαλύτερη από την ποσότητα των πολικών λιποειδών (1% PL - 93.6% NL). Η αυξημένη ποσότητα των ουδέτερων λιποειδών πιθανόν να οφείλεται στη χρήση μη πολικών διαλυτών για την εκχύλιση του μουρουνέλαιου. Οι πολικοί διαλύτες δεν εκχυλίζουν επαρκή ποσότητα ελαίου καθώς, λόγω πολικότητας, απομακρύνουν σημαντική ποσότητα νερού. Αυτό έχει ως άμεσο επακόλουθο να πρέπει να ακολουθήσουν πολλές εκχυλίσεις ώστε να διασφαλιστεί η ανάκτηση του ελαίου, γεγονός που αυξάνει σημαντικά το κόστος. Η προτίμηση σε μεθόδους που εκχυλίζουν μικρά ποσοστά πολικών λιποειδών, όπως η εκχύλιση με υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα (SFE), οφείλεται και στο γεγονός ότι, με τις μεθόδους αυτές, αποφεύγεται η συνεχής εκχύλιση ορισμένων πολικών ακαθαρσιών, όπως τα βαρέα μέταλλα. Επίσης, έρευνες έχουν δείξει ότι στο ήπαρ της μουρούνας τα ουδέτερα λιποειδή βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με τα πολικά λιποειδή.

Η παρουσία ανταγωνιστών του PAF σε διάφορα τρόφιμα και σκευάσματα έχει μεγάλη σημασία για τη διατροφική τους αξία, λαμβάνοντας υπόψη τον κρίσιμο ρόλο της ενεργοποίησης των αιμοπεταλίων και της θρόμβωσης στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την αθηρογένεση, έχουν δείξει ότι μόνο ειδικοί αναστολείς του PAF<sup>152</sup>, τα πολικά λιποειδή<sup>153</sup> του ελαιολάδου και οι στατίνες είναι δυνατό να μειώσουν την αθηρογένεση *in vivo*, ενώ τα ω-3 λιπαρά οξέα παρότι περιορίζουν μεν διάφορα στάδιά της, δεν είναι ικανά να τη μειώσουν σε *in vivo* πειράματα με



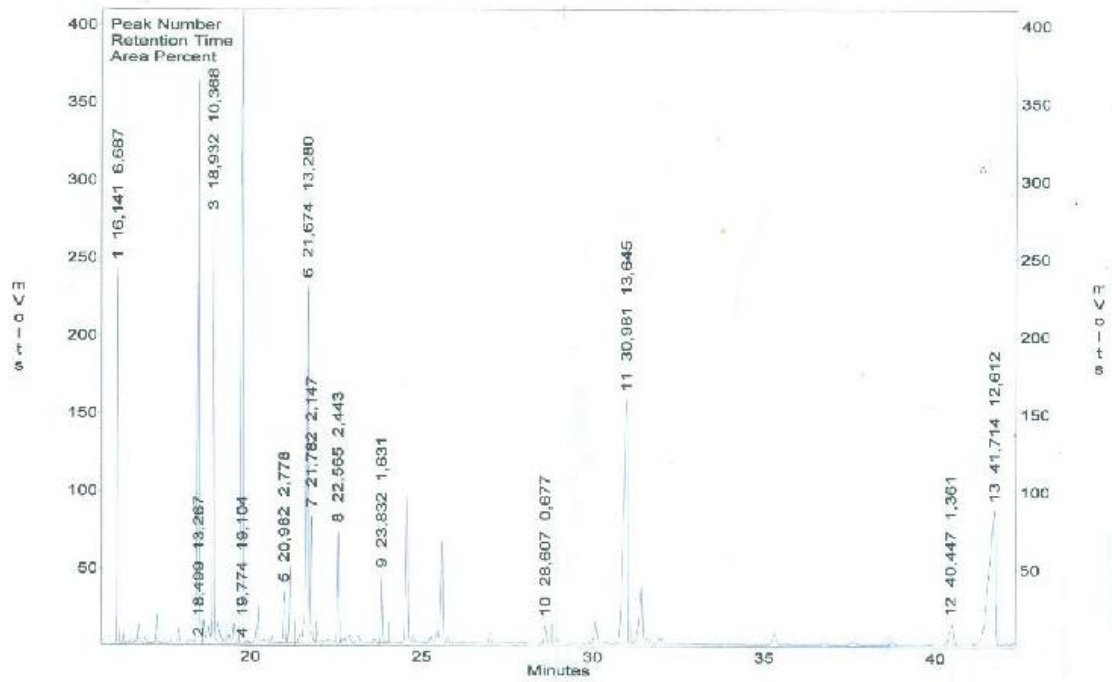
πειραματόζωα. Η λήψη ανταγωνιστών του PAF από τη διατροφή είναι ανώτερης ποιότητας, αφού είναι φυσικά προϊόντα και κατά συνέπεια δε θέτουν σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία σε αντίθεση με τις τοξικές παρενέργειες που παρουσιάζουν οι στατίνες.

Η παρούσα εργασία αποδεικνύει ότι τόσο τα ολικά πολικά όσο και τα ολικά ουδέτερα λιποειδή του μουρουνέλαιου είναι κύρια πηγή ω-3 λιπαρών οξέων, όπως τα DHA και EPA. Και στις δυο ομάδες λιποειδών η αναλογία ω-6/ω-3 λιπαρά οξέα είναι μικρότερη της μονάδας, γεγονός πολύ σημαντικό καθώς όταν η αναλογία αυτή είναι μικρότερη της μονάδας διατηρούνται χαμηλά επίπεδα πρόσληψης κορεσμένου λίπους και trans λιπαρών οξέων. Επίσης, η εργασία αυτή έδειξε ότι όλα τα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα του γάδου που περιέχονται στο μουρουνέλαιο καθώς και τα ολικά πολικά λιποειδή του παρουσιάζουν *in vitro* βιολογική δράση έναντι του PAF, γεγονός που αποτελεί άλλη μια ένδειξη της σημαντικής συμβολής των πολικών λιποειδών κατά των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Θα είχε ενδιαφέρον να μελετηθούν τα λιποειδή από τον γάδο, γιατί στο μουρουνέλαιο – από τον τρόπο απομόνωσης – παραλαμβάνονται κυρίως τα ουδέτερα λιποειδή και πολύ λίγα πολικά λιποειδή, τα οποία παρουσιάζουν και το μεγαλύτερο βιολογικό ενδιαφέρον. Προκειμένου να διαπιστωθεί αν τα βιολογικά δραστικά λιποειδικά κλάσματα του μουρουνέλαιου είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο, είναι απαραίτητο τα δραστικά αυτά λιποειδικά κλάσματα να μελετηθούν σε *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα, έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί ποιά λιποειδικά κλάσματα μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό των αθηρωματικών πλάκων στις αρτηρίες. Επίσης, σε επόμενο στάδιο, κρίνεται απαραίτητη η χρήση ενόργανων τεχνικών ανάλυσης, όπως συζευγμένη αεριοχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών (GC-MS) και φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR), που σκοπό θα έχουν την πιστοποίηση της δομής των βιολογικά δραστικών κλασμάτων. Και βέβαια θα πρέπει να γίνουν πειράματα με διατροφική παρέμβαση σε ανθρώπους για την τελική απόδειξη της δράσης των εν λόγω πολικών λιποειδών.

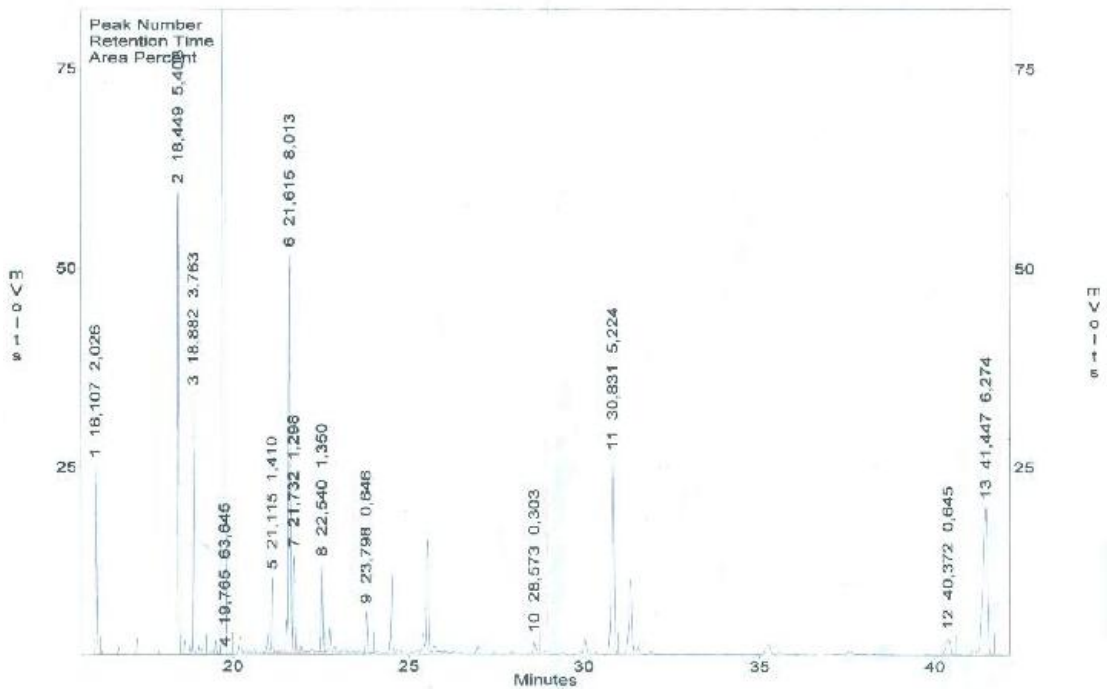
## ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AA: Αραχιδονικό οξύ
ACD: Αντιπηκτικό που περιέχει κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο και δεξτρόζη
BSA: Αλβουμίνη βοδινού ορού
CL: Καρδιολιπίνη
DHA: Εικοσιδιεξαενοϊκό οξύ
EC <sub>50</sub> : Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί συσώρευση ίση με το μισό της μέγιστης αντιστρεπτής συσώρευσης που προκαλεί πρότυπο διάλυμα PAF
EGTA: Αιθυλενο-γλυκολ-δισ-(β-αμινο-αιθυλο-αιθερο)-N'-τετραοξικό οξύ
EPA: Εικοσιπενταενοϊκό οξύ
FFA: Ελεύθερα λιπαρά οξέα
FID: Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας
GC: Αεριοχρωματογραφία
HDL: Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
HUFA: Λιπαρά οξέα υψηλής ακορεστότητας
IC <sub>50</sub> : Συγκέντρωση ουσίας που προκαλεί 50% αναστολή
LDL: Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
L-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη
L-PE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
GC-MS: Αεριοχρωματογραφία- Φασματομετρία Μαζών
MUFA: Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα
NL: Ουδέτερα λιποειδή
NMR: Φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού
Ox-LDL: Οξειδωμένη μορφή της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας
PA: Φωσφατιδικό οξύ
PAF : Παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων
PAF-AH: Ακετυλουδρολάση του PAF
PC: Φωσφατιδυλοχολίνη
PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη
PI: Φωσφατιδυλοϊννοσιτόλη
PL: Πολικά λιποειδή
PLA <sub>2</sub> : Φωσφολιπάσες A <sub>2</sub>
PS: Φωσφατιδυλοσερίνη
PUFA: Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα
SFA: Κορεσμένα λιπαρά οξέα
SM: Σφιγγομυελίνη
TAG: Τριακυλογλυκερόλες
TL: Ολικά λιποειδή
TLC: Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α



Εικόνα Α1. Χρωματογράφημα των PL του δείγματος μπουρουνέλαιου.



Εικόνα Α2. Χρωματογράφημα των NL του δείγματος μπουρουνέλαιου.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

**Πίνακας Β1.** Ταυτοποίηση των κορυφών των PL του δείγματος μουρουνέλαιου σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	Χρόνος έκλουσης (min)
14:0	16.141
16:0	18.499
16:1 (ω-7)	18.932
17:0 (Εσωτερικό πρότυπο)	19.774
18:0	20.982
18:1 cis	21.674
18:1 trans	21.782
18:2 (ω-6)	22.565
18:3 (ω-3)	23.832
20:4 (ω-6)	28.607
20:5 (ω-3)	30.981
22:5 (ω-3)	40.447
22:6 (ω-3)	41.714

**Πίνακας Β2.** Ταυτοποίηση των κορυφών των NL του δείγματος μουρουνέλαιου σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	Χρόνος έκλουσης (min)
14:0	16.107
16:0	18.449
16:1 (ω-7)	18.882
17:0 (Εσωτερικό πρότυπο)	19.765
18:0	21.115
18:1 cis	21.615
18:1 trans	21.732
18:2 (ω-6)	22.540
18:3 (ω-3)	23.798
20:4 (ω-6)	28.573
20:5 (ω-3)	30.831
22:5 (ω-3)	40.372
22:6 (ω-3)	41.447

Από την παρούσα ερευνητική εργασία έχει προκύψει η επιστημονική εργασία με τίτλο «Assessment of the *in vitro* antiatherogenic properties of Sardine (*Sardina pilchardus*) and Cod liver oil» και συγγραφείς τους Aggeliki Kyriazopoulou, Gregory Morphis, Eleni Sioriki, Maria Detopoulou, Constantina Nasopoulou, Constantinos A. Demopoulos and Ioannis Zabetakis που έχει υποβληθεί στο περιοδικό *European Journal of Lipid Science and Technology* προς δημοσίευση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 
- <sup>1</sup> Tucker, B.W., and Pigott, G.M., Fish Oils/ Composition and Properties in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd ed)*. Sea Resources Engineering Inc, Kirkland, WA, USA, 2003, pp. 2495–2501.
- <sup>2</sup> Wander, R.C., Du, S.H., Ketchum, S.O., and Rowe, K.E., Effects of interaction of RRR-alpha-tocopheryl acetate and fish oil on low-density-lipoprotein oxidation in postmenopausal women with and without hormone-replacement therapy. *Am J Clin Nutr* 1996, **63**(2), 184–193.
- <sup>3</sup> Rice, R., Fish Oils/ Dietary Importance in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd ed)*. The Fish Foundation, Tiverton, UK, 2003, pp. 2502–2509.
- <sup>4</sup> Simopoulos, A.P., The Mediterranean Diets: What Is So Special about the Traditional Diet of Greece? *J Nutr* 2001, **131**, 30655–30735.
- <sup>5</sup> 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.
- <sup>6</sup> Holdson, L., Skeaff, C.M., *et al*, The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. *Eur J Clin Nutr* 2001, **55**, 908–915.
- <sup>7</sup> Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., *et al* for the Nutrition Committee, AHA Scientific Statement: Fish consumption, fish oil, ω-3 fatty acids, and CVD. *Circulation* 2002, **106**, 2747–2757.
- <sup>8</sup> De Lorgeril, M., Salen, P., *et al*, Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications after Myocardial Infarction Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999, **99**, 779–785.
- <sup>9</sup> Burr, M.L., Gilbert, J.F., Holliday, R.M., *et al*, Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART). *Lancet* 1989, **344**, 757–761.

- 
- <sup>10</sup> Knapp, H.R., and FitzGerald, G.A., The antihypertensive effects of fish oil. A controlled study of polyunsaturated fatty acid supplements in essential hypertension. *N Engl J Med* 1989, **320**, 1037–1043.
- <sup>11</sup> Nasopoulou, C., Karantonis, H.C., Perrea, D.N., Theocharis, S.E., Iliopoulos, D.G., Demopoulos, C.A., and Zampetakis, I., In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits. *Food Chem* 2010, **120**(3), 831–836.
- <sup>12</sup> Tucker, B.W., and Pigott, G.M., Fish Oils/ Composition and Properties in *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd ed)*. Sea Resources Engineering Inc, Kirkland, WA, USA, 2003, pp. 2491–2495.
- <sup>13</sup> Ritter, J.M., and Taylor, G.W., Fish oil in asthma. *Thorax* 1988, **43**(2), 81–83.
- <sup>14</sup> Dawson, J.K., Abernethy, V.E., Graham, D.R., and Lynch, M.P., A woman who took cod-liver oil and smoked. *Lancet* 1996, **347**(9018), 1804.
- <sup>15</sup> Vessby, B., and Boberg, M., Dietary supplementation with n-3 fatty acids may impair glucose homeostasis in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Intern Med* 1990, **228**(2), 165–171.
- <sup>16</sup> Tracy, R.P., Diet and hemostatic factors. *Curr Atheroscler Rep* 1999, **1**(3), 243–248.
- <sup>17</sup> Clarke, J.T., Cullen-Dean, G., Regelink, E., Chan, L., and Rose, V., Increased incidence of epistaxis in adolescents with familial hypercholesterolemia treated with fish oil. *J Pediatr* 1990, **116**(1), 139–141.
- <sup>18</sup> Belluzzi, A., Brignola, C., Campieri, M., Pera, A., Boschi, S., and Miglioli, M., Effect of an enteric-coated fish-oil preparation on relapses in Crohn's disease. *N Engl J Med* 1996, **334**(24), 1557–1560.
- <sup>19</sup> Cairns, J.A., Gill, J., Morton, B., Roberts, R., Gent, M., Hirsh, J., Holder, D., Finnie, K., Marquis, J.F., Naqvi, S., and Cohen, E., Fish oils and low-



---

molecular-weight heparin for the reduction of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. The EMPAR Study. *Circulation* 1996, **94**(7), 1553–1560.

<sup>20</sup> Rothman, K.J., Moore, L.L., Singer, M.R., Nguyen, U.S., Mannino, S., and Milunsky, A., Teratogenicity of high vitamin A intake. *N Engl J Med* 1995, **333**(21), 1369–1373.

<sup>21</sup> Wetzel, D., Cod liver oil: notes on the manufacture of our most important dietary supplement. *Wise traditions Food* 2005, **6**: 22–27.

<sup>22</sup> Duan, Z., Kangsen, M., Qinghui, A., Milley, E.J., and Lall, P.S., Lipid and Fatty Acid Compositions of Cod (*Gadus morhua*), Haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) and Halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *J Ocean Univ China (Oceanic and Coastal Sea Research)* 2010, **9**, 381–388.

<sup>23</sup> Kurlansky, M., *Cod in Vintage*, London, UK, 1997.

<sup>24</sup> Lie, O.E., Lied, E., and Lambertsen, G., Liver retention of fat and of fatty acids in cod (*Gadus morhua*) fed different oils. *Aquaculture* 1986, **59**, 187–196.

<sup>25</sup> Cohen, M.D., Inada, T., Iwamoto, T., and Scialabba, N., FAO Fisheries Synopsis. Rome, 1990, vol. 10(125), pp. 442.

<sup>26</sup> [FAO, The cod www.fao.org/wairdocs/tan/x5911e/x5911e01.htm](http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5911e/x5911e01.htm)

<sup>27</sup> Calvano, C.D., Zambonin, C.G., Foti, C., Cassano, N., and Vena, G.A., A matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry investigation to assess the composition of cod liver oil based products which displayed a different in vivo allergenic power. *Food and Chemical Toxicology* 2008, **46**, 3580–3585.

<sup>28</sup> Curtis, C.L., *et al*, Biological basis for the benefit of nutraceutical supplementation e.g. cod liver oil in arthritis. *Drug Discov Today* 2004, **9**(7), 336.

- 
- <sup>29</sup> Gruenwald, J., Graubaum, H.J., and Harde, A., Effect of cod liver oil on symptoms of rheumatoid arthritis. *Adv Ther* 2002, **19**(2), 101–107.
- <sup>30</sup> Vitamin D has anti-cancer properties. *Earthtimes.org*. May 23, 2005.
- <sup>31</sup> Dyck, M.C., *et al*, The anticancer effects of Vitamin D and omega-3 PUFAs in combination via cod-liver oil: one plus one may equal more than two. *Med Hypotheses* 2011, **77**(3), 326–332.
- <sup>32</sup> Hünkar, T., Aktan, F., Ceylan, A., and Karasu, C., Antioxidants in Diabetes-Induced Complications (ADIC) Study Group. Effects of cod liver oil on tissue antioxidant pathways in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Cell Biochem Funct* 2002, **20**, 297–302.
- <sup>33</sup> Kumosani, T.A., *et al*, Modulatory effect of cod-liver oil on Na<sup>(+)</sup>-K<sup>(+)</sup> ATPase in rats' brain. *Hum Exp Toxicol* 2011, **30**(4), 267–274.
- <sup>34</sup> Roger, V.L., Go, A.S., Lloyd-Jones, D.M., *et al*, Executive Summary: heart disease and stroke statistics - 2012 update. *Circulation* 2012, **125**, 188–197.
- <sup>35</sup> Thom, T., Haase, N., Rosamond, W., Howars, V.J., Rumsfeld, J., Manolio, T., *et al*, Heart Disease and Stroke Statistics-2006 update: A Report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2006, **113**, 85–151.
- <sup>36</sup> Kuehn, K., *Claudii Galeni Opera Omnia Vol X*. Leipzig: Officina Libraria Car. Cnoblochii, 1825.
- <sup>37</sup> Lippincott, W., Wilkins, *Stedman's Medical Dictionary*, 27<sup>th</sup> ed., Kluwer, Baltimore, 2000.
- <sup>38</sup> Munro, J.M., and Cotran, R.S., The pathogenesis of atherosclerosis: Atherogenesis and inflammation. *Lab Invest* 1988, **58**, 249–261.
- <sup>39</sup> Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and

---

Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). *Journal of the American Medical Association* 2001, **285**, 2486–2497.

<sup>40</sup> Jonasson, L., Holm, J., Skall, O., Bondjers, G., and Hansson, G.K., Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986, **6**, 131–138.

<sup>41</sup> Van der Wal, A.C., Das, P.K., Van de Berg, D.B., Van der Loos, C.M., and Becker, A.E., Atherosclerotic lesions in humans. In situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989, **61**, 166–170.

<sup>42</sup> Ross, R., and Glomset, J.A., The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976, **295**, 369–377.

<sup>43</sup> Ross, R., and Glomset, J.A., The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976, **295**, 420–425.

<sup>44</sup> Ross, R., Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999, **340**, 115–126.

<sup>45</sup> Ronald, S., Keaney, F.J., J.R., Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews* 2004, **84**, 1381–1478.

<sup>46</sup> Kaperonis, E.A., Liapis, C.D., Kakisis, J.D., Dimitroulis, D., and Papavassiliou, V.G., Inflammation and Atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006, **31**, 386–393.

<sup>47</sup> Feletou, M., and Vanhoutte, M.P., Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006, **291**, 985–1002.

<sup>48</sup> Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., and Kihara, Y., Endothelial Function and Oxidative Stress in Cardiovascular Disease. *Circulation Journal* 2009, **73**, 411–418.

<sup>49</sup> Nievelstein, P.F.E.M., Fogelman, A.M., Mottino, G., and Frank, J.S., Lipid accumulation in rabbit aortic intima 2 hours after bolus infusion of low density

---

lipoprotein. A deep-etch and immunolocalization study of ultrarapidly frozen tissue. *Arterioscl Thromb* 1991, **11**, 1795–1805.

<sup>50</sup> Williams, K.J., Petrie, K.A., Brocia, R.W., and Swenson, T.L., Lipoprotein lipase modulates net secretory output of apolipoprotein B in vitro. A possible pathophysiologic explanation for familial combined hyperlipidemia. *J Clin Invest* 1991, **88**, 1300–1306.

<sup>51</sup> Williams, K.J., Fless, G.M., Petrie, K.A., Snyder, M.L., Brocia, R.W., and Swenson, T.L., Mechanisms by which lipoprotein lipase alters cellular metabolism of lipoprotein(a), low density lipoprotein, and nascent lipoproteins. Roles for low density lipoprotein receptors and heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 1992, **267**, 13284–13292.

<sup>52</sup> Tamminen, M., Mottino, G., Qiao, J.H., Breslow, J.L., and Frank, J.S., Ultrastructure of early lipid accumulation in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999, **19**, 847–853.

<sup>53</sup> Xu, X.X., and Tabas, I., Sphingomyelinase enhances low density lipoprotein uptake and ability to induce cholesteryl ester accumulation in macrophages. *J Biol Chem* 1991, **266**, 24849–24858.

<sup>54</sup> Ismail, N.A., Alavi, M.Z., and Moore, S., Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1994, **105**, 79–87.

<sup>55</sup> Vijayagopal, P., Srinivasan, S.R., Radhakrishnamurthy, B., and Berenson, G.S., Lipoprotein-proteoglycan complexes from atherosclerotic lesions promote cholesteryl ester accumulation in human monocytes/macrophages. *Arterioscl Thromb* 1992, **12**, 237–249.

<sup>56</sup> Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., and Brown, M.S., Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979, **76**, 333–337.

---

<sup>57</sup> Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., and Steinberg, D., Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, **81**, 3883–3887.

<sup>58</sup> Haberland, M.E., Fogelman, A.M., and Edwards, P.A., Specificity of receptor-mediated recognition of malonyldialdehyde-modified low density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, **79**, 1712–1716.

<sup>59</sup> Haberland, M.E., Olch, C.L., and Fogelman, A.M., Role of lysines in mediating interaction of modified low density lipoproteins with the scavenger receptor of human monocyte macrophages. *J Biol Chem* 1984, **259**, 11305–11311.

<sup>60</sup> Cushing, S.D., Berliner, J.A., Valente, A.J., Territo, M.C., Navab, M., Parhami, F., Gerrity, R., Schwartz, C.J., and Fogelman, A.M., Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, **87**, 5134–5138.

<sup>61</sup> Rajavashisth, T.B., Andalibi, A., Territo, M.C., Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., and Lusis, A.J., Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature* 1990, **344**, 254–257.

<sup>62</sup> Navab, M., Imes, S.S., Hama, S.Y., Hough, G.P., Ross, L.A., Bork, R.W., Valente, A.J., Berliner, J.A., Drinkwater, D.C., Laks, H., and Fogelman, A.M., Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein. *J Clin Invest* 1991, **88**, 2039–2046.

<sup>63</sup> Boring, L., Gosling, J., Cleary, M., and Charo, I.F., Decreased lesion formation in CCR2<sup>-/-</sup> mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 1998, **394**, 894–897.

- 
- <sup>64</sup> Gosling, J., Slaymaker, S., Gu, L., Tseng, S., Zlot, C.H., Young, S.G., Rollins, B.J., and Charo, I.F., MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* 1999, **103**, 773–778.
- <sup>65</sup> Quinn, 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987, **84**, 2995–2998.
- <sup>66</sup> McMurray, H.F., Parthasarathy, S., and Steinberg, D., Oxidatively modified low density lipoprotein is a chemoattractant for human T lymphocytes. *J Clin Invest* 1993, **92**, 1004–1008.
- <sup>67</sup> Stiko-Rahm, A., Hultgardh-Nilsson, A., Regnstrom, J., Hamsten, A., and Nilsson, J., Native and oxidized LDL enhances production of PDGF AA and the surface expression of PDGF receptors in cultured human smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 1992, **12**, 1099–1109.
- <sup>68</sup> Parums, D.V., Brown, D.L., and Mitchinson, M.J., Serum antibodies to oxidized low-density lipoprotein and ceroid in chronic periaortitis. *Arch Pathol Lab Med* 1990, **114**, 383–387.
- <sup>69</sup> Salonen, J.T., Ylä-Herttuala, S., Yamamoto, R., Butler, S., Korpela, H., Salonen, R., Nyssönen, K., Palinski, W., and Witztum, J.L., Autoantibody against oxidised LDL and progression of carotid atherosclerosis. *Lancet* 1992, **339**, 883–887.
- <sup>70</sup> Griffith, R.L., Virella, G.T., Stevenson, H.C., and Lopes-Virella, M.F., Low density lipoprotein metabolism by human macrophages activated with low density lipoprotein immune complexes A possible mechanism of foam cell formation. *J Exp Med* 1988, **168**, 1041–1059.
- <sup>71</sup> Klimov, A.N., Denisenko, A.D., Popov, A.V., Nagornev, V.A., Pleskov, V.M., Vinogradov, A.G., Denisenko, T.V., Magracheva, E., Kheifes, G.M., and

---

Kuznetzov, A.S., Lipoprotein-antibody immune complexes. Their catabolism and role in foam cell formation. *Atherosclerosis* 1985, **58**, 1–15.

<sup>72</sup> Virchow, R. *Cellular Pathology*. London: John Churchill, 1858.

<sup>73</sup> Witztum, J.L., The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *Lancet* 1994, **344**, 793–795.

<sup>74</sup> Loscalzo, J., *Molecular mechanisms of atherosclerosis*. Abingdon: Taylor & Francis, 2005.

<sup>75</sup> Barrett-Connor, E., Bush, T.L., Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 1991, **265**, 1861–1867.

<sup>76</sup> Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., and Vittinghoff, E., Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 1998, **280**, 605–613.

<sup>77</sup> Wilson, P.W., Kannel, W.B., Silbershatz, H., and D'Agostino, R.B., Clustering of metabolic factors and coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1999, **159**, 1104–1109.

<sup>78</sup> Doll, R., and Hill, A.B., Lung cancer and other causes of death in relation to smoking: a second report on the mortality of British doctors. *Br Med J* 1956, **2**, 1071–1081.

<sup>79</sup> English, J.P., Willius, F.A., and Berkse, N.J., Tobacco and coronary disease. *JAMA* 1940, **115**, 1327–1329.

<sup>80</sup> Hammond, E.C., and Horn, D., Smoking and death rates: report on forty-four months of follow-up of 187,783 men. 2. Death rates by cause. *J Am Med Assoc* 1958, **166**, 1294–1308.

---

<sup>81</sup> United States Department of Health and Human Services. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. Report Surgeon General *DHSS CDC 89–8411*, 1989.

<sup>82</sup> Gaziano, J.M., Epidemiology of risk factor reduction. In: *Vascular Medicine*, edited by Loscalzo, J., Creagher, M., Dzau, V., Boston, MA: Little Brown, 1996, 569–586.

<sup>83</sup> Pressure JNCoDoHB. The fifth report of the Joint National Committee on detection, evaluation and treatment of high blood pressure (JNC V). *Arch Intern Med* 1993, **153**, 154–183.

<sup>84</sup> MacMahon, S., Peto, R., Cutler, J., Collins, R., Sorlie, P., Neaton, J., Abbott, R., Godwin, J., Dyer, A., and Stamler, J., Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1. Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 1990, **335**, 765–774.

<sup>85</sup> Cowie, C.C., Rust, K.F., Byrd-Holt, D., Eberhardt, M.S., Saydah, S., Geiss, L.S., Engelgan, M.M., Ford, E.S., and Gregg, E.W., Prevalence of diabetes and impaired fasting glucose in adults—United States, 1999–2000. *MMWR* 2003, **52**, 833–837.

<sup>86</sup> Bierman, E.L., George Lyman Duff Memorial Lecture. Atherogenesis in diabetes. *Arterioscler Thromb* 1992, **12**, 647–656.

<sup>87</sup> Pyorala, K., Laakso, M., and Uusitupa, M., Diabetes and atherosclerosis: an epidemiologic view. *Diabetes Metab Rev* 1987, **3**, 463–524.

<sup>88</sup> Colwell, J.A., Lopes-Virella, M., and Halushka, P.V., Pathogenesis of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1981, **4**(1), 121-133.

<sup>89</sup> Gotto, A.M. Jr., and Grundy, S.M., Lowering LDL cholesterol: questions from recent meta-analyses and subset analyses of clinical trial Data. Issues from the Interdisciplinary Council on Reducing the Risk for Coronary Heart Disease, ninth Council meeting. *Circulation* 1999, **99**, 1-7.



---

<sup>90</sup> Gotto, A.M. Jr., and Farmer, J.A., Risk factors for coronary artery disease. In: Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine, edited by Braunwald E. Philadelphia, PA: Saunders 1988, pp1153–1190.

<sup>91</sup> Oram, J.F., Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta* 2000, **1529**, 321–330.

<sup>92</sup> Keizer, H.G., The “Mevalonate hypothesis”: A cholesterol independent alternative for the etiology of atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease* 2012, **11**, 149.

<sup>93</sup> Hanahan, D.J., Demopoulos, C.A., Liehr, J., and Pinckard, R.N., Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 1980, **255**, 5514–5516.

<sup>94</sup> Montrucchio, G., Sapino, A., Bussolati, B., Ghisolfi, G., Rizea-Savu, S., Silvestro, L., *et al*, Potential angiogenic role of platelet-activating factor in human breast cancer. *Am J Pathol* 1998, **153**, 1589–1596.

<sup>95</sup> Tsoupras, A.B., Iatrou, C., Frangia, C., and Demopoulos, C.A., The implication of platelet activating factor in cancer growth and metastasis: potent beneficial role of PAF-inhibitors and antioxidants. *Infect Disord Drug Targets* 2009, **9**, 390–399.

<sup>96</sup> Demopoulos, C.A., Karantonis, H.C., and Antonopoulou, S., Platelet activating factor – A molecular link between atherosclerosis theories. *European Journal of Lipid Science and Technology* 2003, **105**, 705–716.

<sup>97</sup> [http://www.chem.uoa.gr/research/PAF\\_engl.htm](http://www.chem.uoa.gr/research/PAF_engl.htm) (Τελευταία επίσκεψη Ιούνιος 2013).

<sup>98</sup> Νομικός, Τ., Μελέτη του μεταβολισμού του παράγοντα ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF) σε ανθρώπινο νεφρό και της συμμετοχής του στην πρόκληση σπειραματονεφρίτιδας. Διδακτορική Διατριβή, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, 2002.

---

<sup>99</sup> Νασσοπούλου Κ., Σύγκριση Λιποειδών με Αντιαθηρωματική Δραστικότητα στα Ψάρια: Τσιπούρα (*Sparus aurata*) και Λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) Ιχθυοτροφείου και Ελεύθερης Αλιείας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας, Αθήνα, 2005.

<sup>100</sup> Ninio, E., and Joly, F., Transmembrane signalling and pafacether biosynthesis, *Lipids* 1991, **26**, 1034–1037.

<sup>101</sup> Pinckard, R.N., Woodard, D.S., Showell, H.J., Conklyn, M.J., Novak, M.J., and McManus, L.M., Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin Rev Allergy* 1994, **12**, 329–359.

<sup>102</sup> Δημόπουλος Κ., Παραδόσεις Μεταπτυχιακού μαθήματος: *Διατροφή*, [http://www.chem.uoa.gr/courses/Undergraduate/Diatrofi/Post\\_Diatrofi.htm](http://www.chem.uoa.gr/courses/Undergraduate/Diatrofi/Post_Diatrofi.htm)

<sup>103</sup> Brown, M.S., and Goldstein, J.L., *Annu Rev Biochem* 1983, **52**, 223–261.

<sup>104</sup> Marathe, G.K., Davies, S.S., Harrison, K.A., Silva, A.R., Murphy, R.C., Castro-Faria-Neto, H., *et al*, Inflammatory plateletactivating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem* 1999, **274**, 28395–28404.

<sup>105</sup> Tsoukatos, D.C., Liapikos, T.A., Tselepis, A.D., Chapman, M.J., and Ninio, E., Mechanisms of PAF formation upon coppercatalyzed oxidation of human LDL. *Atherosclerosis* 1999, **144**(1), 1–23.

<sup>106</sup> Δημόπουλος Κ., Αντωνοπούλου Σ., *Βασική Βιοχημεία*, Αθήνα, 2000.

<sup>107</sup> Snyder, F., Platelet activating factor: the biosynthetic and catabolic enzymes. *Biochem J* 1995, **305**, 689–705.

<sup>108</sup> Stephen, M., Prescott, M.D., Thomaw, M., McIntyre, M.D., Guy, A., Zimmerman, M.D., and Stafforini, M.D., *Japanese Circulation Journal* 1996, **60**, 137–140.

<sup>109</sup> Liapikos, T.A., Antonopoulou, S., Karabina, S.A.P., Tsoukatos, D.C., Demopoulos, C.A., and Tselepis, A.D., *Biochim Biophys Acta*, 1994, **1212**, 353–360.

- 
- <sup>110</sup> Δημόπουλος Α. Κ., Αντωνοπούλου Σ., *Βασική Βιοχημεία* 2000, 181–192.
- <sup>111</sup> Sanders, T.A., Marine oils: metabolic effects and role in human nutrition. *Proc Nutr Soc* 1993, **52**(3), 457–472.
- <sup>112</sup> Sanders, T.A., and Roshanai, F., The influence of different types of omega 3 polyunsaturated fatty acids on blood lipids and platelet function in healthy volunteers. *Clin Sci (Lond)* 1983, **64**(1), 91–99.
- <sup>113</sup> Din, J.N., Newby, D.E., and Flapan, A.D., Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease – fishing for a natural treatment. *British Medical Journal* 2004, **328**, 30–35.
- <sup>114</sup> Russo, L.G., Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical pharmacology* 2009, **77**, 937–946.
- <sup>115</sup> Engler, M.M., and Engler, B.M., Omega-3 Fatty Acids: Role in Cardiovascular Health and Disease. *Journal of Cardiovascular Nursing* 2006, **21**, 17–24.
- <sup>116</sup> Kris–Etherton, P.M., Harris, W.S., and Appel, L.J., Fish consumption, fish oil, omega–3 fatty acids and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2003, **23**, 20–31.
- <sup>117</sup> Tamura, Y., Hirai, A., Terano, T., and Yoshida, S., Clinical and epidemiological studies of ω–3 polyunsaturated fatty acids in Japan. *Nutritional support in organ failure: proceedings of the International Symposium* 1990, **836**, 89–95.
- <sup>118</sup> Dyerberg, J., Bang, H.O., Stoffersen, E., *et al*, Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis *Lancet* 1978, **2**, 117–119.
- <sup>119</sup> Saravanan, P., Davidson, N.C., Schmidt, E.B., and Calder, P.C., Cardiovascular effects of marine omega–3 fatty acids. *Lancet* 2010, **376**, 540–550.

- 
- <sup>120</sup> Mayer, K., Merfels, M., Muhly–Reinholz, M., Gokorsch, S., Rosseau, S., Lohmeyer, J., *et al*,  $\omega$ -3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology* 2002, **283**, 811–818.
- <sup>121</sup> Nomikos, T., Karantonis, H.C., Skarvelis, C., Demopoulos, C.A., and Zabetakis, I., Antiatherogenic properties of lipid fractions of raw and fried fish. *Food Chemistry* 2006, **96**, 29–35.
- <sup>122</sup> Panayiotou, A., Samartzis, D., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Karantonis, H.C., Demopoulos, C.A., *et al*, Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod (*Gadus morhua*): correlation with platelet-activating factor and atherogenesis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000, **48**, 6372–6379.
- <sup>123</sup> Rementzis, J., Antonopoulou, S., and Demopoulos, C.A., Identification and study of gangliosides from *Scomber scombrus* muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997, **45**, 611–615.
- <sup>124</sup> Fragopoulou, E., Antonopoulou, S., and Demopoulos, C.A., Biologically active lipids with antiatherogenic properties from white wine and must. *J Agric Food Chem* 2002, **50**, 2684–2694.
- <sup>125</sup> Antonopoulou, S., Semidalas, C.E., Koussissis, S., and Demopoulos, C.A., Platelet-activating factor (PAF) antagonists in foods: a study of lipids with PAF or anti-PAF like-activity in cow's milk and yoghurt. *J Agr Food Chem* 1996, **44**, 3047–3051.
- <sup>126</sup> Nasopoulou, C., Nomikos, T., Demopoulos, C.A., and Zabetakis, I., Comparison of antiatherogenic properties of lipids obtained from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chem* 2007, **100**, 560–567.
- <sup>127</sup> Koussissis, S.G., Semidalas, C.E., Hadzistavrou, E.C., Kalyvas, V., Antonopoulou, S., and Demopoulos, C.A., PAF antagonists in foods: isolation and identification of PAF in honey and wax. *Revue Francaise des Corps Gras* 1994, **41**, 127–132.

- 
- <sup>128</sup> Koussissis, S.G., Semidalas, C.E., Antonopoulou, S., Kapoulas, V.M., Demopoulos, C.A., and Kalyvas, V., PAF antagonists in foods: isolation and identification of PAF antagonists in virgin olive oil. *Revue Francaise des Corps Gras* 1993, **40**, 323–327.
- <sup>129</sup> Karantonis, H.C., Antonopoulou, S., Perrea, D.N., *et al*, In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbits. *Nutr Metab Cardiovas* 2006, **16**, 174–185.
- <sup>130</sup> Tsantila, N., Karantonis, H.C., Perrea, D.N., *et al*, Atherosclerosis regression in rabbits upon olive pomace polar lipid extract administration. *Nutr Metab Cardiovas* 2010, **20**, 740–747.
- <sup>131</sup> Tsantila, N., Karantonis, H.C., Perrea, D.N., *et al*, Antithrombotic and antiatherosclerotic properties of olive oil and olive pomace polar extracts in rabbits. *Mediators Inflamm* 2007, **2007**, 1–11.
- <sup>132</sup> Nasopoulou, C., Stamatakis, G., Demopoulos, C.A., and Zabetakis, I., Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* 2011, **129**, 1108–1113.
- <sup>133</sup> Nasopoulou, C., Karantonis, H.C., Perrea, D.N., *et al*, In vivo anti-atherogenic properties of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) polar lipid extracts in hypercholesterolaemic rabbits. *Food Chem* 2010, **120**, 831–836.
- <sup>134</sup> Skoog, A.D., Holler, F.J., Nieman, A.T., Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, *Εκδόσεις Κωσταντάκη* 2007, pp. 816– 888.
- <sup>135</sup> Galanos, D.S., Kapoulas, V.M., Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *J Lipid Res* 1962, **3**, 134–137.
- <sup>136</sup> Νασοπούλου, Κ., Μελέτη των δραστικών λιποειδών ψαριών ιχθυοτροφείου και ελεύθερης αλιείας ως προς τα καρδιαγγειακά νοσήματα, *Διδακτορική*

---

διατριβή, Τμήμα χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 2009.

<sup>137</sup> Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N., and Hanahan, D.J., Platelet-Activating Factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphoryl- choline as the active component. (A new class of lipid chemical mediators). *J Biol Chem* 1979, **254**, 9355–9358.

<sup>138</sup> Νασοπούλου, Κ., Νικολάου, Σ., Ζαμπετάκης, Ι., *Τεχνολογία Τροφίμων*, Αθήνα, 2010.

<sup>139</sup> Pigott, G.M., and Tucker, B.W., Fish Oils/ Production in Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (2nd ed). *Sea Resources Engineering Inc* Kirkland, WA, USA, 2003, pp. 2491–2495.

<sup>140</sup> Rubio-Rodriguez, N., de Diego, M. S., Beltran, S., Jaime, I., Sanz, M.T., and Rovira, J., Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. *Journal of Food engineering* 2012, **109**, 238–248.

<sup>141</sup> Ackman, R.G., Nutritional composition of fats in seafoods. *Prog Food Nutr Sci* 1989, **13**, 161–241.

<sup>142</sup> Simopoulos, A., The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 2002, **56**, 365–379.

<sup>143</sup> Simopoulos, A.P., The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Biol Med* 2008, **233**(6), 674–688.

<sup>144</sup> Simopoulos, A.P., Essential Fatty Acids in Health and Chronic Disease. *Am J Cl Nutr* 1999, **70**, 560–569.

<sup>145</sup> Samples, L., Pool, G.L., and Lumb, R.H., Subcellular localization of enzyme activities involved in the metabolism of platelet-activating factor in rainbow trout leukocytes. *Biochimica and Biophysica Acta* 1999, **1437**, 357–366.

- 
- <sup>146</sup> Summers, B., Al-Hassan, J.M., Thomson, M., Chun, A., and Criddle, R.S., Platelet activating factor (AGEPC) from epidermal secretions of the Arabian Gulf catfish, (*Arius bilineatus*), which stimulate wound healing. *Biochimica and Biophysica Acta* 1991, **1091**, 329–336.
- <sup>147</sup> Nomikos, T., Karantonis, C.H., Skarvelis, C., Demopoulos, A.C., and Zabetakis I., Antiatherogenic properties of lipid fractions of raw and fried fish. *Food Chemistry* 2006, **96**(1), 29–35.
- <sup>148</sup> Nasopoulou, C., Karantonis, C.H., Andriotis M., Demopoulos, A.C., and Zabetakis I., Antibacterial and anti-PAF activity of lipid extracts from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) *Food Chemistry* 2008, **111**(2), 433–438.
- <sup>149</sup> Nasopoulou, C., Smith, T., Detopoulou, M., Tsikrika, C., Papaharisis, L., Barkas, D., Zabetakis, I., Structural elucidation of olive pomace fed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) polar lipids with cardioprotective activities. *Food Chemistry* 2013, In Press, Accepted Manuscript, Available online 31 August 2013.
- <sup>150</sup> Tsantila, N., Karantonis, H.C., Perrea, D.N., *et al*, Atherosclerosis regression in rabbits upon olive pomace polar lipid extract administration. *Nutr Metab Cardiovas* 2010, **20**, 740–747.
- <sup>151</sup> Nasopoulou, C., Stamatakis, G., Demopoulos, C.A., and Zabetakis, I., Effects of olive pomace and olive pomace oil on growth performance, fatty acid composition and cardio protective properties of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Chemistry* 2011, **129**, 1108–1113.
- <sup>152</sup> 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.

---

<sup>153</sup> Karantonis, H.C., Tsantila, N., Antonopoulou, S., Perrea, D.N., Sokolis, D.P., Theocharis, S.E., *et al*, In vivo antiatherogenic properties of olive oil and its constituent lipid classes in hyperlipidemic rabbit. *Chemistry and Physics of Lipid* 2004, **130**, 59.