

# Fish against thrombosis? : dietary fish and cardiovascular risk profile

## Citation for published version (APA):

van Houwelingen, A. C. (1988). Fish against thrombosis? : dietary fish and cardiovascular risk profile. Maastricht: Rijksuniversiteit Limburg.

## Document status and date:

Published: 01/01/1988

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

# Summary

---

Atherosclerosis is the most important cause of cardiovascular death in Western industrialized countries and already since the beginning of this century a relation between cardiovascular disease and nutrition was suggested. Recent evidence suggest that diets rich in fish and fish-products (containing fatty acids of the n-3 type) are beneficial in the prevention of ischemic cardiac and vascular disease. A careful screening of the literature (Chapter 1) reveals, however, that the results of epidemiological studies on the relation between fish consumption and cardiovascular disease are ambiguous and inconclusive. These studies have, nevertheless, initiated many human intervention trials to investigate the effects of n-3 fatty acids on variables involved in the cardiovascular risk profile. The significance of these trials, however, is seriously reduced by several shortcomings in their design: in only one third of these studies an adequate control group had been included. Therefore, the results of the other two third cannot be interpreted correctly.

In this thesis first the hypothesis that habitual fish consumption might be related to coronary heart disease through an effect on platelet functions and fibrinolysis, was tested in a selection of the study population, which belonged to the Dutch cohort of the Seven Countries Study (Chapter 2).

Forty healthy elderly men were selected on the basis of their fish consumption over the last 26 years. In the high-fish group ( $n = 25$ ) fish consumption was on average 33 g; in the low-fish group ( $n = 15$ ) it was on average 2 g per person per day. This difference was reflected by significant differences in the concentrations of timnodonic acid (20:5 n-3) and cervonic acid (22:6 n-3) in the serum phospholipids of the participants. Between both groups no significant differences were observed in cutaneous bleeding time, platelet number, and collagen induced platelet aggregation and ATP-release in whole blood. The same holds for the actual as well as the potential  $\text{TxB}_2$ -formation of activated platelets and for the activity of the plasminogen activator inhibitor. For most of the platelet-related variables a trend was found for a lower activity in the high-fish group. Therefore changes in platelet function might not explain, but may have slightly contributed to the inverse relationship between coronary heart disease and fish consumption, as observed in Zutphen.

To evaluate the validity of the cross-check dietary history method for the assessment of the habitual intake of polyunsaturated fatty acids from fish, as performed in the above mentioned study, the relationship was investigated between the estimated intake of these fatty acids and their relative amounts in the various serum lipid frac-

tions. The fatty acid compositions of total lipids, phospholipids, triglycerides and cholesterolesters was determined in fasting serum samples. Although correlations between the calculated dietary intake of timnodonic acid (20:5 n-3, TA) and cervonic acid (22:6 n-3, CA), on the one hand, and the relative amounts of these fatty acids in the various serum lipid fractions on the other, appeared to be statistically significant, no more than about 20% of the variance in the serum values could be explained on the basis of dietary intake. For linoleic acid (18:2 n-6, LA) this was 55%. It is concluded that the cross-check dietary history method is an acceptable technique for estimating the habitual intake of linoleic acid of a given individual. For the fish-related fatty acids, however, this method is less reliable. This most probably results from the large differences in TA and CA content in similar foods. In addition, a negative association with the calculated LA intake on the proportional amount of TA for most of the serum lipid fractions was demonstrated. This indicates an interference of dietary LA with the metabolism of TA (Chapter 3).

Secondly we performed a well-controlled intervention study in which the effect of a reasonable amount of dietary fish on a number of risk indicators of ischemic heart and vessel disease was investigated.

Chapter 4 describes the outline and first results of this international study which was performed within the framework of the international working party: "Fish against thrombosis?"

In Maastricht, Tromsø, and Zeist healthy male volunteers were given a dietary supplement containing 100 g of mackerel or meat per day for a 6 week period. Compliance was monitored on the basis of the urinary excretion of lithium, added to the supplements. Average compliance was ca. 80%, which resulted in a daily intake of 1.4 g timnodonic acid (20:5 n-3) and 2.4 g cervonic acid (22:6 n-3) in the mackerel group. Compliance decreased slightly in time.

Systolic blood pressure decreased in both groups to a comparable degree; consequently no specific effect of the fish supplement was observed. The fish supplement significantly prolonged the bleeding time. Hematology was hardly affected, but platelet counts decreased significantly. No indications were obtained for adverse effects of the fish supplement.

In Chapter 5 the effects of a fish enriched diet on serum lipids, apolipoproteins A-1 and B, and the fatty acid compositions of serum triglycerides and cholesterolesters are described. LDL- and total serum cholesterol concentrations were unaffected. HDL cholesterol increased to a comparable degree in both the mackerel and the control group; thus no specific fish effect was observed. Triglyceride content of serum decreased in the fish group as compared with the control group. Apolipoproteins A-1 and B (Maastricht only) were only slightly affected. In the mackerel group the n-3 fatty acids increased significantly in the serum cholesterolesters and triglycerides; the n-6 fatty acids decreased in the cholesterolesters only.

In Chapter 6 the effect of dietary fish on platelet aggregation in platelet rich plasma (PRP), induced by collagen and thrombin is reported. Platelet number in PRP decreased significantly in the fish group. Collagen-induced platelet aggregation in PRP differed widely between the three centres despite the attempt to use exactly the same conditions. Nonetheless, aggregation decreased significantly in the fish group. The mackerel effect on thrombin-induced aggregation was inconsistent.

In Chapter 7 the effect of a reasonable amount of dietary fish on collagen induced platelet aggregation and ATP release in citrated whole blood is described. These measurements were performed in Maastricht only. The mackerel supplement had a weak, but significant inhibitory effect on collagen induced platelet aggregation (impedance method) and ATP release (firefly assay) in whole blood. Platelet release was significantly related to the compliance.

In Chapter 8 the results are given of the influence of the dietary fish on the various aspects of eicosanoid formation and metabolism. In collagen-activated platelet rich plasma the potency of blood platelets to produce cyclo-oxygenase and lipoxygenase-dependent monohydroxy fatty acids from endogenous arachidonic acid (HHT and HETE) was significantly reduced in the mackerel group as compared with the control group, whereas the formation of products derived from endogenous timnodonic acid (HHTE and HEPE) significantly increased. Changes in the formation of HHT and HHTE, measured by HPLC, correlated significantly with those of  $\text{TxB}_2$  and  $\text{TxB}_3$ , respectively, measured by GC/MS. Formation of immono reactive  $\text{TxB}_2$  and 6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  in clotting blood showed comparable significant decreases, both in the mackerel group and the control group, leaving the ratio between the two compounds unchanged. Mackerel consumption was associated with the formation of considerable amounts of PGI<sub>3</sub>, as judged from the appearance of 2,3-dinor-17-6-keto-PGF<sub>3 $\alpha$</sub>  in urine. Moreover, the amount of the major metabolite of PGI<sub>2</sub>, 2,3-dinor-6-keto-PGF<sub>1 $\alpha$</sub>  increased considerably in the urine in striking association with PGI<sub>3</sub>. The total daily turnover of PGE and PGF (as reflected by the amount of tetranor prostanedioic acid in the urine) did not change in the mackerel-supplemented volunteers. Therefore the findings with respect to PGI<sub>2</sub>-M may result from a change in the metabolism rather than from an increase in turnover rate of PGI<sub>2</sub> upon fish consumption.

In Chapter 9 the results of dietary fish on the coagulation tendency of blood and on the procoagulant activity of monocytes are reported. We did not observe a significant effect of the fish supplement on the prothrombin time or on the levels of factor VII, activated factor VII, antithrombin III, von Willebrand factor, fibrinogen. An indication of a slight, but transient compliance-related prolongation in the partial thromboplastin time was observed. Moreover, a significant increase of the factor X level with prolongation of the experimental period was noticed; no activated factor X was found. A tendency towards a stimulation of monocyte procoagulant

activity by the fish supplement was also found, which was also related to the dietary adherence.

Fibrinolytic parameters (Chapter 10) were determined in plasma samples obtained at the beginning as well as at the end of the experimental period. No changes were found in plasminogen,  $\alpha_2$ -antiplasmin, tissue-type plasminogen activator (t-PA) antigen and euglobulin t-PA activity.

In the control group, no change in plasminogen activator inhibitor activity was found. In the fish group, however, total plasma plasminogen activator inhibitor activity increased by 45 percent, due to a 71 percent increase in plasminogen activator inhibitor type-1. This increase could not be ascribed to a diet-induced acute phase reaction and could not be explained by changes in serum triglycerides or insulin. The results caution against the use of fish-enriched diets by people with low endogenous fibrinolytic activity.

In general the effects of dietary n-3 fatty acids on human health are not very convincing. This is in contrast to the promising results of many epidemiological studies which, however, may have been confounded by a low intake of saturated fatty acids. From our study it is concluded that a reasonable amounts of dietary fish prolongs the bleeding time, decrease serum triglyceride content, lower platelet aggregability in response to collagen, diminish thromboxane B<sub>2</sub> production in clotting blood, reduce PGI<sub>2</sub> content of serum, decrease platelet number, and increase the activity of the major plasminogen activator inhibitor. The meaning of these results in relation to a decrease in cardiovascular risk is dubious. It cannot be excluded, however that a long-term (life-long) influence of a small amount of dietary fish may contribute to a lower cardiovascular risk.

# Samenvatting

---

Hart- en vaatziekten zijn de belangrijkste doodsoorzaak in geïndustrialiseerde landen. Sinds het begin van deze eeuw wordt er een verband verondersteld tussen voeding en hart- en vaatziekten. Uit epidemiologisch onderzoek is de indruk ontstaan dat voeding rijk aan vis en andere zee- en zoetwaterdieren van belang zou kunnen zijn bij de bestrijding van deze ziekten. Een nadere bestudering van deze epidemiologische onderzoeken toonde echter aan dat de resultaten tegenstrijdig zijn (hoofdstuk 1). Desalniettemin hebben deze epidemiologische bevindingen veel onderzoek op gang gebracht naar de invloed van visvetzuren op de risicofactoren van hart- en vaatziekten. Het merendeel van deze onderzoeken bleek echter niet betrouwbaar te zijn omdat een goede controlegroep ontbrak.

Hart- en vaatziekten zijn ondermeer het gevolg van trombose in de slagaders. Bloedplaatjes, de kleinste in het bloed voorkomende cellen, vervullen hierbij een essentiële rol doordat ze in staat zijn aan de wand van het bloedvat en aan elkaar te kleven (aggregeren). Op deze wijze dragen ze bij aan het langzaam dichtslibben van slagaders; zelfs kunnen ze een plotselinge verstopping daarvan veroorzaken.

In dit proefschrift worden twee eigen onderzoeken beschreven. In het eerste onderzoek wordt de hypothese getoetst dat langdurige (habituële) visconsumptie de sterfte aan hart- en vaatziekten beïnvloedt door middel van een invloed op de functie van bloedplaatjes en op de fibrinolyse. Voor dit onderzoek werden mensen uitgenodigd die reeds betrokken zijn bij een langdurig onderzoek in Zutphen. Veertig mannen met een stabiele visconsumptie gedurende de afgelopen 26 jaar werden in twee groepen verdeeld. In de groep met de hoge visconsumptie (25 personen) werd gemiddeld 33 g vis per dag per persoon gegeten. De groep met de lage visconsumptie (15 personen) at gemiddeld 2 g vis per dag per persoon. Dit verschil in visconsumptie was ook waar te nemen in het bloed van de vrijwilligers. De hoeveelheid visvetzuren (timnodonzuur (20:5 n-3) en cervonzuur (22:6 n-3)) in het bloed (serum fosfolipiden) was in de groep met de hoge visconsumptie hoger dan in de groep met de lage visconsumptie. Door middel van statistische berekeningen wordt aangetoond dat deze verschillen echt zijn (signifikaant) en niet op toeval berusten. We konden echter geen verschil tussen beide groepen aantonen in bloedingstijd, aantal bloedplaatjes en functies van bloedplaatjes. Het leek er echter wel op dat de bloedplaatjes van de mannen in de hoge visgroep wat minder actief waren. Op grond van deze resultaten kunnen we het verband tussen de sterfte aan hart- en vaatziekten en visconsumptie, zoals waargenomen in Zutphen niet verklaren. We kunnen echter niet geheel uitslui-

ten dat een kleine hoeveelheid vis in de voeding op de lange duur toch een bijdrage levert aan een vermindering van het risico voor hart- en vaatziekten (hoofdstuk 2).

Op grond van een vragenlijst over het dieet is bij deze mensen berekend hoeveel timnodonzuur en cervonzuur per persoon per dag gegeten werd. In het bloed zijn de concentraties van deze beide vetzuren gemeten. Per persoon was de relatie tussen de berekende en de gemeten hoeveelheid visvetzuren niet duidelijk. Een van de redenen hiervoor zou kunnen zijn dat de hoeveelheid visvetzuren in dezelfde soort vis sterk kan variëren en het dus erg moeilijk is precies vast te stellen hoeveel van een bepaald vetzuur iemand binnen krijgt. Het lijkt dus beter dit in het bloed te meten.

Voor een ander onverzadigd vetzuur, linolzuur (18:2 n-6), was het verband tussen de hoeveelheid bepaald via de vragenlijst en de concentratie in het bloed veel duidelijker. Bovendien bleek dat de hoeveelheid linolzuur in de voeding van invloed is op de inbouw van timnodonzuur (hoofdstuk 3). Bij het vergelijken van de berekende en de gemeten hoeveelheid timnodonzuur zullen we hiermee rekening moeten houden.

Het tweede onderzoek dat in dit proefschrift wordt beschreven is een study naar de invloed van een dagelijkse portie van 100 g vis in de voeding op een aantal risikofactoren voor hart- en vaatziekten. Deze hoeveelheid vis kwam overeen met ca. 6 g visvetzuren per dag. In Maastricht, Zeist en het Noorse Tromsø werden ruim 80 gezonde mannen van 18-45 jaar voor het onderzoek geselecteerd. Aan ongeveer veertig mannen werd gevraagd om gedurende 6 weken dagelijks een blikje makreelpaté te eten. De andere veertig kregen als controle een blikje vlees. Aan het begin van de proef werd een serie metingen gedaan, die na 3 en 6 weken herhaald werd. De tijdens de proefperiode optredende veranderingen in de visgroep werden vergeleken met de veranderingen die in de controlegroep optraden.

Bij alle vrijwilligers werd regelmatig gecontroleerd of zij de voedingssupplementen ook werkelijk opaten. Dit werd gedaan door een bekende hoeveelheid van een geschikte merkstof (een lithiumzout) aan de supplementen toe te voegen, en de uitscheiding hiervan in de urine te bepalen. Gemiddeld bleek dat de vrijwilligers ongeveer 80 % van de hoeveelheid die ze moesten eten ook werkelijk hebben gegeten (hoofdstuk 4).

Een van de belangrijkste risikofactoren voor hart- en vaatziekten is een te hoge bloeddruk. We hebben in ons onderzoek dan ook nauwkeurig het bloeddrukverloop van de proefpersonen gevolgd, maar van enig specifiek effect door het vis-supplement was geen sprake (hoofdstuk 4).

Een belangrijke risikofactor voor hart- en vaatziekten is de hoeveelheid cholesterol in het bloed: een bepaalde cholesterolfractie (het LDL-cholesterol) houdt direkt verband met het hart-vaat risico. Dit LDL-cholesterol veranderde in de visgroep echter niet.

Een andere vet-fractie in het bloed, de triglyceriden, daalde wel significant bij de mensen die het vissupplement aten. Door sommige deskundigen wordt dit gezien als een daling van het hart-vaat risico; anderen daarentegen, menen dat het triglyceridegehalte van het bloed geen betekenis heeft voor het ontstaan en verloop van hart- en vaatziekten (hoofdstuk 5).

De aggregatie-neiging van bloedplaatjes kan op verschillende manieren worden gemeten. Eén manier is het meten van de bloedingstijd (de tijd dat een klein huidwondje blijft bloeden). De bloedingstijd was na 6 weken in de visgroep significant verlengd (hoofdstuk 4).

Ook op andere wijze gemeten deed het eten van vis de aggregatieneiging van bloedplaatjes afnemen en dat zou op den duur een verminderd risico voor hart- en vaatziekten kunnen betekenen. De waargenomen effecten waren echter gering, en het is dan ook de vraag of ze op zich voldoende zijn om ook inderdaad een risikovermindering tot stand te brengen (hoofdstuk 6 en 7).

In hoofdstuk 8 zijn de resultaten beschreven van de invloed van vis in het dieet op een aantal hormoonachtige stoffen die uit vetzuren worden gemaakt, de prostaglandinen. Dit zijn stoffen die allerlei processen in ons lichaam voortdurend regelen. Bloedplaatjes maken een soort prostaglandine (thromboxaan  $A_2$  dat de aggregatie doet toenemen; de vaatwand produceert een prostaglandine (prostacycline  $I_2$  dat de aggregatie tegengaat. Onder invloed van de visvetzuren bleken de bloedplaatjes een andere soort thromboxaan (thromboxaan  $A_3$  te maken. Deze stof doet de aggregatie veel minder toenemen dan het thromboxaan  $A_2$ , dat onder invloed van visvetzuren in mindere mate gemaakt bleek te worden. De vaatwand maakt óók een ander soort prostacycline ten gevolge van het eten van vis: prostacycline  $I_3$ . Deze stof gaat de aggregatie in dezelfde mate tegen als het prostacycline  $I_2$ . In totaal betekenen deze veranderingen dat er onder invloed van de vissupplementen een afname van de aggregatieneiging plaatsvond.

Het dichtslibben van de slagaders, waarvan een groot deel van de hart- en vaatziekten het gevolg zijn, wordt niet alleen veroorzaakt door samenklonterende bloedplaatjes, ook het optreden van bloedstolling speelt hierbij een belangrijke rol. Het eindprodukt van het stollingsproces, fibrine, vormt als het ware een netwerk dat optredende verstoppingen verstevigt, waardoor deze nauwelijks nog te verwijderen zijn. In het bloed bevindt zich ook een systeem dat fibrine kan oplossen (fibrinolyse) en zolang bloedstolling en fibrinolyse elkaar in evenwicht houden, zijn er geen problemen te verwachten. Een toegenomen stollingsproces of een minder actieve fibrinolyse kan echter wel bijdragen aan het ontstaan van hart- en vaatziekten en omgekeerd kunnen hart- en vaatziekten mogelijk worden tegengegaan door een verminderde stollingsneiging van het bloed en/of een sterkere fibrinolyse.

In ons onderzoek hebben wij de invloed van het vissupplement op zowel bloedstolling (hoofdstuk 9) als fibrinolyse (hoofdstuk 10) nauwkeurig bestudeerd. Beide pro-



cessen verlopen in een groot aantal opeenvolgende stappen die op een ingewikkelde manier in elkaar grijpen. De meeste van die deelprocessen werden afzonderlijk bestudeerd. Daarnaast zijn bloedstolling en fibrinolyse ook als totaalproces bekeken. Het vissupplement bleek hierop nauwelijks enige invloed te hebben. Het fibrinolyseonderzoek is uitgevoerd in samenwerking met Dr. J. Emeis van het Gaubius Instituut te Leiden. Zoals gezegd, op het fibrinolyseproces als geheel had het vissupplement geen significante invloed, maar wel op de activiteit van een van de reguleringsfactoren. Het bleek namelijk dat de activiteit van een natuurlijke, in het bloed voorkomende remmer van de fibrinolyse sterk was toegenomen bij mensen die het vissupplement gebruikten. Aangezien de fibrinolyse een belangrijk verdedigingsproces is tegen ongewenste bloedstolling, moet dit effect van vis in de voeding als nadelig worden beschouwd.

De resultaten van ons onderzoek overziende, moeten we tot de conclusie komen dat de dagelijkse consumptie van ongeveer 100 gram makreel gedurende 6 weken nauwelijks van invloed is op het risikoprofiel van hart- en vaatziekten. Het bloedcholesterolgehalte verandert niet, de bloeddruk evenmin. Wel neemt het triglyceridgehalte van het bloed af, maar de betekenis hiervan voor het hart-vaat risico is niet duidelijk. De neiging van bloedplaatjes om samen te klonteren neemt enigszins af en dit kan inderdaad als gunstig worden geduid. Bloedstolling en fibrinolyse worden nauwelijks beïnvloed; een negatieve invloed op de fibrinolyse kan echter niet worden uitgesloten.

Vis in de voeding is een uitstekende eiwitbron en uit het oogpunt van voedingsvariatie zeker aan te bevelen. Op basis van onze studie zijn er echter geen redenen om aan te nemen dat het eten van vis (of het slikken van visolie-capsules) wezenlijk bijdraagt tot een afname van het risico voor hart- en vaatziekten. Dit komt niet overeen met de veelbelovend lijkende resultaten van verschillende epidemiologische onderzoeken. Deze resultaten zouden weleens beïnvloed kunnen zijn door een lagere hoeveelheid verzadigd vet in het dieet hetgeen dikwijls samen gaat met een visrijke voeding. Het is echter op dit moment niet uit te sluiten dat op de lange duur de consumptie van kleine hoeveelheden vis enig effect heeft, maar het lijkt minstens zo belangrijk de hoeveelheid verzadigd vet in de voeding te verminderen.