

ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΙΩΑΝΝΑ ΒΛΑΧΟΓΙΑΝΝΗ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΛΙΠΟΕΙΔΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΤΖΩΡΤΖΗΣ ΝΟΜΙΚΟΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΝΟΜΙΚΟΣ ΤΖΩΡΤΖΗΣ, ΛΕΚΤΟΡΑΣ

ΑΝΤΩΝΟΠΟΥΛΟΥ ΣΜΑΡΑΓΔΗ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΡΙΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

ΚΑΛΟΓΕΡΟΠΟΥΛΟΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΟΣ ΣΥΝΕΡΓΑΤΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2006

Στους γονείς μου,

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Προκειμένου να περατωθεί η παρούσα εργασία σημαντική ήταν η βοήθεια του επιβλέποντα μου Νομικού Τζώρτζη. Γι' αυτό θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την συνεχή υποστήριξη, καθοδήγηση και συμπαράσταση, τόσο στο εργαστηριακό όσο και στο βιβλιογραφικό μέρος, που συνετέλεσαν με επιτυχία στην διεξαγωγή αυτής της εργασίας. Πολύτιμη ήταν η συμβολή του κύριου Καλογερόπουλου στην διεξαγωγή αυτής της μελέτης τόσο με την ανάλυση των φυτοστερολών όσο και με τις συνεχείς υποδείξεις και συμβουλές του. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κυρία Αντωνοπούλου για τις χρήσιμες υποδείξεις της. Επίσης, σημαντική ήταν η βοήθεια της κας Φραγκοπούλου στο εργαστηριακό μέρος. Τέλος θα ήθελα να αναφέρω την άριστη συνεργασία και φιλοξενία με την ερευνητική ομάδα του τμήματος Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, που συνέβαλε καταλυτικά στο εργαστηριακό κομμάτι αυτής της μελέτης.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΞΗΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ - ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1 Ξηροί καρποί – Ορισμός, κατάταξη	1
1.2 Μαγειρικές και άλλες χρήσεις	3
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ	6
2.1 Εισαγωγή	6
2.2. Μακροθρεπτικά συστατικά των ξηρών καρπών	6
2.3. Η σύσταση του λίπους των ξηρών καρπών	7
2.4 Σύσταση των ξηρών καρπών σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες	12
2.5 Μικροθρεπτικά συστατικά των ξηρών καρπών	15
2.6 Διατροφική αξία ξηρών καρπών	15
3. ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ	19
3.1 Βιολογικές δράσεις ξηρών καρπών γενικά.....	19
3.2 Βιολογικές δράσεις καρυδιού	22
3.3 Βιολογικές δράσεις αμυγδάλου	24
3.4 Βιολογικές δράσεις κελυφωτού φιστικιού	28

3.5 Βιολογικές δράσεις κολοκυθόσπορου	29
3.6 Βιολογικές δράσεις ηλιόσπορου	30
4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (ΡΑΦ)	32
4.1 Εισαγωγή	32
4.2 Χημική δομή του ΡΑΦ	33
4.3 Είδη και μοριακά ανάλογα του ΡΑΦ	33
4.4 Μεταβολισμός του ΡΑΦ	35
4.5 Δράσεις του ΡΑΦ	37

5. ΣΚΟΠΟΣ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ 40

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 41

6.1 Προέλευση ξηρών καρπών και τρόπος επεξεργασίας	41
6.2 Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL) κατά BLIGH-DYER	41
6.3 Εκχύλιση ολικών λιποειδών (TL) κατά FOLCH	42
6.4 Διαχωρισμός ολικών λιποειδών (TL) σε πολικά (PL) και ουδέτερα (NL) λιποειδή με τη μέθοδο της κατανομής κατ' αντιρροή	44
6.5 Προσδιορισμός βάρους λιποειδικών κλασμάτων	45
6.6 Προσδιορισμός φωσφόρου στα λιποειδή	45
6.7 Προσδιορισμός φυτοστερολών στα λιποειδικά κλάσματα ξηρών καρπών	47

**6.8 Βιολογική δοκιμασία συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων
κουελιού 49**

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 55

**7.1 Εύρεση του καλύτερου τρόπου εκχύλισης των ολικών
λιποειδών από τους ξηρούς καρπούς 55**

**7.2 Εκχύλιση ολικών λιποειδών με τη μέθοδο FOLCH και
διαχωρισμός τους σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή με τη μέθοδο
της κατανομής κατ' αντιρροή58**

**7.3.Χημικοί προσδιορισμοί στα λιποειδικά κλάσματα των ξηρών
καρπών 60**

7.3.1 Προσδιορισμός φωσφόρου 60

**7.3.2 Προσδιορισμός στερολών στα λιποειδικά κλάσματα των
ξηρών καρπών 61**

**7.4. Βιολογική δράση των λιποειδικών κλασμάτων των ξηρών
καρπών 65**

8. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ 68

9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ 75

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΞΗΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ξηροί καρποί – Ορισμός, κατάταξη, προέλευση

Στη βοτανική ορολογία καρπός λέγεται το προϊόν που σχηματίζεται στα αγγειόσπερμα φυτά μετά τη γονιμοποίηση του θηλυκού άνθους από τη γύρη του αρσενικού. Χαρακτηριστικά θα μπορούσαμε να πούμε ότι το γονιμοποιημένο ωκύτταρο μετασχηματίζεται σε σπόρια, ενώ η ωοθήκη (που το περιέβαλε) στο περικάρπιο που περιβάλλει τον καρπό. Το περικάρπιο μπορεί να είναι σαρκώδες, ξυλώδες κλπ. Ο καρπός αποτελείται από το εξωκάρπιο, το περικάρπιο, το μεσοκάρπιο και το ενδοκάρπιο. Το πάχος των στρωμάτων αυτών αποτελεί στοιχείο για να καταταγεί ένας καρπός στους σαρκώδεις ή στους ξερούς. Στους σαρκώδεις, το περικάρπιο είναι μαλακό και αποτελείται από εύγευστες και θρεπτικές ουσίες.

Οι χυμώδεις ή και σαρκώδεις καρποί διακρίνονται σε πολύχωρους και σε μονόχωρους. Στους πολύχωρους ανήκουν η ράγα (και τέτοιους καρπούς έχουν τα σταφύλια), ο μεγάλος ραγοειδής των κολοκυθιών, στον οποίο ανήκουν οι καρποί των κολοκυθιών, των πεπονιών, της καρπουζιάς κλπ., ο καρπός των εσπεριδοειδών, τα μήλα, τα ρόδια κλπ. Στους μονόχωρους καρπούς (που ονομάζονται και δρύπες) το εξωκάρπιο είναι λεπτό το μεσοκάρπιο πολύ παχύ, ενώ το ενδοκάρπιο είναι ξυλώδες. Τέτοιοι καρποί είναι τα βερίκοκα, τα κεράσια, τα δαμάσκηνα κλπ.

Πολύ πιο σύνθετη είναι η διαίρεση των ξερών καρπών. Αυτοί διαιρούνται σε πολύχωρους διαρρηκτούς και σε μονόχωρους αδιάρρηκτους. Οι πολύχωροι διαρρηκτοί είναι η κάψα, που είναι τυπικός καρπός της παπαρούνας και της βιόλας, ο θύλακος που είναι το γλυκάνισο κλπ., ο λοβός ή όσπριο, τυπικός καρπός των φασολιών και των υπόλοιπων ψυχανθών κ.ά.

Στους μονόχωρους κι αδιάρρηκτους ανήκουν το καρύδι, το φουντούκι, το βαλανίδι που λέγεται και κάρυα, η καρύοψη που είναι ο καρπός των σιτηρών κ.ά. Ακόμη υπάρχουν οι σύνθετοι καρποί, όπως είναι του ήλιου, ενώ άλλοι είναι εντελώς ιδιόμορφοι, όπως τα συγκάρπια ή καρποταξίες κι οι ψευτοκαρποί. Στην κατηγορία των συγκαρπίων ανήκουν τα βατόμουρα κλπ.

Οι ψευδοκαρποί αν και φαίνονται ότι αποτελούν ένα ενιαίο καρπό, εξωτερικά αποτελούνται από πολλούς καρπούς μαζί όπως είναι π.χ. η φράουλα, το σύκο, ο ανανάς κλπ. Ψευδοκαρποί θεωρούνται και οι καρποί των κωνοφόρων, όπως είναι το πεύκο με τα κουκουνάρια, τα κυπαρίσσια με τα κυπαρισσόμηλα κλπ.

Τα αμύγδαλα προέρχονται από την αμυγδαλιά (*Prunus amygdalus*) το οποίο, είναι καρποφόρο δέντρο που ανήκει στην οικογένεια των ροδιδών (*Rosaceae*). Το επιστημονικό του όνομα είναι "αμυγδαλή η κοινή". Η αμυγδαλιά καλλιεργείται σε όλες της υποτροπικές περιοχές και ιδιαίτερα στις περιοχές της νότιας Ευρώπης. Η καταγωγή της είναι από τη Μικρά Ασία. Στη λεκάνη της Μεσογείου τη διάδωσαν τόσο οι Έλληνες όσο και οι Ρωμαίοι. Στην Ελλάδα η αμυγδαλιά καλλιεργείται από χιλιάδες χρόνια τώρα. Οι καρποί της αμυγδαλιάς, τα αμύγδαλα, είναι "δρύπες". Το σχήμα τους είναι ανάλογο με την ποικιλία, είναι όμως σχεδόν επίμηκες και ποτέ στρογγυλό. Το εξωκάρπιο δεν είναι σαρκώδες, όπως στα άλλα πυρηνόκαρπα, αλλά λεπτό που, όταν ωριμάζει ο καρπός, ανοίγει και ξεραίνεται. Ακόμη το εξωκάρπιο σκεπάζεται με ελαφρό χνούδι. Το ενδοκάρπιο είναι σκληρό και ξυλώδες σε μερικές ποικιλίες σε άλλες όμως δεν είναι σκληρό και κλείνει ένα ή δυο σπέρματα, που καλύπτονται από φλούδα. Η φλούδα είναι δυνατό να αποχωριστεί από τους καρπούς, όσο οι καρποί είναι μαλακοί ή μετά από βράσιμο. Οι καρποί της αμυγδαλιάς χωρίζονται σε δυο κατηγορίες: στους πικρούς και στους γλυκούς.

Τα καρύδια προέρχονται από την καρυδιά (*Juglans regia*) το οποίο είναι φυλλοβόλο δέντρο και ανήκει στην οικογένεια *Juglandaceae*. Από πολλούς αναφέρεται ως τόπος καταγωγής της η Ασία, αλλά και σε πολλά βουνά της Ελλάδας φυτρώνει άγρια καρυδιά. Υπάρχουν πάνω από 20 είδη καρυδιάς ανάλογα που ενδημούν σε διαφορετικές περιοχές. Οι καρποί της καρυδιάς, τα καρύδια, λέγονται δρύπες. Το σχήμα τους είναι από σφαιρικό μέχρι ωοειδές.

Τα φιστίκια Αιγίνης ή κελυφωτά φιστίκια (*pistachio*) προέρχονται από την φιστικιά (*Pistacia vera*). Είναι δένδρο που το μέσο ύψος του φτάνει τα τρία έως τέσσερα μέτρα. Τα κελυφωτά φιστίκια είναι δρύπες και αποτελούνται από ένα επιμήκη καρπό με σκληρό κέλυφο και ένα ελαφρά πρασινωπό ενδοκάρπιο με χαρακτηριστική γεύση. Η φιστικιά αρχικά καλλιεργήθηκε στην Κεντρική Ασία και ήρθε στο χώρο της Μεσογείου τον Μεσαίωνα ενώ τα

τελευταία χρόνια καλλιεργείται και στην Καλιφόρνια καθώς και στην Αυστραλία.

Οι ηλιόσποροι είναι οι σπόροι του φυτού ηλίανθος (*Helianthus annuus*). Για εμπορικούς λόγους διακρίνονται σε δύο είδη, ανάλογα τη μορφή του κέλυφους. Το κέλυφος μπορεί να είναι είτε μαύρο και οι σπόροι που προέρχονται από αυτό το είδος χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ηλιέλαιου, είτε ραβδωτό και λόγω της μικρότερης περιεκτικότητας τους σε έλαιο χρησιμοποιούνται κυρίως για άμεση κατανάλωση.

Τέλος, οι κολοκυθόσποροι είναι οι σπόροι της κολοκυθιάς, η οποία ανήκει στο γένος *cucurbita* που είναι φυτό μονοετές, το οποίο αναρριχάται ή έρπει και καλλιεργείται για τους καρπούς και τα τρυφερά βλαστάρια του που τρώγονται, ενώ μερικοί το χρησιμοποιούν και για ζωτροφές. Ο καρπός είναι ράγα μεγάλων διαστάσεων, που έχει διάφορα σχήματα και χρώματα, όπως κίτρινο, άσπρο, ροζ, πράσινο κλπ. Τα σπέρματα του καρπού είναι, κατά κανόνα, μεγάλα και πλατιά (1).

1.2 Ξηροί καρποί – Μαγειρικές και άλλες χρήσεις

Στην καθημερινή ζωή και ειδικότερα όσον αφορά την μαγειρική, ο ξηρός καρπός έχει μία ευρύτερη έννοια περιλαμβάνοντας και καρπούς που στα στενά πλαίσια της βοτανικής δεν θεωρούνται ξηροί καρποί. Στην μαγειρική κάθε μεγάλη, ελαιώδης ψίχα που περιβάλεται από σκληρό κέλυφος μπορεί να θεωρηθεί ξηρός καρπός. Ένας μεγάλος αριθμός ξηρών καρπών καταναλώνεται ως τρόφιμο από τον άνθρωπο είτε ωμός ως snack, είτε επεξεργασμένος (αλατισμένος, ψημένος), ενώ οι ξηροί καρποί χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην μαγειρική. Τέλος, το έλαιο των ξηρών καρπών μπορεί να απομονωθεί από αυτούς και να χρησιμοποιηθεί ως εδωδιμο έλαιο ή να βρει εφαρμογές στη βιομηχανία καλλυντικών.

Η παγκόσμια παραγωγή αμυγδάλων είναι περίπου 1,5 εκατομμύρια τόνοι και οι κύριες παραγωγές χώρες είναι η Ελλάδα, Ιράν, Ιταλία, Μαρόκο, Πορτογαλία, Ισπανία και ΗΠΑ. Τα αμύγδαλα καταναλώνονται κυρίως ωμά ή ψημένα αλλά βρίσκουν και ευρύτατη εφαρμογή στην ζαχαροπλαστική. Το αμυγδαλέλαιο χρησιμοποιείται συχνά ως μαγειρικό λάδι λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του σε ελαιικό οξύ. Τέλος, διατίθεται εμπορικά βούτυρο από

αμύγδαλο, το οποίο μπορεί να καταναλωθεί έναντι φιστικοβούτυρου από καταναλωτές που έχουν αλλεργία στο φιστίκι. Λόγω της μικρής του περιεκτικότητας σε υδατάνθρακες, αλεύρι από αμύγδαλα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή κεικ και μπισκότων που μπορούν να καταναλωθούν ασφαλώς από διαβητικούς ασθενείς. Το έλαιο του γλυκού αμυγδάλου χρησιμοποιείται ευρύτατα ως φέρον έλαιο στην αρωματοθεραπεία και σε άλλες εναλλακτικές μορφές θεραπείας. Επίσης, χρησιμοποιείται ως λιπαντικό μέσο κατά τις διάφορες θεραπείες μασάζ αφού θεωρείται ότι έχει αναλγητικές ιδιότητες.

Η παγκόσμια παραγωγή κελυφωτού φιστικιού ξεπερνά τους 500 εκατομμύρια τόνους με κύριες παραγωγές χώρες το Ιραν, Τουρκία, Συρία, Κίνα και Ελλάδα. Το φιστίκι Αιγίνης καταναλώνονται είτε ωμό είτε ψημένο και αλατισμένο και χρησιμοποιείται τόσο στην μαγειρική όσο και στην ζαχαροπλαστική.

Η παγκόσμια παραγωγή ηλιόσπορου είναι περίπου 31 εκατομμύρια τόνους και οι κυριότερες χώρες παραγωγής του είναι η Ρωσία, Ουκρανία, Αργεντινή, Κίνα, Ινδία και ΗΠΑ. Οι ηλιόσποροι τρώγονται κυρίως ως πρόχειρο φαγητό (snack) ή χρησιμοποιούνται σε διάφορες μαγειρικές συνταγές. Στο εμπόριο διατίθενται τόσο με την φλούδα όσο και χωρίς αυτή. Κατά την επεξεργασία τους, οι ηλιόσποροι πρώτα ξηραίνονται και στην συνέχεια μπορούν να ψηθούν και να αλατιστούν ή να φυλαχτούν σε αλεύρι ώστε να διατηρηθεί το άρωμα τους. Η κατανάλωση τους ως πρόχειρο φαγητό είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη στις χώρες της Μεσογείου. Ο ελληνικός ηλιόσπορος είναι φημισμένος για την ιδιαίτερη γεύση του, το μεγάλο μέγεθος και τις ασπρόμαυρες διαμήκεις ραβδώσεις του στο κέλυφός του. Λόγω του μεγάλου μήκους του, μπορεί κανείς με ελάχιστη εξάσκηση να ανοίξει το κέλυφος και να αφαιρέσει τον καρπό (ψύχα). Οι αποφλοιωμένοι ηλιόσποροι προστίθενται συχνά στο ψωμί και σε άλλες ζύμες για το άρωμα τους. Επίσης, στο εμπόριο διατίθεται και βούτυρο από ηλιόσπορους.

Το έλαιο που προέρχεται από τους ηλιόσπορους, το ηλιέλαιο, είναι από τα πιο διαδεδομένα εδώδιμα έλαια. Το έλαιο μπορεί να καταναλωθεί όπως είναι ή να χρησιμοποιηθεί για την παρασκευή μαργαρινών.

Τέλος, ο κολοκυθόσπορος (ή πασατέμπος) τρώγεται ως snack όπως και ο ηλιόσπορος. Τρώγεται, ψημένος και αλατισμένος ή ακόμα και ωμός. Ο

ψημένος και αλατισμένος κολοκυθόσπορος είναι και ένα εξαιρετικό snack, πολύ δημοφιλές σε χώρες όπως η Ελλάδα (φυσικά), η Τουρκία, τα υπόλοιπα Βαλκάνια, η Ισπανία, η Ιταλία, οι χώρες της Κεντρικής Αμερικής, και αλλού. Οι κολοκυθόσποροι αποφλοιωμένοι μπορούν επιπλέον να χρησιμοποιηθούν και σε αρτοσκευάσματα (ψωμί, πίτες, κτλ), σε δημητριακά (cereals), σε σαλάτες, ακόμα και σε γλυκά. Από τον κολοκυθόσπορο εξάγεται το αντίστοιχο έλαιο. (1)

Η κατανάλωση ξηρών καρπών στην χώρα μας, ανέρχεται σε 65.000 τόνους. Από αυτή την ποσότητα το 20-25% των πωλήσεων γίνεται τον μήνα Δεκέμβριο. Από τα είδη που προτιμάνε οι καταναλωτές, τα φιστίκια με κέλυφος (τύπου Αιγίνης) βρίσκονται στην πρώτη θέση, αφού τα προτιμάει το 30% της αγοράς, ενώ ακολουθούν τα αμύγδαλα και τα φουντούκια με ποσοστό 20% το καθένα στην προτίμηση των καταναλωτών. (2)

Από τις αρχές της δεκαετίας του '90 σημειώνουν άνοδο οι συσκευασμένοι καρποί, οι οποίοι κέρδισαν το 20%-25% της συνολικής κατανάλωσης. Η παρουσία των συσκευασμένων ευνόησαν την είσοδο των ξηρών καρπών στα super-markets και στα άλλα σημεία λιανικής, γεγονός που βοήθησε επίσης στην συνολική διεύρυνση της αγοράς τους. Σημαντικό ποσοστό της συνολικής κατανάλωσης ξηρών καρπών, που αγγίζει το 25%-30%, απορροφά η βιομηχανία (ζαχαρώδη, σοκολάτες, παγωτά, κ.ά.), ποσοστό που διαφοροποιείται ανάλογα με τον καρπό. Οι κυριότερες χώρες εισαγωγής εντοπίζονται στις εξωκοινοτικές αγορές και κυρίως στην Τουρκία, τις ΗΠΑ, το Ιράν και άλλες χώρες της Ασίας, αλλά και της Ανατολικής Ευρώπης. Από την κοινοτική αγορά ξεχωρίζουν η Γερμανία και η Ισπανία. (3)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Η ποιοτική και ποσοτική χημική σύσταση των ξηρών καρπών διαφέρει ανάλογα το είδος, την περιοχή καλλιέργειας και το χρόνο συγκομιδής για αυτό και οι τιμές που αναφέρονται στις διάφορες βάσεις δεδομένων είναι ενδεικτικές. Παρακάτω, θα περιγραφεί η χημική σύσταση των ξηρών καρπών, οι οποίοι μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, σύμφωνα με τα στοιχεία της Εθνικής Βάσης Θρεπτικών Συστατικών του Υπουργείου Γεωργίας των Ηνωμένων Πολιτειών Αμερικής (National Nutrient Database of the United States Department of Agriculture, USDA), η οποία δίνει προφανώς πληροφορίες για τους Αμερικάνικους ξηρούς καρπούς (4), αλλά και σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης Ελληνικών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Κρήτης και του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης (5) από τους οποίους αντλούνται οι πληροφορίες για τους Ελληνικούς ξηρούς καρπούς. Τέλος αναφέρονται μελέτες χημικής σύστασης που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον.

2.2 Μακροθρεπτικά συστατικά ξηρών καρπών

Η χημική σύσταση του νωπού φιστικιού Αιγίνης (ΦΑΝ), του επεξεργασμένου φιστικιού Αιγίνης (ΦΑΕ), του καρυδιού (ΚΑ), αμυγδάλου (ΑΜ), ηλιόσπορου (ΗΛ) και κολοκυθόσπορου (ΚΣ) σε μακροθρεπτικά συστατικά φαίνεται στον Πίνακα 1.

Από τον πίνακα αυτό φαίνεται ότι, η θερμιδική αξία του κάθε ξηρού καρπού είναι ανάλογη της περιεκτικότητάς του σε λίπος. Τα φιστίκια έχουν την μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες, ενώ όσον αφορά τους

ελληνικούς ξηρούς καρπούς ιδιαίτερα υψηλή περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες έχει ο κολοκυθόσπορος, γεγονός που του προσδίδει υψηλή θερμιδική αξία. Το καρύδι έχει τη μεγαλύτερη ποσότητα λίπους και τις περισσότερες θερμίδες αλλά ταυτόχρονα και την μικρότερη περιεκτικότητα σε υδατάνθρακες. Ο κολοκυθόσπορος, τόσο ο Αμερικάνικος όσο και ο Ελληνικός έχει τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε υγρασία και πρωτεΐνη αλλά και την μικρότερη περιεκτικότητα σε ίνες. Το αμύγδαλο έχει την μεγαλύτερη ποσότητα σε ίνες. Όπως είναι φυσιολογικό, το επεξεργασμένο φυστίκι έχει λιγότερη υγρασία από το νωπό, ενώ έχουν παρόμοια περιεκτικότητα στα υπόλοιπα μακροθρεπτικά συστατικά. Σύγκριση των ελληνικών με τις αμερικάνικες αναλύσεις δείχνει ότι οι ελληνικοί ξηροί καρποί έχουν πολύ μικρότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη.

Πίνακας 1. Σύσταση ξηρών καρπών σε μακροθρεπτικά συστατικά και ενέργεια σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA. Στις παρενθέσεις φαίνεται η χημική σύσταση σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης ελληνικών τροφίμων. Έλλειψη παρένθεσης υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει η αντίστοιχη ανάλυση στους Ελληνικούς ξηρούς καρπούς

	ΕΝΕΡΓΕΙΑ Kcal/100g	ΝΕΡΟ (g/100g)	ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ (g/100g)	ΛΙΠΟΣ (g/100g)	ΥΔΑΤ/ΚΕΣ (g/100g)	ΙΝΕΣ (g/100g)
<u>Φ</u>	557	4,0	21	44	28	10
<u>ΑΝ</u>	(596)	(4,4)	(4,8)	(54,2)	(22,3)	
ΦΑΕ	571	2,0	21	46	28	10
ΑΜ	578	5,0	21	51	20	12
	(591)	(5,2)	(7,1)	(52,1)	(23,3)	
ΚΑ	618	4,5	24	59	10	7
	(646)	(4,3)	(3,6)	(69)	(15,9)	
ΗΛ	570	5,4	23	50	19	11
	(632)	(4,5)	(18,8)	(50)	(26,6)	
ΚΟ	541	7,0	25	46	18	4
	(646)	(6,2)	(19,9)	(47,6)	(34,4)	

2.3 Η σύσταση του λίπους των ξηρών καρπών

Στον Πίνακα 2, παρουσιάζεται η σύσταση των ξηρών καρπών σε κορεσμένα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 2. Σύσταση ξηρών καρπών σε κορεσμένα λιπαρά οξέα σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA. Στις παρενθέσεις φαίνεται η χημική σύσταση σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης ελληνικών τροφίμων. Έλλειψη παρένθεσης υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει η αντίστοιχη ανάλυση στους Ελληνικούς ξηρούς καρπούς

	ΟΛΙΚΑ SFA (g/100g)	Λαυρικό (12:0) (g/100g)	Μυριστικό (14:0) (g/100g)	Παλμιτικό (16:0) (g/100g)	Στεατικό (18:0) (g/100g)	Αραχιδικό (20:0) (g/100g)	Βεχενικό (22:0) (g/100g)
ΦΑΝ	5,44 (6,4)	0,000	0,000	4,889	0,446	0,043	0,043
ΦΑΕ	5,56	0,000	0,000	4,945	0,514	0,055	0,041
ΑΜ	3,88 (4,48)	0,000	0,000	3,198	0,683	0,000	0,000
ΚΑ	3,37 (5,04)	0,000	0,000	1,923	1,445	0,000	0,000
ΗΛ	5,20 (4,45)	0,000	0,051	2,795	2,202	0,000	0,000
ΚΟ	8,67 (7,76)	0,044	0,052	5,612	2,811	0,000	0,000

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 2, την πιο υψηλή ποσότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα έχει ο κολοκυθόσπορος σύμφωνα και με τις δύο πηγές. Την μικρότερη ποσότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα έχει το καρύδι, ενώ από την ελληνική ανάλυση την μικρότερη ποσότητα έχει ο ηλιόσπορος, με μικρή διαφορά από το αμύγδαλο. Όσον αφορά τη σύσταση του κορεσμένου λίπους σε λιπαρά οξέα φαίνεται ότι παλμιτικό και στεατικό οξύ περιέχουν όλοι οι ξηροί καρποί και μάλιστα το παλμιτικό οξύ έχει το μεγαλύτερο ποσοστό. Λαυρικό οξύ περιέχει

μόνο ο κολοκυθόσπορος, ενώ μυριστικό οξύ ο ηλιόσπορος και ο κολοκυθόσπορος. Αραχιδικό και βεχενικό οξύ περιέχουν τα φιστίκια.

Στον Πίνακα 3, παρουσιάζεται η χημική ανάλυση των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων των ξηρών καρπών.

Την μεγαλύτερη ποσότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχει το αμύγδαλο με μεγάλη διαφορά από τους υπόλοιπους ξηρούς καρπούς, ενώ όσον αφορά τις Ελληνικές αναλύσεις το φιστίκι. Την μικρότερη ποσότητα σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχει ο ηλιόσπορος ενώ σύμφωνα με τις Ελληνικές αναλύσεις την μικρότερη ποσότητα μονοακόρεστων περιέχει το καρύδι. Σε όλα τα είδη ξηρών καρπών, σχεδόν ολόκληρη η ποσότητα των μονοακόρεστων λιπαρών οξέων αποτελείται από ελαικό οξύ. Πολύ μικρές ποσότητες της τάξεως του μισού ή ενός γραμμαρίου αποτελούν το παλμιτελαϊκό και γαδελαικό οξύ, ενώ το αμύγδαλο και ο κολοκυθόσπορος δεν περιέχουν καθόλου γαδελαικό οξύ.

Πίνακας 3. Σύσταση ξηρών καρπών σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA. Στις παρενθέσεις φαίνεται η χημική σύσταση σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης ελληνικών τροφίμων. Έλλειψη παρένθεσης υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει η αντίστοιχη ανάλυση στους Ελληνικούς ξηρούς καρπούς

	ΟΛΙΚΑ MUFA (g/100g)	Παλμιτελαϊκό (16:1) (g/100g)	Ελαικό (18:1) (g/100g)	Γαδελαικό (20:1) (g/100g)
ΦΑΝ	23,319 (34,000)	0,463	22,686	0,170
ΦΑΕ	24,216	0,457	23,583	0,176
ΑΜ	32,155 (31,100)	0,234	31,921	0,000
ΚΑ	15,004 (9,250)	0,063	14,533	0,408
ΗΛ	09,462 (16,400)	0,049	09,356	0,048
ΚΟ	14,258 (16,800)	0,099	14,146	0,000

Στον Πίνακα 4, παρουσιάζεται η χημική σύσταση των ξηρών καρπών σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα.

Πίνακας 4. Σύσταση ξηρών καρπών σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA. Στις παρενθέσεις φαίνεται η χημική σύσταση σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης ελληνικών τροφίμων. Έλλειψη παρένθεσης υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει η αντίστοιχη ανάλυση στους Ελληνικούς ξηρούς καρπούς

	ΟΛΙΚΑ ΡUFA (g/100g)	Λινελαϊκό (18:2) (g/100g)	Λινολενικό (18:3) (g/100g)
ΦΑΝ	13,455 (13,220)	13,201	0,254
ΦΑΕ	13,899	13,636	0,262
ΑΜ	12,214 (16,520)	12,214	0,000
ΚΑ	35,077 (54,500)	33,072	2,006
ΗΛ	32,735 (29,000)	32,632	0,069
ΚΟ	20,904 (23,560)	20,702	0,181

Από τον παραπάνω πίνακα φαίνεται ότι την μεγαλύτερη ποσότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα έχει το καρύδι με μικρή διαφορά από τον ηλιόσπορο που είναι δεύτερος στην κατάταξη. Από τα ελληνικά δεδομένα ξεχωρίζει κατά πολύ το καρύδι. Τη μικρότερη ποσότητα σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα περιέχει το αμύγδαλο, ενώ σύμφωνα με τις ελληνικές αναλύσεις το φιστίκι. Σε όλα τα είδη το μεγαλύτερο ποσοστό των πολυακόρεστων λιπαρών οξέων κατέχει το λινελαϊκό οξύ. Μόνο το αμύγδαλο δεν περιέχει λινολενικό οξύ.

Στον Πίνακα 5, παρουσιάζεται η σχετική αναλογία κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καθώς και η σχετικές ποσότητες ω-3 και ω-6 λιπαρών οξέων. Όπως επίσης η σύσταση των ξηρών καρπών σε trans λιπαρά οξέα και η χημική ανάλυση σε χοληστερόλη.

Πίνακας 5. Σύσταση ξηρών καρπών σε ω-3, ω-6, trans λιπαρά οξέα και χοληστερόλη σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης ελληνικών τροφίμων. Αναφέρονται επίσης κάποιες σχετικές αναλογίες

	Trans (g/100g)	ω-3 (g/100g)	ω-6 (g/100g)	ω-6/ ω-3 (g/100g)	MUFA/ SFA (g/100g)	PUFA/ SFA (g/100g)	ΧΟΛΗΣΤΕ ΡΟΛΗ (mg/100g)
ΦΑΝ	0,05	00,43	12,85	028,85	5,31	02,07	< 0,5
ΑΜ	-	00,26	16,26	067,83	6,91	03,66	< 0,5
ΚΑ	-	10,70	43,80	004,09	1,84	10,83	< 0,5
ΗΛ	-	00,10	28,85	250,86	3,70	06,55	< 0,5
ΚΟ	-	00,19	23,40	114,13	2,09	03,04	< 0,5

Την μεγαλύτερη ποσότητα σε ω-3 έχει το καρύδι και μάλιστα σε 10πλάσια ποσότητα από τους υπόλοιπους ξηρούς καρπούς ενώ την μικρότερη ο ηλιόσπορος. Το καρύδι υπερέχει και στην παρουσία ω-6 λιπαρών οξέων ενώ υστερεί το φιστίκι. Trans λιπαρά οξέα ανιχνεύονται μόνο στο νωπό φιστίκι. Ενώ η ποσότητα σε χοληστερόλη είναι πάρα πολύ μικρή < 0,5 mg, σύμφωνα με τον πίνακα του USDA δεν περιέχουν καθόλου.

Μεμονωμένες μελέτες έχουν δείξει την παρουσία στο αμύγδαλο (6) και στο καρύδι σφιγγολιπιδίων (7) και σκουαλενίου (8). Στα καρύδια έχει γίνει επίσης ανάλυση γλυκολιπιδίων στην οποία βρέθηκε ότι η υδατανθρακική ομάδα των γλυκολιπιδίων ήταν αποκλειστικά γαλακτόζη (9).

Μελέτη των αιθέριων ελαίων κελυφωτών φιστικιών έχει δείξει την παρουσία κατά 90% μονοτερπενίων, κατά 10% οξυγονούχων τερπενίων και κατά 1% διτερπενίων με πιο χαρακτηριστικά είδη το α-πινένιο, β-πινένιο, λιμονένιο, κ.α. (10). Τα αιθέρια έλαια των καρυδιών είναι πλούσια σε αλειφατικούς υδρογονάνθρακες (11).

Οι ξηροί καρποί αποτελούν πλούσια πηγή φυτοστερολών. Φυτοστερόλες έχουν ανιχνευθεί στα έλαια του καρυδιού, αμυγδάλου και οι κυριότεροι εκπρόσωποι είναι η β-σιτοστερόλη και η καμπεστερόλη (6,8,12)

2.4 Σύσταση των ξηρών καρπών σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες

Στον Πίνακα 6, παρουσιάζεται η χημική σύσταση των ξηρών καρπών σε ιχνοστοιχεία.

Πίνακας 6. Σύσταση ξηρών καρπών σε ιχνοστοιχεία σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA. Στις παρενθέσεις φαίνεται η χημική σύσταση σύμφωνα με τους πίνακες σύστασης ελληνικών τροφίμων. Έλλειψη παρένθεσης υποδηλώνει ότι δεν έχει γίνει η αντίστοιχη ανάλυση στους Ελληνικούς ξηρούς καρπούς

	Ca (mg/ 100g)	Fe (mg/ 100g)	Mg (mg/ 100g)	P (mg/ 100g)	K (mg/ 100g)	Na (mg/ 100g)	Zn (mg/ 100g)	Cu (mg/ 100g)	Se (mcg/ 100g)	Cr (mcg/ 100g)
ΦΑΝ	107 (158)	4,15 (2,80)	121 (132)	490 (953)	1025 (474)	1,0 (6,0)	2,20	1,300	7,0 (-)	(28,5)
ΦΑΕ	110	4,20	120	485	1042	10	2,30	1,325	9,3	
ΑΜ	248 (405)	4,3 (3,0)	275 (720)	474 (1235)	728 (4,70)	1,0 (2,5)	3,36	1,110	2,8 (-)	(14,3)
ΚΑ	61 (139)	3,12 (2,50)	201 (495)	513 (1000)	523 (262)	2,0 (3,0)	3,37	1,360	17 (-)	(-)
ΗΛ	116 (110)	6,77 (4,10)	354 (930)	705 (2513)	689 (532)	3,0 (10)	5,06	1,752	59,50 (244,4)	(7,0)
ΚΟ	43 (59)	14,97 (5,70)	535 (960)	1174 (2947)	807 (479)	18 (4,0)	7,46	1,387	5,6 (6,7)	(20)

Με βάση τον παραπάνω πίνακα προκύπτει ότι το φιστίκι Αιγίνης είναι μία σημαντική πηγή καλίου ενώ το αμύγδαλο είναι μία πλούσια πηγή ασβεστίου. Ο κολοκυθόσπορος υπερτερεί έναντι των άλλων ξηρών καρπών σε σίδηρο, μαγνήσιο, φώσφορο, νάτριο και ψευδάργυρο ενώ ο ηλιόσπορος αποτελεί την καλύτερη πηγή σεληνίου και χαλκού. Χρώμιο σύμφωνα με την ελληνική

ανάλυση περισσότερο περιέχει το φιστίκι και λιγότερο ο ηλιόσπορος. Πάντως αυτό που αξίζει να σημειωθεί είναι ότι υπάρχουν αισθητές διαφορές μεταξύ των δύο πηγών αφού οι ελληνικοί ξηροί καρποί περιέχουν πολύ μεγαλύτερη ποσότητα σε ασβέστιο, μαγνήσιο, φώσφορο και σελήνιο και πολλή χαμηλότερη σε κάλιο, σε σύγκριση με τους αντίστοιχους αμερικάνικους.

Μελέτη στο Πακιστάν έδειξε ότι το αμύγδαλο περιέχει τα μεγαλύτερα ποσοστά μολύβδου και καδμίου από όλους τους άλλους ξηρούς καρπούς (13). Ενώ έχει ανιχνευθεί αρσενικό στο έλαιο καρυδιού, αμυγδάλου, φυστικιού, ηλιόσπορου και κολοκυθόσπορος, το οποίο κυμαινόταν από 2.9-16.9 ng/g (14, 15).

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζεται η χημική σύσταση των ξηρών καρπών σε βιταμίνες.

Πίνακας 7. Σύσταση ξηρών καρπών σε βιταμίνες σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA.

	B ₁ (mg 100g)	B ₂ (mg 100g)	B ₃ (mg 100g)	B ₆ (mg 100g)	Φυλλικό (mcg 100g)	Vit K (mcg 100g)	Vit A (IU 100g)	Vit C (mg 100g)
ΦΑΝ	0,870	0,160	1,300	1,700	51,0	-	553	5,0
ΦΑΕ	0,840	0,158	1,425	1,274	50,0	13,2	262	2,3
ΑΜ	0,241	0,811	3,925	0,131	29,0	0,0	5,00	0,0
ΚΑ	0,057	0,130	0,470	0,583	31,0	2,70	40,0	1,7
ΗΛ	2,290	0,250	4,500	0,770	227	2,70	50,0	1,4
ΚΟ	0,210	0,320	1,745	0,224	58,0	51,40	380	1,9

Σύμφωνα με τις παραπάνω αναλύσεις ο ηλιόσπορος περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα βιταμίνης Β1, Β3, φυλλικού οξέος. Ο κολοκυθόσπορος έχει σε σχέση με τους άλλους ξηρούς καρπούς σημαντικά μεγαλύτερη ποσότητα

βιταμίνης Κ,. Το αμύγδαλο υπερέχει όσον αφορά τη βιταμίνη Β2, ενώ το φιστίκι έχει πολύ μεγαλύτερη ποσότητα βιταμίνης Β6, Α και C, των οποίων όμως ένα μεγάλο ποσοστό χάνεται κατά την επεξεργασία.

Τέλος, στο πίνακα 8 παρουσιάζεται η χημική σύσταση των ξηρών καρπών σε τοκοφερόλες και καροτενοειδή.

Πίνακας 8. Σύσταση ξηρών καρπών σε τοκοφερόλη, καροτένιο και λουτεΐνη – ζεαξανθίνη, σύμφωνα με τη βάση δεδομένων της USDA.

	Τοκοφερόλη α (mg/ 100g)	β(mg/ 100g)	γ(mg/ 100g)	δ(mg/ 100g)	Καροτένιο β(mcg/ 100g)	Λουτεΐνη- ζεαξανθίνη (mcg/ 100g)
ΦΑΝ	2,30	0,00	22,60	0,80	332	-
ΦΑΕ	1,93	0,14	22,45	0,73	157	1205
ΑΜ	25,87	0,43	00,89	0,25	3,00	1,000
ΚΑ	1,80	0,00	28,48	1,44	24,0	9,000
ΗΛ	34,50	1,30	00,00	0,00	30,0	0,000
ΚΟ	0,00	-	19,07	-	228	0,000

Το φιστίκι Αιγίνης περιέχει την μεγαλύτερη ποσότητα αντιοξειδωτικών στο σύνολο του, ενώ ανάλογα το είδος του ξηρού καρπού καθορίζεται το είδος των τοκοφερολών, με την τοκοφερόλη α να επικρατεί στο αμύγδαλο και τον ηλιόσπορο, την τοκοφερόλη β στον ηλιόσπορο και τις τοκοφερόλες γ και δ στο καρύδι. Σε καροτένιο ξεχωρίζει το φιστίκι νωπό και ακολουθεί ο κολοκυθόσπορος με μεγάλη διαφορά από τους υπόλοιπους. Τέλος το επεξεργασμένο φιστίκι περιέχει πάρα πολύ μεγάλη ποσότητα λουτεΐνης -

ζεαξανθίνης σε σχέση με τους υπόλοιπους, που περιέχουν άλλοι μηδενικές και άλλοι αμελητέες ποσότητες.

2.5 Μικροθρεπτικά συστατικά των ξηρών καρπών

Οι ξηροί καρποί αποτελούν μία σημαντική πηγή φαινολικών και άλλων αντιοξειδωτικών ενώσεων. Οι φαινολικές ενώσεις του αμυγδάλου χαρακτηρίζονται από την παρουσία γλυκοζιτών της 3-Ο'-μεθυλοκερκετίνης, καμφερόλης και ναριγενίνης καθώς και από την παρουσία κατεχίνης, πρωτοκατεχοικού οξύ, βανιλλικού οξέος, π-υδροξυβενζοϊκό οξύ και καφεικού οξέος (16,17). Trans-ρεσβερατρόλη έχει ανιχνευθεί σε ποικιλίες κελυφωτών φιστικιών Τουρκίας και τα επίπεδα της κυμαίνονταν από 0.03 έως 1.92 μg/g (18). Στους ηλιόσπορους η κύρια φαινολική ένωση είναι το χλωρογενικό οξύ (19), ενώ αρκετά είδη ταννινών έχουν απομονωθεί από το εκχυλίσματα καρυδιού (20). Λιγνάνια με δράση φυτοοιστρογόνων (secoisolariciresinol, lariciresinol) έχουν βρεθεί στον κολοκυθόσπορο (21). Καρύδια και αμύγδαλα είναι επίσης πλούσια σε φυτικό οξύ (22) ενώ σε μικρότερες ποσότητες στα καρύδια έχουν βρεθεί αλκάνια (23) και juglone, μία ναφθοκινόνη με αντιμικροβιακή δράση (24). Τέλος, στο καρύδι έχει ανιχνευθεί η παρουσία σεροτονίνης από 87-400 μg/g ανάλογα την ποικιλία του καρυδιού (25) καθώς και μελατονίνης σε συγκεντρώσεις 3,5 ng/g γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της σεροτονίνης του πλάσματος με ταυτόχρονη αύξηση της αντιοξειδωτικής του ικανότητας μετά από κατανάλωση καρυδιών (26).

2.6 Διατροφική αξία ξηρών καρπών (12, 27)

Οι ξηροί καρποί είναι σύνθετο φυτικό προϊόν. Είναι πλούσιοι σε λίπος, το οποίο κυμαίνεται από 45 έως 75% του βάρους τους, το οποίο στο μεγαλύτερο μέρος του είναι ακόρεστο.

Οι περισσότεροι ξηροί καρποί είναι πλούσιοι σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, με κυρίαρχο το ελαικό οξύ το οποίο συνεισφέρει κατά μέσο όρο λιγότερο από 62% της ενέργειας από λίπος. Απ' την άλλη τα καρύδια είναι πλούσια σε πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το λινελαϊκό και λινολενικό οξύ. Τα

μονοακόρεστα μαζί με τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, συμβάλλουν λιγότερο από το 91% της ενέργειας από λίπος.

Ανάμεσα στους καρπούς που παράγονται από δέντρα, τα καρύδια είναι μοναδικά επειδή είναι πολύ καλή πηγή του λιπαρού οξέος α - λινολενικό. Σε σχέση με τα φυτικά έλαια που χρησιμοποιούνται ευρέως στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, οι ξηροί καρποί περιέχουν κατά μέσο όρο λιγότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα από το ελαιόλαδο και αμελητέα ποσότητα παραπάνω από το έλαιο canola. Η περιεκτικότητα των ξηρών καρπών σε ελαιικό οξύ είναι παρόμοια με αυτή του ελαίου canola, αλλά λιγότερη από αυτή του ελαιολάδου και του λιναρέλαιου. Από την άλλη η περιεκτικότητα σε λινελαϊκό είναι παρόμοια σε σχέση με το έλαιο canola και περισσότερη από αυτή που υπάρχει στο ελαιόλαδο και στο λιναρέλαιο .

Οι ξηροί καρποί περιέχουν ω -3 λιπαρά οξέα, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι έχουν καρδιοπροστατευτική επίδραση. Τα λιπαρά οξέα που είναι κυρίως υπεύθυνα για αυτή την επίδραση είναι, το εικοσαπεντανοϊκό οξύ (EPA) και το δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA). Εξάλλου και το α - λινολενικό έχει κάποιο ρόλο αφού μετατρέπεται σε ένα ποσοστό σε EPA και DHA.

Έχει προταθεί ότι η καρδιοπροστατευτική δράση των ω – 3 λιπαρών οξέων ίσως οφείλεται στις αντιθρομβωτικές τους δράσεις. Έχει φανεί ότι τα ω – 3 λιπαρά οξέα μειώνουν την συσσώρευση των αιμοπεταλίων (μαζί αντιδραστικότητα και προσκόλληση) και την αγγειοσύσπαση, καθώς και ότι έχουν ευνοϊκή επίδραση στην αιμόσταση διαμέσου δράσεων όπως η ινωδολυση και ο σχηματισμός θρόμβων στο αίμα.

Εκτός από πλούσια πηγή λίπους και πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, οι ξηροί καρποί είναι μοναδική πηγή φυτικής πρωτεΐνης, αφού είναι πλούσιοι σε αργινίνη.

Οι διαιτητικές ίνες βρίσκονται σε μεγάλη περιεκτικότητα στους ξηρούς καρπούς (<7 g/100g), κυμαίνονται από 5-9% του βάρους τους. Από το σύνολο των ινών λιγότερο από 25% είναι διαλυτές, οι οποίες φαίνεται να μειώνουν τη συγκέντρωση της ολικής και της LDL χοληστερόλης και να βελτιώνουν τον γλυκαιμικό δείκτη. Έτσι, στα πλαίσια δίαιτας πλούσιας σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα στην οποία οι καρποί είναι η κύρια πηγή, αν

καταναλώνεται ποσότητα ίση με 100 γραμμάρια, οι καρποί μπορούν να συνεισφέρουν στην προτεινόμενη κατανάλωση διαιτητικών ινών που είναι της τάξεως των 25 – 30 γραμμάρια ανά ημέρα. Τα φιστίκια καλύπτουν με την κατανάλωση ενός ισοδύναμου, το 5-10% της συνιστώμενης πρόσληψης σε διαιτητικές ίνες.

Οι ξηροί καρποί είναι επίσης πηγές φυτοστερολών και άλλων φυτοχημικών συστατικών με ρυθμιστική επίδραση στη χοληστερόλη. Τα φυτοχημικά συστατικά περιλαμβάνουν το ελλαγικό οξύ, φλαβονοειδή, φαινολικά συστατικά, λουτεολίνη (βασικό αντιοξειδωτικό) και τοκοτριενόλες.

Με βάση κάποιες προφανείς αποδείξεις, τα φλαβονοειδή έχουν καρδιοπροστατευτική δράση. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι η πρόσληψη φλαβονοειδών είναι σημαντικά και αντίστροφα συνδεδεμένη με την θνησιμότητα από την στεφανιαία νόσο.

Οι φυτικές στερόλες αναστέλλουν την απορρόφηση της χοληστερόλης. Η σιτοστερόλη, είναι αυτή που βρίσκεται σε περίσσεια στα φυτικά έλαια, η οποία φαίνεται ότι έχει υποχοληστερολαιμική επίδραση. Λίγες πληροφορίες υπάρχουν για τη σύσταση των καρπών σε στερόλες και την επίδραση αυτών. Αν υπάρχουν όμως φαίνεται να επηρεάζουν την απορρόφηση χοληστερόλης και τη συγκέντρωσή της στο αίμα.

Ίσως οι ξηροί καρποί είναι, η καλύτερη φυσική πηγή της αντιοξειδωτικής βιταμίνης E και άλλων συστατικών με βιολογική δραστηριότητα όπως τα φλαβονοειδή, άλλες πολυφαινόλες και στερόλες. Η βιταμίνη E σε μεγάλες δόσεις (> 100 IU/d) έχει φανεί ότι μειώνει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο. Αυτή η καρδιοπροστατευτική επίδραση φαίνεται να συνδέεται με την αναστολή της οξειδωσης της LDL [η βιταμίνη E μεταφέρεται στο σωματίο της LDL], το σημαντικό στάδιο για τη διαδικασία της αθηρογένεσης. Ωστόσο το ποσό της βιταμίνης E που προσλαμβάνεται από τη συνήθη πρόσληψη ξηρών καρπών είναι πολύ λιγότερο από τα ποσά που έχουν ευεργετική επίδραση στην στεφανιαία νόσο. Παρόλο αυτά η κατανάλωση ξηρών καρπών είναι ένα ακόμη μέσο αύξησης της πρόσληψης βιταμίνης E.

Εκτός από το ξεχωριστό προφίλ των ξηρών καρπών σε λιπαρά οξέα, είναι και καλή πηγή σημαντικών μικροθρεπτικών συστατικών όπως το μαγνήσιο, ο χαλκός, το μαγγάνιο, ο φώσφορος και ο ψευδάργυρος. Κατά

μέσο όρο, ένα ισοδύναμο ξηρών καρπών περιέχει <18% του DRI σε χαλκό (2 mg) και έτσι οι ξηροί καρποί είναι σημαντική πηγή αυτού του ιχνοστοιχείου. Ο χαλκός έχει ρόλο κλειδί στην αιματοποίηση και δίαιτες χαμηλές σε χαλκό έχουν συσχετιστεί με δυσμενείς επιδράσεις στα λιπίδια, στην ανοχή της γλυκόζης, στην πίεση του αίματος και στο ηλεκτροκαρδιογράφημα.

Σχεδόν όλοι οι ξηροί καρποί είναι καλές πηγές μαγνησίου, περιέχοντας <8–20% του DRI (400 mg) για αυτό το μεταλλικό στοιχείο σε 28.4-g, δηλαδή 1 ισοδύναμο (1-oz). Το μαγνήσιο είναι σημαντικό για τη ρύθμιση της ισορροπίας ασβεστίου – καλίου. Χαμηλά επίπεδα μαγνησίου συνεπάγονται δυσρρυθμίες, έμφραγμα του μυοκαρδίου και ίσως αρτηριακή υπέρταση. Το μαγνήσιο είναι επίσης κρίσιμο για τη λειτουργία των ενζύμων, την υγιεινή του σμάλτου των δοντιών, τη χαλάρωση των μυών και τη μετάδοση του νευρικού σήματος.

Άλλα συστατικά που υπάρχουν σε σημαντικές ποσότητες στους περισσότερους ξηρούς καρπούς είναι η θειαμίνη, η νιασίνη, η ριβοφλαβίνη, το σελήνιο, το κάλιο και ο σίδηρος. Οι ξηροί καρποί που καλλιεργούνται στη Βραζιλία είναι ιδιαίτερα πλούσιοι σε σελήνιο, αφού ένα ισοδύναμο 28.4 g ή 1-oz, διασφαλίζει το 920% της συνιστώμενης διαιτητικής πρόσληψης.

Τα φιστίκια είναι καλή πηγή φυλλικού οξέος. Πρόσληψη 100 g ξηρών καρπών διασφαλίζουν <16% της συνιστώμενης καθημερινής πρόσληψης (DRI) σε φυλλικό οξύ, το οποίο είναι 400 mg ανά ημέρα. Επαρκής πρόσληψη φυλλικού οξέος είναι σημαντική για την αποφυγή χαμηλών επιπέδων της συγκέντρωσης ομοκυστεΐνης, η οποία φαίνεται να συνδέεται με την στένωση των καρωτικών αρτηριών.

Συγκεφαλαιώνοντας, είναι ξεκάθαρο ότι οι ξηροί καρποί περιέχουν πολλά θρεπτικά συστατικά και διαιτητικούς παράγοντες που ίσως παρέχουν προστατευτική επίδραση στην λειτουργία της καρδιάς. Το πιο σημαντικό είναι να γίνουν έρευνες ώστε να βρεθεί η συσχέτιση των συστατικών που βρίσκονται στους ξηρούς καρπούς και σχετίζονται με τον κίνδυνο της στεφανιαίας νόσου και άλλων χρόνιων ασθενειών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΔΡΑΣΕΙΣ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ

3.1 Βιολογικές δράσεις ξηρών καρπών γενικά

Σύμφωνα με την ιστορία η ξηροί καρποί, αποτελούσαν από παλιά βασικό συστατικό της διατροφής γιατί πρόσφεραν ενέργεια, πρωτεΐνη, απαραίτητα λιπαρά οξέα βιταμίνες και μέταλλα. Σήμερα αποτελούν μέρος της διατροφικής πυραμίδας του USDA Food Guide Pyramid's. Η παράδοση και οι υποσχέσεις της επιστήμης υποστηρίζουν το γεγονός ότι η πρόσληψη ξηρών καρπών είναι στα πλαίσια της υγιεινής διατροφής (28).

Παραδοσιακά υπήρχε η άποψη ότι η κατανάλωση ξηρών καρπών θα οδηγούσε σε αύξηση του βάρους λόγω της υψηλής τους περιεκτικότητας σε λίπος. Αυτό οδηγούσε τους ιατρούς και τους διαιτολόγους στο να είναι συγκρατημένοι όσον αφορά την ενσωμάτωση των ξηρών καρπών σε ένα υγιινό διαιτολόγιο. Ωστόσο, επιδημιολογικές και κλινικές μελέτες υποστηρίζουν ότι η μακροχρόνια κατανάλωση ξηρών καρπών δεν οδηγεί απαραίτητα σε αύξηση βάρους. Επιδημιολογικές έρευνες σε Ισπανία και Αμερική έδειξαν ότι η συχνότητα κατανάλωσης ξηρών καρπών όχι δεν σχετίζεται θετικά με το σωματικό βάρος ή το BMI (29, 30). Σε άλλες μελέτες μάλιστα έχει φανεί και αντίστροφη σχέση (31, 32). Τα αποτελέσματα επιδημιολογικών ερευνών επιβεβαιώνουν κλινικές μελέτες και διατροφικές παρεμβάσεις που δείχνουν ότι ισοθερμιδική αντικατάσταση τροφίμων ενός διαιτολογίου με ξηρούς καρπούς δεν οδηγεί σε αύξηση βάρους. Πολλές θεωρίες έχουν διατυπωθεί για το γεγονός ότι οι ξηροί καρποί όχι μόνο δεν οδηγούν σε αύξηση βάρους αλλά αντιθέτως προκαλούν ακόμα και μείωση του. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι καταναλωτές ξηρών καρπών επιδεικνύουν και μεγαλύτερη φυσική δραστηριότητα. Επίσης, οι ξηροί καρποί έχουν σαν αποτέλεσμα μεγαλύτερη κατανάλωση ενέργειας λόγω του υψηλού πρωτεϊνικού τους φορτίου και των αυξημένων πολυακόρεστων λιπαρών

οξέων. Τέλος, οι ξηροί καρποί προκαλούν αύξηση της αίσθησης κορεσμού με αποτέλεσμα την κατανάλωση μικρότερη ποσότητας τροφής (33).

Στο παρελθόν πολλοί αγνοούσαν τους ξηρούς καρπούς εξαιτίας της υψηλής περιεκτικότητάς της σε λίπος. Παρ' όλα αυτά η διαιτητική προσέγγιση για την αντιμετώπιση της υπέρτασης, η DASH diet, περιείχε ξ. καρπούς και όσπρια 4- 5 μερίδες ανά εβδομάδα. Οι καρποί είναι θρεπτικά πυκνοί και το περισσότερο λίπος είναι ακόρεστο. Φαίνεται ωστόσο να είναι η πιο καλή φυσική πηγή βιταμίνης E, περιέχουν επίσης σε σημαντικές αποθήκες διαιτητικές ίνες, μαγνήσιο, κάλιο και αργίνινη, είναι ο διαιτητικός πρόδρομος του νιτρικού οξειδίου. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι μειώνεται η LDL κατά 8 -12%, όταν καρύδια και αμύγδαλα περιλαμβάνονται στη δίαιτα. Τέσσερις από τις καλύτερες και μεγαλύτερες επιδημιολογικές μελέτες, έδειξαν ότι συχνή κατανάλωση ξ. καρπών σχετίζεται με μείωση του κινδύνου για στεφανιαία νόσο κατά 30 – 50%. Αυτά τα ευρήματα είναι σταθερά και δύσκολα μπορούν να διαψευστούν. Πιθανοί μηχανισμοί που βοηθούν για να μειωθεί η LDL είναι οι αντιοξειδωτικές λειτουργίες της βιταμίνης E, η επίδραση των υψηλών επιπέδων νιτρικού οξειδίου στη λειτουργία των αιμοπεταλίων και του ενδοθηλίου. Μπορεί οι ξηροί καρποί να αυξάνουν λίγο την ενεργειακή πρόσληψη, που όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενες μελέτες δεν οδηγεί σε πρόσληψη βάρους, αλλά οι επιδράσεις τους στη μείωση του κινδύνου είναι σημαντική (34).

Ένα από τα πιο τα απρόβλεπτα ευρήματα της διατροφικής επιδημιολογίας τα τελευταία 5 χρόνια είναι ότι η πρόσληψη ξηρών καρπών φαίνεται να προστατεύει την ισχαιμική καρδιοπάθεια. Πιο συγκεκριμένα σε αυτό το άρθρο ανασκόπησης μελετώνται όλες οι επιδημιολογικές μελέτες στις οποίες ερεύνησαν κατά πόσο η συχνή πρόσληψη ξηρών καρπών βοηθά στην πρόσληψη του εμφράγματος του μυοκαρδίου και της ισχαιμικής καρδιοπάθειας, σε χορτοφάγους και μη. Παρατηρήθηκε ότι οι χορτοφάγοι κατανάλωναν περισσότερους ξηρούς καρπούς απ' ότι οι μη χορτοφάγοι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε σύγκριση με αυτούς που έτρωγαν λιγότερο από 1 φορά / εβδομάδα, αυτοί που έτρωγαν 1- 4 φορές είχαν 22% λιγότερο κίνδυνο για οξύ έμφραγμα του μυοκαρδίου, ενώ αυτοί που έτρωγαν πάνω από 5 φορές / εβδομάδα είχαν 51 % λιγότερο κίνδυνο. Σημειωτέο ότι η πρόσληψη κάποιες φορές / μήνα δεν φαίνεται να έχει ευεργετικά

αποτελέσματα. Όσον αφορά την ισχαιμική καρδιοπάθεια τα ευρήματα είναι πολύ ενθαρρυντικά. Πρόσληψη ξηρών καρπών πάνω από 5 φορές / εβδομάδα, μειώνει τον κίνδυνο 12% και οι άντρες εμφανίζουν τη νόσο 5,6 χρόνια αργότερα από αυτούς που τρώνε σπάνια. Γενικά μειώνεται η θνησιμότητα και θνητότητα κατά 18 – 24% σε αυτούς που τρώνε πάνω από 5 φορές / εβδομάδα ξηρούς καρπούς. Έτσι η συχνή πρόσληψη ξηρών καρπών όχι μόνο μειώνει τον κίνδυνο αλλά αναβάλλει κιόλας την εμφάνιση της νόσου για πολλά χρόνια (35). Αντίστοιχες μελέτες έχουν δείξει παρόμοια αποτελέσματα σε ΑφροΑμερικάνικο πληθυσμό (36) και σε μεταεμμηνοπαυσιακές γυναίκες (37). Η προστατευτική δράση των ξηρών καρπών έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων οφείλεται εν πολλοίς στο γεγονός ότι οι ξηροί καρποί μπορούν να βελτιώσουν το λιπιδαιμικό προφίλ. Έχουν γίνει πολλές κλινικές μελέτες και διατροφικές παρεμβάσεις τόσο σε φυσιολογικούς όσο και σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς, οι οποίες θα παρουσιαστούν αναλυτικότερα για κάθε ξηρό καρπό ξεχωριστά, οι οποίες ωστόσο δείχνουν ότι η κατανάλωση ξηρών καρπών μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ολικής και LDL χοληστερόλης χωρίς να επηρεάζει δραματικά τα επίπεδα της HDL χοληστερόλης. Συγκεκριμένα, έχει φάνει ότι η πρόσληψη 30 γραμμαρίων ξηρών καρπών/ ημέρα, μειώνει τον κίνδυνο για μοιραίο καρδιακό επεισόδιο κατά 45% όταν αντικαταστήσουν κορεσμένα λιπαρά οξέα και κατά 30% όταν αντικαταστήσουν υδατάνθρακες, ενώ η LDL μειώνεται κατά 10% μέσα σε λίγες εβδομάδες (38). Οι ευεργετικές αυτές επιδράσεις οφείλονται κυρίως στη σύσταση τους σε λιπαρά οξέα και συγκεκριμένα στο υψηλό ποσοστό MUFA και PUFA. Φαίνεται όμως ότι η μείωση του σχετικού κινδύνου για καρδιαγγειακά επεισόδια μετά από κατανάλωση ξηρών καρπών είναι πολύ μεγαλύτερη από αυτή που μπορεί θεωρητικά να υπολογιστεί από την σύσταση του λίπους τους. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ύπαρξη στους ξηρούς καρπούς και άλλων συστατικών που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε μείωση του κινδύνου για καρδιαγγειακά. Πιθανά τέτοια συστατικά των ξηρών καρπών είναι οι τοκοφερόλες, φυτοστερόλες και φυτοιστρογόνα, οι φυτικές ίνες, η αυξημένη βιταμίνη E, αργινίνη, φυλλικό οξύ, κάλιο, μαγνήσιο, ταννίνες και πολυφαινόλες (27).

3.2 Βιολογικές δράσεις καρυδιού

Όπως και στο αμύγδαλο οι περισσότερες μελέτες που έχουν γίνει με καρύδια αναφέρονται στα ευεργετικά αποτελέσματα του καρυδιού στο λιπιδαιμικό προφίλ.

Στην σημαντικότερη επιδημιολογική μελέτη που έχει γίνει με σκοπό να μελετήσει την επίδραση της κατανάλωσης καρυδιού στα επίπεδα των λιπιδίων του αίματος σε Γαλλικό πληθυσμό που ζούσε σε περιοχή παραγωγής καρυδιών φάνηκε ότι υψηλή κατανάλωση καρυδιού συσχετίζεται με υψηλά επίπεδα HDL-C και apoA1. Οι άλλοι λιπιδαιμικοί δείκτες δεν εμφάνισαν συσχέτιση με την κατανάλωση καρυδιού (39). Ωστόσο αρκετές μελέτες διατροφικής παρέμβασης με καρύδια έχουν δείξει ότι μπορούν να βελτιώσουν το λιπιδαιμικό προφίλ. Συγκεκριμένα, παρέμβαση που έγινε με υγιείς εθελοντές και στην οποία αντικαταστάθηκε το 20% των θερμίδων μίας υποχοληστερολαιμικής δίαιτας με καρύδι έδειξε σημαντική μείωση της TC και του λόγου LDL-C/HDL-C (40). Σε παρόμοια μελέτη που έγινε με ελαφρά υπερλιπιδαιμικούς άντρες συγκρίθηκαν δύο διατροφικές παρεμβάσεις με χαμηλού λίπους δίαιτες, στην μία από τις οποίες ένα μέρος των θερμίδων είχε αντικατασταθεί με καρύδια. Αν και η κατανάλωση λίπους ήταν μεγαλύτερη στη δίαιτα με καρύδια αυτή μείωσε εξίσου την TC και LDL-C ενώ αύξησε εξίσου την HDL-C με την control δίαιτα. Παράλληλα, η κατανάλωση καρυδιών αύξησε σημαντικά το λινολεϊκό οξύ στα τριγλυκερίδια και στους εστέρες χοληστερόλης του πλάσματος (41). Παρόμοια επίδραση στο λιπιδαιμικό προφίλ φάνηκε και από μελέτες που έγιναν σε Ιαπωνικό πληθυσμό (42),(43). Η σημαντική δράση των καρυδιών στην μείωση της χοληστερόλης φαίνεται και από μελέτη όπου η αντικατάσταση μέρους των MUFA σε λίπος που προέρχεται από καρύδια σε μία μεσογειακή δίαιτα οδηγεί σε επιπλέον μείωση της TC και LDL-C σε σχέση με την μείωση που θα αναμενόταν με την Μεσογειακή Δίαιτα μόνη της (44). Σε μελέτες που έχουν γίνει στο Ιράν με την χορήγηση ελαίου από καρύδι σε μορφή κάψουλας ή με ολόκληρα καρύδια φάνηκε ότι η κατανάλωση καρυδιού για μικρό χρονικό διάστημα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των TGs και σε αύξηση της HDL-C (45), (46). Σε μελέτη όπου συμμετείχαν υπερλιπιδαιμικοί ασθενείς χορηγήθηκαν οι παρακάτω δίαιτες: 1) συνηθισμένη δίαιτα (HD), 2)

συνηθισμένη δίαιτα συν καρύδια (HD+W), 3) χαμηλή σε λίπος δίαιτα (LFD), και 4) χαμηλή σε λίπος δίαιτα συν καρύδια (LFD+W). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αυξημένη κατανάλωση ενέργειας από καρύδια δεν οδήγησε σε αύξηση του σωματικού βάρους, ενώ η δίαιτα χαμηλή σε λίπος οδήγησε σε απώλεια βάρους. Συγκρίνοντας την HD με την HD+W, αυξήθηκε η συγκέντρωση του λινελαϊκού και του α-λινολενικού. Με τη δίαιτα LFD+W, η ολική χοληστερόλη μειώθηκε σε σύγκριση με την HD και την LFD. Η συγκέντρωση της LDL μειώθηκε σε σύγκριση με την LFD. Άρα η συμπληρωματική χορήγηση καρυδιών αλλάζει την κατανομή των λιπιδίων στις διάφορες λιποπρωτεΐνες του πλάσματος ακόμα και όταν δεν αλλάζει τα λιπίδια (47). Σε μελέτη με διαβητικούς ασθενείς, οι οποίοι ακολουθούσαν δίαιτα χαμηλή σε λίπος ή δίαιτα χαμηλή σε λίπος με αυξημένα πολυακόρεστα ή δίαιτα χαμηλή σε λίπος με 30 g/ ημέρα καρύδια, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι στην ομάδα με τα καρύδια αυξήθηκε η HDL, μειώθηκε η LDL και η ολική χοληστερόλη, ενώ επιτεύχθηκαν τα επιθυμητά υψηλά επίπεδα πρόσληψης πολυακόρεστων και χαμηλά κορεσμένων, ενώ δεν επηρεάστηκε το σωματικό βάρος, η λιπώδης μάζα σώματος και η γλυκοζυλιωμένη αιμοσφαιρίνη. Άρα φαίνεται ότι η πρόσληψη καρυδιών βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ και σε διαβητικούς τύπου 2. (48)

Αν και η βελτίωση του λιπιδαιμικού προφίλ είναι ένας από τους σημαντικότερους τρόπους μείωσης της αθηροσκληρωτικής διαδικασίας τα καρύδια φαίνεται ότι δρουν και με άλλο τρόπο. Δίαιτες πλούσιες σε καρύδια έχει φανεί ότι μπορούν να οδηγήσουν σε αύξηση της ενσωμάτωσης PUFA (λινελαϊκό, α-λινολενικό οξύ) στα σωματίδια της LDL με ταυτόχρονη αύξηση της εισόδου της LDL, μέσω των υποδοχέων της, στα ηπατικά κύτταρα και άρα στην απομάκρυνση της από το αίμα (49). Επίσης, η αντικατάσταση MUFA σε μία Μεσογειακού τύπου δίαιτα με λίπος από καρύδι οδηγεί σε βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου σε υπερχοληστερολαιμικούς ασθενείς (50).

Η κατανάλωση καρυδιού φαίνεται ότι συμμετέχει επίσης στους μηχανισμούς της αιμόστασης και με αυτό τον τρόπο εμμέσως στους μηχανισμούς αθηροσκλήρωσης.

Χορήγηση πρωτεΐνης από καρύδι σε κουνέλια μείωσε την ικανότητα

συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και η μείωση αυτή σχετιζόταν με το λόγο

λυσίνης προς αργινίνη στο πρωτεϊνικό κλάσμα (51). Αντιθέτως, δεν φάνηκαν να επηρεάζονται αιμοστατικοί δείκτες (ιστικός ενεργοποιητής πλασμινογόνου, αναστολέας του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου, ο παράγοντας von Willebrand) σε ασθενείς με μεταβολικό σύνδρομο ύστερα από δίαιτα πλούσια σε καρύδια (52).

Μία μελέτη αναφέρεται στην θετική επίδραση του καρυδιού στην χημειοθεραπεία. Δηλαδή, τα εκχυλίσματα καρυδιού καταργούν την τοξικότητα που προκαλεί η κυκλοφωσφαμίδη κατά την χημειοθεραπεία σε ποντίκια (53). Επίσης, το ελλαγικό οξύ, στο οποίο είναι πλούσια τα καρύδια μπορεί να μειώσει *in vitro* των πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων και αυτό υποδεικνύει μία πιθανή αντικαρκινική δράση του καρυδιού (54).

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι το καρύδι είναι πλούσια πηγή φυσικών αντιοξειδωτικών. Το μεθανολικό του εκχύλισμα εμφανίζει από τις ισχυρότερες αντιοξειδωτικές δράσεις έναντι μεθανολικών εκχυλισμάτων από άλλα έλαια λόγω της υψηλής του περιεκτικότητας σε φαινολικές ενώσεις (55). Πολυφαινολικά εκχυλίσματα καρυδιού μπορούν να αναστείλουν την *in vitro* οξειδωση πλάσματος και LDL (56). Επίσης, έχει φανεί ότι τα καρύδια περιέχουν υψηλά ποσά μελατονίνης και ότι η κατανάλωση καρυδιών από αρουραίους οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα μελατονίνης στο πλάσμα τους, τα οποία σχετίζονται με την αυξημένη αντιοξειδωτική του ικανότητα (57). Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση των φαινολικών των καρυδιών, στο οξειδωτικό στρες ποντικών με διαβήτη τύπου 2. Χορηγήθηκε από το στόμα, κλάσμα πολυφαινολών καρυδιών 200 mg/kg σωματικού βάρους για 4 εβδομάδες και φαίνεται η σημαντική μείωση της 8-υδροξυ-δεοξυγουανοσίνης των ούρων, που είναι δείκτης οξειδωτικού στρες. Τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν ότι οι πολυφαινόλες των καρυδιών έχουν αντιοξειδωτικές επιδράσεις τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* (58).

3.3 Βιολογικές δράσεις αμυγδάλου

Οι περισσότερες μελέτες που αφορούν το αμύγδαλο αναφέρουν την προστατευτική του δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα και την ευεργετική του επίδραση στα λιπίδια αίματος. Ήδη από τις αρχές τις δεκαετίας του 1990 είχε

διαφανεί ότι η ενσωμάτωση ξηρών καρπών σε διαιτολόγιο χαμηλό σε κορεσμένα λίπη και χοληστερόλη μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της LDL-C και της TC αν και ήταν γνωστό ότι τα αμύγδαλα είχαν υψηλό ποσοστό λίπους (59). Παρόμοια αποτελέσματα αντιλιπιδαιμικής δράσης φάνηκαν και σε μελέτες διατροφικής παρέμβασης όπου αντικαταστάθηκε το κορεσμένο λίπος από το λίπος του αμυγδάλου (60) ή όταν συγκρίθηκε δίαιτα, η οποία περιείχε αμύγδαλα με δίαιτα όπου το λίπος προέρχονταν από βούτυρο ή τυρί κυρίως (61). Σε μία ιδιαίτερα σημαντική μελέτη, η ενσωμάτωση αμυγδάλου σε δίαιτα ειδικά διαμορφωμένη από την National Cholesterol Education Programme σε υπερλιπιδαιμικούς ασθενείς έδειξε ότι αντίστροφη σχέση μεταξύ της ενέργειας που λαμβάνεται από τα αμύγδαλα με την συγκέντρωση των TC, LDL-C, apoB και με τους λόγους LDL-C/HDL-C και apoA/ApoB (62). Σε μία προσπάθεια να διερευνηθεί αν πέρα από το λίπος του αμυγδάλου και άλλα συστατικά του αμυγδάλου συμμετέχουν στην αντιλιπιδαιμική δράση του, συγκρίθηκε δίαιτα εμπλουτισμένη με έλαιο αμυγδάλου με την ίδια δίαιτα όπου είχε εμπλουτιστεί με ισοενεργειακή ποσότητα ολικών αμυγδάλων. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι τόσο το έλαιο του αμυγδάλου όσο και τα ολικά αμύγδαλα προκαλούσαν παρόμοια σημαντική μείωση στα TG, TC, LDL-C χωρίς να επηρεάζουν την αντίσταση στην οξειδωση της LDL (63). Τέλος, μελέτη που συνέκρινε την επίδραση του τρόπου επεξεργασίας του αμυγδάλου (ωμό, ψημένο, ψημένο και αλατισμένο) έδειξε ότι η επεξεργασία του αμυγδάλου δεν επηρεάζει την αντιλιπιδαιμική του ικανότητα (64). Πολλές μελέτες εδώ και 20 χρόνια έχουν αποδείξει ότι οι μικρές και πυκνές LDL έχουν την μεγαλύτερη αθηρογόνο δράση. Για αυτό το λόγο έγινε προσπάθεια να εξακριβωθεί κατά πόσο η ενσωμάτωση σε μια δίαιτα πρωτεΐνης σόγιας, φυτικών ινών, φυτοστερολών και αμυγδάλων θα επηρέαζε την LDL. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η LDL-C μειώθηκε κατά 30 % ενώ ο λόγος TC/LDL-C κατά 18,6%. Το σημαντικότερο εύρημα όμως αυτής της μελέτης ήταν ότι μειώθηκε η πιο αθηρογόνος μορφή της LDL, αυτή με διάμετρο <25.5 nm. Αυτό σημαίνει ότι ο συνδυασμός αυτών των φυτικών συστατικών μειώνει τον κίνδυνο για καρδιαγγειακά νοσήματα (65).

Αν και όπως φάνηκε από τις παραπάνω μελέτες, η κατανάλωση αμυγδάλου βελτιώνει κατά πολύ το λιπιδαιμικό προφίλ, η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος επηρεάζει την απόφαση γιατρών και διαιτολόγων να

το ενσωματώσουν σε μία δίαιτα, ιδιαίτερα όταν αυτή προορίζεται για υπερλιπιδαιμικούς ή παχύσαρκους ασθενείς. Στην κατεύθυνση αυτή έχουν γίνει αρκετές μελέτες, οι οποίες έχουν δείξει ότι η ενσωμάτωση μίας μέτριας ποσότητας αμυγδάλων σε ένα φυσιολογικό διαιτολόγιο δεν οδήγησε σε αύξηση βάρους (66). Μία μόνο μελέτη έδειξε ότι η χορήγηση 100 g αμυγδαλού (οι θερμίδες του αμυγδαλού μειώθηκαν από την συνηθισμένη δίαιτα που ακολουθούσαν οι εθελοντές) για 4 εβδομάδες σε άντρες και προεμμηνοπαυσιακές γυναίκες οδήγησε σε μία αύξηση 0,9 kg για τους άντρες και 0,3 kg για τις γυναίκες (67).

Πέρα από την αντιλιπιδαιμική του δράση, το αμύγδαλο εμφανίζει και αντιοξειδωτικές δράσεις. Έχουν απομονωθεί πολλές φαινολικές ενώσεις, τόσο από τον καρπό όσο και από τη φλούδα του αμυγδαλού που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση *in vitro* (16), (17). Τα φλαβονοειδή που προέρχονται από τη φλούδα του αμύγδαλου, με κυρίαρχα την κατεχίνη και φλαβονόλη, δρουν προστατευτικά και συνεργιστικά με τις βιταμίνες A και E στην οξειδωση της LDL. Το ίδιο κλάσμα, χορηγούμενο σε hamsters, προκάλεσε αύξηση της αντίστασης στην οξειδωση της LDL μέσα σε μία ώρα, η οποία σχετίζεται με την αύξηση της εισόδου αντιοξειδωτικών φαινολικών ενώσεων, όπως της κατεχίνης, επικατεχίνης και φλαβονολών στο πλάσμα (68). Η αύξηση των αντιοξειδωτικών στο πλάσμα μετά από κατανάλωση αμυγδαλού έχει φανεί και σε διατροφική παρέμβαση σε υγιείς εθελοντές όπου υπήρχε δοσοεξαρτώμενη σχέση μεταξύ κατανάλωσης αμυγδαλού και α-τοκοφερόλης στο πλάσμα και στα ερυθρά κύτταρα (69).

Αν και έχει διεξαχθεί πληθώρα ερευνών για τα ευεργετικά αποτελέσματα του αμύγδαλου στα λιπίδια αίματος και για την προστατευτική του δράση στα καρδιαγγειακά νοσήματα, τρεις μόνο μελέτες έχουν με διαβητικούς ασθενείς. Στην πρώτη συμμετείχαν 10 άντρες και 10 γυναίκες, ηλικίας 20 – 50 χρόνων και BMI 18 – 30 kg/m², όπου έπρεπε να έχουν γλυκόζη νηστείας έως 120 mg/dl. Ενώ στη δεύτερη συμμετείχαν 34 άντρες και γυναίκες που είχαν διαβήτη τύπου 2, ηλικίας 30 -65 χρόνων και BMI 20 -40 kg/m². Στην πρώτη έρευνα αφού έκαναν καμπύλη ανοχής γλυκόζης, ακολούθησαν για 4 εβδομάδες το συνηθισμένο τους διαιτολόγιο και έτρωγαν συμπληρωματικά 100 g αμύγδαλων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι αυξήθηκε

λίγο το σωματικό τους βάρος, μειώθηκε η TC και η LDL-C έως 21% και 29%, αντίστοιχα. Ωστόσο δεν φάνηκε η κατανάλωση αμυγδάλων να επηρεάζει την ευαισθησία της ινσουλίνης. Στην δεύτερη έρευνα ακολουθήθηκαν 4 είδη δίαιτας για 4 εβδομάδες. 1) υψηλή σε λίπος και αμύγδαλα (HFA; 37% ολικό λίπος, 10% από τα αμύγδαλα) 2) χαμηλή σε λίπος υψηλή σε αμύγδαλα (LFA: 25% ολικό λίπος, 10% από αμύγδαλα); 3) υψηλή σε λίπος ελέγχου (HFC: 37% ολικό λίπος, 10% από ελαιόλαδο) και 4) χαμηλή σε λίπος ελέγχου (LFC: 25% ολικό λίπος, 10% από ελαιόλαδο). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ολική χοληστερόλη μειώθηκε περισσότερο με την δίαιτα HFA . Η HDL-C μειώθηκε με τις δίαιτες που περιείχαν αμύγδαλα. Και από αυτή την έρευνα φαίνεται ότι δεν επηρεάστηκε η υπεργλυκαιμία. Συμπεραίνουμε ότι τα αμύγδαλα μπορούν να βελτιώσουν το λιπιδαιμικό προφίλ σε διαβητικούς περισσότερο από το αναμενόμενο αλλά όχι την αυξημένη γλυκόζη στο αίμα (67). Στην τρίτη μελέτη έγινε σύγκριση ανάμεσα σε δίαιτα χαμηλή σε θερμίδες εμπλουτισμένη με αμύγδαλα (Δ.Χ.Θ.Α) ή με σύνθετους υδατάνθρακες (Δ.Χ.Θ.Υ.). Οι συμμετέχοντες ήταν 65 παχύσαρκοι και υπέρβαροι, ηλικίας 27-79 χρονών, με δείκτη μάζας σώματος (BMI): 27-55 kg/m²). Η δίαιτα πλούσια σε αμύγδαλα περιείχε 84 g ανά ημέρα και είχε την εξής σύσταση: 39% λίπος, 25% μονοακόρεστα και 32% υδατάνθρακες), ενώ η δίαιτα εμπλουτισμένη με υδατάνθρακες είχε την εξής σύσταση: 18% λίπος, 5% μονοακόρεστα και 53% υδατάνθρακες), παρέχοντας και οι 2 ίσα ποσά θερμίδων και πρωτεΐνης. Η έρευνα είχε διάρκεια 24 εβδομάδες. Τα αποτελέσματα ήταν τα εξής: η δίαιτα χαμηλή σε θερμίδες και εμπλουτισμένη με αμύγδαλα παρουσίασε μεγαλύτερη μείωση του σωματικού βάρους /BMI σε σύγκριση με τους σύνθετους υδατάνθρακες(-18 αντί -11%), περιφέρεια μέσης (WC) (-14 αντί -9%), λιπώδη μάζα (FM) (-30 αντί -20%), ολικά σωματικά υγρά (-8 αντί -1%) και συστολική αρτηριακή πίεση (-11 αντί 0%). Η μεγαλύτερη μείωση: σωματικού βάρους ήταν 62% , περιφέρειας μέσης 50% και 56% λιπώδους μάζας που φάνηκε σε αυτούς που ακολουθούσαν δίαιτα εμπλουτισμένη με αμύγδαλα σε σχέση με τη δίαιτα πλούσια σε σύνθετους υδατάνθρακες. Η υψηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη αυξήθηκε στην Δ.Χ.Θ.Υ. και μειώθηκε στην Δ.Χ.Θ.Α. Η γλυκόζη, η ινσουλίνη, η διαστολική αρτηριακή πίεση, η ολική χοληστερόλη, τα τριγλυκερίδια, η χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη (LDL-C) και ο λόγος LDL-C/HDL-C μειώθηκαν σημαντικά σε παρόμοιο βαθμό και στις 2 παρεμβάσεις.

Η αντίσταση στην ινσουλίνη μειώθηκε και στις 2 παρεμβάσεις (Δ.Χ.Θ.Α -66% και Δ.Χ.Θ.Υ -35%). Ανάμεσα σε αυτούς που έπασχαν από διαβήτη τύπου 2 υπήρχαν παρόμοιες ή και μεγαλύτερες μειώσεις σε σχέση με την φαρμακευτική αγωγή, τόσο στην Δ.Χ.Θ.Α , όσο και στην Δ.Χ.Θ.Υ (96 αντί 50%, αντίστοιχα). Άρα η Δ.Χ.Θ.Α ομαλοποιεί της ανωμαλίες που σχετίζονται με το μεταβολικό σύνδρομο και έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του σωματικού βάρους (70).

Τέλος, σε μία μελέτη που έγινε προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του ελαίου του αμύγδαλου σε πειραματικά επαγόμενο καρκίνο του παχέος εντέρου σε αρουραίους φάνηκε ότι με την πρόσληψη του ελαίου μειώθηκαν οι έκτοπες εστίες. Έτσι συμπεραίνεται ότι η πρόσληψη του ελαίου του αμύγδαλου ίσως να μειώνει τον καρκίνο του παχέος εντέρου (71).

3.4 Βιολογικές δράσεις κελυφωτού φιστικιού

Ελάχιστες διατροφικές μελέτες έχουν γίνει για την μελέτη των βιολογικών δράσεων του κελυφωτού φιστικιού. Στην μοναδική μελέτη διατροφικής παρέμβασης, στην οποία μελετήθηκε κατά πόσο η αντικατάσταση του 20% των ημερήσιων θερμίδων πρόσληψης από φιστίκια βελτιώνει το λιπιδαιμικό προφίλ σε ασθενείς με πρώιμη μέτρια υπερχοληστερολαιμία φάνηκε ότι η ενσωμάτωση φιστικιών στο καθημερινό διαιτολόγιο μείωσε την ολική χοληστερόλη, αύξησε την HDL χοληστερόλη, μείωσε τον λόγο TC/ HDL-C και μείωσε τον λόγο LDL-C/HDL-C. Η μείωση των TG και της LDL-C δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Το σωματικό βάρος και η αρτηριακή πίεση παρέμειναν σταθερά κατά τη διάρκεια της έρευνας. Φαίνεται λοιπόν ότι η πρόσληψη φιστικιών σε σχέση με άλλα λιπαρά που καταναλώνονται καθημερινά σε ένα διαιτολόγιο, μπορεί να βελτιώσει το λιπιδαιμικό προφίλ και άρα να μειώσει τον κίνδυνο για στεφανιαία νόσο (72).

Εκχυλίσματα από καρπό κελυφωτού φιστικιού παρουσιάζουν αντιμυκητιακή, αντιβακτηριαδική και αντιική δράση in vitro. Συγκεκριμένα, 15 λιπόφιλες ενώσεις από τα φύλλα, το βλαστό και τον καρπό του φιστικιού

μελετήθηκαν για την δράση τους έναντι των *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *C. Parapsilosis*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα εκχυλίσματα εμφάνισαν μικρή αντιμυκητιακή και αντιβακτηριδιακή δράση σε συγκεντρώσεις 128 – 256 µg/ ml. Τα εκχυλίσματα που προέρχονταν από τον καρπό έδειξαν σημαντική αντιμυκητιακή δράση σε σχέση με τα άλλα (73). Σε άλλη μελέτη, διερευνήθηκε η αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου από τα φιστίκια της Τουρκίας, έναντι της ανάπτυξης 13 βακτηρίων και 3 παθογόνων ζυμών. Τα αιθέρια έλαια περιείχαν μονοτερπένια, οξυγονομένα μονοτερπένια, διτερπένια, α- πινένιο, β- πινένιο, trans-verbenol, camphene, trans-pinocarveol and limonene. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αιθέρια έλαια εμποδίζουν την ανάπτυξη 9 βακτηρίων και όλων των ζυμών που μελετήθηκαν. Οι δράσεις των ελαίων ήταν χαμηλότερες από αυτές των αντιβιοτικών όπως η αμπικιλίνη και η στρεπτομυκίνη. Οι αντιμικροβιακές δράσεις εξαρτιόντουσαν σημαντικά από την συγκέντρωση των βιοδραστικών συστατικών carvacrol, camphene, and limonene (10).

3.5 Βιολογικές δράσεις κολοκυθόσπορου

Όσον αφορά τον κολοκυθόσπορο οι περισσότερες μελέτες αναφέρονται στην προστατευτική του δράση στον προστάτη και στο ουροποιητικό σύστημα. Συγκεκριμένα, σε μελέτη που έγινε σε εφήβους στην Ταϊλάνδη, συγκρίθηκε η πρόσληψη ενός βασικού μενού με σνακ κολοκυθόσπορου. Η μελέτη έδειξε ότι ο κολοκυθόσπορος είχε ανασταλτική δράση στη διαμόρφωση και συσσώρευση κρυστάλλων στην ουροδόχο κύστη, σε σύγκριση με το βασικό μενού (74). Παρόμοια αποτελέσματα φάνηκαν και από την συμπληρωματική χορήγηση κολοκυθόσπορου σε 20 αγόρια 2- 7 ετών στην Ταϊλάνδη. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αύξηση χορήγησης κολοκυθόσπορου δίνει καλύτερη κλινική εικόνα μειώνοντας την ύπαρξη κρυστάλλων ασβεστίου και οξαλικού και τα επίπεδα ασβεστίου με παράλληλη αύξηση των επιπέδων φωσφόρου, πυροφωσφορικού, γλυκοζαμινογλυκανών και καλίου στα ούρα. Άρα ο κολοκυθόσπορος διασφαλίζει υψηλά επίπεδα φωσφόρου και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως ενδεχόμενος παράγοντας

μείωσης του κινδύνου δημιουργίας πέτρας στην ουροδόχο κύστη (75). Σε άλλη μελέτη χορηγήθηκε το συμπλήρωμα curbicin (που προέρχεται από τον κολοκυθόσπορο) σε 53 ασθενείς με καλοήγη υπερπλασία προστάτη, για 3 μήνες. Η έρευνα ήταν διπλή τυχαιοποιημένη και συγκρίθηκε η αποτελεσματικότητα του χορηγούμενου συμπληρώματος σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου. Η ουροποιητική ροή, ο χρόνος ούρησης, τα υπολειπόμενα ούρα, η συχνότητα ούρησης και η υποκειμενική εκτίμηση της επίδρασης της θεραπείας, βελτιώθηκαν σημαντικά στην ομάδα θεραπείας χωρίς να παρατηρηθούν ανεπιθύμητες παρενέργειες (76).

Σποραδικές μελέτες έχουν γίνει με την χορήγηση εκχυλισμάτων κολοκυθόσπορου σε πειραματόζωα. Σε μία απ' αυτές φάνηκε ότι η χορήγηση πρωτεΐνης κολοκυθόσπορου σε ποντίκια που ακολουθούσαν δίαιτα χαμηλή σε πρωτεΐνη μείωσε την αύξηση των ηπατικών ενζύμων που οφείλεται στον πρωτεϊνικό υποσιτισμό (77). Το έλαιο του κολοκυθόσπορου φαίνεται ότι έχει και αντιφλεγμονώδεις δράσεις αφού μπορεί να μειώσει τους δείκτες φλεγμονής σε ποντίκια στα οποία έχει πειραματικά προκληθεί αρθρίτιδα (78).

Τέλος, *in vitro* μελέτες έχουν δείξει την παρουσία βιολογικά δραστικών μικροσυστατικών στον κολοκυθόσπορο. Συγκεκριμένα, ένα πεπτίδιο του κολοκυθόσπορου, η *cucurmoschin* έχει αντιμυκητιακές ιδιότητες (79). Μία άλλη πρωτεΐνη του κολοκυθόσπορου, η *moschatin*, ανέστειλε την ανάπτυξη κυττάρων μελανώματος υποδεικνύοντας ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινικός παράγοντας (80). Από τον κολοκυθόσπορο έχουν επίσης απομονωθεί και αναστολείς του παράγοντα XIIa της πήξης (81) καθώς και της θρυψίνης (82).

3.6 Βιολογικές δράσεις ηλιόσπορου

Ελάχιστες μελέτες έχουν γίνει για τις βιολογικές δράσεις του ηλιόσπορου. Σε μία απ' αυτές το έλαιο του ηλιόσπορου, *Biopegoxoil*, εξετάστηκε για την αντιμικροβιακή δράση ενάντια κάποιων παθογόνων στελεχών *in vitro*, καθώς και την επούλωση πληγών από *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* και *Escherichia coli* *in vivo*. Φαίνεται ότι 3.5 mg/ml από το έλαιο την έβδομη ημέρα μετά από τον

εμβολιασμό με *S. Aureus*, βοηθάει την επούλωση. Το *Bioferoxoil* έδειξε αντιφλεγμονώδεις επιδράσεις σε όλα τα στελέχη, σε συγκέντρωση 2.0 to 3.5 mg/ml. Επίσης φαίνεται να προστατεύει το δέρμα και να βοηθά στην επούλωση πληγών σε σχέση με την νεομυκίνη που χρησιμοποιήθηκαν ως έλεγχος (83). Σε διατροφική μελέτη, στην οποία χορηγήθηκε πρωτεΐνη ηλιόσπορου σε αρουραίους, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη του ηλιόσπορου ευνοούσε την ανάπτυξη των ποντικών πολύ περισσότερο απ'ότι η καζεΐνη, προκάλεσε μείωση της TC και LDL-C και γενικά εμφάνισε υψηλή διατροφική αξία (84). Τέλος, απομονώθηκε πρωτεΐνη από τον ηλιόσπορο, η οποία υδρολύθηκε από τις πρωτεάσες πεψίνη και παγκρεατίνη και δημιουργήθηκαν τα υδρολυμένα πρωτεολυτικά προϊόντα τα οποία αναστέλλουν το μετατρεπτικό ένζυμο της αγγειοτενσίνης (ACE). Ο αναστολέας του ACE είναι πεπτιδίο και έχει αλληλουχία Phe-Val-Asn-Pro-Gln-Ala-Gly-Ser και απομονώθηκε με χρωματογραφία. Αυτό το πεπτιδίο συμφωνεί με ένα κλάσμα της ηλιανθίνης, της 11S σφαιρίνης από τον καρπό του ηλιόσπορου, που είναι η βασική πηγή αποθήκευσης στο φυτό. Αυτό δείχνει ότι η πρωτεΐνη του ηλιόσπορου είναι μια ενδεχόμενη πηγή του πεπτιδίου που αναστέλλει τον ACE, όταν υδρολυθεί με πεψίνη και παγκρεατίνη (85).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

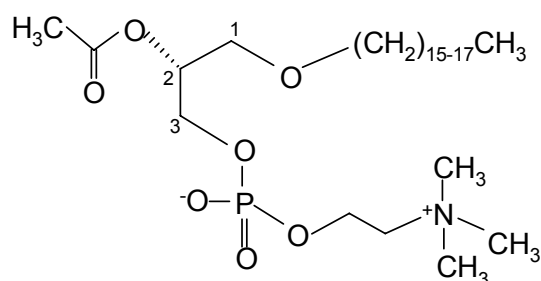
4.1 Εισαγωγή

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) είναι το πρώτο βιολογικά δραστικό φωσφολιποειδές το οποίο βρέθηκε στην φύση και παραμένει μέχρι σήμερα ένας από τους πιο δραστικούς, φυσικά παραγόμενους, χημικούς μεσολαβητές. Συντίθεται και εκκρίνεται από πλήθος κυττάρων, τόσο σε βασικά επίπεδα, όσο και σε απόκριση διαφόρων ερεθισμάτων και συμμετέχει σε ένα μεγάλο αριθμό παθοφυσιολογικών καταστάσεων του οργανισμού. Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη του PAF εμφανίστηκαν το 1966 με την ανακάλυψη μηχανισμού ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων κουνελιού από αντιγόνα, ο οποίος ήταν ανεξάρτητος από το συμπλήρωμα και προκαλούσε έκκριση ισταμίνης από τα αιμοπετάλια. Το 1977 αποδείχτηκε η φωσφολιποειδική φύση του μορίου και τελικά το 1979 οι Demopoulos, Hanahan και Pinckard ανακοίνωσαν την ημισυνθετική παρασκευή της 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορυλοχολίνης, η οποία είχε την ίδια βιολογική, χημική, και χρωματογραφική συμπεριφορά με αυτή του φυσικά απομονωμένου PAF. Αμέσως μετά, η ομάδα του Benveniste ανακοίνωσε μια διαφορετική ημισυνθετική πορεία παρασκευής του PAF ενώ εννέα μήνες αργότερα διευκρινίστηκε και η δομή του φυσικά απαντώμενου PAF, από βασεόφιλα κουνελιού, η οποία ήταν η ίδια με αυτή του συνθετικού PAF. Την ίδια χρονική περίοδο οι *Blank et al* ανακοίνωσαν την ημισυνθετική παρασκευή του αντιυπερτασικού πολικού λιποειδούς του νεφρού (antihypertensive polar renomedullary lipid, APRL) το οποίο είχε απομονωθεί από μυελό νεφρού κουνελιού είχε σημαντικές αντιυπερτασικές ιδιότητες και εμφάνιζε τα ίδια δομικά χαρακτηριστικά με τον PAF. Τελικά αποδείχτηκε ότι το APRL και ο PAF αντιστοιχούσαν στο ίδιο μόριο. Η παρουσία του PAF είχε ανιχνευθεί και σε εκχυλίσματα εγκεφάλου βοδιού, από τα οποία

απομονώθηκε, το 1976, αγγειοδιασταλτικός παράγοντας που ονομάστηκε depressor-I, ο οποίος είχε χρωματογραφική συμπεριφορά παρόμοια με την λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη. Αργότερα, αποδείχτηκε ότι παράγοντας αυτό ήταν ένα μίγμα μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF (86).

4.2 Χημική δομή του PAF

Ο PAF είναι ένα γλυκεριναιθερικό φωσφολιποειδές. Στην πρώτη θέση του γλυκερινικού σκελετού συνδέεται, με αιθερικό δεσμό, μια λιπαρή αλυσίδα που περιλαμβάνει συνήθως 16 ή 18 άτομα άνθρακα και είναι κορεσμένη ή ακόρεστη με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς, στη δεύτερη θέση βρίσκεται εστεροποιημένο ένα οξικό οξύ και στην τρίτη θέση υπάρχει μια ομάδα φωσφορυλοχολίνης (Σχήμα 1). Η παρακάτω δομή αντιπροσωπεύει την πιο δραστική μορφή του PAF όχι όμως και τη μοναδική αφού στη φύση έχει βρεθεί μια μεγάλη ποικιλία μοριακών ειδών και αναλόγων του PAF με παρόμοιες βιολογικές δράσεις. (86)



Σχήμα 4.1. Χημική δομή του PAF

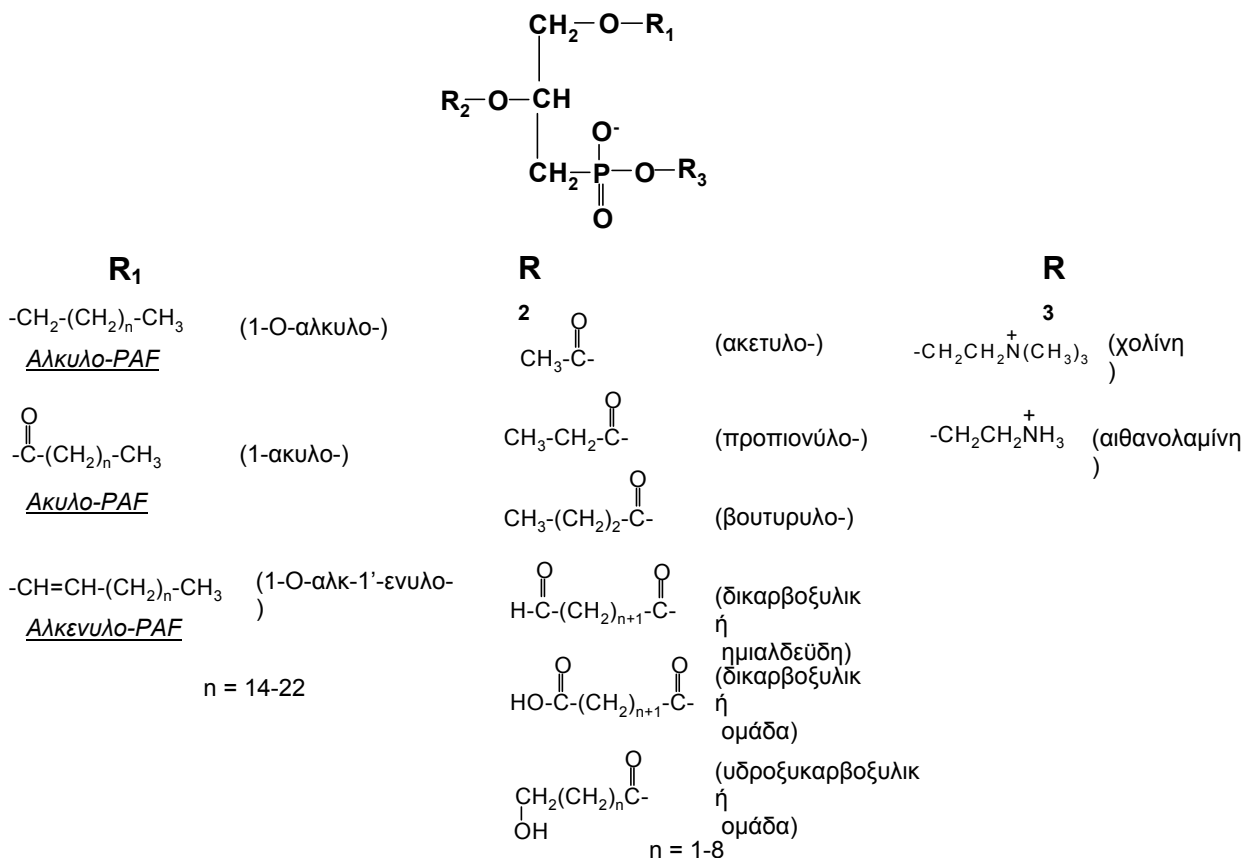
4.3 Είδη και μοριακά ανάλογα του PAF

Εκτός από την κλασσική δομή του PAF (Σχήμα 1), στη φύση έχουν βρεθεί και πιστοποιηθεί πλήθος μοριακών ειδών και αναλόγων του με παρόμοιες ή μικρότερες βιολογικές δραστηριότητες. Τα μοριακά είδη και ανάλογα του PAF διαφέρουν ως προς το είδος της λιπαρής αλυσίδας και του δεσμού με τον οποίο αυτή συνδέεται στην sn-1 θέση του γλυκερινικού

σκελετού, ως προς το είδος του λιπαρού οξέος που είναι εστεροποιημένο στην sn-2 θέση και τέλος ως προς το είδος της βάσης στην sn-3 θέση. Στην sn-1 θέση έχουν βρεθεί ανθρακικές αλυσίδες από 14 έως 22 άτομα άνθρακα με έναν ή δύο διπλούς δεσμούς ενώ έχουν βρεθεί ανάλογα του PAF με υδροξυλιωμένες ανθρακικές αλυσίδες. Ο άκυλο-PAF, στον οποίο η ανθρακική αλυσίδα συνδέεται στην sn-1 θέση με εστερικό δεσμό, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένος στη φύση και αποτελεί το κυριότερο μοριακό είδος του PAF στα μαστοκύτταρα, βασεόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα. Επίσης, έχουν βρεθεί και αλκένυλο- ανάλογα του PAF, όπου η λιπαρή αλυσίδα συνδέεται με βινυλαιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση. Τα ανάλογα αυτά προέρχονται από τα πλασμαλόγωνα. Στην sn-2 θέση έχουν βρεθεί εστεροποιημένες τόσο προπιονύλο- όσο και βουτυρύλο- ομάδες, ενώ τα τελευταία χρόνια μελετώνται, ιδιαίτερα εκτεταμένα, ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) όπου στην sn-2 θέση βρίσκονται εστεροποιημένες μικρές άκυλο- ομάδες που είναι συνήθως μονοκαρβοξυλικά, δικαρβοξυλικά και υδροξυκαρβοξυλικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές έχουν δράση ανάλογη του PAF και σχηματίζονται με οξειδωση της PC, που έχει πολυακόρεστα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση, σε καταστάσεις όπου σχηματίζεται ένα ισχυρά οξειδωτικό περιβάλλον όπως στις διάφορες ισχαιμίες και στις χρόνιες φλεγμονές. Τέλος, έχουν βρεθεί ανάλογα του PAF όπου στην sn-3 θέση αντί για χολίνη υπάρχει αιθανολαμίνη. Σε αυτά τα ανάλογα, η λιπαρή αλυσίδα συνδέεται στην sn-1 θέση κυρίως με βινυλαιθερικό δεσμό.

Μελέτες που έχουν γίνει με συνθετικά ανάλογα του PAF έχουν δείξει πως η δομή των μοριακών ειδών καθορίζει και την βιολογική τους δραστικότητα. Το σημαντικότερο δομικό χαρακτηριστικό για την ύπαρξη βιολογικής δραστικότητας είναι η παρουσία ακετυλομάδας στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Απομάκρυνση της ακετυλομάδας οδηγεί στο λυσο-PAF, ο οποίος είναι ανενεργός. Αντικατάσταση της ακετυλομάδας με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας οδηγεί σε μόρια με μικρότερη βιολογική δραστικότητα. Επίσης, ο χημικός δεσμός στην sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την βιολογική δραστικότητα του PAF. Η δραστικότητα ακολουθεί γενικά την σειρά αλκυλο-PAF>αλκενυλο-PAF>ακυλο-PAF. Όσον αφορά το είδος της ανθρακικής αλυσίδας στην sn-1 θέση, η μέγιστη δραστικότητα εμφανίζεται για κορεσμένα

ή μονοακόρεστα λιπαρά οξέα με 16 ή 18 άτομα άνθρακα. Η σειρά δραστηριότητα όσον αφορά την βάση στην sn-3 θέση είναι η εξής : χολίνη>διμεθυλοαιθανολαμίνη>μονομεθυλοαιθανολαμίνη> αιθανολαμίνη. Τέλος, ο PAF εμφανίζει στερεοεξειδίκευση αφού η δραστική εναντιομερής μορφή του στην sn-2 θέση είναι η φυσικά απαντώμενη R μορφή (87), (88).



Σχήμα 4.2. Μοριακά είδη και ανάλογα του PAF

4.4 Μεταβολισμός του PAF

Η μελέτη του μεταβολισμού του PAF ξεκίνησε σχεδόν ταυτόχρονα με την εύρεση της δομής του. Οι πρώτες μελέτες επικεντρώθηκαν στην εύρεση των καταβολικών και βιοσυνθετικών πορειών του PAF στα κύτταρα, στην μελέτη των μεμονωμένων αντιδράσεων της κάθε πορείας και στο βιοχημικό χαρακτηρισμό των ενζύμων που καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές. Τα τελευταία χρόνια η έρευνα εστιάζεται κυρίως στους μηχανισμούς ρύθμισης

των μεταβολικών πορειών και στον καθαρισμό και κλωνοποίηση των ενζύμων μεταβολισμού. Τα αποτελέσματα των ερευνών έχουν δείξει ότι ο PAF μπορεί να βιοσυντίθεται και να αποικοδομείται με περισσότερο από μία πορείες στα κύτταρα, ανάλογα το είδος και το περιβάλλον του κυττάρου. Οι πορείες αυτές βρίσκονται κάτω από αυστηρό έλεγχο και ρυθμίζονται από εξωκυτταρικά σήματα που οδηγούν, είτε στην σύνθεση είτε στην απενεργοποίηση του PAF ανάλογα την παθοφυσιολογική κατάσταση του οργανισμού. Παράλληλα, έχει βρεθεί άμεση συσχέτιση του μεταβολισμού του PAF με το μεταβολισμό και άλλων, βιολογικά δραστικών, λιπιδίων, κυρίως εικοσανοειδών, ενώ έχουν βρεθεί καινούργιες αντιδράσεις και ένζυμα που καθορίζουν το είδος των δομικών αναλόγων του PAF σε κάθε κύτταρο.

Δύο είναι οι κύριες μεταβολικές πορείες βιοσύνθεσης του PAF, οι οποίες είναι:

α) *De novo πορεία βιοσύνθεσης του PAF* : Το πρώτο στάδιο της *de novo* πορείας είναι η μεταφορά μίας ακετυλομάδας από το ακετυλο-CoA στο ALPA προς σχηματισμό του 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφορικού οξέος (AAPA). Η αντίδραση καταλύεται από το ένζυμο ακετυλο-CoA:ALPA ακετυλοτρανσφεράση (*de novo AT*). Στην συνέχεια η φωσφορική ομάδα του AAPA αντικαθίσταται από φωσφορυλοχολίνη με την διαδοχική δράση μίας φωσφοϋδρολάσης, που υδρολύει την φωσφορική ομάδα και μίας DTT ανεξάρτητης φωσφοχολινοτρανσφεράσης (CPT) που μεταφέρει την ομάδα της φωσφορυλοχολίνης, ενεργοποιημένης υπό την μορφή κιτυδιλοδιφωσφορικής χολίνης (CDP-χολίνης), στην sn-3 θέση του γλυκερινικού σκελετού.

β) *Βιοσύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού (remodeling πορεία)* : Η βιοσύνθεση του PAF μέσω της πορείας ανασχηματισμού περιλαμβάνει την μετατροπή γλυκεριναιθερικών φωσφολιπιδίων, που προϋπάρχουν στις μεμβράνες των κυττάρων, σε PAF. Είναι η πρώτη πορεία βιοσύνθεσης του PAF που περιγράφηκε και ενεργοποιείται σε απόκριση φλεγμονωδών και αλλεργικών ερεθισμάτων με σκοπό την άμεση παραγωγή του από τα κύτταρα. Πρόδρομη ένωση του PAF στην remodeling πορεία είναι το μεμβρανικό γλυκεριναιθερικό φωσφολιπιδές 1-O-αλκυλο-2-ακυλο-sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (AAGPC). Το πρώτο στάδιο της remodeling πορείας περιλαμβάνει την υδρόλυση της AAGPC προς 1-O-αλκυλο-2-λυσσο-

sn-γλυκερυλο-3-φωσφοχολίνη (λυσο-PAF). Το δεύτερο στάδιο της remodeling πορείας είναι η ακετυλίωση του λυσο-PAF προς PAF από το ένζυμο ακετυλο-CoA:λυσο-PAF ακετυλοτρανσφεράση (rem AT). Η rem AT δείχνει εξειδίκευση για αιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση και μεταφέρει μικρού Mr άκυλο- ομάδες (2 ή 3 ατόμων C) στην sn-2 θέση.

Το πρώτο και σημαντικότερο στάδιο αποικοδόμησης του PAF είναι η υδρόλυση της ακετυλομάδας από την sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού, η οποία οδηγεί στον σχηματισμό του βιολογικά ανενεργού λυσο-PAF. Η αντίδραση υδρόλυσης της ακετυλομάδας μπορεί να επιτευχθεί με τους εξής τρόπους :

- α) Με την δράση της PAF ακετυλοϋδρολάση (PAF-AH), μίας Ca^{2+} -ανεξάρτητης PLA_2 που δείχνει εξειδίκευση για μικρού Mr (2 ή 3 ατόμων C) και οξειδωμένα λιπαρά οξέα στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού
- β) Με τη δράση τρανσακετυλασών που μεταφέρουν την ακετυλομάδα σε άλλα λιποειδικά υποστρώματα με ελεύθερο υδροξύλιο όπως λυσο-πλασμαλογόνα, λυσο-φωσφατιδυλοχολίνη , λιπαρές αλκοόλες, σφιγγοσίνη κ.α.
- γ) Με τη δράση της λεκιθίνη:χοληστερόλη ακυλοτρανσφεράσης (LCAT), η οποία μπορεί να μεταφέρει την ακετυλομάδα σε λυσο-PC στο πλάσμα ανθρώπου.

Ενδοκυτταρικά, ο λυσο-PAF είναι ιδιαίτερα κυτταροτοξικός λόγω των απορρυπαντικών ιδιοτήτων του. Για αυτό και είτε εκκρίνεται στον εξωκυτταρικό χώρο, είτε μεταβολίζεται περαιτέρω στο εσωτερικό του κυττάρου. Η μεταβολική τύχη του λυσο-PAF εξαρτάται από το είδος του κυττάρου. (89)

4.5 Δράσεις του PAF

Ο παραγόμενος από τα κύτταρα PAF μπορεί να ακολουθήσει τις παρακάτω πορείες :

- 1) Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
- 2) Να ενσωματωθεί στην πλασματική μεμβράνη του κυττάρου από το οποίο συντέθηκε και να δράσει από εκεί ως διακυτταρικός μεσολαβητής

ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα. Αυτός ο τρόπος δράσης του PAF είναι ιδιαίτερα σημαντικός κατά την ενεργοποίηση και προσκόλληση των ουδετερόφιλων στα ενδοθηλιακά κύτταρα σε καταστάσεις φλεγμονής.

3) Να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής.

Ο PAF ασκεί τις δράσεις του μέσω υποδοχέων που έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί και κλωνοποιηθεί. Η σύνδεση του PAF με τους υποδοχείς του ενεργοποιεί πολλές ενδοκυτταρικές πορείες μεταγωγής σήματος που οδηγούν στην τελική απόκριση του κύτταρου. Οι δράσεις του PAF έχουν μελετηθεί, τόσο *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων και απομονωμένους ιστούς (Πίνακας 9), όσο και *in vivo* μετά από χορήγηση του PAF σε πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο (Πίνακας 10) (90).

Πίνακας 9. Δράσεις του PAF σε κύτταρα και απομονωμένους ιστούς.

Είδος κυττάρου/ιστού	<u>Δράσεις</u>
Αιμοπετάλια	Αποκοκκίωση, αλλαγή σχήματος, συσώρευση, έκκριση εικοσανοειδών
Ουδετερόφιλα	Αποκοκκίωση, συσώρευση, χημειοταξία, παραγωγή υπεροξειδίων, αύξηση προσκολλητικής ικανότητας, έκκριση εικοσανοειδών
Μονοκύτταρα/ Μακροφάγα Ηωσινόφιλα	Συσώρευση, σύνθεση εικοσανοειδών, παραγωγή υπεροξειδίων, παραγωγή IL-1, έκκριση λυσοσωμιακών ενζύμων Χημειοταξία, έκκριση κατιοντικών πρωτεϊνών, αύξηση κυτταροτοξικότητας, σύνθεση LTC ₄ , παραγωγή υπεροξειδίων, μετανάστευση διαμέσου των επιθηλιακών κυττάρων, σύνθεση IL-8, πολυμερισμός ακτίνης
Λεμφοκύτταρα Ενδοθηλιακά	Βλαστική τροποποίηση, καταστολή παραγωγής IL-2 Ανακατανομή κυτταροσκελετού και αλλαγή σχήματος, σύνθεση εικοσανοειδών, μετανάστευση, αύξηση της προσκολλητικής τους ικανότητα με τα ουδετερόφιλα
Νευρώνες	Αύξηση ενδοκυτταρικού Ca ²⁺ , ενεργοποίηση του κύκλου της φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης, ενεργοποίηση της έκφρασης των πρωτοογκογονιδίων c-fos και c-jun, έκκριση προλακτίνης
Σπερματοζωάρια Πρωτόζωα	Αύξηση κινητικότητας, αύξηση της διεισδυτικότητας τους στον τράχηλο της μήτρας Σύνθεση εικοσανοειδών, αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβολή στην σύσταση των λιπιδίων
Φυτικά κύτταρα	Ρύθμιση δραστηριότητας H ⁺ ATPασών, επίδραση στο φωτοσύστημα II των θυλακοειδών
Ήπαρ	Αύξηση γλυκογονόλυσης, μεταβατική αύξηση στην πίεση της πυλαίας φλέβας, αύξηση έκκρισης γαλακτικού και οξαλοξικού οξέος
Πνεύμονας	Μείωση της επιφάνειας των τριχοειδών, σύσπαση απομονωμένου πνευμονικού ιστού και μείωση της διατασιμότητάς του, αγγειοσύσπαση, πνευμονικό οίδημα
Καρδιά	Μείωση της συσταλτικής ικανότητας της κοιλίας, σύσπαση των στεφανιαίων, μείωση της ροής αίματος, πρόκληση αρρυθμιών
Έντερο	Σύσπαση, ισχαιμική νέκρωση

Πίνακας 10: Δράσεις του PAF in vivo.

Βρογχόσπασμος

Θρομβοπενία, ουδετεροπενία, βασεοφιλοπενία

Σηπτικό σοκ

Μεσολαβητής του σηπτικού σοκ που επάγεται από βακτηριακές λοιμώξεις και χορήγηση ενδοτοξίνης

Αναφυλακτικές αντιδράσεις

α) *Στον αναπνευστικό* : Μείωση αναπνευστικής συχνότητας, βρογχόσπασμο, αύξηση πνευμονικών αντιστάσεων, αύξηση της ενδοτικότητας του πνεύμονα, αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα πρόκληση πνευμονικού οιδήματος. Μεσολαβητής του άσθματος

β) *Στο κυκλοφοριακό* : Μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης, αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης

Επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα

Αρνητική ινότροπη δράση, μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης (υπόταση), μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος, μείωση των περιφερειακών αντιστάσεων

Καρδιακή ισχαιμία και κοιλιακές αρρυθμίες

Συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκληρώσεως

Επίδραση στο πεπτικό σύστημα

Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου, μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία

Συμμετοχή στην παθογένεια του πεπτικού έλκους και της παγκρεατίτιδας

Επίδραση στο σύστημα αναπαραγωγής

Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος, στην ωορρηξία, στην εμφύτευση του ωαρίου στη μήτρα και στην υπέρταση της εγκυμοσύνης

Συμμετοχή στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού

Επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία

Μεσολαβητής της εγκεφαλικής ισχαιμίας και του τραυματισμού των νευρώνων σε ισχαιμικές καταστάσεις

Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση-επινεφρίδια και έκκριση ορμονών, ρυθμίζει τα επίπεδα των νευροπεπτιδίων

Συμμετέχει στο LTP και θεωρείται ανάδρομος (retrograde) μεσολαβητής

Επίδραση στο ανοσολογικό

Συμμετέχει στην ανοσολογική κυτταρική απόκριση, είτε άμεσα ρυθμίζοντας τα επίπεδα και τον πολλαπλασιασμό των λεμφοκυττάρων και την παραγωγή κυτταροκινών από αυτά, είτε έμμεσα ενεργοποιώντας τα λευκοκύτταρα και την παραγωγή εικοσανοειδών από αυτά.

Μεσολαβητής της οξείας απόρριψης των μοσχευμάτων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΚΟΠΟΣ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας λιποειδικών κλασμάτων από ξηρούς καρπούς, οι οποίοι καταναλώνονται ευρέως στην Ελλάδα. Οι ξηροί καρποί που μελετήθηκαν ήταν καρύδι, αμύγδαλο, κελυφωτό φιστίκι Αιγίνης (νωπό-επεξεργασμένο), ηλιόσπορος και κολοκυθόσπορος και όλοι προέρχονταν από τον Ελληνικό χώρο, ενώ τα λιποειδικά κλάσματα τους μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αναστολή της συσσώρευσης που επάγεται από τον Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ ΚΑΙ ΤΡΟΠΟΣ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το κελυφωτό φιστίκι Αιγίνης προέρχεται από την Κυψέλη Αιγίνης, από το οποίο χρησιμοποιήθηκαν 2 κλάσματα το νωπό και το επεξεργασμένο. Για το τελευταίο η διαδικασία παρασκευής που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: σε ένα 1 kg φιστίκια προστέθηκε μισό ποτήρι του κρασιού νερό, στο οποίο είχε διαλυθεί 1 κουταλιά της σούπας αλάτι ψιλό και 2 λεμόνια. Στη συνέχεια οι καρποί παρέμειναν με αυτό το διάλυμα για 3- 4 ώρες μέχρι να το απορροφήσουν. Αφού γίνει αυτό, τα φιστίκια παρέμειναν για 6- 24 ώρες στον αέρα για να στεγνώσουν. Τελικά ψήθηκαν στους 150° C για 15 min.

Το αμύγδαλο προήλθε από το Προσήλιο Παρνασσίας και χρησιμοποιήθηκε νωπό. Το καρύδι προήλθε από τον Βαθύλακκο Καρδίτσας και ήταν νωπό. Ο κολοκυθόσπορος προήλθε από την Αργιθέα Παιανίας Αττικής και ήταν επίσης νωπός. Τέλος ο ηλιόσπορος ήταν ελληνικής προέλευσης, εμπορικά διαθέσιμος και μη κατεργασμένος.

6.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ (TL) ΚΑΤΑ BLYGH-DYER

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη)
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Büchi Rotavapor R-114
- Multi Mixer της Mullinex
- Ομογενοποιητής της Ultra – Turvax T₂₅ Janke & Kunkel IKA- Labortechnik
- Φυγόκεντρος της HERMLE Z320
- Ζυγός ακριβείας της Analytical standard OHAUS

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων όπως αλάτων, αμινοξέων κ.α. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στην μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v), με την βοήθεια του ομογενοποιητή και φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 10 min, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης προστίθενται υπολογισμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O (0,25 ml για κάθε 1 ml προστιθέμενου μίγματος διαλυτών) ώστε η αναλογία των διαλυτών να γίνει $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v) και το σύστημα να μετατραπεί σε διφασικό. Λόγω της ύπαρξης γαλακτώματος, ο σχηματισμός του διφασικού συστήματος επιταχύνεται με τη βοήθεια φυγοκέντρωσης του διφασικού συστήματος στις 2000 rpm για 10 min. Η χλωροφορμική (κάτω) φάση μεταφέρεται, ανάλογα τον όγκο της, είτε σε γυάλινο σωλήνα, είτε σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου ή σε flash evaporator, αντίστοιχα. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία (91)

6.3 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ (TL) ΚΑΤΑ FOLCH

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (χλωροφόρμιο, μεθανόλη)
- Φυσιολογικός ορός
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Büchi Rotavapor R-114

- Multi Mixer της Mullinex
- Ομογενοποιητής της Ultra – Turvax T₂₅ Janke & Kunkel IKA- Labortechnik
- Ζυγός ακριβείας της Analytical standard OHAUS
- Φυγόκεντρος της HERMLE Z320

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων όπως αλάτων, αμινοξέων κ.α. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στην μεν χλωροφορμική φάση κατανέμονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (2:1 v/v), με την βοήθεια του ομογενοποιητή και φυγοκεντρείται στις 2000 rpm για 10 min, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης προστίθεται φυσιολογικός ορός, ποσότητας ίσης με το 1/5 του όγκου του αρχικού μονοφασικού συστήματος με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί διφασικό σύστημα. Λόγω της ύπαρξης γαλακτώματος, ο σχηματισμός του διφασικού συστήματος επιταχύνεται με τη βοήθεια φυγοκέντρωσης του διφασικού συστήματος στις 2000 rpm για 10 min. Τόσο η χλωροφορμική (κάτω) φάση όσο και η υδατική (πάνω) φάση μεταφέρονται, ανάλογα τον όγκο τους, είτε σε γυάλινο σωλήνα, είτε σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου ή σε flash evaporator, αντίστοιχα. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία, ενώ η υδατική φάση, μετά την εξάτμιση, αναδιαλύεται σε μίγμα $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) (92)

6.4 ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ (TL) ΣΕ ΠΟΛΙΚΑ (PL) ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΛΙΠΟΕΙΔΗ (NL) ΜΕ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΚΑΤ' ΑΝΤΙΡΡΟΗ

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας (πετρελαιοί αιθέρας, αιθανόλη)
- Προεξισοροποιημένος πετρελαιοί αιθέρας και αιθανόλη : Σε διαχωριστική χοάνη των 250ml αναμιγνύονται 100ml πετρελαϊκού αιθέρα με 100ml αιθανόλης 87%. Οι δύο μη αναμίξιμοι διαλύτες αναταράσσονται έντονα και στη συνέχεια αφήνονται σε ηρεμία ώστε να σχηματιστεί το διφασικό σύστημα. Παραλαμβάνεται ξεχωριστά η κάτω φάση (προεξισοροποιημένη αιθανόλη) και η πάνω φάση (προεξισοροποιημένος πετρελαιοί αιθέρας).
- Περιστροφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Büchi Rotavapor R-114

Αρχή μεθόδου

Με κατάλληλη ποσότητα πετρελαϊκού αιθέρα και προεξισοροποιημένης αιθανόλης (87%) και επαναλαμβανόμενες εκχυλίσεις (8 φορές) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των ολικών λιποειδών σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή.

Αναλυτική πορεία

Τα ολικά λιποειδή μεταφέρονται σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα και αναδιαλύονται σε 9 ml προεξ. πετρελαιοί αιθέρα. Προστίθενται 3 ml προεξ. αιθανόλης, το μίγμα αναταρράσσεται ισχυρά και αφήνεται σε ηρεμία για 5 min ώστε να σχηματιστεί το διφασικό σύστημα. Παραλαμβάνεται η κάτω φάση (αιθανολική φάση) και μεταφέρεται σε δεύτερο δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 9 ml προεξ. πετρελαιοί αιθέρα. Το μίγμα αναταρράσσεται έντονα και αφήνεται σε ηρεμία για 5 min ώστε να σχηματιστεί το διφασικό σύστημα. Παραλαμβάνεται η κάτω φάση (αιθανολική φάση), η οποία μεταφέρεται σε σφαιρική φιάλη. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 8 φορές με 3 ml

προεξ. αιθανόλης κάθε φορά. Μετά το τέλος της διαδικασίας, στις ενωμένες αιθανολικές φάσεις έχουν εκχυλιστεί τα πολικά λιποειδή ενώ στην φάση του πετρελαικού αιθέρα έχουν εκχυλιστεί τα πολικά λιποειδή. Οι διαλύτες εξατμίζονται στους 40°C σε συσκευή rotary evaporator και τα λιποειδή αναδιαλύονται σε 2-3ml CHCl₃/CH₃OH 1:1 (93).

6.5 Προσδιορισμός βάρους λιποειδικών κλασμάτων

Αντιδραστήρια – Όργανα

Ζυγός ακριβείας της Analytical standard OHAUS

Αναλυτική πορεία

Το προς ζύγιση λιποειδικό κλάσμα μεταφέρεται σε προζυγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂ και συνεχείς ζυγίσεις μέχρι η μάζα του ξηρού λιποειδικού υπολείματος να είναι σταθερή. Το βάρος των λιποειδικών κλασμάτων υπολογίζεται από την διαφορά του μικτού βάρους (σωληνάκι + λιποειδικό κλάσμα) και του βάρους του δοκιμαστικού σωλήνα.

6.6 Προσδιορισμός φωσφόρου στα λιποειδή

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Υπερχλωρικό οξύ 70%
- Μολυβδαινικό αμμώνιο 0,4% : Ζυγίζονται 2,21 g μολυβδαινικού αμμωνίου και διαλύονται σε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 500 ml.
- Διάλυμα ANSA (αμινο-ναφθολο-σουλφονικό οξύ) : Διαλύονται 30 g NaHSO₃ και 6 g Na₂SO₃ σε 250 ml νερό. Στο διάλυμα αυτό διαλύονται 0,5 g 1,2,4-αμινο-ναφθολο-σουλφονικού οξέος. Αν μετά από τρεις ώρες σχηματιστεί ίζημα, διηθείται και το αντιδραστήριο φυλάσσεται υπό ψύξη. Το διάλυμα θεωρείται κατάλληλο προς χρήση για ένα μήνα από την ημέρα παρασκευής του.

- Αντιδραστήριο ANSA : Παρασκευάζεται πριν από την εκτέλεση του προσδιορισμού με ανάμιξη 4 ml διαλύματος ANSA και 6 ml απεσταγμένου νερού.
- Πρότυπο διάλυμα δισόξινου φωσφορικού καλίου συγκέντρωσης 4μg P/ml
- Αμμόλουτρο θερμοκρασίας 170-180 °C
- Φωτόμετρο Novaspec II (Pharmacia Biotech)

Αρχή μεθόδου

Ο προσδιορισμός φωσφόρου βασίζεται στη μετατροπή με καύση, παρουσία υπερχλωρικού οξέος, του οργανικού φωσφόρου σε ανόργανα φωσφορικά άλατα. Στη συνέχεια, με προσθήκη μολυβδαινικού αμμωνίου σχηματίζεται φωσφομολυβδαινικό αμμώνιο, το οποίο παρουσία του ANSA ως αναγωγικού μέσου και με θέρμανση σε όξινο περιβάλλον ανάγεται προς κυανούν του μολυβδαινίου.

Αναλυτική πορεία

Το δείγμα, που περιέχει 0,5-5 μg P, φέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα rygex, εξατμίζεται ο διαλύτης, προσθέτονται 0,5 ml υπερχλωρικού οξέος και τοποθετείται σε αμμόλουτρο 170-180 °C για μία ώρα. Στη συνέχεια, αφού ψυχθούν τα δείγματα, προσθέτονται 1 ml απεσταγμένου νερού, 3 ml μολυβδαινικού αμμωνίου και 0,5 ml αντιδραστηρίου ANSA. Μετά από ισχυρή ανάδευση οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδρόλουτρο 100 °C για 10 min. Αφήνονται να ψυχθούν για 20 min και φωτομετρούνται στα 820 nm. Παράλληλα, γίνεται τυφλός προσδιορισμός και πρότυπη καμπύλη αναφοράς με πρότυπα διαλύματα δισόξινου φωσφορικού καλίου που περιέχουν 0,8 – 1,6 – 2,4 και 3,2 μg φωσφόρου (94).

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Διάλυμα KOH / MeOH 0.5 M
- BF₃/MeOH 14% (w/v)
- Διάλυμα κορεσμένου NaCl
- Εξάνιο χρωματογραφικής καθαρότητας
- Εσωτερικό πρότυπο 5α-χολεστάνιο
- Ζυγός ακριβείας 1mg
- Δοκιμαστικοί σωλήνες με βιδωτά πώματα
- Πιπέτες Pasteur
- Ρυθμιζόμενη πιπέτα 100-1000μL
- Φυγόκεντρος
- Υδατόλουτρο
- Φιαλίδια GC (vials) και πώματα (cups)
- Εργαλείο ειδικό για το σφράγισμα των vials
- Διάλυμα BSTFA (bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, δις-τριμεθυλσιλυλ-τριφθοροακεταμίδιο) σε πυριδίνη
- Δοκιμαστικοί σωλήνες
- Ρυθμιζόμενη πιπέτα 100-1000μL
- Υδατόλουτρο
- Πώματα για φιαλίδια (vials) GC
- Εργαλείο ειδικό για το κλείσιμο των vials
- Πρότυπες ουσίες: β-σιτοστερόλη, στιγμαστερόλη, καμπεστερόλη
- Αέριος χρωματογράφος Agilent (Wallborn, Germany) HP σειρά GC 6890, με αυτόματο δειγματολήπτη HP 6890
- Ανιχνευτής: ιονισμού φλόγας με φλόγα αέρα-υδρογόνου
- Στήλη: τριχοειδής στήλη BPX50 (SGE, Melbourne, Australia) μήκους 30m και εσωτερικής διαμέτρου 0.25mm, καλυμμένη εσωτερικά με 50% PH phenylmethylpolysiloxane σε στρώμα πάχους 250 μm.

Αναλυτική πορεία

Σε ζυγό ακριβείας 0,1mg ζυγίζουμε περίπου 0,1 g από τα δείγματα των ελαίων και τοποθετούμε αυτές τις ποσότητες σε δοκιμαστικούς σωλήνες, καλά πλυμένους και εντελώς στεγνούς και ακολουθούμε την παρακάτω διαδικασία:

1. Προσθέτουμε στα δείγματά μας από 2ml KOH/MeOH 0.5M (σαπωνοποίηση)
2. Αναταράσσουμε με vortex, ώστε να επιτευχθεί καλή ανάμιξη.
3. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο 90° C για 15 min.
4. Αφού κρυώσουν τα δείγματα, προσθέτουμε 1,5 ml BF₃/MeOH στο καθένα.
5. Αναταράσσουμε με vortex, ώστε να επιτευχθεί καλή ανάμιξη
6. Τοποθετούμε τα δείγματα σε υδατόλουτρο 90° C για 2 min.
7. Αφού κρυώσουν οι σωλήνες προστίθενται (α) 5ml κορεσμένο NaCl και (β) 2ml εξάνιο
8. Αναταράσσουμε με vortex, ώστε να επιτευχθεί καλή ανάμιξη
9. Φυγοκεντρούμε τους σωλήνες επί 6-7 min στις 3000 στροφές
10. Παραλαμβάνουμε με μεγάλη προσοχή και ρυθμισμένη πιπέτα, 500μl από την υπερκείμενη στιβάδα τα οποία τοποθετούμε σε vials αέριας χρωματογραφίας.
11. Στα vials προσθέτουμε και 200μl διαλύματος 5-α χολεστανίου (εσωτερικό πρότυπο) και τα σφραγίζουμε με τη χρήση του ειδικού εργαλείου.
12. Τα δείγματα τοποθετούνται στην κατάψυξη (-40° C) μέχρι τη σιλυλίωσή τους

Στη συνέχεια ακολουθεί η σιλυλίωση, ως εξής:

1. Βγάζουμε τα δείγματα από την κατάψυξη και αφού τα αφήσουμε λίγο σε θερμοκρασία δωματίου ανοίγουμε τα vials, στα οποία περιέχονται, με το ειδικό εργαλείο.
2. Τοποθετούμε τα vials σε ρεύμα αζώτου ώστε να επιτευχθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού και στη συνέχεια προσθέτουμε σε καθένα από αυτά 250μL BSTFA, με ιδιαίτερη προσοχή, φορώντας γάντια σε απαγωγό.
3. Σφραγίζουμε ξανά τα vials και τα βάζουμε μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, χωρίς καπάκια, τους οποίους στη συνέχεια τους τοποθετούμε

στο υδατόλουτρο στους 70 για 20 λεπτά, ώστε να ολοκληρωθεί η σιλυλίωση.

4. Αφού κρυώσουν τα vials είναι έτοιμα για προσδιορισμό στερολών με αέρια χρωματογραφία

Τέλος γίνεται αεριοχρωματογραφικός προσδιορισμός των φυτοστερολών ως εξής :

Ποσότητα 1 μL από το κάθε σιλυλιωμένο δείγμα εισάγεται στον αέριο χρωματογράφο, με αναλογία δείγματος προς φέρον αέριο (split ratio) 1:20. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιείται ήλιο με ροή 1 mL min^{-1} . Ο εισαγωγέας και ο ανιχνευτής ρυθμίζονται στους 140°C και 290°C αντίστοιχα. Η θερμοκρασία φούρνου αυξάνεται βάσει προγράμματος από τους 100 στους 300 °C με ρυθμό 20°C / min και παραμένει στην τελική θερμοκρασία για 15 min. Η ταυτοποίηση των φυτοστερολών έγινε με βάση το χρόνο κατακράτησης (± 0.05 RT) της κάθε φυτοστερόλης. Η ποσοτικοποίηση έγινε με χρήση καμπύλης αναφοράς με πρότυπα φυτοστερολών που περιείχαν όλα την ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου και είχαν τον ίδιο όγκο με τα προς ανάλυση δείγματα.

6.8 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΟΚΙΜΑΣΙΑ ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗΣ ΠΛΥΜΕΝΩΝ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ ΚΟΥΝΕΛΙΟΥ

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Διάλυμα 10x Tyrodes stock : Σε 1 lt νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 10 g γλυκόζης
- Διάλυμα 100x CaCl_2 stock : Σε 100 ml νερού διαλύονται 1,911 g CaCl_2
- Διάλυμα 0,2 M EGTA stock : Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 ml νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5 M
- Διάλυμα ζελατίνης 10% σε νερό
- Διαλύματα Tyrodes-Gelatin pH 6,5 (Tg pH 6,5), Tyrodes-Gelatin-EGTA pH 6,5 (Tg EGTA pH 6,5) : Σε 80 ml νερό προσθέτονται 10 ml Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προσθέτονται 2,5 ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο

βρασμού). Κατόπιν, προσθέτονται 5 ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203 g NaHCO_3 σε 10 ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται 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. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1 N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 16 ml μέχρι επάνω (χωρίς φυσαλίδες αέρα) και σκεπάζονται με parafilm. Φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tyrodes-ασβεστίου pH 7,2 (Tg-Ca pH 7,2) : Σε 5 ml Tyrodes 10x προστίθενται 40 ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25 ml διαλύματος ζελατίνης 10%. Στη συνέχεια προσθέτονται 0,5 ml διαλύματος CaCl_2 100x. Κατόπιν προστίθενται 2,5 ml διαλύματος NaHCO_3 (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). 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.
- Αντιπηκτικό διάλυμα ACD : Σε 1000 ml νερού διαλύονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Διάλυμα βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/ml : Ποσότητα 100 mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) διαλύεται σε 1 ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους -20 °C
- Διάλυμα BSA 2,5 mg/ml : Από 10 ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL BSA stock
- Ficoll-Paque (Pharmacia)
- Υγρό επίστρωσης σιλικόνης (Serva)
- Πλαστικοί σωλήνες των 50 ml
- Πλαστικά σιφώνια των 20 ml
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log
- pHμετρο ORION 410A
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb
- Υδρόλουτρο 37 °C
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont

Αναλυτική πορεία

Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 ml προστίθενται 7 ml 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 500g (~ 1800 στροφές ανά λεπτό, rpm). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 ml. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20 ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό πλάσματος τα 9 ml για κάθε 2 ml Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφώνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι πλάσματος σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Σκεπάζουμε με parafilm και οι σωλήνες φυγοκεντρούνται για 20 min στους 24 °C στα 750g (2200 rpm). Μετά την φυγοκέντρηση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του πλάσματος και του στρώματος του Ficoll. Το υπερκείμενο πλάσμα (φτωχό σε αιμοπετάλια) αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστική σύριγγα των 20 ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Αν υπάρχουν 2 σωλήνες προστίθενται 7 ml Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Αν υπάρχουν 3 σωλήνες προστίθενται 3 ml Tg EGTA pH 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 ml του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3 ml Tg EGTA pH 6,5. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 ml Ficoll (8 ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 2400 rpm. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και

απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με πιπέτα pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Στην συνέχεια προστίθενται ίσοι όγκοι (~ 8 ml) 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 parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 2350 rpm. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Προστίθενται 0,8 ml Tg pH 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με προσοχή. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται με πλαστικό σωλήνα.

Ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/ml. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μ L τα οποία αραιώνονται με 990 μ L Tg pH 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μ L δίνεται από τον τύπο : $\text{κύτταρα}/10 \mu\text{L} = A \times 1,25 \cdot 10^8$ όπου A είναι η απορρόφηση. Με βάση πρότυπη καμπύλη της οπτικής απορρόφησης συναρτήσει του αριθμού αιμοπεταλίων υπολογίζεται ο αριθμός αιμοπεταλίων και ετοιμάζεται το επιθυμητό εναιώρημα αιμοπεταλίων.

Συσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 100 μ L από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 400 μ L Tg Ca pH 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200 rpm. Επωάζονται για 15 min σε υδρόλουτρο 37 °C. Ρυθμίζεται το 100 της κλίμακας του συσσωρευματομέτρου με Tg Ca pH 7,2 και το 0 με το εναιώρημα αιμοπεταλίων. Στην συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5 mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη συσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσώρευση, το δε φαινόμενο της συσώρευσης των

αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό 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 δραστηριότητα. 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).

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.

Η ανασταλτική ικανότητα των δειγμάτων εκτιμάται με το δείκτη IC_{50} (Inhibitory Concentration for 50% inhibition). Ο δείκτης αυτός αντιστοιχεί στην ποσότητα εκείνη του λιποειδούς που προκαλεί αναστολή της δράσης του PAF ή κάποιου άλλου αγωνιστή ίση με το 50% της μέγιστης παρατηρούμενης συσσώρευσης από την συγκεκριμένη ποσότητα του αγωνιστή. Όσο πιο μικρό είναι το IC_{50} τόσο πιο δραστικό θεωρείται το δείγμα που μελετάται, αφού έχει την ικανότητα να προκαλεί 50% αναστολή της δράσης του αγωνιστή σε μικρότερη ποσότητα. Για τον υπολογισμό του δείκτη αυτού ακολουθούνται τα

εξής βήματα: **α)** με την προσθήκη του αγωνιστή στην κυψελίδα με τα αιμοπετάλια προκύπτει μια καμπύλη συσσώρευσης έτσι μετρείται το ύψος της με χάρακα σε cm (ρ). Το μέγιστο ύψος συσσώρευσης είναι εκείνο που αντιστοιχεί στην πρώτη μη αντιστρεπτή συσσώρευση ή στην τελευταία μέγιστη αντιστρεπτή, η οποία βρίσκεται με διαδοχικές δοκιμασίες διαφόρων συγκεντρώσεων του PAF **β)** προστίθεται στην κυψελίδα συγκεκριμένη συγκέντρωση δείγματος προκειμένου να εξεταστεί αν αναστέλλει τον αγωνιστή. Αν η καμπύλη αντιστρεπτής συσσώρευσης ήταν χαμηλότερου ύψους από αυτή του PAF, αυτό έδειχνε ότι το δείγμα είχε ανασταλτική δράση και μετρίονταν το ύψος με χάρακα σε cm (π) **γ)** με τον τύπο $[(\rho - \pi) / \rho] * 100$ βρισκόταν η επί της % αναστολή **δ)** τέλος κατασκευαζόταν συνάρτηση με την επί της % αναστολή και την συγκέντρωση του δείγματος, από όπου υπολογιζόταν το 50% της αναστολής. (95)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

7.1 ΕΥΡΕΣΗ ΤΟΥ ΚΑΛΥΤΕΡΟΥ ΤΡΟΠΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΞΗΡΟΥΣ ΚΑΡΠΟΥΣ

Αρχικά, επιχειρήθηκε να εκχυλιστούν τα TL από τους ξηρούς καρπούς με τη μέθοδος Bligh-Dyer. Η έναρξη της μελέτης έγινε με το φιστίκι Αιγίνης (ΦΑ) και δοκιμάστηκαν να εκχυλιστούν τόσο ολόκληρος ο καρπός (φιστίκι Αιγίνης νωπό, ΦΑΝ) όσο και ο καρπός από τον οποίο είχε αφαιρεθεί η εξωτερική κόκκινη φλούδα (φιστίκι Αιγίνης νωπό ξεφλουδισμένο, ΦΑΝΞ) .

Τα φιστίκια καθαρίστηκαν από τα τσόφλια και τεμαχίστηκαν σε multi mixer 50 g τόσο από το ΦΑΝ όσο και από το ΦΑΝΞ (η φλούδα είχε απομακρυνθεί προσεκτικά με μαχαίρι). Ζυγίστηκαν 10 g από το κάθε είδος τεμαχισμένου φιστικιού και τοποθετήθηκαν σε κωνικές εσφυρισμένες φιάλες στις οποίες προστέθηκαν 100 ml από το μονοφασικό σύστημα διαλυτών $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v). Μετά από έντονη ανατάραξη με το χέρι, το μίγμα παρέμεινε σε ηρεμία για 1 ώρα και στη συνέχεια το στερεό υπόλειμμα απομακρύνθηκε με διήθηση με την βοήθεια ηθμού Büchner. Στο διαυγές μονοφασικό σύστημα ακολούθησε η εκχύλιση των λιποειδών κατά Bligh-Dyer, όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία. Τα λιποειδικά εκχυλίσματα ζυγίστηκαν και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1: Αποτελέσματα εκχύλισης Bligh-Dyer και παραλαβή του εκχυλίσματος με διήθηση Büchner στο φιστίκι Αιγίνης.

Ξηρός καρπός	Βάρος εκχυλιζόμενου ξηρού καρπού (g)	Βάρος TL (g)	% ποσοστό λίπους
ΦΑΝΞ	10,00	0,4094	4,09 %
ΦΑΝ	10,00	0,4141	4,14 %

Στην συνέχεια επιχειρήθηκε η εκχύλιση του λίπους από τον καρπό να γίνει με την υποβοήθηση ομοιογενοποιητή προκειμένου να εκχυλιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο λίπος. Ζυγίστηκαν 10 g τεμαχισμένου με multi mixer ΦΑΝ και τοποθετήθηκαν από 5 g σε 2 γυάλινους φυγοκεντρικούς σωλήνες. Στο κάθε σωλήνα προστέθηκαν 30 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v). Ο διαλύτης μαζί με τον ξηρό καρπό αναταράχτηκαν έντονα με το μεγάλο στέλεχος του ομοιογενοποιητή για 1 min και μετά από αναμονή 10 min ακολούθησε μία δεύτερη ανατάραξη για 1 min ξανά. Το εκχύλισμα λαμβάνεται καθαρό από στερεά σωματίδια με φυγοκέντρηση 2000 rpm x 10 min και στο υπερκείμενο συλλέγεται σε κωνική εσφυρισμένη φιάλη. Στη συνέχεια προσθέτονται στον κάθε σωλήνα 20 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) και ο διαλύτης μαζί με τον καρπό αναταράχτηκαν έντονα με το μικρό στέλεχος του ομοιογενοποιητή για 1 min και μετά από αναμονή 10 min ακολούθησε μία δεύτερη ανατάραξη για 1 min ξανά. Ξαναγίνεται φυγοκέντρηση 2000 rpm x 10 min και το υπερκείμενο καθαρό από στερεά σωματίδια συλλέγεται σε κωνική εσφυρισμένη φιάλη. Αφού η υπερκείμενη φάση είναι 100 ml προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα CHCl_3 (25 ml) και H_2O (25 ml) ώστε το σύστημα να γίνει διφασικό όπως αναφέρεται στην μεθοδολογία. Το λιποειδικό εκχύλισμα ζυγίστηκε και τα αποτελέσματα φαίνονται στον Πίνακα 7.2

Πίνακας 7.2 : Αποτελέσματα εκχύλισης Bligh-Dyer, με τη χρήση ομοιογενοποιητή, στο φιστίκι Αιγίνης.

Ξηρός καρπός	Βάρος εκχυλιζόμενου ξηρού καρπού (g)	Βάρος TL (g)	% ποσοστό λίπους
ΦΑΝ	10,00	0,1083	1,08 %

Παρ' όλο που παρατηρήθηκε ότι το λίπος που εκχυλίζεται είναι πολύ λίγο (1% του βάρους, σε σχέση με την βιβλιογραφία -χημική ανάλυση του USDA, που αναφέρει ότι η περιεκτικότητα σε λίπος του φιστικιού ανέρχεται 45 %), συνεχίσαμε την διαδικασία για το καρύδι (ΚΑ) όπως αναφέρεται στα προηγούμενα βήματα μόνο που έγινε προσπάθεια να εκχυλιστεί λίπος από

περισσότερο καρπό για να εξεταστεί αν μεγαλύτερη ποσότητα καρπού μπορεί να μας δώσει καλύτερα ποσοστά εκχύλισης. Έτσι ζυγίστηκαν 20 g και τοποθετήθηκαν από 5 g σε 4 φυγοκεντρικούς σωλήνες. Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν από 30 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και παραπάνω. Μετά τις φυγοκεντρήσεις υπήρχε το ίζημα και το υπερκείμενο που ήταν αναμενόμενο και φυσιολογικό, αλλά κάτω από το ίζημα του καρπού υπήρχε ένα παχύρρευστο κίτρινο στρώμα με ζελατινώδη μορφή, που δεν μπορούσε να απομακρυνθεί αλλά ούτε να γίνει αντιληπτή η χημική του σύσταση. Έτσι δοκιμάστηκε μικρότερη ποσότητα καρπού για να εξεταστεί αν έφταιγε η αναλογία δείγματος – διαλύτη. Ξανάγινε η ίδια διαδικασία για 1 g καρπού χρησιμοποιώντας 25 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:2:0,8, v/v/v) και στη συνέχεια προστίθενται άλλα 25 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ όταν γίνεται η ανάδευση με το μικρό στέλεχος του ομοιογενοποιητή. Τα αποτελέσματα των εκχυλίσεων στο καρύδι φαίνονται στον Πίνακα 7.3.

Πίνακας 7.3: Αποτελέσματα εκχύλισης Bligh-Dyer, με τη χρήση ομοιογενοποιητή, στο καρύδι.

Ξηρός καρπός	Βάρος εκχυλιζόμενου ξηρού καρπού (g)	Βάρος TL (g)	% ποσοστό λίπους
KA	20,00	4,1802	20,9 %
KA	1,00	0,0138	1,38 %

Παρατηρήθηκε ξανά ότι η εκχυλιζόμενη ποσότητα ήταν πολύ μικρή από τα αναμενόμενα, σύμφωνα με την βιβλιογραφία -χημική ανάλυση του USDA, που αναφέρει ότι η περιεκτικότητα σε λίπος του καρυδιού ανέρχεται 60 %, από τα 20 g πήραμε το 21% σε λίπος και από το 1 g 1%. Φαίνεται λοιπόν ότι η εκχύλιση Bligh-Dyer όχι μόνο δεν είναι ποσοτικά αλλά δεν είναι ούτε επαναλήψιμη αφού εξαρτάται από το βάρος του εκχυλιζόμενου ξηρού καρπού. Εκτός αυτού του προβλήματος υπήρχε και το ζελατινώδες ίζημα που η χημική του σύσταση ήταν άγνωστη και παρεμπόδιζε την εκχύλιση. Τα 2 αυτά προβλήματα που παρουσιάστηκαν ήταν αρκετά για να γίνει αλλαγή του

τρόπου εκχύλισης. Αποφασίστηκε λοιπόν να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος Folch.

7.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ FOLCH ΚΑΙ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥΣ ΣΕ ΠΟΛΙΚΑ ΚΑΙ ΟΥΔΕΤΕΡΑ ΛΙΠΟΕΙΔΗ ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ ΤΗΣ ΚΑΤΑΝΟΜΗΣ ΚΑΤ'ΑΝΤΙΡΡΟΗ

Η μέθοδος εκχύλισης Folch εφαρμόστηκε σε όλα τα είδη των καρπών που μελετήθηκαν και έδωσε σύσταση ολικού λίπους στους ξηρούς καρπούς συγκρίσιμη με αυτή των βάσεων δεδομένων. Οι ξηροί καρποί που εκχυλίστηκαν ήταν αμύγδαλο (ΑΜ), καρύδι (ΚΑ), φιστίκι Αιγίνης νωπό (ΦΑΝ), φιστίκι Αιγίνης επεξεργασμένο (ΦΑΕ), ηλιόσπορος (ΗΛ), κολοκυθόσπορος (ΚΟ). Οι ξηροί καρποί καθαρίστηκαν από τα τσόφλια, τεμαχίστηκαν σε multi mixer και από τον τεμαχισμένο καρπό ζυγίστηκαν 2 g, τα οποία μοιράστηκαν σε δύο φυγοκεντρικούς σωλήνες. Σε κάθε σωλήνα προστέθηκαν 20 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) δηλαδή ποσότητα 20πλάσια από αυτή του καρπού. Ο διαλύτης μαζί με τον ξηρό καρπό αναταράχτηκαν έντονα με το μεγάλο στέλεχος του ομοιογενοποιητή για 1 min και μετά από αναμονή 30 min γίνεται φυγοκέντρηση 2000 rpm x 10 min. Έτσι το εκχύλισμα λαμβάνεται καθαρό από στερεά σωματίδια και το υπερκείμενο συλλέγεται σε κωνική εσφυρισμένη φιάλη. Στη συνέχεια προσθέτονται στον κάθε σωλήνα 20 ml μίγματος $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) και ο διαλύτης μαζί με τον καρπό αναταράχτηκαν έντονα με το μικρό στέλεχος του ομοιογενοποιητή για 1 min. Ξαναγίνεται φυγοκέντρηση 2000 rpm x 10 min και το υπερκείμενο καθαρό από στερεά σωματίδια συλλέγεται σε κωνική εσφυρισμένη φιάλη. Τα TL αναδιαλύθηκαν σε 5 ml $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1, v/v) και φυλάχθηκαν στους $-20\text{ }^\circ\text{C}$ για περαιτέρω ανάλυση. Τα αποτελέσματα της εκχύλισης Folch φαίνονται στον Πίνακα 7.4.

Το 1/5 της ποσότητας των TL φυλάχθηκαν για τον προσδιορισμό της βιολογικής τους δραστηριότητας και για χημικές αναλύσεις ενώ στα 4/5 εφαρμόστηκε η μέθοδος της κατανομή κατ' αντιρροή για τον διαχωρισμός των TL σε PL και NL. Εφαρμόστηκε κατά βήμα η διαδικασία όπως αναφέρεται στην μεθοδολογία, συλλέχθηκαν τα PL και τα NL, ζυγίστηκαν και προέκυψαν τα αποτελέσματα που φαίνονται στο Πίνακα 7.5

Πίνακας 7.4: Εκχύλιση ξηρών καρπών με τη μέθοδο Folch

Ξηρός καρπός	Βάρος εκχυλιζόμενου ξηρού καρπού (g)	Βάρος TL (mg)	Ποσοστό ολικών λιποειδών (%)	Τελική συγκέντρωση διαλύματος TL (mg/ml)
ΚΑ	2,00	1217,5	60,9	243,5
ΑΜ	2,00	933,0	46,7	186,6
ΦΑΝ	2,00	950,2	47,5	190,0
ΦΑΕ	2,00	1044,8	52,2	208,9
ΗΛ	2,00	952,2	47,6	190,4
ΚΟ	2,00	852,7	42,6	170,5

Πίνακας 7.5: Διαχωρισμός TL ξηρών καρπών σε PL και NL με τη μέθοδο της κατανομής κατ'αντιρροή. Κάτω από την μάζα των PL και NL, σε παρένθεση, φαίνεται το ποσοστό των αντίστοιχων κλασμάτων επί της αρχικής ποσότητας των TL που διαχωριστήκαν.

Ξηρός καρπός	Αρχική ποσότητα TL (mg)	PL (mg) (%)	NL (mg) (%)	Ανάκτηση (%)
ΚΑ	974,0	79,0 (8,1)	861,1 (88,4)	96,5
ΑΜ	746,4	22,1 (3,0)	593,7 (79,5)	82,5
ΦΑΝ	760,2	30,3 (4,0)	655,9 (86,3)	90,3
ΦΑΕ	835,8	49,6 (5,9)	716,9 (85,8)	91,7
ΗΛ	761,8	47,4 (6,2)	711,3 (93,4)	99,6
ΚΟ	682,2	19,5 (2,8)	653,0 (95,7)	98,5

Τα PL αναδιαλύθηκαν σε 5 ml CHCl₃:CH₃OH:H₂O (1:2:0,8 , v/v/v) και τα NL σε 5 ml CHCl₃:MeOH (1:1, v/v). Τα διαλύματα των λιποειδών φυλάχθηκαν στους -20 °C για περαιτέρω αναλύσεις.

7.3 ΧΗΜΙΚΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΙ ΣΤΑ ΛΙΠΟΕΙΔΙΚΑ ΚΛΑΣΜΑΤΑ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ

7.3.1 Προσδιορισμός φωσφόρου

Αφού εκχυλίστηκαν τα λιποειδή από τους ξηρούς καρπούς και διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα, προσδιορίστηκε το περιεχόμενο τους σε φώσφορο, όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία. Αρχικά προσδιορίστηκε ο φώσφορος στα PL. Αναλύθηκαν οι ποσότητες 2 και 20 μl, τα 2 μl δεν περιείχαν ποσά φωσφόρου ανιχνεύσιμα. Έτσι οι υπολογισμοί έγιναν με βάση τα αποτελέσματα των 20 μl. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο Πίνακα 7.6

Πίνακας 7.6 : Ανάλυση λιποειδικού φωσφόρου στα κλάσματα των PL

Ξηροί καρποί	Ποσότητα P στα 20 μl PL (μg P)	Συνολική ποσότητα P στα PL (μg P)	Συγκέντρωση P στα PL (μg P/mg PL)	Συγκέντρωση P στο τελικό διάλυμα (μg P/μl)
ΚΑ	1,291	323,0	4,09	0,0646
ΑΜ	1,352	338,0	15,3	0,0676
ΦΑΝ	2,269	567,5	18,7	0,1135
ΦΑΕ	2,466	616,5	12,42	0,1233
ΗΛ	2,055	514,0	1,08	0,1028
ΚΟ	1,178	294,5	1,51	0,0589

Στην συνέχεια έγινε ο προσδιορισμός φωσφόρου σε TL και NL. Για τα TL χρησιμοποιήθηκαν οι ποσότητες 5 και 20 μl, όπου τα 5 μl δεν είχαν ανιχνεύσιμη ποσότητα P, οπότε ο υπολογισμός του P έγινε από την ανάλυση των 20 μl. Επιχειρήθηκε να προσδιοριστεί ο P και στα NL όμως είτε η ποσότητα που αναλύθηκε δεν έδωσε αποτέλεσμα είτε σε μεγαλύτερες ποσότητες τα δείγματα απανθρακώνονταν λόγω της μεγάλης ποσότητας οργανικού C με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατός ο προσδιορισμός P στα NL. Έτσι στον Πίνακα 7.7 παρουσιάζεται η ανάλυση P στα TL.

Πίνακας 7.7 : Ανάλυση λιποειδικού φωσφόρου στα κλάσματα των TL

Ξηροί καρποί	Ποσότητα P στα 20 μl TL (μg P)	Συνολική ποσότητα P στα TL (μg P)	Συγκέντρωση P στα TL (μg P/mg TL)	Συγκέντρωση P στο τελικό διάλυμα (μg P/μl)	Συγκέντρωση P στον καρπό (μgP/g καρπού)
ΚΑ	1,503	375,7	0,294	0,0752	187,6
ΑΜ	1,436	359,0	0,385	0,0718	179,2
ΦΑΝ	2,191	547,7	0,576	0,1096	273,8
ΦΑΕ	3,415	853,7	0,817	0,1708	426,8
ΗΛ	2,252	563,0	0,591	0,1126	281,5
ΚΟ	1,206	301,5	0,353	0,0603	150,5

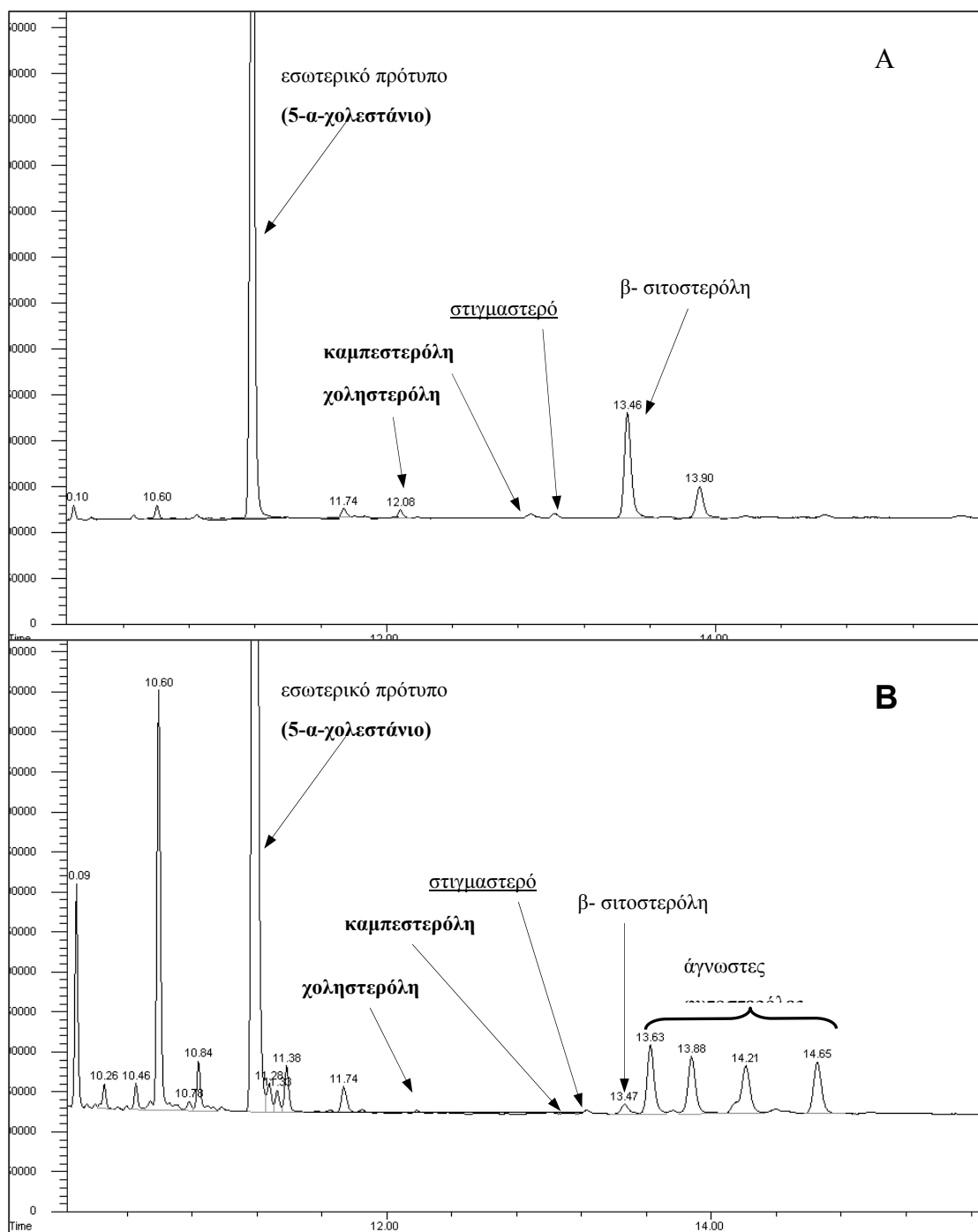
Στον Πίνακα 7.8 φαίνεται το ποσοστό ανάκτησης του λιποειδικού P στο κλάσμα των PL.

Πίνακας 7.8 : Ανάκτηση λιποειδικού φωσφόρου στο κλάσμα των PL

Ξηροί καρποί	Συνολική ποσότητα P στα TL (μg P)	Συνολική ποσότητα P στα PL (μg P)	Ανάκτηση P στο κλάσμα των PL (%)
ΚΑ	375,7	403,4	107
ΑΜ	359,0	422,5	118
ΦΑΝ	547,7	709,0	129
ΦΑΕ	853,7	770,6	90,3
ΗΛ	563,0	642,2	114
ΚΟ	301,5	367,5	122

7.3.2 Προσδιορισμός στερολών στα λιποειδικά κλάσματα των ξηρών καρπών

Στην συνέχεια έγινε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των στερολών στο κλάσμα των ολικών λιποειδών των ξηρών καρπών.



Σχήμα 7.1 Ανάλυση φυτοστερολών A) αμυγδαλού, B) κολοκυθόσπορου με αέρια χρωματογραφία

Στα παραπάνω σχήματα φαίνονται τα χρωματογραφήματα ελαίων ξηρών καρπών. Στο σχήμα A είναι το χρωματογράφημα του αμύγδαλου και στο σχήμα B αυτό του κολοκυθόσπορου. Από τα χρωματογραφήματα αυτά φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές της χοληστερόλης, στιγμαστερόλης, β-σιτοστερόλης και καμπεστερόλης, ενώ υπάρχουν και 4 άγνωστες κορυφές στερολών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι ο κολοκυθόσπορος είναι πολύ πλούσιος σε άγνωστες στερόλες και αυτό φαίνεται τόσο από το

χρωματογράφημα όσο και από την ποσοτική ανάλυση των στερολών που παρουσιάζεται παρακάτω σε πίνακες.

Στον Πίνακα 7.9 παρουσιάζεται η ανάλυση των ολικών στερολών καθώς και η συγκέντρωσή τους στο λίπος και στην συνολική μάζα των ξηρών καρπών ενώ στον Πίνακα 7.10 παρουσιάζεται η ποσοτική ανάλυση των γνωστών στερολών στο έλαιο καθώς και η συγκέντρωσή τους.

Πίνακας 7.9. Η περιεκτικότητα των ξηρών καρπών σε ολικές στερόλες. Οι τιμές προέρχονται από το μέσο όρο 2 μετρήσεων.

Ξηροί καρποί	ΣΥΝΟΛΟ ΣΤΕΡΟΛΩΝ	
	μg/ g ελαίου	mg/100 g καρπού
ΚΑ	2551	150
ΑΜ	5178	240
ΦΑΝ	5875	279
ΦΑΕ	5505	288
ΗΛ	4560	217
ΚΟ	2783	140

Πίνακας 7.10. Η περιεκτικότητα των ξηρών καρπών σε γνωστές στερόλες. Οι τιμές προέρχονται από το μέσο όρο 2 μετρήσεων.

Ξηροί καρποί	Άθροισμα γνωστών στερολών μg/ g ελαίου	<u>Καμπεστερόλη</u>	<u>Στιγμαστερόλη</u>	β – Σιτοστερόλη
		μg/ g ελαίου	μg/ g ελαίου	μg/ g ελαίου
ΚΑ	2250	81	18,13	2151
ΑΜ	4057,5	176	92,73	3788,8
ΦΑΝ	5027	257,27	47,8	4722
ΦΑΕ	4808,8	243,8	85	4480
ΗΛ	3942,89	481,72	394,17	3067
ΚΟ	218,65	47,44	22,2	148,99

Στον Πίνακα 11 φαίνεται η ποσοτική ανάλυση των κορυφών που δεν ήταν γνωστές στερόλες και άρα δεν ήταν δυνατόν να ταυτοποιηθούν.

Πίνακας 7.11. Η περιεκτικότητα των ξηρών καρπών στις άγνωστες ενώσεις που εκκλύονται μετά τις στερόλες. Οι τιμές προέρχονται από το μέσο όρο των αποτελεσμάτων 2 μετρήσεων.

Ξηροί καρποί	Άθροισμα αγνώστων	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄
	στερολών μg/ g ελαίου	μg/ g ελαίου	μg/ g ελαίου	μg/ g ελαίου	μg/ g ελαίου
ΚΑ	301,0	45,95	176,3	25,05	53,8
ΑΜ	1120,7	61,62	830,9	97,20	131,0
ΦΑΝ	847,7	223,80	434,6	58,90	130,3
ΦΑΕ	696,5	111,90	420,1	63,80	100,7
ΗΛ	617,0	66,90	178,4	257,70	114,0
ΚΟ	2564,4	672,48	646,3	662,00	583,6

7.4 ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΛΙΠΟΕΙΔΙΚΩΝ ΚΛΑΣΜΑΤΩΝ ΤΩΝ ΞΗΡΩΝ ΚΑΡΠΩΝ

Στο τελευταίο μέρος της εργασίας εκτιμήθηκε η ικανότητα των λιποειδικών κλασμάτων των ξηρών καρπών να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αναστολή της συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF.

Οι ποσότητες λιποειδικών κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας ήταν οι εξής: 50 μl από τα TL που αναδιαλύονταν σε 500 μl BSA, 500 μl από τα PL που αναδιαλύονταν σε 500 μl BSA και 100 μl από τα NL που αναδιαλύονταν σε 1 ml BSA. Οι συγκεντρώσεις των λιποειδικών κλασμάτων στο διάλυμα εργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της βιολογικής δραστηριότητας φαίνονται στο πίνακα 7.12.

Πίνακας 7. 12.: Οι συγκεντρώσεις των TL, PL, NL στο διάλυμα εργασίας της BSA που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της βιολογικής δραστηριότητας

Ξηρός καρπός	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΤΗΝ BSA (μg κλάσματος/μL BSA)		
	TL	PL	NL
ΚΑ	24,3	15,8	17,2
ΑΜ	18,6	4,4	11,9
ΦΑΝ	19,0	6,0	13,1
ΦΑΕ	20,8	10,0	14,3
ΗΛ	19,0	9,4	14,2
ΚΟ	17,0	3,9	13,1

Αφού απομονώθηκαν τα αιμοπετάλια από το αίμα του κουνελιού, εξετάστηκε αρχικά η δράση των των κλασμάτων στα αιμοπετάλια. Αν τα κλάσματα δεν επιδείκνυαν κάποια δράση συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στην συνέχεια στην ίδια κυψελίδα προσθέτονταν συγκέντρωση PAF γνωστού ύψους συσσώρευσης και διερευνόταν αν το κλάσμα μπορούσε να αναστείλει τη συσσώρευση του PAF.

Τα περισσότερα κλάσματα εμφάνισαν ανασταλτική δράση ενώ κάποια κλάσματα στο εύρος συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν δεν εμφάνισαν κάποια δράση γενικότερα. Για τα κλάσματα που εμφάνισαν ανασταλτική

δράση, η ικανότητα αναστολής εκτιμήθηκε με βάση το IC₅₀, το οποίο υπολογίστηκε όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο πίνακα 7.13.

Πίνακας 7.13 : Ανασταλτική δράση λιποειδικών κλασμάτων ξηρών καρπών έναντι της επαγόμενης από PAF συσσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

Ξηρός καρπός	IC ₅₀ (μg κλάσματος/μL διαλύματος αιμοπεταλίων)		
	TL	PL	NL
<u>ΚΑ</u>	1,1	¹	²
ΑΜ	³	0,049	0,30
ΦΑΝ	⁴	0,24	0,75
ΦΑΕ	0,72	⁵	⁶
ΗΛ	0,057	0,17	0,073
ΚΟ	0,40	0,12	0,79

¹ : Μέχρι τα 0,72 μg/ml δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση

² : Μέχρι τα 1,3 μg/ml δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση

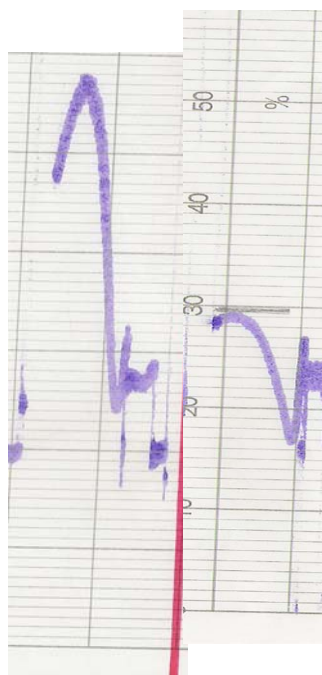
³ : Μέχρι τα 1,2 μg/ml δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση

⁴ : Μέχρι τα 0,57 μg/ml δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση

⁵ : Μέχρι τα 0,55 μg/ml δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση

⁶ : Μέχρι τα 0,87 μg/ml δεν εμφάνισε ανασταλτική δράση

Στα παρακάτω σχήματα φαίνεται ενδεικτικά η αναστολή που προκαλείται από διάφορα λιποειδικά κλάσματα στην επαγόμενη από PAF συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού.

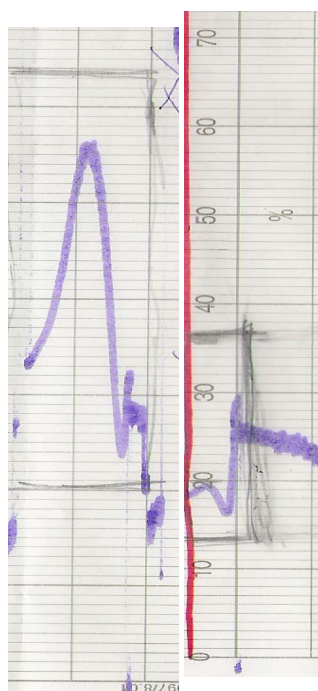


Σχήμα 7.2. Αριστερά φαίνεται η καμπύλη συσσώρευσης που επάγεται από 20 μL PAF συγκέντρωσης $6,5 \times 10^{-10}$ M και δεξιά η καμπύλη συσσώρευσης που



επάγεται από 20 μL PAF συγκέντρωσης $6,5 \times 10^{-10}$ M ύστερα από προεπάωση των αιμοπεταλίων με PL αμυγδάλου τελικής συγκέντρωσης 0,066 μg/mL

Σχήμα 7.3. Αριστερά φαίνεται η καμπύλη συσσώρευσης που επάγεται από 20 μL PAF συγκέντρωσης $6,5 \times 10^{-10}$ M και δεξιά η καμπύλη συσσώρευσης που επάγεται από 20 μL PAF συγκέντρωσης $6,5 \times 10^{-10}$ M ύστερα από προεπάωση των αιμοπεταλίων με TL ηλιόσπορου τελικής συγκέντρωσης 0,057 μg/mL



Σχήμα 7.4. Αριστερά φαίνεται η καμπύλη συσσώρευσης που επάγεται από 20 μL PAF συγκέντρωσης $6,5 \times 10^{-10}$ M και δεξιά η καμπύλη συσσώρευσης που επάγεται από 20 μL PAF συγκέντρωσης $6,5 \times 10^{-10}$ M ύστερα από προεπάση των αιμοπεταλίων με PL κολοκυθόσπορου τελικής συγκέντρωσης 0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η διατροφική αξία των ξηρών καρπών, όπως φάνηκε και από το 2^ο κεφάλαιο της εργασίας είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η υψηλή τους περιεκτικότητα σε διαιτητικές ίνες, ιχνοστοιχεία, βιταμίνη Ε και Α καθώς και η καλή σύσταση του λίπους τους τα καθιστά, ανεξάρτητα το είδος τους, σε τρόφιμα υψηλής διατροφικής αξίας αρκεί να καταναλώνονται με μέτρο λόγω της υψηλής θερμιδικής τους αξίας. Οι περισσότερες εργασίες που σχετίζονται με τις βιολογικές δράσεις των ξηρών καρπών είναι κυρίως επιδημιολογικές μελέτες και διατροφικές παρεμβάσεις σε διάφορες πληθυσμιακές ομάδες με κυριότερο εύρημα αυτών την αντιλιπιδαιμική τους δράση και συνεπώς στην ικανότητα τους να μειώνουν τον κίνδυνο για καρδιαγγειακές παθήσεις και αρτηριοσκλήρυνση αν ενσωματωθούν, σε μικρές σχετικά ποσότητες στο καθημερινό διαιτολόγιο. Η ευεργετική δράση των ξηρών καρπών στο λιπιδαιμικό προφίλ οφείλεται κυρίως στη σύσταση του λίπους τους, το οποίο είναι πλούσιο σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (κυρίως ελαιικό οξύ) και σε ω-3 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (27). Λίγες μελέτες έχουν εστιάσει στην αντιοξειδωτική δράση συγκεκριμένων εκχυλισμάτων και ακόμα λιγότερες μελέτες στην αντικαρκινική και αντιφλεγμονώδη δράση τους (27). Αντιθέτως, καμία μελέτη δεν έχει γίνει για να μελετηθεί η αντιθρομβωτική δράση των ξηρών καρπών, η οποία θα μπορούσε να συνεισφέρει στην γενικότερη προστατευτική τους δράση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Παράλληλα, ο Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) είναι από τους ισχυρότερους ενδογενείς μεσολαβητές της φλεγμονής και της θρόμβωσης και μέσω αυτών των δράσεων του συμμετέχει στους μηχανισμούς δημιουργίας της αθηρωματικής πλάκας (96). Η ύπαρξη ενώσεων στα τρόφιμα που μπορούν να αναστείλουν την δράση του PAF θα μπορούσε να αποτελέσει μέτρο της διατροφικής τους αξίας. In vitro μελέτες που έχει γίνει με παραδοσιακά τρόφιμα της Μεσογειακής διατροφής όπως κρασί, μέλι, γιαούρτι, γάλα και ελαιόλαδο, έδειξαν ότι τα τρόφιμα αυτά περιέχουν

ανταγωνιστές του PAF και αυτό θα μπορούσε εν μέρει να αποτελέσει εξήγηση για την ευεργετική αξία αυτών των τροφίμων έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων (96).

Το μοντέλο της συσσώρευσης πλυμένων κουνελιού είναι ένα πολύ καλό και απλό μοντέλο μελέτης της αντιθρομβωτικής δράσης εκχυλισμάτων, αφού τα αιμοπετάλια κουνελιού είναι ευκολότερα διαθέσιμα από τα αιμοπετάλια ανθρώπου, λειτουργούν πιο επαναλήψιμα και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα σε θρομβωτικούς παράγοντες όπως το ADP, θρομβίνη, κολλαγόνο, PAF κ.α. Από την άλλη ο PAF είναι ο ισχυρότερος παράγοντας συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και συνεπώς η δοκιμασία αυτή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη για την μελέτη ύπαρξης πιθανών αναστολέων του PAF σε ένα μεγάλο αριθμό εκχυλισμάτων. Έτσι κρίθηκε σκόπιμο και αφού δεν έχουν γίνει αντίστοιχες μελέτες, να διερευνηθεί κατά πόσο ένα ακόμα είδος τροφίμου της Μεσογειακής διατροφής, οι ξηροί καρποί και συγκεκριμένα τα λιποειδικά εκχυλίσματα τους επηρεάζουν την συσσώρευση που προκαλεί ο PAF στα αιμοπετάλια κουνελιού.

Προκειμένου να μελετηθεί η δράση των λιποειδών έπρεπε αυτά να εκχυλιστούν αρχικά από τον καρπό. Αυτό επιχειρήθηκε στην αρχή με τη μέθοδο Bligh-Dyer (91), η οποία όμως παρουσίασε προβλήματα. Κατ' αρχήν εκχυλιζόταν πάρα πολύ λίγο λίπος από τους καρπούς σε σχέση με την αντίστοιχη βιβλιογραφία. Επίσης, μετά τη φυγοκέντρηση του μίγματος διαλύτη – καρπού, εμφανιζόταν ένα ζελατινώδες ίζημα, του οποίου η χημική σύσταση ήταν άγνωστη και ίσως ήταν η αιτία που χανόταν τόσο λίπος. Μια υπόθεση είναι ότι αυτό το ίζημα αποτελείται από ίνες, οι οποίες είχαν προσροφήσει νερό το οποίο είναι μέρος του διαλύτη εκχύλισης στην Bligh-Dyer ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 1:2:0,8, v/v/v), ενώ δεν είναι στην Folch ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:2, v/v/v). Η προσρόφηση ύδατος από τις ίνες που οδηγεί στην διόγκωση τους και τον σχηματισμό πηκτής είναι μία καλά παγιωμένη ιδιότητα τους και οφείλεται στην ικανότητα των πολυαριθμων ομάδων –OH να συγκρατούν ισχυρά μόρια ύδατος (97). Η πρώτη μέθοδος απέτυχε να δώσει αποτελέσματα συγκρίσιμα με την βιβλιογραφία, έτσι χρησιμοποιήθηκε τελικά η Folch, η οποία έδωσε συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά της βιβλιογραφίας. Οι συγκρίσεις φαίνονται στον πίνακα 8.1:

ΠΙΝΑΚΑΣ 8.1: Παρουσιάζονται οι μετρήσεις του λίπους στους ξηρούς καρπούς που μελετήθηκαν σύμφωνα με τη βάση δεδομένων του USDA, τους πίνακες σύστασης τροφίμων του Πανεπιστημίου Κρήτης και του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης. Η έλλειψη κάποιας τιμής σημαίνει ότι δεν έχει γίνει αντίστοιχη ανάλυση.

ΞΗΡΟΙ ΚΑΡΠΟΙ	USDA (g/100g)	Ελληνικοί Πίνακες (g/100g)	Αποτελέσματα πτυχιακής (g/100g)
ΚΑ	59	69,0	61,0
ΑΜ	51	52,1	46,7
ΦΑΝ	44	54,2	47,5
ΦΑΕ	46	-	52,2
ΗΛ	50	50,0	47,6
ΚΟ	46	47,6	42,6

Παρατηρείται ότι τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης είναι συγκρίσιμα και με τις δύο πηγές, όμως είναι πιο κοντά στις μετρήσεις των πινάκων του USDA. Με βάση και τις 3 πηγές το καρύδι έχει το περισσότερο λίπος, ενώ το λιγότερο σύμφωνα με τους ελληνικούς πίνακες και τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης το έχει ο κολοκυθόσπορος, σε αντίθεση με τη βάση του USDA που το έχει το κελυφωτό φιστίκι νωπό. Το μεγαλύτερο ποσοστό λίπους στο ΦΑΕ σε σχέση με το ΦΑΝ οφείλεται στην ξήρανση και ψήσιμο του που έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια νερού και συνεπώς την αύξηση του ποσοστού του λίπους επί του νωπού δείγματος.

Στη συνέχεια έγινε διαχωρισμός των λιποειδών σε πολικά λιποειδή και ουδέτερα λιποειδή με τη μέθοδο της κατανομής κατ' αντιρροή. Η μέθοδος αυτή δεν έχει εφαρμοστεί ξανά για τον διαχωρισμό των ΤΛ των ξηρών καρπών και έτσι δεν μπορούν να γίνουν συγκρίσεις με την βιβλιογραφία. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στον πίνακα 7.5 του πειραματικού μέρους, φαίνεται ότι το καρύδι έχει το μεγαλύτερο ποσοστό πολικών λιποειδών με τιμή 8,1%, το οποίο βέβαια έρχεται σε αντίθεση με μια άλλη μελέτη που έδειξε ότι το καρύδι περιέχει 3,1 % PL (7). Αυτό ίσως

μαρτυρεί το γεγονός ότι η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στη διαφορετική ποικιλία, γιατί προέρχονται και οι 2 αναλύσεις από ελληνικά καρύδια, από διαφορετικό μέρος όμως. Από την άλλη χαμηλότερος σε πολικά λιποειδή είναι ο κολοκυθόσπορος με ποσοστό 2,8%, αφού είναι ο πλουσιότερος σε ουδέτερα λιποειδή με ποσοστό 95,7% και ανάκτηση της μέτρησης 98,5%. Πάντως πλούσιος σε πολικά λιποειδή είναι και ο ηλιόσπορος αφού έχει ποσοστό 6,2% και ανάκτηση 99,6%, καθώς και το φιστίκι επεξεργασμένο με ποσοστό 5,9% και ανάκτηση 91,7%. Εκτός από τις παρατηρήσεις που αναφέρονται παραπάνω σχετικά με το ποσοστό των λιποειδών, από τον πίνακα 7.5, προκύπτει επίσης ότι οι ανακτήσεις των μετρήσεων είναι πολύ υψηλές αφού κυμαίνονται από 82,5- 99,6%. Αυτό ισχυροποιεί τα αποτελέσματα της κατανομής σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή.

Η μέτρηση του λιποειδικού P είναι μέτρο της ποσότητας των φωσφολιποειδών σε ένα μίγμα λιποειδών. Τα αποτελέσματα των δικών μας αναλύσεων έδειξαν ότι το μεγαλύτερο ποσό φωσφολιποειδών στο μίγμα των TL έχει το ΦΑΕ, το οποίο μάλιστα έχει αξιοσημείωτα μεγαλύτερο ποσό P στο ολικό λίπος σε σχέση με το αντίστοιχο ΦΑΝ, γεγονός που δείχνει ότι η επεξεργασία του ΦΑΝ επηρεάζει την ποιοτική σύσταση των φωσφολιποειδών του. Χαμηλότερα ποσά φωσφολιποειδών έχουν ο ΗΛ, το ΑΜ και ο ΚΟ ενώ το μικρότερο ποσοστό φωσφολιποειδών στο ολικό λίπος έχει το ΚΑ. Όσον αφορά τη σύσταση των PL σε φωσφολιποειδή, την υψηλότερη συγκέντρωση φωσφόρου έχει το φιστίκι νωπό 18,7 $\mu\text{g P/mg PL}$ ενώ χαρακτηριστικά μικρότερες ποσότητες P έχουν το ΚΟ και ο ΗΛ. Αξίζει να σημειωθεί ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ ποσού PL και P στους ξηρούς καρπούς γεγονός που υποδεικνύει ότι το ποσοστό φωσφολιποειδών δεν είναι ανάλογο των συνολικών PL αλλά εξαρτάται από το είδος του ξηρού καρπού.

Παρατηρώντας τον πίνακα 7.8, προκύπτει επίσης ότι οι ανάκτηση του P άρα και των φωσφολιποειδών στα PL μετά την κατανομή κατ'αντιρροή, όχι μόνο είναι ποσοτικές αλλά οι περισσότερες από αυτές ξεπερνούν ελαφρά το 100%. Η ποσοτική ανάκτηση του P στο κλάσμα των PL δείχνει ότι η μέθοδος διαχωρισμού των TL σε PL και NL ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματική. Το γεγονός ότι η ανάκτηση ξεπερνά το 100% οφείλεται στο ότι κατά την εφαρμογή της

μεθόδου για τον προσδιορισμό φωσφόρου στα ολικά λιποειδή το δείγμα αμαυρωνόταν σε κάποιο ποσοστό, εξαιτίας της ύπαρξης υψηλού ποσού οργανικού άνθρακα με αποτέλεσμα η αμαύρωση να μειώνει την απορρόφηση των δειγμάτων.

Ακολούθησε ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των στερολών στα κλάσματα των ολικών λιποειδών των ξηρών καρπών. Σύμφωνα με τον πίνακα 7.9, πιο πλούσιο σε στερόλες είναι το έλαιο του νωπού φιστικιού Αιγίνης και πιο φτωχό αυτό του καρυδιού. Στον ποιοτικό προσδιορισμό που έγινε, ανιχνεύτηκαν οι γνωστές στερόλες καμπεστερόλη, στιγμαστερόλη και β-σιτοστερόλη, ενώ μετά τις κορυφές των γνωστών στερολών εμφανίστηκαν 4 κορυφές, οι οποίες δεν ταυτοποιήθηκαν και οι οποίες ήταν ιδιαίτερα έντονες στον κολοκυθόσπορο. Όσον αφορά την ποιοτική σύσταση των ξηρών καρπών σε φυτοστερόλες, ο ηλιόσπορος έχει τα μεγαλύτερα ποσά καμπεστερόλης και στιγμαστερόλης και μάλιστα σε πολλαπλάσια ποσά σε σχέση με τους άλλους ξηρούς καρπούς ενώ τα μεγαλύτερα ποσά β-σιτοστερόλης περιέχουν τα φιστίκια Αιγίνης ακολουθούμενα από το αμύγδαλο και τον ηλιόσπορο. Από την άλλη ο κολοκυθόσπορος έχει πολύ μικρά ποσά γνωστών φυτοστερολών αλλά πολύ μεγαλύτερες ποσότητες από τις άγνωστες ενώσεις που εμφανίζονται στο χρωματογράφημα των φυτοστερολών. Σε όλες όμως τις περιπτώσεις η β-σιτοστερόλη είναι η κύρια φυτοστερόλη των ξηρών καρπών και αυτό επιβεβαιώνεται και από ανεξάρτητες μελέτες άλλων ερευνητών (98). Στον πίνακα 8.2 φαίνεται η σύσταση των ξηρών καρπών σε φυτοστερόλες ανά 100g ξηρού καρπού (συνυπολογίζοντας την περιεκτικότητα των ξηρών καρπών σε λίπος) και συγκρίνεται με την σύσταση όπως δίνεται από την USDA. Οι τιμές της στιγμαστερόλης και καμπεστερόλης μεταξύ των δικών μας αναλύσεων και της USDA είναι αρκετά κοντινές. Οι σημαντικότερες διαφορές παρατηρούνται στις ολικές στερόλες του ΚΑ όπου στα δικά μας δείγματα έχει βρεθεί διπλάσια σχεδόν ποσότητα κι η διαφορά αυτή αποδίδεται στην πολύ μεγαλύτερη ποσότητα σιτοστερόλης που έχουν τα δείγματα καρυδιών της δικής μας ανάλυσης. Το αντίθετο συμβαίνει στην ανάλυση του ΗΛ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8.2: Σύσταση ξηρών καρπών σε φυτοστερόλες σύμφωνα με τις αναλύσεις της πτυχιακής εργασίας σε mg/100g καρπού. Στην παρένθεση φαίνονται οι αναλύσεις της USDA

Ξηροί καρποί	Άθροισμα στερολών mg/100g καρπού	<u>Καμπεστερόλη</u> mg/100g καρπού	<u>Στιγμαστερόλη</u> mg/100g καρπού	β – Σιτοστερόλη mg/100g καρπού
ΚΑ	150 (72)	4,9 (7)	1,1 (1)	131 (64)
ΑΜ	240 (120)	8,2 (5)	4,3 (4)	177 (111)
ΦΑΝ	279 (214)	12,2 (10)	2,3 (5)	223 (198)
ΦΑΕ	288 (214)	12,7 (10)	4,4 (4)	234 (199)
ΗΛ	217 (534)	22,9 (-)	18,7 (-)	146 (-)
ΚΟ	140 (-)	2,0 (-)	0,95 (-)	6,3 (-)

Όσον αφορά την βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων όλα τα κλάσματα των ξηρών καρπών εμφανίζουν ανασταλτική δράση έναντι της επαγομένης από PAF συσσώρευσης αιμοπεταλίων. Πρέπει να τονιστεί ότι τα κλάσματα των TL, NL, PL είναι μίγματα ενώσεων και η ανασταλτική δράση αυτών δεν αποκλείει την ύπαρξη και ενώσεων που προκαλούν συσσώρευση. Ωστόσο, το άθροισμα όλων των δραστικότητων που συνυπάρχουν μέσα σε αυτά τα κλάσματα φαίνεται τελικά ότι οδηγεί σε αναστολή της συσσώρευσης αιμοπεταλίων που επάγεται από τον PAF. Την πιο αδιάφορη βιολογική δραστικότητα εμφανίζει το καρύδι αφού τα TL έχουν μία μικρή ανασταλτική δράση ενώ τα επιμέρους κλάσματα του, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, δεν εμφανίζουν κάποια δράση. Την καλύτερη ανασταλτική δράση εμφανίζουν τα TL του ηλιόσπορου, η οποία αποδίδεται στην πολύ ισχυρή ανασταλτική δράση των ουδετέρων λιποειδών του. Όσον αφορά τα PL την καλύτερη ανασταλτική δράση εμφανίζουν τα PL του αμύγδαλου.

Σε μία προσπάθεια να συσχετιστούν οι βιολογικές δράσεις με τις μετρούμενες χημικές παραμέτρους αυτής της εργασίας φαίνονται τα εξής : Μόνο, το ποσοστό στιγμαστερόλης στο λίπος των ξηρών καρπών μπορεί να συσχετιστεί με την βιολογική τους δραστικότητα και φαίνεται ότι όσο

μεγαλύτερο το ποσοστό στιγμαστερόλης τόσο ισχυρότερη η αναστολή που παρατηρείται από τα NL των ξηρών καρπών που εμφάνισαν ανασταλτική δράση. Φαίνεται επίσης ότι ο ηλιόσπορος, του οποίου τα TL έχουν την χαμηλότερη τιμή IC₅₀, έχει την υψηλότερη περιεκτικότητα σε καμπεστερόλη και στιγμαστερόλη. Πρέπει να τονιστεί ότι μόνο η β-σιτοστερόλη και οι γλυκοζίτες αυτές έχουν βρεθεί να έχουν αντιαιμοπεταλιακή δράση (99, 100) χωρίς ωστόσο να έχει βρεθεί κάτι αντίστοιχο και για τις άλλες φυτοστερόλες.

Πρέπει να τονιστεί ότι πολλά από τα συστατικά που θεωρητικά υπάρχουν στα λιποειδικά κλάσματα των ξηρών καρπών έχει αποδειχτεί ότι έχουν αντιαιμοπεταλιακή δράση *in vitro*. Συγκεκριμένα, το ελαιικό οξύ είναι ένας καλά παγιωμένος αναστολέας της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από τον PAF (101) και θα μπορούσε να συνεισφέρει στην ανασταλτική δράση των κλασμάτων. Αναστολείς επίσης της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων είναι τόσο οι τοκοφερόλες (102) όσο και το λινολεϊκό (103), γ-λινολεϊκό οξύ (104) καθώς και τα ω-3 λιπαρά οξέα (105) στα οποία είναι πλούσια οι ξηροί καρποί. Οι τοκοφερόλες και τα λιπαρά οξέα κατανέμονται στα ουδέτερα λιποειδή. Είναι χαρακτηριστικό ότι ο ηλιόσπορος, ο οποίος εμφανίζει την ισχυρότερη ανασταλτική δράση στα NL είναι ταυτόχρονα ο ξηρός καρπός με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε τοκοφερόλη και από τις μεγαλύτερες περιεκτικότητες σε λινολεϊκό οξύ. Πρέπει να τονιστεί ότι και η τριλινελαινη, το τριγλυκερίδιο με τρία λινολεϊκά οξέα εμφανίζει ανασταλτική δράση έναντι των αιμοπεταλίων (106).

Είναι λοιπόν προφανές ότι η παρουσία τόσων ισχυρών αναστολέων της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων στα λιποειδικά κλάσματα των ξηρών καρπών οδηγεί, όπως αποδείχτηκε σε αυτή την εργασία, σε αναστολή των αιμοπεταλίων και αποδεικνύει την αντιθρομβωτική δράση των ξηρών καρπών, τουλάχιστον *in vitro*. Επίσης, αποδεικνύεται για πρώτη φορά η ισχυρή ανταγωνιστική δράση των λιποειδικών κλασμάτων στις δράσεις του PAF, η οποία θα μπορούσε να έχει ισχύ τόσο σε άλλα κύτταρα όσο και σε άλλες δράσεις του PAF. Μένει να αποδειχτεί σε ποια συστατικά αυτών των κλασμάτων οφείλεται η ανασταλτική δράση έναντι του PAF.

9. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βιολογική δραστηριότητα των λιποειδικών κλασμάτων των Ελληνικών ξηρών καρπών : καρύδι, αμύγδαλο, κελυφωτό φιστίκι Αιγίνης, ηλιόσπορος και κολοκυθόσπορος. Έγινε ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για την χημική και διατροφική τους αξία, όπου φάνηκε ότι η δεύτερη είναι πολύ μεγάλη αφού έχουν καρδιοπροστατευτική δράση εξαιτίας των λιπαρών οξέων που περιέχουν, είναι πλούσιοι σε φυτοστερόλες, διαιτητικές ίνες, φλαβονοειδή, μικροθρεπτικά συστατικά και άλλα αντιοξειδωτικά. Έχουν μελετηθεί οι βιολογικές τους δράσεις τόσο σε διατροφικές παρεμβάσεις στους ανθρώπους όσο και σε επιδημιολογικές μελέτες οι οποίες έχουν δείξει ότι οι ξηροί καρποί έχουν αντιλιπιδαιμική, αντιαθηρωματική, αντικαρκινική και αντιοξειδωτική δράση. Ωστόσο, δεν έχει μελετηθεί η αντιθρομβωτική δράση των ξηρών καρπών, η οποία θα μπορούσε να συνεισφέρει στην καρδιοπραστατευτική τους δράση.

Στο πειραματικό μέρος έγινε απομόνωση του ολικού λίπους (το οποίο αποτελεί κατά μέσο όρο γύρω στο μισό βάρος τους) και διαχωρισμός του σε πολικά και ουδέτερα λιποειδή. Στη συνέχεια έγινε προσδιορισμός φωσφόρου στα πολικά και ολικά λιποειδή, καθώς και ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός στερολών στα τελευταία. Τα κλάσματα των λιποειδών που απομονώθηκαν μελετήθηκαν ως προς τη βιολογική τους δραστηριότητα σε αιμοπετάλια κουνελιού. Όλοι οι ξηροί καρποί είχαν σημαντικά ποσά φυτοστερολών με σημαντικότερη στερόλη την β-σιτοστερόλη. Όλα τα δείγματα παρουσίασαν ανασταλτική δράση στη συσσώρευση που προκαλούσε ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF), άλλα μεγαλύτερη και άλλα μικρότερη. Την σημαντικότερη αναστολή παρουσίασαν τα πολικά λιποειδή του αμύγδαλου, ακολουθούν τα ολικά λιποειδή του ηλιόσπορου και τέλος τα ουδέτερα λιποειδή του ηλιόσπορου. Η ανασταλτική δράση των κλασμάτων συσχετίστηκε μόνο με το ποσό στιγμαστερόλης στους ξηρούς καρπούς.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://en.wikipedia.org/wiki/>
2. http://www.agrotypos.gr/news/news_Show.asp?AA=4702
3. <http://www.iobe.gr/>
4. <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>
5. <http://nutrition.med.uoc.gr/GreekTables/>
6. Sang S, Kikuzaki H, Lapsley K, Rosen RT, Nakatani N, Ho CT., Sphingolipid and other constituents from almond nuts (*Prunus amygdalus* Batsch). *J Agric Food Chem.* 2002 Jul 31;50(16):4709-12
7. Tsamouris G, Hatziantoniou S, Demetzos C. Lipid analysis of Greek walnut oil (*Juglans regia* L.). *Z Naturforsch [C].* 2002 Jan-Feb;57(1-2):51-6.
8. Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM., Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut. *Int J Food Sci Nutr.* 2004 May;55(3):171-8
9. Kulkarni AS, Khotpal RR, Bhakare, HA (1991) Studies on glycolipids of Kenaf, English Walnut, Myrobalan and Manila Tamarind seeds of the Vidarbha region (India). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68: 891–893.
10. Alma MH, Nitz S, Kollmannsberger H, Digrak M, Efe FT, Yilmaz N., Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the gum of Turkish pistachio (*Pistacia vera* L.). *J Agric Food Chem.* 2004 Jun 16;52(12):3911-4
11. Buchbauer, G. & Jirovetz, L. (1992) Volatile constituents of the essential oil of the peels of *Juglans nigra* L. *J. Essent. Oil Res.* 4: 539–541.
12. Feldman EB *J Nutr.* 2002 May;132(5):1062S-1101S. The scientific evidence for a beneficial health relationship between walnuts and coronary heart disease.

13. Sattar A, Wahid M, Durrani SK, Concentration of selected heavy metals in spices, dry fruits and plant nuts, *Plant Foods Hum Nutr.* 1989 Sep;39(3):279-86
14. Kannamkumarath SS, Wrobel K, Wrobel K, Caruso JA, Speciation of arsenic in different types of nuts by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Agric Food Chem.* 2004 Mar 24;52(6):1458-63.
15. Svarc-Gajic JV, *Mol Nutr Food Res.* 2005 Apr;49(4):337-42
16. Sang S, Lapsley K, Jeong WS, Lachance PA, Ho CT, Rosen RT, Antioxidative phenolic compounds isolated from almond skins (*Prunus amygdalus Batsch*), *J Agric Food Chem.* 2002 Apr 10;50(8):2459-63.
17. Kayano S, Kikuzaki H, Fukutsuka N, Mitani T, Nakatani N, Antioxidant activity of prune (*Prunus domestica L.*) constituents and a new synergist, *J Agric Food Chem.* 2002 Jun 19;50(13):3708-12
18. Tokusoglu O, Unal MK, Yemis F, Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), *J Agric Food Chem.* 2005 Jun 15;53(12):5003-9.
19. Aramendia MA, Garcia IM, Lafont F, Lizaso J, Marinas JM, Urbano FJ, Rapid determination of chlorogenic acid and related compounds in sunflower seeds by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2000;14(12):1019-22.
20. Fukuda T, Ito H, Yoshida T, Antioxidative polyphenols from walnuts (*Juglans regia L.*), *Phytochemistry.* 2003 Aug;63(7):795-801.
21. Sicilia T, Niemeyer HB, Honig DM, Metzler M, Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds, *J Agric Food Chem.* 2003 Feb 26;51(5):1181-8.
22. Macfarlane, B. J., Bezwoda, W. R., Bothwell, T. H., Baynes, R. D., Bothwell, J. E., MacPhail, A. P., Lamparelli, R. D., & Mayet, F. (1988) Inhibitory effect of nuts on iron absorption. *Am. J. Clin. Nutr.* 47: 270–274.

23. McGill, A. S., Moffat, C. F., Mackie, P. R., & Cruickshank, P. (1993) The composition and concentration of n-alkanes in retail samples of edible oils. *J.Sci. Food Agric.* 61: 357–362.
24. Daugherty, W., Smith, S., Wigal, C., Verhoek, S., & Williams, S. (1995) Distribution of 5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone and other naphthoquinone derivatives in the Juglandaceae (walnut family) and related families. In: *Phytochemicals and Health* (Gustine, D. L. & Flores, H. E., eds.), vol. 15, pp. 335–337. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
25. Feldman JM, Lee EM, Serotonin content of foods: effect on urinary excretion of 5-hydroxyindoleacetic acid, *Am J Clin Nutr.* 1985 Oct;42(4):639-43.
26. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX, Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood, *Nutrition.* 2005 Sep;21(9):920-4.
27. Kris-Etherton PM, Yu-Poth S, Sabate J, Ratcliffe HE, Zhao G, Etherton TD, Nuts and their bioactive constituents: effects on serum lipids and other factors that affect disease risk, *Am J Clin Nutr.* 1999 Sep;70(3 Suppl):504S-511S
28. Dreher ML, Maher CV, Kearney P, The traditional and emerging role of nuts in healthful diets, *Nutr Rev.* 1996 Aug;54(8):241-5.
29. Soriguer FJ, Gonzalez-Romero S, Esteva I, et al. Does the intake of nuts and seeds alter the appearance of menarche? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1995;74:455–61.
30. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2000. Continuing Survey of Food Intake by Individuals CSFII 1994–96, 1998.
31. Fraser GE, Sabaté J, Beeson WL, Strahan M. A possible protective effect of nut consumption on risk of coronary heart disease. *Arch Intern Med* 1992;152:1416–24.
32. Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, et al. Frequent nut consumption and risk of coronary heart disease in women: prospective cohort study. *BMJ* 1998;317:1341–5.

33. Sabate J, Nut consumption and body weight, *Am J Clin Nutr*, 2003, 78(Suppl), 647S-650S.
34. Fraser GE, Nut consumption, lipids, and risk of a coronary event, *Clin Cardiol*. 1999 Jul;22(7 Suppl):III11-5.
35. Sabate J, Nut consumption, vegetarian diets, ischemic heart disease risk, and all-cause mortality: evidence from epidemiologic studies, *Am J Clin Nutr*. 1999 Sep;70(3 Suppl):500S-503S.
36. Fraser, G. E., Sumbureru, D., Pribis, P., Neil, R. L., & Frankson, M. A. C. (1997) Association among health habits, risk factors, and all-cause mortality in a black California population. *Epidemiology* 8: 168–174.
37. Kushi, L. H., Folsom, A. R., Prineas, R. J., Mink, P. J., Wu, Y., & Bostick, R. M. (1996) Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *N. Engl. J. Med.* 334: 1156–1162.
38. Strahan TM, Nuts for cardiovascular protection, *Asia Pac J Clin Nutr*. 2004;13(Suppl):S33.
39. Lavedrine F, Zmirou D, Ravel A, Balducci F, Alary J, Blood cholesterol and walnut consumption: a cross-sectional survey in France, *Prev Med*. 1999 Apr;28(4):333-9.
40. Sabate J, Fraser GE, Burke K, Knutsen SF, Bennett H, Lindsted KD, Effects of walnuts on serum lipid levels and blood pressure in normal men, *N Engl J Med*. 1993 Mar 4;328(9):603-7.
41. Chisholm A, Mann J, Skeaff M, Frampton C, Sutherland W, Duncan A, Tiszavari S, A diet rich in walnuts favourably influences plasma fatty acid profile in moderately hyperlipidaemic subjects, *Eur J Clin Nutr*. 1998 Jan;52(1):12-6.
42. Iwamoto M, Sato M, Kono M, Hirooka Y, Sakai K, Takeshita A, Imaizumi K. J, Walnuts lower serum cholesterol in Japanese men and women, *J Nutr*. 2000 Feb;130(2):171-6.
43. Iwamoto M, Imaizumi K, Sato M, Hirooka Y, Sakai K, Takeshita A, Kono M, Serum lipid profiles in Japanese women and men during consumption of walnuts, *Eur J Clin Nutr*. 2002 Jul;56(7):629-37.
44. Zambon D, Sabate J, Munoz S, Campero B, Casals E, Merlos M, Laguna JC, Ros E, Substituting walnuts for monounsaturated fat improves the

- serum lipid profile of hypercholesterolemic men and women. A randomized crossover trial, *Ann Intern Med*. 2000 Apr 4;132(7):538-46.
45. Zibaenezhad MJ, Rezaiezhadeh M, Mowla A, Ayatollahi SM, Panjehshahin MR, Antihypertriglyceridemic effect of walnut oil, *Angiology*. 2003 Jul-Aug;54(4):411-4.
 46. Zibaenezhad MJ, Shamsnia SJ, Khorasani M, Walnut consumption in hyperlipidemic patients, *Angiology*. 2005 Sep-Oct;56(5):581-3.
 47. Almario RU, Vonghavaravat V, Wong R, Kasim-Karakas SE, Effects of walnut consumption on plasma fatty acids and lipoproteins in combined hyperlipidemia, *Am J Clin Nutr*. 2001 Jul;74(1):72-9.
 48. Tapsell LC, Gillen LJ, Patch CS, Batterham M, Owen A, Bare M, Kennedy M, Including walnuts in a low-fat/modified-fat diet improves HDL cholesterol-to-total cholesterol ratios in patients with type 2 diabetes, *Diabetes Care*. 2004 Dec;27(12):2777-83.
 49. Munoz S, Merlos M, Zambon D, Rodriguez C, Sabate J, Ros E, Laguna JC, Walnut-enriched diet increases the association of LDL from hypercholesterolemic men with human HepG2 cells, *J Lipid Res*. 2001 Dec;42(12):2069-76.
 50. Ros E, Nunez I, Perez-Heras A, Serra M, Gilabert R, Casals E, Deulofeu R, A walnut diet improves endothelial function in hypercholesterolemic subjects: a randomized crossover trial, *Circulation*. 2004 Apr 6;109(13):1609-14. Epub 2004 Mar 22.
 51. Ravel A, Roussel AM, Alary J, Laturaze J, Effects of varying dietary proteins on plasma lipids and rabbit platelet function, *Thromb Res*. 1988 Feb 15;49(4):405-14.
 52. Pieters M, Oosthuizen W, Jerling JC, Loots du T, Mukuddem-Petersen J, Hanekom SM, Clustering of haemostatic variables and the effect of high cashew and walnut diets on these variables in metabolic syndrome patients, *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005 Sep;16(6):429-37.
 53. Haque R, Bin-Hafeez B, Parvez S, Pandey S, Sayeed I, Ali M, Raisuddin S, Aqueous extract of walnut (*Juglans regia* L.) protects mice against cyclophosphamide-induced biochemical toxicity, *Hum Exp Toxicol*. 2003 Sep;22(9):473-80.

54. Narayanan BA, Geoffroy O, Willingham MC, Re GG, Nixon DW, p53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells, *Cancer Lett.* 1999 Mar 1;136(2):215-21.
55. Espin JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ, Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical, *J Agric Food Chem.* 2000 Mar;48(3):648-56.
56. Anderson KJ, Teuber SS, Gobeille A, Cremin P, Waterhouse AL, Steinberg FM, Walnut polyphenolics inhibit in vitro human plasma and LDL oxidation, *J Nutr.* 2001 Nov;131(11):2837-42.
57. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX, Melatonin in walnuts: influence on levels of melatonin and total antioxidant capacity of blood, *Nutrition.* 2005 Sep;21(9):920-4.
58. Fukuda T, Ito H, Yoshida T, Effect of the walnut polyphenol fraction on oxidative stress in type 2 diabetes mice, *Biofactors.* 2004;21(1-4):251-3.
59. Spiller GA, Jenkins DJ, Cragen LN, Gates JE, Bosello O, Berra K, Rudd C, Stevenson M, Superko R, Effect of a diet high in monounsaturated fat from almonds on plasma cholesterol and lipoproteins, *J Am Coll Nutr.* 1992 Apr;11(2):126-30.
60. Abbey M, Noakes M, Belling GB, Nestel PJ, Partial replacement of saturated fatty acids with almonds or walnuts lowers total plasma cholesterol and low-density-lipoprotein cholesterol, *Am J Clin Nutr.* 1994 May;59(5):995-9.
61. Spiller GA, Jenkins DA, Bosello O, Gates JE, Cragen LN, Bruce B, Nuts and plasma lipids: an almond-based diet lowers LDL-C while preserving HDL-C, *J Am Coll Nutr.* 1998 Jun;17(3):285-90.
62. Sabate J, Haddad E, Tanzman JS, Jambazian P, Rajaram S, Serum lipid response to the graduated enrichment of a Step I diet with almonds: a randomized feeding trial, *Am J Clin Nutr.* 2003 Jun;77(6):1379-84.
63. Hyson DA, Schneeman BO, Davis PA, Almonds and almond oil have similar effects on plasma lipids and LDL oxidation in healthy men and women, *J Nutr.* 2002 Apr;132(4):703-7.

64. Spiller GA, Miller A, Olivera K, Reynolds J, Miller B, Morse SJ, Dewell A, Farquhar JW, Effects of plant-based diets high in raw or roasted almonds, or roasted almond butter on serum lipoproteins in humans, *J Am Coll Nutr.* 2003 Jun;22(3):195-200.
65. Lamarche B, Desroches S, Jenkins DJ, Kendall CW, Marchie A, Faulkner D, Vidgen E, Lapsley KG, Trautwein EA, Parker TL, Josse RG, Leiter LA, Connelly PW, Combined effects of a dietary portfolio of plant sterols, vegetable protein, viscous fibre and almonds on LDL particle size, *Br J Nutr.* 2004 Oct;92(4):657-63.
66. Fraser GE, Bennett HW, Jaceldo KB, Sabate J, Effect on body weight of a free 76 Kilojoule (320 calorie) daily supplement of almonds for six months, *J Am Coll Nutr.* 2002 Jun;21(3):275-83.
67. Lovejoy JC, Most MM, Lefevre M, Greenway FL, Rood JC, Effect of diets enriched in almonds on insulin action and serum lipids in adults with normal glucose tolerance or type 2 diabetes, *Am J Clin Nutr* 2002 Nov 76:1000–6.
68. Chen CY, Milbury PE, Lapsley K, Blumberg JB, Flavonoids from almond skins are bioavailable and act synergistically with vitamins C and E to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation, *J Nutr.* 2005 Jun;135(6):1366-73.
69. Jambazian PR, Haddad E, Rajaram S, Tanzman J, Sabate J, Almonds in the diet simultaneously improve plasma alpha-tocopherol concentrations and reduce plasma lipids, *J Am Diet Assoc.* 2005 Mar;105(3):449-54.
70. Wien MA, Sabate JM, Ikle DN, Cole SE, Kandeel FR, Almonds vs complex carbohydrates in a weight reduction program, *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003 Nov;27(11):1365-72.
71. Davis PA, Iwahashi CK, Whole almonds and almond fractions reduce aberrant crypt foci in a rat model of colon carcinogenesis, *Cancer Lett.* 2001 Apr 10;165(1):27-33.
72. Edwards K, Kwaw I, Matud J, Kurtz I, Effect of pistachio nuts on serum lipid levels in patients with moderate hypercholesterolemia, *J Am Coll Nutr.* 1999 Jun;18(3):229-32.

73. Ozcelik B, Aslan M, Orhan I, Karaoglu T, Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*, *Microbiol Res.* 2005;160(2):159-64.
74. Suphiphat V, Morjaroen N, Pukboonme I, Ngunboonsri P, Lowhnoo T, Dhanamitta S, The effect of pumpkin seeds snack on inhibitors and promoters of urolithiasis in Thai adolescents, *J Med Assoc Thai.* 1993 Sep;76(9):487-93.
75. Suphakarn VS, Yarnnon C, Ngunboonsri P, The effect of pumpkin seeds on oxalocrystalluria and urinary compositions of children in hyperendemic area, *Am J Clin Nutr.* 1987 Jan;45(1):115-21.
76. Carbin BE, Larsson B, Lindahl O, Treatment of benign prostatic hyperplasia with phytosterols, *Br J Urol.* 1990 Dec;66(6):639-41.
77. Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE, Effect of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl₄-induced liver injury in low-protein fed rats, *Phytother Res.* 2005 Apr;19(4):341-5.
78. Fahim AT, Abd-el Fattah AA, Agha AM, Gad MZ, Effect of pumpkin-seed oil on the level of free radical scavengers induced during adjuvant-arthritis in rats, *Pharmacol Res.* 1995 Jan;31(1):73-9.
79. Wang HX, Ng TB, Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate and glycine residues from black pumpkin seeds, *Peptides.* 2003 Jul;24(7):969-72.
80. Xia HC, Li F, Li Z, Zhang ZC, Purification and characterization of Moschatin, a novel type I ribosome-inactivating protein from the mature seeds of pumpkin (*Cucurbita moschata*), and preparation of its immunotoxin against human melanoma cells, *Cell Res.* 2003 Oct;13(5):369-74.
81. Hojima Y, Pierce JV, Pisano JJ, Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIa (activated Hageman factor) and bovine trypsin, *Biochemistry.* 1982 Aug 3;21(16):3741-6.
82. Krishnamoorthi R, Gong YX, Richardson M, A new protein inhibitor of trypsin and activated Hageman factor from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds, *FEBS Lett.* 1990 Oct 29;273(1-2):163-7.

83. Rodrigues KL, Cardoso CC, Caputo LR, Carvalho JC, Fiorini JE, Schneedorf JM, Cicatrizing and antimicrobial properties of an ozonised oil from sunflower seeds, *Inflammopharmacology*. 2004;12(3):261-70.
84. Sen M, Bhattacharyya DK, Nutritional quality of sunflower seed protein fraction extracted with isopropanol, *Plant Foods Hum Nutr*. 2000;55(3):265-78.
85. Megias C, del Mar Yust M, Pedroche J, Lquari H, Giron-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J, Purification of an ACE inhibitory peptide after hydrolysis of sunflower (*Helianthus annuus* L.) protein isolates, *J Agric Food Chem*. 2004 Apr 7;52(7):1928-32.
86. Hanahan DJ, Platelet activating factor, a biologically active phosphoglyceride. *Ann.Rev.Biochem.*, 1986, 55, 483-509.
87. McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN, PAF molecular heterogeneity. Pathobiological implications. *Lab.Invest.*, 1993, 69, 639-650
88. Pinckard RN, Woodard DS, Showell HJ, Conklyn MJ, Novak MJ, McManus LM, Structural and (patho)physiological diversity of PAF. *Clin.Rev.Allergy*, 1994, 12, 329-359
89. Snyder F, Platelet-activating factor and its analogs, metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim.Biophys.Acta*, 1995, 1254, 231-249
90. Stafforini DM, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM., Platelet-activating factor, a pleiotropic mediator of physiological and pathological processes., *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2003;40(6):643-72
91. Bligh EG, Dyer WJ, A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can.J.Biochem.Pharmacol.*, 1959, 37, 911-917.
92. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH, A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES, *J. Biol. Chem*. 1957, 226, 497-509
93. Galanos, D. S., & Kapoulas, V. M. (1962). Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures. *Journal of Lipid Research*, 3, 134–137.
94. Barlett GR, *J.Biol.Chem.*, 1959, 234, 466.
95. Pinckard RN, Farr RS, Hanahan DJ, Physicochemical and functional identity of rabbit platelet-activating factor (PAF) released in vivo during IgE

- anaphylaxis with PAF released in vitro from IgE sensitized basophils. *J.Immunol.*, 1979, 123, 1847-1857.
96. Demopoulos CA, Karantonis HC and Antonopoulou S, Platelet activating factor – a molecular link between atherosclerosis theories. *Eur J Lipid Sci Technol* 105:705-716 (2003).
 97. McPherson Kay R., Dietary fibers, *J.Lipid Res.*, 1982, 23, 221-242
 98. Maguire LS, O'Sullivan SM, Galvin K, O'Connor TP, O'Brien NM, Fatty acid profile, tocopherol, squalene and phytosterol content of walnuts, almonds, peanuts, hazelnuts and the macadamia nut, *Int J Food Sci Nutr.* 2004, 55(3):171-8
 99. Zhao J, Zhang CY, Xu DM, Huang GQ, Xu YL, Wang ZY, Fang SD, Chen Y, Gu YL., The antiatherogenic effects of components isolated from pollen typhae., *Thromb Res.* 1990, 57(6):957-66
 100. Chang FR, Wei JL, Teng CM, Wu YC, Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea.*, *J Nat Prod.* 1998;61(12):1457-61
 101. Nunez D, Randon J, Gandhi C, Siafaka-Kapadai A, Olson MS, Hanahan DJ., The inhibition of platelet-activating factor-induced platelet activation by oleic acid is associated with a decrease in polyphosphoinositide metabolism., *J Biol Chem.*;265(30):18330-8
 102. Zingg JM, Azzi A, Non-antioxidant activities of vitamin E., *Curr Med Chem.* 2004 May;11(9):1113-33
 103. Vallee E, Gougat J, Ageron M., Inhibition of platelet phospholipase-A2 as a mechanism for the anti-aggregating effect of linoleic acid., *Agents Actions.* 1980 Apr;10(1 Pt 2):57-62
 104. Refsum N, Lowery C, Nordoy A., The effects of albumin-bound unsaturated fatty acids on platelets., *Haemostasis.* 1981;10(1):3-13
 105. Srivastava KC, Docosahexaenoic acid (C22:6 omega 3) and linoleic acid are anti-aggregatory, and alter arachidonic acid metabolism in human platelets., *Prostaglandins Leukot Med.* 1985 Mar;17(3):319-27
 106. Shen YC, Hong CY., Effect of trilinolein on cyclic nucleotide formation in human platelets: relationship with its antiplatelet effect and nitric oxide synthesis., *Br J Pharmacol.* 1995 Sep;116(1):1644-8