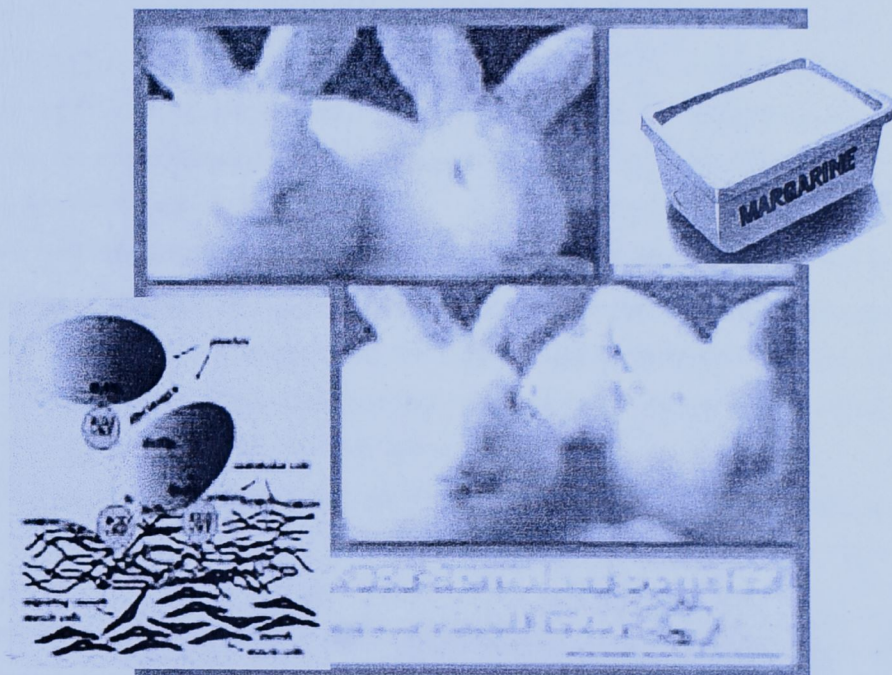


«Light τρόφιμα»: μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας των λιπαρών υλών τους και σύγκριση με τα αντίστοιχα πλήρη σε λίπος τρόφιμα (μαργαρίνη)



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Καπώλη Γεωργία Α.Μ.:20014

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)

Τριμελής Επιτροπή

Αντωνοπούλου Σμαραγδή (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)

Νομικός Τζώρτζης (Λέκτορας)

Δεδούσης Γιώργος (Λέκτορας)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου κα Σμαραγδή Αντωνοπούλου, αφενός μεν για την ευκαιρία την οποία μου έδωσε μέσω της ανάθεσης της παρούσας πτυχιακής εργασίας να έχω μία εποικοδομητική πρώτη επαφή με χρήσιμες χημικές μεθόδους, αφετέρου δε για τη συνεχή υποστήριξή της και την παροχή χρήσιμων συμβουλών για την επίλυση δυσκολιών που εμφανίστηκαν κατά τη διάρκεια της διεξαγωγής της εργασίας αυτής. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Κωνσταντίνο Δημόπουλο, Καθηγητή του Τμήματος Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών για τη διάθεση των χώρων του εργαστηρίου Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, συμβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο αποφασιστικά στην ολοκλήρωση του εργαστηριακού μέρους της παρούσας πτυχιακής. Επίσης, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στα εξής άτομα:

- Στον κο Τζώρτζη Νομικό, Λέκτορα του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου, του οποίου η βοήθεια, μέσα από τη συνεχή παρακολούθηση και την επίλυση προβλημάτων και δυσκολιών, τόσο στο πειραματικό όσο και στο βιβλιογραφικό μέρος της παρούσας πτυχιακής, υπήρξε καταλυτική. Οφείλω να ομολογήσω ότι χωρίς τη βοήθειά του, η παρούσα πτυχιακή θα είχε διεξαχθεί με δυσκολία.
- Στην κα Δέσποινα Γαλάνη για τη συνεχή υποστήριξη και την παροχή χρήσιμων συμβουλών τόσο κατά την διεξαγωγή του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας αυτής.
- Στην κα Λίζα Φραγκοπούλου, υποψήφια Διδάκτορα, για τις χρήσιμες συμβουλές της στο πειραματικό μέρος της παρούσα εργασίας.
- Στο Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, για την διάθεση των χώρων και των οργάνων έτσι να διεξαχθεί επιτυχώς το πειραματικό μέρος της παρούσα πτυχιακής.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα άτομα του φιλικού μου περιβάλλοντος για την συνεχή ψυχολογική υποστήριξη που μου προσέφεραν σε αυτήν μου την προσπάθεια και πάνω από όλα την οικογένειά μου, η οποία στέκεται πάντα στο πλευρό μου σε οποιαδήποτε κατάσταση, δύσκολη ή εύκολη.

Σας ευχαριστώ πολύ!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Θέματα

Σελίδες

A. Εισαγωγή	1-30
1. Γενικά περί λιποειδών	1-5
1.1 Βιολογικές λειτουργίες των λιποειδών	1-2
1.2 Κατάταξη των λιποειδών	2-5
2. Παράγοντας Ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (PAF)	6-17
2.1 Χημική δομή του PAF - Σχέση δομής και δραστηριότητας –Ανάλογα PAF	6-7
2.2 Κυτταρικές πηγές και τρόπος δράσης του PAF	8
2.3 Μεταβολισμός του βιοσύνθεσης του PAF – Σύνθεση και Διάσπαση	8-9
2.4 Συμμετοχή του PAF σε παθολογικές καταστάσεις	9-10
2.5 PAF και αθηρωμάτωση	10-11
2.6 Αναστολείς του PAF	12-17
<u>3. Light Τρόφιμα</u>	18-25
3.1 Γιατί χρησιμοποιούνται	18-20
3.2 Επιπτώσεις στην υγεία από την κατανάλωση των light τροφίμων	20-25
<u>4. Μαργαρίνη</u>	26-32
4.1 Ιστορική αναδρομή μαργαρίνης	26
4.2 Ορισμός και είδη μαργαρινών	26-27
4.3 Σύσταση της μαργαρίνης	27-29
4.4 Παρασκευή της μαργαρίνης	29-30

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

5. Σκοπός	31
6. Υλικά και Μέθοδοι	32-40
Πειραματική πορεία	41
2.1 Πλήρης Μαργαρίνη	42-47
2.2 Light Μαργαρίνης	43-53
Αποτελέσματα	
A) Διαχωρισμός και μελέτη βιολογικής δραστηρότητας Πολικών Λιποειδών (PL)	
Πλήρους και Light Μαργαρίνης	54-58
B) Διαχωρισμός και μελέτη ποσοτήτων και βιολογικής δραστηρότητας Περιοχών από την TLC των Ουδετέρων Λιποειδών (NL) Πλήρους και Light Μαργαρίνης	59-63
Γ) Διαχωρισμός και μελέτη της βιολογικής δραστηρότητας της περιοχής 1 από την TLC των NL της Πλήρους και Light Μαργαρίνης	64-69
Σχολιασμός	70-73
Δ. Περίληψη	74
Βιβλιογραφία	75-80

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1) ΓΕΝΙΚΑ ΠΕΡΙ ΛΙΠΟΕΙΔΩΝ

1.1 Βιολογικές λειτουργίες των λιποειδών

Τα λιποειδή όπως και τα αμινοξέα, τα νουκλεϊκά οξέα και οι υδατάνθρακες ανήκουν στην κατηγορία των βιομορίων, τα οποία είναι απαραίτητα για την ορθή λειτουργία του οργανισμού. Συγκεκριμένα, τα λιποειδή έχουν μεγάλη σημασία για τη δομή, τη σύσταση και τη διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών (1,2). Επιπλέον, έχουν πολύ σημαντικές βιολογικές δράσεις, όπως είναι η κυτταρική αναγνώριση, η ιστική ανοσία ή λειτουργούν ως ορμόνες (π.χ. λυσοφωσφατιδικό οξύ), στεροειδή ή ως βιταμίνες (π.χ. βιταμίνες A, D, E, K) (1).

Τα λιποειδή επίσης δρουν ως προστατευτικός «μανδύας» στην επιφάνεια πολλών οργανισμών και οργάνων για τη θερμική μόνωση αυτών, αλλά και για την ηλεκτρική μόνωση των κυττάρων (σαν συστατικά των περικυτταρικών και άλλων μεμβρανών), ώστε να είναι δυνατόν να αναπτύσσεται ηλεκτρικό δυναμικό ανάμεσα στις δύο επιφάνειες της μεμβράνης. (1,2). Σημαντικότερη είναι και η συμμετοχή τους στην πήξη του αίματος με τη δράση του Παράγοντα Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), της βιταμίνης K, και των φωσφολιποειδών που είναι απαραίτητα στους διάφορους παράγοντες πήξης για να μετατραπεί η προθρομβίνη σε θρομβίνη.

Ένας άλλος ρόλος των λιποειδών είναι η δράση τους ως αντιοξειδωτικά (π.χ. βιταμίνη E), όπως επίσης και η συμμετοχή τους σε ενζυμικές αντιδράσεις ως συνένζυμα (συνένζυμο Q, λιποϊκό οξύ) ή ως ρυθμιστές των ενζυμικών αντιδράσεων επιδρώντας στο υπόστρωμα, στους αναστολείς, στους συμπαράγοντες, στον αλλοστερισμό, στην ενέργεια ενεργοποίησης. (1).

Τα λιποειδή επιπρόσθετα έχουν και σημαντική φαρμακολογική δράση ως αντικαρκινικά φάρμακα, ορμόνες, βιταμίνες, αναστολείς του PAF, τοξικά (οξειδωμένα λιποειδή κατά τη θέρμανση) (1). Τέλος, τα λιποειδή αποτελούν πηγές και ενώσεις αποθήκευσης ενέργειας, με άλλα λόγια είναι «καύσιμο» για τον οργανισμό. Συγκεκριμένα, κατά την αποικοδόμηση 1g λίπους παρέχεται στον οργανισμό ενέργεια ίση με 9 Kcal, με αποτέλεσμα να θεωρείται η πλουσιότερη πηγή ενέργειας

συμβάλλοντας έτσι στην ενεργειακή υποστήριξη του οργανισμού σε περιπτώσεις ένδειας άλλων ενεργειακών υποστρωμάτων, όπως καταστάσεις παρατεταμένης νηστείας (1,3).

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω, τα λιποειδή είναι σημαντικά για τη σωστή διεξαγωγή των λειτουργιών τόσο του κυττάρου όσο και ολόκληρου του οργανισμού. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η συστηματική τους πρόσληψη από την διατροφή. Ημερησίως συνίσταται το λίπος να συνεισφέρει το 25-35% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης και από αυτό τα κορεσμένα (SFA), μονοακόρεστα (MUFA) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) να αποδίδουν λιγότερο από 7%, 20% και 10% αντίστοιχα της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης. Τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα λαμβάνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό συγκρινόμενα με τα κορεσμένα και τα πολυακόρεστα διότι έχουν μόνο ένα ενεργό δεσμό (διπλό δεσμό), με αποτέλεσμα να σχετίζονται σε μικρότερο βαθμό με την ανάπτυξη των καρδιαγγειακών παθήσεων. Αντίθετα, τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι γνωστό ότι αυξάνουν τα λιποειδή του πλάσματος. Όσον αφορά τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα μπορεί να μειώνουν τα επίπεδα των λιπιδίων του πλάσματος αλλά και αυτά όταν καταναλώνονται σε αυξημένη ποσότητα μπορεί να είναι βλαβερά για την υγεία. Αυτό οφείλεται στο ότι τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα διαθέτουν διπλούς δεσμούς, οι οποίοι είναι πολύ δραστικοί και οξειδώνονται δεσμεύοντας οξυγόνο σχηματίζοντας υπεροξειδία όταν εκτίθενται στον αέρα ή στη θερμότητα.. Συγκεκριμένα, όταν υπόκεινται μαγείρεμα τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα παράγουν αυξημένα επίπεδα τοξικών προϊόντων (αλδεύδες) τα οποία προωθούν τα καρδιαγγειακά επεισόδια. (3).

1.2 Κατάταξη των λιποειδών

Συνοπτικά, η κατάταξη διαγραμματικά των λιποειδών έχει ως εξής:

Απλά λιποειδή (simple lipids) ή ουδέτερα λιποειδή (neutral lipids, NL): Σε αυτήν την κατηγορία συγκαταλέγονται εκείνα τα λιποειδή τα οποία δεν διαθέτουν πολικές ή ιονισμένες ομάδες, αντίθετα αποτελούνται από μη σαπωνοποιήσιμες ενώσεις και δεν διαλύονται σε οργανικούς διαλύτες (π.χ. CH_3Cl) (1,4). Οι σημαντικότερες κατηγορίες ουδετέρων λιποειδών είναι οι εξής:

Τερπένια-Στεροειδή: Και τα δύο είδη ενώσεων θεωρούνται παράγωγα του ισοπρενίου ή περιέχουν στο μόριό τους μία ή περισσότερες ομάδες ισοπρενίου. Όσον αφορά τα τερπένια, κύριοι αντιπρόσωποι θεωρούνται τα καροτενοειδή (α , β , γ καροτενοειδή) τα

οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη φωτοσύνθεση και το σκουαλένιο, που αποτελεί πρόδρομη ένωση βιοσύνθεσης της χοληστερόλης. Από την άλλη, τα στεροειδή είναι παράγωγα του υπερυδροκυκλοπεντανοφενανθρενίου, το οποίο προέρχεται από την συμπύκνωση των ισοπρενοειδών μονάδων με ενδιάμεσο σχηματισμό σκουαλενίου. Κύριοι εκπρόσωποι αυτής της ομάδας είναι η χοληστερόλη και η βιταμίνη D, η οποία αποτελεί ανάλογο της χοληστερόλης. Αυξημένη πρόσληψη της χοληστερόλης, ιδίως από λήψη ζωικών τροφών έχει, ως αποτέλεσμα το σχηματισμό αθηρωματικών πλακών που οδηγούν σε αθηροσκλήρυνση και σε καρδιακές παθήσεις. Η χοληστερόλη είναι ενδιάμεση ένωση στον σχηματισμό των χολικών οξέων και μητρική ένωση των στεροειδών ορμονών. Στις φυτοστερόλες ανήκουν οι υπόλοιπες στερόλες με πλέον διαδεδομένη την β-σιτοστερόλη που βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα φυτικά έλαια. (1,4).

Λιπαρά οξέα: Είναι τα αλειφατικά μονοκαρβονικά οξέα και έχουν σχεδόν πάντα άρτιο αριθμό ατόμων άνθρακα. Διακρίνονται σε κορεσμένα και ακόρεστα (με έναν ή περισσότερους διπλούς δεσμούς) και σε ορισμένες περιπτώσεις με διάφορους υποκαταστάτες ή διακλαδισμένη αλυσίδα. Οι διπλοί δεσμοί σε όλα σχεδόν τα ακόρεστα λιπαρά οξέα που απαντώνται στη φύση έχουν cis-διαμόρφωση. Ως απαραίτητα λιπαρά οξέα χαρακτηρίζονται εκείνα τα οποία δεν μπορούν να συντεθούν de novo από τον οργανισμό (λινελαϊκό και γ-λινολενικό) και πρέπει να προσληφθούν από τη διατροφή.

Μία άλλη σημαντική κατηγορία λιπαρών οξέων είναι οι προσταγλαδίνες με 20 άτομα άνθρακα στον σκελετό τους, οι δομές των οποίων προκύπτουν από το προστανοϊκό οξύ. Οι κύριες τάξεις των προσταγλαδινών είναι οι: PGA, PGB, PGE και PGF. Η σημασία των προσταγλαδινών προκύπτει από το ευρύ φάσμα των δράσεών τους που συνοπτικά έχουν ως εξής: 1) Διέγερση λείων μυών, 2) Ρύθμιση σύνθεσης των στεροειδών, 3) Αναστολή γαστρικής έκκρισης, 4) Αναστολή ορμονοευαίσθητων λιπασών, 5) Αναστολή συσώρευσης αιμοπεταλίων, 6) Διέγερση συσώρευσης αιμοπεταλίων, 7) Ρύθμιση μεταβίβασης νευρικού ερεθίσματος, 8) Ευαισθητοποίηση στον πόνο 9) Μεσολάβηση στην φλεγμονώδη απάντηση (1,5).

Μονογλυκερίδια, Διγλυκερίδια, Τριγλυκερίδια: Τα λιπαρά οξέα σπάνια απαντώνται ελεύθερα στη φύση. Αντίθετα βρίσκονται ενωμένα με άλλα μόρια είτε με εστερικούς είτε με αμιδικούς δεσμούς. Ανάλογα με τον αριθμό υδροξυλίων των λιπαρών οξέων προκύπτουν τα μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, τριγλυκερίδια.. Τα μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια δεν είναι τόσο διαδεδομένα στα φυσικά τρόφιμα και χρησιμοποιούνται

κυρίως ως πρόσθετα τροφίμων. Αντίθετα, τα τριγλυκερίδια αποτελούν το 95% των λιπιδίων της τροφής. Χαρακτηρίζονται ως κορεσμένα ή ακόρεστα ανάλογα με το λιπαρό οξύ που υπάρχει στο μόριό τους. Τα κορεσμένα τριγλυκερίδια είναι στερεά σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ τα ακόρεστα είναι υγρά. Επιπλέον, τα τριγλυκερίδια απαντώνται και σε κρυσταλλικές μορφές και μάλιστα περισσότερες από μία. Έτσι, εξηγείται το φαινόμενο του πολυμορφισμού, κατά το οποίο δεν υπάρχει μόνο ένα σημείο τήξης, αλλά περιοχή τήξης για τα λίπη (1,4).

Κηροί: Πρόκειται για εστέρες ανώτερων λιπαρών οξέων με ανώτερες λιπαρές αλκοόλες ή στερόλες. Εκτός από τους εστέρες, σαν συστατικά των κηρών συναντώνται σε μικρότερη αναλογία οι υδρογονάνθρακες και (με ευθύγραμμη ανθρακική αλυσίδα), τα ελεύθερα λιπαρά οξέα και τα υδροξυλιωμένα λιπαρά οξέα. Οι κηροί στα φυτά συναντώνται στην επιφάνεια των φύλλων, ενώ στους ζωικούς οργανισμούς στην επιφάνεια του δέρματος, του τριχώματος και στα πούπουλα. Τέλος, οι κηροί εκτός από προστατευτική δράση έχουν και αποθηκευτικό ρόλο στα ψάρια (1).

Λιπαρές αλκοόλες: Πρόκειται για αλκοόλες με περισσότερα από 10 άτομα άνθρακα και κυρίως η δεκαεξανόλη (1).

Σύνθετα λιποειδή (complex lipids) ή Πολικά λιποειδή (polar lipids, PL)

Αυτή η κατηγορία λιποειδών διαφοροποιείται από εκείνη των ουδετέρων, ως προς το ότι τα σύνθετα λιποειδή εμφανίζουν πολικότητα λόγω της ύπαρξης πολικών ομάδων στο μόριό τους. Ο κύριος ρόλος των πολικών λιποειδών είναι ότι αποτελούν συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών. (1,4).

Οι κυριότερες κατηγορίες των πολικών λιποειδών είναι οι παρακάτω:

Φωσφολιποειδή: Η βιολογική δράση των φωσφολιποειδών είναι σημαντική, εφόσον αποτελούν δομικά συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, συμμετέχουν στη πέψη των λιποειδών και στη μεταφορά τους στο κυκλοφορικό σύστημα, δρώντας ως γαλακτοματοποιητές.

Ανάλογα με τον σκελετό τους - γλυκερόλη ή σφινγγοσίνη - διακρίνονται σε γλυκερινούχα και σφινγγοσινούχα φωσφολιποειδή αντίστοιχα.

Τα κυριότερα δομικά ανάλογα των γλυκερινούχων φωσφολιποειδών, (παράγωγα του φωσφατιδικού οξέος) ανάλογα με τη βάση που υπάρχει στη θέση sn-3, είτε χολίνη, είτε αιθανολαμίνη, είτε ινositης είτε γλυκερόλη προκύπτουν οι αντίστοιχες ενώσεις:

φωσφατίδουλοχολίνη, φωσφατίδουλοαθανολαμίνη, φωσφατίδουλοϊνόςτης και φωσφατίδουλογλυκερόλη αντίστοιχα.. Τα γλυκερινούχα φωσφολιποειδή με τη σειρά τους διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- ✓ Γλύκερο-βινυλαιθερικά ανάλογα των φωσφολιποειδών: είναι σημαντικά λόγω της βιολογική τους δράσης, όπως αντικαρκινική και δράση μεσολαβητών ορμονών.
- ✓ Γλυκεριναιθερικά ανάλογα των φωσφολιποειδών: Πρόκειται για ενώσεις της γλυκερόλης που έχουν στο μόριο τους ένα ή περισσότερους αιθερικούς δεσμούς. Κύριος αντιπρόσωπος αυτής της κατηγορίας φωσφολιποειδών είναι ο Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (PAF) που είναι μία 1-O-αλκυλο-sn γλυκερο-3-φωσφοχολίνη.

Τα σφιγγοσινούχα γλυκολιποειδή με τη σειρά τους, έχουν ως μητρική τους ένωση το κηραμίδιο, το οποίο με τη σειρά του έχει σκελετό σφιγγοσίνης στον οποίο η αμινομάδα δεν είναι ελεύθερη, αλλά συνδεδεμένη με αμιδικό δεσμό με ένα λιπαρό οξύ. Επιπλέον, τα κηραμίδια μπορεί να έχουν στην ακραία υδροξυλομάδα μια φωσφορική ομάδα και κάποια βάση (π.χ. χολίνη).

Γλυκολιποειδή: Αυτή η κατηγορία φωσφολιποειδών με τη σειρά της, ανάλογα με τον σκελετό της, διακρίνεται σε δύο κατηγορίες:

Γλυκερινούχα γλυκολιποειδή: πρόκειται για μια 1,2 – διάκυλογλυκερόλη που στη θέση 3 έχει δεσμευμένο με γλυκοζιτικό δεσμό ένα μόνο- ή ολιγοσακχαρίτη.

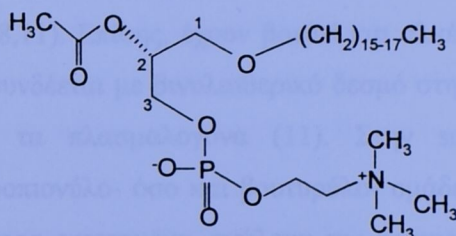
Σφιγγοσινούχα γλυκολιποειδή: πρόκειται για γλυκολιποειδή με σκελετό γλυκερόλης τα οποία διακρίνονται στις εξής κατηγορίες: 1) Παράγωγα των κηραμιδίων που έχουν συνδεδεμένο στο ακραίο υδροξύλιο με β-γλυκοζιτικό δεσμό ένα μόνο ή ολιγοσακχαρίτη 2) Κερεβροζίτες, που έχουν συνδεδεμένο στο ακραίο υδροξύλιο ένα μονοσακχαρίτη 3)Γαγγλιοζυλοκηραμίδια όταν έχουν συνδεδεμένο στο ακραίο υδροξύλιο δι- ή τρι- ή τετρασακχαρίτη 4)Σουλφατίδια, που έχουν τη θέση 3 της γαλακτόζης εστεροποιημένη με θεικό οξύ και 5) Γαγγλιοζίτες που αποτελούνται από κηραμίδια συνδεδεμένα με 1-2 μόρια γλυκόζης και γαλακτόζης, 1 μόριο N-ακέτυλο γαλακτοζαμίνης και 1-3 μόρια N –ακέτυλο-νευραμινικού οξέος (σιαλικό οξύ) (1,4).

Οπότε είναι αναμενόμενο (1,4). Αναμενόμενη της αλληλεπίδρασης με λιπαρά οξέα αποτελώντας σφαιρικής αλληλεπίδρασης οδηγεί σε μόρια με μικρότερη βιολογική δραστηριότητα. Επίσης, ο γλυκός δεσμός στην sn-1 θέση του γλυκερικού σκελετού καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την βιολογική δραστηριότητα του PAF. Η δραστηριότητα

2) ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΑΙΜΟΠΕΤΑΛΙΩΝ (PAF)

2.1 Χημική δομή του PAF - Σχέση δομής και δραστηριότητας –Ανάλογα PAF

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), του οποίου το κοινό όνομα είναι 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη αναγνωρίστηκε το 1979 και ανήκει στην κατηγορία των γλυκεριναιθερικών αναλόγων των φωσφολιποειδών. 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 2.1) (6).



Σχήμα 2.1: Χημική δομή του PAF

Όσον αφορά τη δραστηριότητα του μορίου του PAF, μελέτες που έχουν γίνει με συνθετικά ανάλογα του PAF έχουν δείξει πως η δομή των μοριακών ειδών καθορίζει και την βιολογική τους δραστηριότητα. Το σημαντικότερο δομικό χαρακτηριστικό για την ύπαρξη βιολογικής δραστηριότητας είναι η παρουσία ακετυλομάδας στην sn-2 θέση του γλυκερινικού σκελετού. Απομάκρυνση της ακετυλομάδας οδηγεί στο λυσο-PAF, ο οποίος είναι ανενεργός (1,4). Αντικατάσταση της ακετυλομάδας με λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας οδηγεί σε μόρια με μικρότερη βιολογική δραστηριότητα. Επίσης, ο χημικός δεσμός στην sn-1 θέση του γλυκερινικού σκελετού καθορίζει σε σημαντικό βαθμό την βιολογική δραστηριότητα του PAF. Η δραστηριότητα

ακολουθεί γενικά την σειρά αλκυλο-PAF>αλκενυλο-PAF>ακυλο-PAF. Όσον αφορά το είδος της ανθρακικής αλυσίδας στην sn-1 θέση, η μέγιστη δραστηριότητα 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 (7-10). Εκτός από την κλασσική δομή του PAF (Σχήμα 2.1), 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. 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 (7,8,11). Επίσης, έχουν βρεθεί και αλκενυλο- ανάλογα του PAF, όπου η λιπαρή αλυσίδα συνδέεται με βινυλαιθερικό δεσμό στην sn-1 θέση. Τα ανάλογα αυτά προέρχονται από τα πλασμαλογόνα (11). Στην sn-2 θέση έχουν βρεθεί εστεροποιημένες τόσο προπιονύλο- όσο και βουτυρύλο- ομάδες (7,8) ενώ τα τελευταία χρόνια μελετώνται, ιδιαίτερα εκτεταμένα, ανάλογα της φωσφατιδυλοχολίνης (PC) όπου στην sn-2 θέση 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 (12). 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 (8,11). Αυτά δρουν ως ανταγωνιστές σε χαμηλές συγκεντρώσεις και διεγείρουν τους υποδοχείς του PAF σε υψηλές συγκεντρώσεις ή αντίθετα (13). Αν και τα λιποειδή με ανάλογη δράση με του PAF είναι παρόντα σε πολύ υψηλότερες συγκεντρώσεις από ότι στον PAF, η δραστηριότητά τους είναι πολύ λιγότερη (10^5 - 10^7 φορές). Εντούτοις, η βιολογική δραστηριότητα του PAF περιορίζεται εφόσον ο αριθμός

των υποδοχέων στην κυτταρική επιφάνεια είναι περιορισμένος και υπάρχει συναγωνισμός μεταξύ του PAF και των αναλόγων του ως προς τις θέσεις δέσμευσης (14).

2.2) Κυτταρικές πηγές και τρόπος δράσης του PAF

Ο PAF παράγεται και εκκρίνεται από ένα πλήθος κυττάρων, τόσο σε φυσιολογικές καταστάσεις όσο και ύστερα από ενεργοποίηση των κυττάρων (ουδετερόφιλα, βασεόφιλα, μονοκύτταρα/μακροφάγα, αιμοπετάλια, μαστοκύτταρα, ηωσινόφιλα και ενδοθηλιακά κύτταρα) με διάφορα ερεθίσματα (14). Φυσική συνέπεια της δυνατότητας των κυττάρων να εκκρίνουν τον PAF που συνθέτουν ήταν η ανίχνευσή του σε πολλά βιολογικά υγρά όπως στο πλάσμα, ούρα, σάλιο, γαστρικά υγρά, και αμνιακό υγρό. Τα τελευταία χρόνια η ύπαρξη του PAF έχει βρεθεί και σε φυτικά κύτταρα, σε κατώτερους ζωικούς οργανισμούς και σε μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς δικαιολογώντας έτσι την άποψη που τον θεωρεί ως αρχέγονο βιολογικό μεσολαβητή (15). Οι ακριβείς τρόποι δράσης του PAF είναι οι εξής:

- Να εκκριθεί από τα κύτταρα και να δράσει, είτε αυτοκρινώς πάνω στα κύτταρα από τα οποία παράχθηκε, είτε παρακρινικά ενεργοποιώντας γειτονικά κύτταρα του ίδιου ή διαφορετικού είδους.
- Να 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.
- Να παραμείνει στα κύτταρα και να δράσει ως ενδοκυτταρικός μεσολαβητής. (15,16).

2.3 Μεταβολισμός του βιοσύνθεσης του PAF – Σύνθεση και Διάσπαση

Η βιοσύνθεση του PAF επιτυγχάνεται μέσω των παρακάτω βιοχημικών οδών: την εξ'υπαρχής πορεία βιοσύνθεσης του (de novo πορεία), την οξειδωτική αποικοδόμηση φωσφολιποειδών και την πορεία ανασχηματισμού (remodeling πορεία). Από αυτές η πιο

σημαντική είναι η τρίτη μιας και είναι εκείνη, η οποία ενεργοποιείται σε καταστάσεις φλεγμονής. Στην περίπτωση αυτή πρόδρομη ένωση του PAF είναι το φωσφολιπιδές 1-Ο-άλκυλο-2-αραχιδονόυλο-sn-γλύκερο-3-φωσφοχολίνη. Αυτό υφίσταται υδρόλυση της αραχιδονικού οξέος, οπότε και σχηματίζεται η λύσο-μορφή του PAF. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του ενζύμου ακέτυλοτρανσφεράση προκύπτει ο PAF.

Ο καταβολισμός του PAF (απενεργοποίηση) ξεκινάει με υδρόλυση της ακετυλομάδας από τη θέση sn-2 μετά την επίδραση του ενζύμου, των ακέτυλοϋδρολάση που απαντώνται τόσο ενδοκυτταρικά όσο και εξοκυτταρικά (17, 18).

2.4 Συμμετοχή του PAF σε παθολογικές καταστάσεις

Ο PAF έχει ένα ευρύ φάσμα βιολογικών δράσεων, οι οποίες έχουν μελετηθεί τόσο *in vitro* σε καλλιέργειες κυττάρων και απομονωμένους ιστούς όσο και *in vivo* μετά από χορήγηση του PAF σε πειραματόζωα αλλά και στον άνθρωπο. Περίληπτικά, τα αποτελέσματα της δράσης του PAF *in vivo* παρατίθενται στον πίνακα 2.1:

Πίνακας 2.1: Δράσεις του PAF *in vivo* (19, 20)

Σύστημα	Είδος Δράσης
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
Καρδιαγγειακό	Μείωση της συστολικής και διαστολικής πίεσης, αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης Καρδιακή ισχαιμία και κοιλιακές αρρυθμίες Συμμετέχει στην παθογένεια της αρτηριοσκλήρυνσης
Πεπτικό	Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου, ισχαιμική νέκρωση εντέρου, μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκαδακτυλική αρτηρία Συμμετοχή στην παθογένεια του πεπτικού έλκους και της παγκρεατίτιδας
Αναπαραγωγικό	Συμμετοχή στην κνητωποίηση του σπέρματος, στην ωορρηξία, στην εμφύτευση του ωαρίου στη μήτρα και στην υπέρταση της εγκυμοσύνης Συμμετοχή στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού

Νευρικό	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
Ανοσολογικό	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 μωσχευμάτων

2.5 PAF και αθηρωμάτωση

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει φανεί ότι τα καρδιαγγειακά και τα αγγειακά εγκεφαλικά επεισόδια είναι οι πιο σημαντικές αιτίες θανάτου στις αναπτυγμένες βιομηχανικά κοινωνίες. Για το λόγο αυτό η αποφυγή της αθηροσκλήρωσης είναι το πιο σημαντικό αντικείμενο μελέτης της σύγχρονης Ιατρικής. Πολλές θεωρίες έχουν διατυπωθεί για την ερμηνεία του μηχανισμού της αθηρογένεσης με πιο σημαντική εκείνη που υποστηρίζει ότι ο PAF και τα ανάλογά του εμπλέκονται στη δημιουργία της αθηρωματικής πλάκας μέσω της ενεργοποίησης των λευκοκυττάρων και της δέσμευσής τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα (14,21). Ο μηχανισμός με τον οποίο ο PAF εμπλέκεται στην αθηρογένεση περιληπτικά έχει ως εξής:

Η δέσμευση της LDL στις πρωτεογλυκάνες του εξωκυτταρικού μέσου, παγιδεύει την LDL στον έσω χιτώνα των αρτηριών, με αποτέλεσμα την οξείδωση της LDL (OxLDL). Κατά την οξειδωτική τροποποίηση της LDL λαμβάνουν χώρα πολλές διαδικασίες (22). Η OxLDL είναι κύτταροτοξική, διεγείροντας την παραγωγή χημειοτακτικών παραγόντων (μεσολαβητές μόρια στη μετακίνηση κυττάρων προς μια κατεύθυνση αποκρινόμενα σχεμικά ερεθίσματα - χημειοταξία) από τα ενδοθηλιακά κύτταρα και των κυτοκινών από τα μονοκύτταρα. (23). Επιπλέον κατά την οξείδωση της LDL παράγεται ο PAF και τα ανάλογά του προκαλώντας in situ φλεγμονή. (23-25) Η

παραγωγή του PAF οδηγεί σε γεγονότα πολύ σημαντικά για την αθηρογένεση, όπως η ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και η δέσμευσή τους στα ενδοθηλιακά κύτταρα (26). Άλλες αντιδράσεις, οι οποίες συμβαίνουν κατά την ενεργοποίηση του υποδοχέα του PAF είναι η παραγωγή της διακυλογλυκερόλης (DAG), η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση C (PKC) η οποία είναι πρωτεΐνη απευαισθητοποίησης του υποδοχέα του PAF και την παραγωγή τριφωσφορικής ινοσιτόλης (IP3), που μεσολαβεί για την απελευθέρωση του αποθηκευμένου ασβεστίου (27). Επιπλέον, η παραγωγή των αναλόγων του PAF από την οξείδωση της LDL προκαλεί τη διέγερση των μονοκυττάρων, λευκοκυττάρων και αιμοπεταλίων τα οποία με τη σειρά τους απελευθερώνουν είτε αραχιδονικό οξύ είτε εικοσανοειδή (28). Τέλος, έχει αποδειχθεί ότι ο PAF-AH (PAF- ακετυλδωρολάση, ένυμο που υδrolύει την sn-2 θέση του PAF και μετατρέποντάς το στη λύσο μορφή του) όταν επιδρά στην HDL προστατεύει από την παραγωγή και δραστηριότητα των Ox-LDLs διευκολύνοντας την υδρόλυση των αναλόγων του. Η PAF-AH είναι ικανή να αναστείλει τις αθηρογόνες αλλαγές στην LDL, στη φλεγμονή, στην ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων και στον ομαλό πολλαπλασιασμό των μυϊκών κυττάρων (29). Το 1994 βρέθηκε ότι η PAF-AH είναι προοδευτικά ανενεργή στην οξείδωση της LDL και επιπλέον χάνει την ικανότητά του να προστατεύει από τις προφλεγμονώδεις δράσεις του PAF και των αναλόγων του (24,30). Επιπρόσθετα, οι Ambrosio et al (1994) απέδειξαν ότι οι ρίζες οξυγόνου αναστέλλουν την PAF-AH στο ανθρώπινο πλάσμα (31).

Πέραν από τον PAF, στο μηχανισμό της αθηρογένεσης συμβάλλουν και άλλοι παράγοντες, όπως είναι το ένζυμο θρομβίνη, που αποτελεί την ενεργοποιημένη μορφή της προθρομβίνης (πρωτεΐνη του πλάσματος) και καταλύει τη μετατροπή του ινωδογόνου σε ινώδες. Όσον αφορά την εμπλοκή της θρομβίνης στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης, αυτή εξηγείται από την ικανότητα της να ασκεί θετική ανατροφοδότηση στον ίδιο της τον σχηματισμό. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εκκίνηση διαδικασιών πήξης και την ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων, με άμεση συνέπεια την έκθεση ειδικών υποδοχέων της κυτταροπλασματικής μεμβράνης που δεσμεύουν παράγοντες της θρόμβωσης (32).

2.6 Αναστολείς του PAF

Λόγω του ότι ο PAF εμπλέκεται σε ένα ευρύ φάσμα παθοφυσιολογικών καταστάσεων δημιουργήθηκε η ανάγκη για ανεύρεση ενώσεων ή μεθόδων που θα συμβάλλουν στον περιορισμό ή την αναστολή της δράσης τους. Μέχρι σήμερα έχουν βρεθεί ότι υπάρχουν 3 είδη αναστολέων του PAF: 1) οι ενδογενείς αναστολείς, 2) οι μη ειδικοί αναστολείς και 3) οι ειδικοί αναστολείς του PAF.

Ενδογενείς αναστολείς του PAF

Οι ενδογενείς αναστολείς του PAF είναι ενώσεις θηλαστικής κυρίως προέλευσης, οι οποίοι πιθανώς να ρυθμίζουν την τοπική αυτακοειδή δράση του στα κύτταρα και στους ιστούς των θηλαστικών.

Τέτοιοι αναστολείς έχουν βρεθεί στα ούρα του ανθρώπου και η συγκέντρωσή τους αυξάνεται στην αρχή της εγκυμοσύνης προκαλώντας σύγχρονη αύξηση και της ιντερλευκίνης-1 στο πλάσμα. Εντούτοις, οι ενώσεις αυτές λειτουργούν μόνο ως αναστολείς του PAF, χωρίς να επηρεάζουν την αντίστοιχη δράση του αραχιδονικού οξέος, της θρομβίνης και του ADP (33).

Επίσης, ενδογενείς αναστολείς του PAF βρέθηκαν και στο ολικό εκχύλισμα των λιποειδών του συκωτιού του αρουραίου. Μετά από χρωματογραφική ανάλυση του εκχυλίσματος ταυτοποιήθηκαν οι ενώσεις, οι οποίες προκαλούσαν αναστολή του PAF. Επρόκειτο για φωσφατιδυλογλυκερόλη και λιπαρά οξέα, οι οποίες προκαλούσαν αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων και μείωση της έκκρισης της σερετονίνης (34).

Από την καρδιά βοδιού απομονώθηκε καρδιολιπίνη, η οποία μετά από βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού προκάλεσε αναστολή της δράσης του PAF. Αντίστοιχα αποτελέσματα προέκυψαν και για την φωσφονοκαρδιολιπίνη

Ένας ακόμη ενδογενής αναστολέας του PAF είναι η λυσολεκιθίνη που απομονώθηκε από τη μήτρα του αρουραίου.

Επιπρόσθετα, στο έκχυμα καρδιάς ινδικού χοιριδίου ανιχνεύθηκε εξειδικευμένος αναστολέας της δράσης του PAF με δομή ανάλογη των καρδιολιπινών και των φωσφατιδυλογλυκερολών. Τέλος, αναστολείς του PAF βρέθηκαν στο σάλιο. Αξιοσημείωτο είναι ότι η δομή των προαναφερθέντων αναστολέων δεν έχει διεκρινισθεί ακόμη (35).

Μη ειδικοί αναστολείς

Οι μη ειδικοί αναστολείς του PAF δρουν συνήθως αναστέλλοντας τις δευτερογενείς του δράσεις, μετά την σύνδεση με τον υποδοχέα του. Η αναστολή της δράσης του PAF πραγματοποιείται μέσω δύο μονοπατιών: είτε μεταβάλλοντας τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου δρώντας ως ανταγωνιστές καναλιών Ca^{2+} (βεραπαμίλη τριφθοροιπεραζίνη) είτε ενώσεις που ρυθμίζουν τα επίπεδα των κυκλικών νουκλεοτιδίων, όπως η σαλβουταμόλη και τα κυκλικά των αναστολών της φωσφοδιεστεράσης (36,37).

Ειδικοί αναστολείς

Οι ειδικοί αναστολείς με τη σειρά τους δρουν ανταγωνιζόμενοι την σύνδεση του PAF με τον υποδοχέα του διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

➤ **Συνθετικοί αναστολείς:** πρόκειται για αναστολείς, οι οποίοι συντίθεται εργαστηριακά με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως φάρμακα σε παθολογικές καταστάσεις ταξινομούνται ως εξής:

α) Δομικά ανάλογα του PAF, τα οποία είναι παράγωγα του τεταρτοταγούς αζώτου Διακρίνονται σε δομικά ανάλογα με σκελετό γλυκερόλης, με κύριους αντιπροσώπους τις σειρές CV (Takeda, Japan), ONO (ONO Pharmaceuticals, Japan), RO (Hoffman-La Roche) και σε δομικά ανάλογα, όπου η ομάδα γλυκερόλης έχει αντικατασταθεί από κυκλικές δομές που περιορίζουν την ευελιξία στην διαμόρφωση του μορίου με πιο σημαντικά μέλη τις σειρές SRI (Sandoz) και UR (Uriach, Spain).

β) Ετεροκυκλικές ενώσεις με ένα sp^2 άτομο αζώτου το οποίο αλληλεπιδρά με τον υποδοχέα του PAF ως δέκτης δεσμού υδρογόνου. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι:

i) παράγωγα πυροθειαζολίου (RP-48740, YM-264, YM-461), **ii)** παράγωγα θειαζολιδίνης (SM-10661, SR-27417), **iii)** παράγωγα διϋδροπυριδίνης όπως το modipafant (Pfizer, USA) και PCA-4248 (Alter), **iv)** παράγωγα τετραϋδروναφθαλενίου (CIS-19) **v)** παράγωγα ετραζεπίνης (WEB, BN) **vi)** ιμιδαζολυλο- παράγωγα (BB-182, BB-823, SDZ-64412 και SDZ-64688), **vii)** παράγωγα τετραυδροφουρανίου (L-652,731 και L-671,284). (37, 38).

➤ **Φυσικοί αναστολείς:** αυτή η κατηγορία αναστολέων παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον μιας και έχουν βρεθεί τόσο σε ζωικά όσο και σε φυσικά τρόφιμα και έχουν συσχετισθεί με την πρόληψη καρδιοπαθειών.

Σε έρευνα όπου αναλύθηκαν τα λιποειδή των σπορελαίων (σησαμέλαιο, καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο) με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και στη συνέχεια διερευνήθηκε η βιολογική τους δραστικότητα σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού βρέθηκαν τα εξής: Από την χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) των πολικών λιποειδών που απομονώθηκαν από 100ml ηλιελαίου προέκυψαν 25 κλάσματα εκ των 7 προκαλούσαν αναστολή του PAF και της θρομβίνης, 4 προκαλούσαν αναστολή μόνο στον PAF και δύο ακόμη κλάσματα ανέστειλαν τη δράση της θρομβίνης. Επίσης, βρέθηκαν και κλάσματα με συσσωρευτική δράση, η οποία όμως αναστέλετο από το BN52021 (γκινγκολίδιο-φυσικός αναστολέας PAF) και το ενζυματικό σύστημα CP/CPK. Δομική ανάλυση (φάσμα UV) κλασμάτων που έδρασαν ως αναστολείς του PAF, έδειξε ότι το κλάσμα επρόκειτο για φαινολικό συστατικό με εστερικούς δεσμούς στους οποίους οφειλόταν η βιολογική του δραστικότητα. Όσον αφορά τα κλάσματα που προκάλεσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων μετά από μελέτες δομής (φάσμα UV) φάνηκε ότι το ένα από αυτά ήταν φαινολικό παράγωγο του οποίου η συσσωρευτική δράση οφειλόταν στην αναλογία των ακετυλομάδων προς τις υδροξυλομάδες. Ένα άλλο κλάσμα που έδρασε ως συσσωρευτής ύστερα από ESI-MS φάνηκε ότι επρόκειτο για μίγμα φωσφογλυκολιποειδών. Μετά από χρωματογραφικό διαχωρισμό και μελέτη της βιολογικής δραστικότητας των πολικών λιποειδών του σησαμέλαιου φάνηκε ότι ο αριθμός των κλασμάτων που προκαλούσαν αναστολή είτε του PAF είτε της θρομβίνης ήταν πολύ περισσότερα από εκείνα που προκαλούσαν συσσώρευση. Τέλος, τα αποτελέσματα από την δοκιμασία της βιολογικής δραστικότητας των πολικών λιποειδών σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών έδειξαν ότι στο καλαμποκέλαιο υπάρχουν περισσότεροι αναστολείς από ότι συσσωρευτές. Εντούτοις, η δράση των συσσωρευτών αναστέλετο από το BN52021 και το ενζυματικό σύστημα CP/CPK. Από την παραπάνω έρευνα, εξάγεται το συμπέρασμα ότι η ύπαρξη αναστολέων στα σπορέλαια υπερτερεί έναντι των συσσωρευτών. Συνεπώς, η συστηματική κατανάλωση σπορελαίων συμβάλλει στην πρόληψη της αθηρογένεσης (40).

Εκτός από τις έρευνες που διεξήχθησαν με σκοπό την διερεύνηση της αντιαθηρογενετικής δράσης των σπορελαίων, ανάλογες μελέτες έχουν γίνει και για το ελαιόλαδο. Τα λιποειδή από το ελαιόλαδο κλασματοποιήθηκαν και διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια των μεθόδων TLC και HPLC. Για κάθε κλάσμα ελέγχθηκε η ικανότητά του να αναστέλλει την προκαλούμενη από τον PAF και τη θρομβίνη συσσώρευση των

αιμοπεταλίων. Τα βιολογικά δραστικά κλάσματα αναλύθηκαν με τις μεθόδους IR, MS και H-NMR και βρέθηκαν κλάσματα από την TLC, τα οποία προκαλούσαν, δοσοεξαρτώμενη αναστολή της συσσωρευτικής δράσης του PAF, ολική αναστολή, δοσοεξαρτώμενη συσσώρευση και τελικά αναστρέψιμη συσσώρευση. Ο περαιτέρω διαχωρισμός με τη βοήθεια της HPLC και η δομική ανάλυση έδειξαν ότι επρόκειτο για μίγμα τοκοφερολών και τριοελαΐνης. Τα αποτελέσματα έδωσαν μία διαφορετική εξήγηση της αντιαθηρογενετικής δράσης του ελαιολάδου, με την παρουσία αναστολέων του PAF, ο οποίος αποτελεί μεσολαβητή των φλεγμονών και της αθηρογένεσης (41).

Επιπλέον, έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες οι οποίες θεωρούν ότι το κρασί έχει προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών νοσημάτων. Σε έρευνα που διεξήχθη για το κόκκινο κρασί, τα ολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα. Στη συνέχεια, τα πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν με χρωματογραφική ανάλυση (HPLC) σε γλυκολιποειδή και σε φωσfolιποειδή. Τα αποτελέσματα από την δοκιμασία της βιολογικής δραστικότητας των κλασμάτων από την HPLC σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών έδειξαν ότι στο κρασί υπάρχουν αναστολείς του PAF. Από δομικές μελέτες των βιολογικά δραστικών ουσιών φάνηκε ότι η trans-ρεσβερατρόλη έχει ανασταλτική δράση και μάλιστα δοσοεξαρτώμενη σε ότι αφορά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που προκαλείται είτε από τον PAF, είτε από τη θρομβίνη (42). Ανάλογες έρευνες που έγιναν στο λευκό κρασί και στο μούστο κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι και στο λευκό κρασί και το μούστο υπάρχουν αναστολείς του PAF και της θρομβίνης, ελαχιστοποιώντας έτσι τη βιολογική δράση του PAF σε κύτταρα και ιστούς. Δομικές μελέτες των βιολογικά δραστικών ουσιών έδειξαν ότι οι αναστολείς του PAF ήταν ενώσεις με σκελετό γλυκερόλης. Συγκεκριμένα, στο μούστο τα βιολογικά δραστικά λιποειδή ήταν φωσφογλυκολιποειδή ενώ στο λευκό κρασί ήταν γλυκολιποειδή. Τα αποτελέσματα των προαναφερθέντων ερευνών στηρίζουν την υπόθεση του Γαλλικού παραδόξου, δείχνοντας ότι το κρασί περιέχει λιποειδή με αντιθρομβωτική και αντιαθηρογενετική δράση (43).

Τα λιποειδή του μελιού και οι κηροί απομονώθηκαν και διαχωρίστηκαν με τη βοήθεια της μεθόδου TLC χρησιμοποιώντας ποικιλία συστημάτων διαλυτών. Κάθε απομονωθέν κλάσμα ελέγχθηκε για την ικανότητά του να προκαλεί συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων ή να αναστέλλει την προκαλούμενη συσσώρευση από τον PAF ή τη θρομβίνη. Στη συνέχεια, τα βιολογικά ενεργά μίγματα υπέστησαν τις εξής

διαδικασίες: FTIR, MS και H-NMR. Κανένα από τα λιποειδή του μελιού δεν προκάλεσε συσσώρευση αιμοπεταλίων αλλά έξι από αυτά ανέστειλαν την προκαλούμενη συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και τη θρομβίνη, αν και απαιτούνταν υψηλές συγκεντρώσεις. Η δραστηριότητα των αναστολέων παρουσίαζε ποικιλία ανάλογα με την προέλευση του μελιού. Οι προτεινόμενες δομές των ενώσεων που έδρασαν ως αναστολείς του PAF και της θρομβίνης είναι οι παρακάτω: α) 1-0-αλκένυλο-2-ακένυλο-3-ακυλογλυκερόλη ή 1-0-αλκένυλο-2-ακένυλο-3-β-κετο-ακυλογλυκερόλη, β) πολυδρόζυ – στερόλη, γ) ουδέτερα λιποειδή με αιθερικούς ή εστερικούς δεσμούς εκ των οποίων ο ένας ήταν εστεροποιημένος με οξικό οξύ. Αυτά τα αποτελέσματα ερμήνευσαν τη φαρμακευτική χρήση του μελιού σε περιπτώσεις φλεγμονών (44)

Το γιαούρτι, ένα τρόφιμο με αδιαμφισβήτητη θρεπτική αξία, χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς σκοπούς. Τα συστατικά του γάλακτος έχουν ενοχοποιηθεί για παθολογικές συνέπειες της κατανάλωσης γιαουρτιού σε επιλεγμένα υποκείμενα, όπως τα νεογνήνητα ή τα βρέφη. Για τη διερεύνηση της παραπάνω υπόθεσης διεξήχθη έρευνα με σκοπό τη παρουσία ή μη του PAF καθώς και λιποειδών με δράση αναστολέων του PAF σε γάλα και γιαούρτι. Σε αυτήν την έρευνα, η βιολογική μελέτη των λιποειδών σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών έδειξαν μικρή παραγωγή του PAF στο γάλα κατά την επώαση αν και οι συγκεντρώσεις του PAF στο λίπος του γάλακτος παρέμεναν σταθερές κατά τον χρόνο επώασης. Τα μέσης πολικότητας λιποειδή του γιαουρτιού εμφάνισαν πιο ισχυρή ανασταλτική δράση έναντι στον PAF συγκριτικά με τα λιποειδή στο ωμό και προς επώαση γάλα. Οι πληροφορίες μας έδειξαν ότι ο *Streptococcus Thermophilus* και ο *Lactobacillus bulgaricus* βιοσυνθέτουν σημαντικές ποσότητες αναστολέων του PAF, ενώ η τυχαία μόλυνση του γάλακτος οδηγεί στην παραγωγή του PAF και των αναστολέων του (45).

Ο μπακαλιάρος (*Cadus Morhua*) είναι ένα σημαντικό τροφιμο της διαίτας σε πολλές χώρες. Στις περισσότερες περιπτώσεις καταναλώνεται τηγανισμένος. Σε έρευνα που διεξήχθη τα ολικά λιποειδή του μπακαλιάρου διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα, τα οποία κλασματοποιήθηκαν περαιτέρω με τη μέθοδο HPLC. Τα κλάσματα των λιποειδών μελετήθηκαν *in vitro* με σκοπό την τη διαπίστωση της πιθανής ύπαρξης μιγμάτων λιποειδών, τα οποία εμφανίζουν είτε ανάλογη δράση με τον PAF είτε τον αναστέλλουν. Η διεξαγωγή βιολογικού πειράματος σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού χρησιμοποιήθηκε για να εκτιμήσει τη δράση των ολικών λιποειδών, των πολικών

λιποειδών και των ουδετέρων λιποειδών. Η ανίχνευση τέτοιων μιγμάτων σε φρέσκο και τηγανισμένο μπακαλιάρο χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της θρεπτικής αξίας αυτού του ψαριού. Τα αποτελέσματα του βιολογικού πειράματος σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού έδειξαν ότι τα κλάσματα των λιποειδών στο φρέσκο μπακαλιάρο ανέστειλαν και ευόδωσαν τη δράση του PAF. Αντίθετα, στον τηγανισμένο μπακαλιάρο τα κλάσματα τόσο των πολικών όσο και των ουδετέρων λιποειδών ανέστειλαν τη συσσωρευτική δράση του PAF. Εφόσον, έχει ήδη αποδειχθεί η αθηρογόνος δράση του PAF, η ύπαρξη αναστολέων του PAF στον μπακαλιάρο ενδεχομένως συνεισφέρει στον προστατευτικό ρόλο του μπακαλιάρου έναντι της αθηροσκλήρωσης (46).

3) LIGHT ΤΡΟΦΙΜΑ

3.1 Γιατί χρησιμοποιούνται

Στις σύγχρονες δυτικές κοινωνίες το προσδόκιμο επιβίωσης έχει αυξηθεί και είναι πλέον γεγονός ότι οι συνηθέστερες αιτίες θανάτου είναι οι μη μολυσματικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία. Στην αιτιολογία αυτών των ασθενειών εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό οι περιβαλλοντικοί παράγοντες με κύριο εκπρόσωπο τη σύνθεση της διατροφής. Αυτή η συσχέτιση της διατροφής με τα χρόνια νοσήματα είχε ως αποτέλεσμα να δίνεται ολοένα και περισσότερη έμφαση στον τρόπο με τον οποίο τα μακροθρεπτικά συστατικά (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη) και ειδικότερα το διατητικό λίπος επηρεάζουν το ενεργειακό ισοζύγιο συμβάλλοντας έτσι στην εμφάνιση των παραπάνω ασθενειών. (47).

Οι διάφοροι παγκόσμιοι οργανισμοί υγείας λαμβάνοντας υπόψιν την παραπάνω θέση για τη συμβολή του διατητικού λίπους στην παθογένεση διαφόρων ασθενειών έθεσαν τους παρακάτω στόχους, οι οποίοι πρέπει να έχουν επιτευχθεί έως το 2005: Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δε θα πρέπει να παρέχουν ποσοστό μεγαλύτερο από 10% της συνολικής ενέργειας. Επιπλέον, η συνολική πρόσληψη διατητικού λίπους δε θα πρέπει να υπερβαίνει το 35% της συνολικής ενέργειας. Τέλος, κρίνεται σκόπιμη η μείωση των παχύσαρκων αντρών και γυναικών ηλικίας 16-64 ετών (48).

Οι καταναλωτές, έχοντας γνώση των παραπάνω, υιοθετούν ολοένα και περισσότερο την ιδέα ότι τα τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος (Light food) συμβάλλουν στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας τα οποία σχετίζονται με τα υψηλά επίπεδα ενεργειακής πρόσληψης και λίπους. Η βιομηχανία τροφίμων με τη σειρά της έπρεπε να ακολουθήσει τις απαιτήσεις των καταναλωτών (49). Οι τεχνολόγοι τροφίμων κατέβαλαν ιδιαίτερες προσπάθειες προκειμένου να παρασκευάσουν τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος, τα οποία όμως να διατηρούν σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο βαθμό τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των αντίστοιχων πλήρων σε λίπος προϊόντων (50). Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να εξελιχθεί η παραγωγή των light τροφίμων τα οποία παρέχουν λιγότερη ενέργεια και ποσότητα λίπους συγκριτικά με τα αντίστοιχα πλήρη προϊόντα. Κύριο μέλημα της βιομηχανίας τροφίμων κατά την παρασκευή των light τροφίμων είναι η διατήρηση των επιθυμητών οργανοληπτικών χαρακτηριστικών. Ο

βαθμός της συνοχής, γλοιότητας, της ξηρότητας και άλλων φυσικών ιδιοτήτων των light προϊόντων επιτυγχάνεται με τη χρήση μαλτοδεξτρινών, γαλακτοματοποιητών, κόμμεων, βελτιωτικών γεύσης και της υγρασίας του τελικού προϊόντος. Επιπρόσθετα, η αυξημένη ενεργότητα του νερού, απαιτεί την προσθήκη αντιμικροβιακών παραγόντων, τα οποία συμβάλλουν στη μικροβιακή σταθερότητα του light τροφίμου (51).

Οι διάφορες κατηγορίες τροφίμων με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος έχει ως εξής: Πρώτον, τρόφιμα τα οποία έχουν μειωμένο ποσοστό λιπαρών υλών αυξάνοντας την περιεκτικότητά τους σε υδατάνθρακες. Μία δεύτερη κατηγορία αποτελούν τα τρόφιμα με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος τα οποία προέρχονται από αντίστοιχα προϊόντα, που είχαν όμως μεγαλύτερο ποσοστό λίπους. (47). Τέλος, δεδομένου ότι κατά την επεξεργασία ενός προϊόντος για να γίνει light επέρχεται αλλοίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων του, η βιομηχανία τροφίμων την τελευταία δεκαετία άρχισε να προσθέτει στα τρόφιμα συστατικά (fat mimetic), τα οποία μιμούνται τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του διατητικού λίπους (52). Αυτού του είδους τα προσθετικά έχουν τη μισή ενεργειακή πυκνότητα συγκρινόμενα με το διατητικό λίπος και το κύριο μακροθρεπτικό συστατικό τους είναι είτε πρωτεΐνη είτε υδατάνθρακας. Άλλες κοινές ιδιότητες αυτών των συστατικών είναι οι ακόλουθες: 1) Δομή λιποειδούς με ένα τροποποιημένο δεσμό, 2) υδρόφοβο χαρακτήρα, 3) Κατάλληλη σύνθεση βραχέων και μακρών αλυσίδων λιπαρών οξέων και του σκελετού της γλυκερόλης καθώς και εύρεση της κατάλληλης αναλογίας λιπαρών οξέων και γλυκερόλης, 4) Μειωμένο θερμιδικό περιεχόμενο, 5) Παρόμοιες οργανοληπτικές ιδιότητες με το κοινό λίπος (53). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου συστατικού, του οποίου η χρήση έχει εγκριθεί και από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA), είναι η ολέστρα. Η ολέστρα πρόκειται για ένα μίγμα έξα-, έπτα-, όκτοεστέρων της σακχαρόζης με μακράς αλύσου λιπαρά οξέα υπό την παρουσία κατάλληλων καταλυτών. Η διατητική σημασία της ολέστρας έγκειται στο ότι έχει μηδενικό θερμιδικό περιεχόμενο εφόσον δεν πέπτεται και δεν απορροφάται από τον γαστρεντερικό σωλήνα, λόγω του ότι τα λιπαρά οξέα, τα οποία είναι εστεροποιημένα με τη σακχαρόζη δυσχεραίνουν τη δράση των πεπτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα, τα πεπτικά ένζυμα δεν μπορούν να βρουν το σημείο τομής με άμεση συνέπεια το μόριο της ολέστρας να μην μπορεί να μεταβολιστεί σε μικρότερα κομμάτια και να απορροφηθεί από το σώμα (49,51). Επιπρόσθετα, η διατροφική αξία της ολέστρας οφείλεται στο ότι είναι συστατικό ελεύθερο λίπους και χοληστερόλης ,

κατάλληλο για βαθύ τηγάνισμα και ψήσιμο όντας σταθερό σε υψηλές θερμοκρασίες, αποσυντιθέμενο στα ίδια υποπροϊόντα όπως και τα συμβατικά λίπη (49).

Η ανταπόκριση που βρήκαν τα light προϊόντα από τους καταναλωτές είναι προφανής από τα παρακάτω νούμερα: Το 1995, οι πωλήσεις των light τροφίμων απέδωσαν 29 δισεκατομμύρια δολάρια και μέχρι το 2000 είχαν αυξηθεί στα 40 δισεκατομμύρια δολάρια. Επιπλέον, στις μέρες μας το ποσοστό που καταναλώνει προϊόντα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος έχει αυξηθεί δραματικά (88%) συγκρινόμενο με αντίστοιχα ποσοστά της προηγούμενης δεκαετίας (67% το 1991 και 73% το 1993) (50). Τα πιο ευρέως προτιμώμενα light τρόφιμα είναι τα γαλακτοκομικά (γιαούρτι, ημίπαχο γάλα), που αποτελούν το 1/3 των πωλήσεων των light προϊόντων (55). Τέλος, έχει παρατηρηθεί ότι οι γυναίκες αποτελούν την ομάδα με τα υψηλότερα ποσοστά κατανάλωσης light τροφίμων σε αντίθεση με τους άντρες και τους ηλικιωμένους (49).

3.2 Επιπτώσεις στην υγεία από την κατανάλωση των light τροφίμων

Όπως έγινε σαφές από τα παραπάνω τα light τρόφιμα αποκτούν ολοένα και περισσότερο την πρώτη θέση στις προτιμήσεις των καταναλωτών. Η διαπίστωση αυτή έχει ως αποτέλεσμα να τίθεται το ερώτημα κατά πόσο η κατανάλωση των τροφίμων χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος είναι ευεργετική για την υγεία. Στα πλαίσια του να απαντηθεί το παραπάνω ερώτημα έχουν διεξαχθεί πολλές έρευνες.

Η στρατηγική μείωσης του λίπους και ο ρόλος των light τροφίμων στη διαίτα των Αμερικανών αξιολογήθηκε το 1996 από το Αμερικάνικο Υπουργείο Γεωργίας (US Department of Agriculture Continuing Survey of Food Intakes by Individuals) διεξάγοντας μία διεθνή αντιπροσωπευτική μελέτη. Σε αυτήν την έρευνα συμμετείχαν 1731 άτομα (878 άντρες και 853 γυναίκες) τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν στις εξής ομάδες: Η πρώτη ομάδα περιελάμβανε άτομα που κατανάλωναν διαίτα πλούσια σε λίπος (περισσότερο από το 30% της συνολικής ενέργειας προέρχεται από λίπος). Επιπλέον, το δείγμα χωρίστηκε και σε τρεις υποκατηγορίες σύμφωνα με το αν κατανάλωναν ή όχι light τρόφιμα: Η πρώτη ομάδα δεν κατανάλωνε light τρόφιμα, η δεύτερη τα κατανάλωνε σε μέτριες ποσότητες και η τρίτη σε αρκετά αυξημένες. Τα αποτελέσματα, τα οποία προέκυψαν είχαν ως εξής: Η διαφορά στο ενεργειακό περιεχόμενο μεταξύ των ατόμων

που τρέφονταν με δίαιτες υψηλές σε λίπος συγκριτικά με εκείνους που άνηκαν στην ομάδα με τις δίαιτες χαμηλές σε λίπος, ήταν της τάξης των 400-500 kcal. (56). Οι ενήλικες που δε χρησιμοποιούσαν τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος φάνηκε ότι κατανάλωναν δίαιτες με υψηλότερη ενεργειακή πυκνότητα, καθώς επίσης σημείωσαν και υψηλότερες προσλήψεις βιταμίνης Α, φυλλικού και σιδήρου. Ένα ακόμα συμπέρασμα το οποίο προέκυψε από αυτήν την έρευνα ήταν ότι οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τη μείωση του διαιτητικού λίπους και τη διατήρηση της ενεργειακής πρόσληψης δεν ήταν όλες το ίδιο αποτελεσματικές. Συγκεκριμένα, όσοι δεν χρησιμοποιούσαν light τρόφιμα, ενώ η διαίτά τους ήταν χαμηλή σε λίπος έτειναν στην επιπλέον μείωση του προσληφθέντος ποσοστού του λίπους αυξάνοντας την κατανάλωση των υδατανθράκων, κυρίως μέσω της αυξημένης κατανάλωσης αναψυκτικών (56). Τόσο, οι άντρες όσο και οι γυναίκες, οι οποίοι κατανάλωναν δίαιτες χαμηλές σε λίπος είχαν κατά μέσο όρο χαμηλότερο του δείκτη μάζας σώματος (BMI) : Οι διαφορές μεταξύ των ατόμων που κατανάλωναν δίαιτες χαμηλές σε λίπος έναντι εκείνων με τις δίαιτες υψηλές σε λίπος ήταν σημαντικές κυρίως στις γυναίκες που χρησιμοποιούσαν light τρόφιμα. Όλα τα παραπάνω οδηγούν στο συμπέρασμα ότι όταν δίαιτες χαμηλές σε λίπος συνδυαστούν με υψηλή κατανάλωση light τροφίμων μπορούν να συμβάλλουν συγχρόνως τόσο στην επαρκή πρόσληψη θρεπτικών συστατικών όσο και στη διατήρηση του δείκτη μάζας σώματος (BMI) μεταξύ των φυσιολογικών ορίων ($19-25\text{kg/m}^2$) (56).

Μία ακόμη έρευνα, η οποία διεξήχθη με σκοπό την ανεύρεση της επίδρασης των light τροφίμων στην υγεία, πραγματοποιήθηκε σε Γάλλους ενήλικες βασιζόμενη αυτήν τη φορά στη συσχέτιση βιολογικών, ανθρωπομετρικών και διατροφικών παραμέτρων. Ο πληθυσμός στόχος αποτελείτο από 2299 άντρες και 1979 γυναίκες, ηλικίας 45-60 ετών, οι οποίοι συμπλήρωσαν ανακλήσεις εικοσιτετραώρου για έξι τυχαίες μέρες. Η κατηγοριοποίηση του πληθυσμού έγινε σύμφωνα με το αν κατανάλωναν ή όχι light τρόφιμα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν είχαν ως εξής: Τα άτομα (κυρίως γυναίκες) που συμπεριελάμβαναν στη διατροφή τους light τρόφιμα είχαν υψηλότερο σωματικό βάρος και δείκτη μάζας σώματος (BMI) από εκείνα που δεν κατανάλωναν, ενώ οι βιοχημικοί δείκτες δεν εμφάνισαν ιδιαίτερες διαφορές μεταξύ των δύο ομάδων. Επιπρόσθετα, η επιλογή των light τροφίμων συσχετίστηκε, αφενός μεν με την αυξημένη πρόσληψη των περισσότερων μακροθρεπτικών συστατικών, αφετέρου δε με την

ποιοτική βελτίωση της διαίτας. Εντούτοις, η επίδραση των light τροφίμων σε βιολογικές, ανθρωπομετρικές και διατροφικές παραμέτρους χρήζει περαιτέρω έρευνας (57).

Μία άλλη κλινική μελέτη, είχε ως σκοπό τη συσχέτιση της κατανάλωσης των light τροφίμων με την ενεργειακή πρόσληψη, όπως επίσης και την πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών σε υγιή άτομα και σε διαβητικούς. Το δείγμα αποτελείτο από 30 άντρες και γυναίκες, ηλικίας 20-60 έτη. Στους εθελοντές δόθηκαν πέντε light τρόφιμα και τα αντίστοιχά τους πλήρη προϊόντα, όπου η κατανάλωση αυτών πραγματοποιήθηκε στο σπίτι κάθε εθελοντή, ο οποίος κατανάλωνε την κάθε ομάδα τροφίμου για τρεις μέρες. Η ποσοτική και ποιοτική αξιολόγηση των καταναλωθέντων τροφίμων έγινε με τη συμπλήρωση ημερολογίων κατανάλωσης τροφίμων, το οποίο εκτός από τα είδη των τροφίμων που κατανάλωνε ο εθελοντής καταγράφονταν τόσο οι αρχικές όσο και οι μη καταναλωθείσες ποσότητες των τροφίμων. Η προαναφερθείσα έρευνα οδήγησε στο συμπέρασμα ότι οι διαβητικοί ανταποκρίνονταν με παρόμοιο τρόπο στην κατανάλωση των light τροφίμων, όπως και οι μη διαβητικοί. Επιπλέον, σημειώθηκε σημαντική μείωση στο λίπος της τάξης των 8gr στην ομάδα που κατανάλωνε light προϊόντα καθώς και της προερχόμενης ενέργειας από αυτά τα τρόφιμα. Αντίθετα, η ενέργεια η προερχόμενη από τους υδατάνθρακες αυξήθηκε στην ομάδα που κατανάλωνε light τρόφιμα., ενώ και στις δύο ομάδες η μεταβολή είτε των λιπών είτε των υδατανθράκων δεν επηρέασε τη συνολική ενεργειακή πρόσληψη των υποκειμένων. Όσον αφορά τη διαιτητική πρόσληψη τόσο της χοληστερόλης όσο και των κορεσμένων λιπαρών οξέων ήταν σημαντικά μικρότερη στην ομάδα που κατανάλωνε light τρόφιμα. Τέλος, οδηγούμεθα στο συμπέρασμα ότι η κατανάλωση από τους διαβητικούς light τροφίμων συμβάλλει στη μειωμένη διαιτητική πρόσληψη λίπους, χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων (58).

Στα πλαίσια της αναζήτησης του πραγματικού ρόλου των light τροφίμων σε θέματα υγείας, πραγματοποιήθηκε έρευνα, με σκοπό την ανεύρεση των συνεπειών εφαρμογής διαιτών, οι οποίες συμπεριελάμβαναν μεγάλο ποσοστό τροφίμων χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος και εμπλουτισμένων με μη εστεροποιημένες φυτικές στερόλες και μεταλλικά στοιχεία (ασβέστιο, μαγνήσιο, κάλλιο), στα επίπεδα χοληστερόλης ορού και LDL-χοληστερόλης, σε άτομα με ήπια έως μέτρια υπερχοληστερολαιμία. Η παραπάνω μελέτη επρόκειτο για τυχαιοποιημένη, διπλά τυφλό έρευνα, η οποία διήρκεσε 15 εβδομάδες και έλαβε χώρα σε δύο πανεπιστημιακά νοσοκομεία. Τα άτομα του

δείγματος (78) είχαν τα εξής χαρακτηριστικά: άνηκαν στην ηλικιακή ομάδα των 25-75 ετών, με συγκεντρώσεις χοληστερόλης 232-310mg/dl. Όσον αφορά τη διαίτά τους, αυτή αποτελείτο κυρίως από συστηματική κατανάλωση ψωμιού, ζωικών προϊόντων και μαρμελάδας εμπλουτισμένης με 1,25-5gr/ημέρα φυτικών στερολών και μεταλλικά στοιχεία.. Την έρευνα τελικά έφεραν εις πέρας 71 άτομα και τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν είχαν ως εξής: η ολική χοληστερόλη του ορού, μειώθηκε και στην ομάδα παρέμβασης και στην ομάδα που λάμβανε το ψευδοφάρμακο σε ποσοστά 8% και 3% αντίστοιχα. Επιπρόσθετα και τα επίπεδα LDL-χοληστερόλης μειώθηκαν και στις δύο ομάδες, 13% στην ομάδα παρέμβασης και 5% σε αυτήν που λάμβανε το ψευδοφάρμακο. Συμπερασματικά, η κατανάλωση light τροφίμων εμπλουτισμένων με μη εστεροποιημένες φυτικές στερόλες επέφεραν μείωση τόσο στα επίπεδα της ολικής χοληστερόλης όσο και της LDL-χοληστερόλης, ενισχύοντας την άποψη για συσχέτιση εμπλουτισμένων light τροφίμων με μη εστεροποιημένες φυτικές στερόλες στην διατητική πρόληψη των καρδιαγγειακών. (59).

Παρά το γεγονός ότι αρκετές έρευνες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι το λιποειδικό περιεχόμενο της διαίτας έχει μειωθεί κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η επικράτηση της παχυσαρκίας συνεχίζει να αυξάνεται τόσο στην Ευρώπη όσο και στη Βόρεια Αμερική. Το φαινόμενο αυτό το οποίο είναι γνωστό ως «Αμερικάνικο Παράδοξο», αναφέρει ότι η αντικατάσταση των παραδοσιακών τροφίμων πλήρων σε λίπος με τα αντίστοιχά τους light προϊόντα οδήγησε στην υπερκατανάλωση των light τροφίμων, εφόσον οι άνθρωποι τείνουν να τρώνε περισσότερο από ένα τρόφιμο όταν γνωρίζουν ότι αυτό είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος. Συγκεκριμένα, ταυτίζουν τον όρο light τρόφιμα με εκείνων των προϊόντων με μηδενικό θερμιδικό περιεχόμενο. Πολλοί επιστήμονες και τα μέσα ενημέρωσης υποστηρίζουν τη συμβολή του «Αμερικάνικου Παράδοξου» με την υπερκατανάλωση των light τροφίμων εφόσον αυτά συμβάλλουν στην αύξηση του ενεργειακής πυκνότητας παρά το μειωμένο τους λιποειδικό περιεχόμενο κυρίως εξαιτίας της χαμηλής τους περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες, νερό και του υψηλού τους περιεχομένου σε ραφινάρισμένους υδατάνθρακες. Για την περαιτέρω έρευνα των ενεργειακά πυκνών light τροφίμων, αναλύθηκε η πρόσληψη των μακροθρεπτικών συστατικών και η ενεργειακή πυκνότητα τόσο των πλήρων όσο και των αντίστοιχων προϊόντων με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος, από όλες τις ομάδες τροφίμων. Το συμπέρασμα το οποίο προέκυψε ήταν ότι στα γαλακτοκομικά και στα

προϊόντα κρέατος με χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος μειώθηκαν τόσο το εμπεριεχόμενο ποσοστό λίπους όσο και η ενεργειακή τους πυκνότητα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στα ποσοστά των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του ύδατος. Ωστόσο, θα πρέπει να σημειωθεί ότι αντίστοιχες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στη Δανία κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα light τρόφιμα συμβάλλουν στην αύξηση των επιπέδων παχυσαρκίας κυρίως στις περιπτώσεις που συνυπάρχουν και άλλοι επιβαρυντικοί παράγοντες (π.χ. καθιστική ζωή) (60). Το γεγονός ότι με την αυξημένη κατανάλωση των light τροφίμων δεν επιτυγχάνεται μείωση της συνολικής προσληφθείσας ενέργειας αποδεικνύεται και από μελέτες που αφορούσαν τα αποτελέσματα από την κατανάλωση της ολέστρας. Η κατανάλωση της ολέστρας συνέβαλλε στη αύξηση της συνολικής ενέργειας κατά 204kcal ανά ημέρα και της ημερήσιας πρόσληψης υδατανθράκων κατά 37gr ανά ημέρα (61). Επιπλέον, στην Ινδιανάπολη διεξήχθησαν έρευνες, οι οποίες διερεύνησαν τη συσχέτιση της ολέστρας με τις μεταβολές του σωματικού βάρους. Το αποτέλεσμα που προέκυψε έδειξε ότι τα άτομα που κατανάλωναν τρόφιμα με ολέστρα είχαν πολύ περισσότερες πιθανότητες να γίνουν υπέρβαροι συγκριτικά με όσους δεν κατανάλωναν αντίστοιχα τρόφιμα (62).

Μία ακόμη αξιοσημείωτη συνέπεια της ευρείας κατανάλωσης των light τροφίμων εντοπίζεται στην επίδραση αυτών στη βιοδιαθεσιμότητα των λιποδιαλυτών βιταμινών. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η αυξημένη κατανάλωση των light τροφίμων μειώνει τη μεταβολικά διαθέσιμη ενέργεια από το λίπος, λόγω της χρήσης μη απορροφήσιμων υποκαταστάτων του λίπους ή δεσμεύοντας το λίπος στο έντερο αυξάνοντας έτσι το αποβαλλόμενο- απεκκρινόμενο λίπος από το κόλον. Άμεση συνέπεια αυτού είναι και η αυξημένη απέκκριση των λιποδιαλυτών βιταμινών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα της μείωσης της βιοδιαθεσιμότητας των λιποδιαλυτών βιταμινών αποτελούν και οι σχετικές έρευνες με την ολέστρα (63)

Παρόμοια έρευνα μελέτησε την επίδραση της ημερήσιας πρόσληψης 12,5gr ανά ημέρα ολέστρας στα επίπεδα πλάσματος πέντε διαφορετικών καροτενοειδών και βιταμίνης E σε 21 εθελοντές. Επιπλέον εξετάστηκε και η επίδραση 3gr ολέστρας ημερησίως σε 53 υγιείς εθελοντές. Στην πρώτη περίπτωση μειώθηκε σημαντικά η σύγκεντρωση πλάσματος του β-καροτενίου κατά 34% του λυκοπενίου κατά 52 %. Μικρότερες αλλά σημαντικές μειώσεις βρέθηκαν και στις συγκεντρώσεις πλάσματος της β-κρυπτοξανθίνης και της βιταμίνης E. Στην περίπτωση που η ημερήσια πρόσληψη της

ολέστρας ήταν 3g παρατηρήθηκε μείση της συγκέντρωσης πλάσματος του β-καροτενίου κτά 20% και του λυκοπενίου κατά 38% (64).

Από τα παραπάνω γίνεται σαφές ότι οποιαδήποτε διαδικασία μειώνει την πέψη και απορρόφηση του διαιτητικού λίπους από τον εντερικό σωλήνα, θα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της βιοδιαθεσιμότητας των λιποδιαλυτών βιταμινών (64).

Τέλος, το συμπέρασμα που προκύπτει λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις προαναφερθείσες έρευνες, είναι ότι δεν υπάρχει σαφής άποψη για το αν τα light τρόφιμα ωφελούν ή βλάπτουν την υγεία. Το μόνο σίγουρο όμως είναι ότι αν καταναλώνονται με μετριοπάθεια, οι βλαπτικές τους συνέπειες θα μειωθούν στο ελάχιστο. Συγκεκριμένα, οι καταναλωτές θα πρέπει να συνειδητοποιήσουν ότι ο ρεαλιστικός σκοπός της χρήσης των light τροφίμων είναι η μείωση της διαιτητικής πρόσληψης λίπους. Συνεπώς, σε περίπτωση υπερκατανάλωσης τους εξουδετερώνεται η ιδιότητά τους να μειώσουν και την ενεργειακή πρόσληψη (65). Ωστόσο είναι ιδιαίτερα σημαντικό να σημειωθεί ότι και οι βιομηχανίες τροφίμων θα πρέπει να συμμορφωθούν έτσι ώστε να παράγουν ασφαλή light τρόφιμα. Συγκεκριμένα, η προσθήκη νέων και ασφαλών συστατικών θα πρέπει να συνδυάζεται με την ικανότητά τους να διατηρούν τις οργανοληπτικές ιδιότητες των αντίστοιχων τροφίμων πλήρων σε λίπος (49).

4) ΜΑΡΓΑΡΙΝΗ

4.1 Ιστορική αναδρομή μαργαρίνης

Οι πρώτες προσπάθειες για την παρασκευή προϊόντων που να προσομοιάζουν στο βούτυρο έγιναν στην Ευρώπη στα μέσα του 19^{ου} αιώνα λόγω του υψηλού κόστους του βουτύρου. Το πρώτο υποκατάστατο του βουτύρου παρασκευάστηκε από τον Γάλλο χημικό Mege Mouries το 1869 μετά από σύσταση του Ναπολέοντα. Το κλάσμα του ζωικού λίπους που χρησιμοποιήθηκε αποδείχθηκε ένα πολύ καλό υλικό για την επίτευξη οργανοληπτικών ιδιοτήτων παρόμοιων με του βουτύρου. Σε σύντομο χρονικό διάστημα από την κυκλοφορία του πρώτου υποκατάστατου βουτύρου, έγιναν και άλλες προσπάθειες για την παρασκευή αντίστοιχων προϊόντων. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η προσπάθεια του Roudebush στις ΗΠΑ το 1873, ο οποίος χρησιμοποίησε ζωικό λίπος όπου το ρευστοποίησε προσθέτοντας βαμβακέλαιο. Στη συνέχεια, το μίγμα το οποίο προέκυψε το ανέμιξε με φρέσκο γάλα, έτσι ώστε προέκυψε ένα προϊόν παρόμοιο με το λαρδί. Στις αρχές πλέον του 20^{ου} αιώνα (1903), ο Norman ήταν αυτός που εισήγαγε την τεχνική της υδρογόνωσης στην παραγωγή υποκαταστάτων λίπους. Αυτή η τεχνική αποτέλεσε το κίνητρο για την αναγέννηση και προώθηση της παραγωγής υποκαταστάτων βουτύρου που πλέον αναγνωρίζονταν και ονομάζονταν ως μαργαρίνες. Έτσι, μέχρι το 1940 η μαργαρίνη θεωρείται το πλέον αντιπροσωπευτικό και φθηνό υποκατάστατο βουτύρου ενώ το 1941, ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) δημοσίευσε ένα υπόδειγμα για την αναγνώριση και ταυτοποίηση των μαργαρινών (66)

4.2 Ορισμός και είδη μαργαρινών

Ως μαργαρίνη ορίζεται το προϊόν το οποίο παρασκευάζεται με ανάμιξη και κατεργασία εδωδιμων λιπών, φυτικών ή υδρογονομένων, με επεξεργασμένα (ραφινέ) έλαια και γάλακτος ή νερού, έτσι ώστε το τελικό προϊόν να έχει υφή και όψη όμοια με το νωπό βούτυρο (67,68). Όσον αφορά τις μαργαρίνες υψηλής ποιότητας αυτές παρασκευάζονται συνήθως από φυτικά έλαια, ενώ αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα

τελευταία χρόνια στο Ηνωμένο Βασίλειο χρησιμοποιούνται για την παρασκευή της μαργαρίνης και υδρογονωμένα ιχθυέλαια (68).

Οι μαργαρίνες ανάλογα με την προέλευση της λιπαρής πρώτης ύλης (φυτικής ή ζωικής), διακρίνονται σε φυτικές ή ζωικές ή σε μίγματα φυτικών και ζωικών. Επίσης, η αναλογία λίπους-νερού (80/20 ή 40/60) κατατάσσει τις μαργαρίνες σε κανονικές (full-fat) και σε ελαφριές (light) αντίστοιχα. Τέλος, ανάλογα με τη θερμοκρασία ψύξης του ομογενοποιητή λαμβάνονται και οι μαλακές μαργαρίνες για επιτραπέζια χρήση και οι σκληρές για τη μαγειρική (69).

4.3 Σύσταση της μαργαρίνης

Η μαργαρίνη είναι γαλάκτωμα νερού σε λίπος, αποτελούμενο από μία συνεχή φάση λίπους και μία διεσπαρμένη υδατική φάση. Η συνεχής φάση περιέχει βελτιωτικά γεύσης, χρωστικές (καροτένια), βιταμίνες (A, D) και κρυστάλλους λίπους (67).

Οι φυσικές ιδιότητες της μαργαρίνης επηρεάζονται από τον τύπο και την ποσότητα των κρυστάλλων του λίπους. Συγκεκριμένα, για να επιτευχθεί η απαιτούμενη γεύση, η γαλακτωματοποίηση θα πρέπει να παράγει γύρω στο 95% σφαιρίδια ύδατος διαμέτρου 1-5μm και ένα γραμμάριο μαργαρίνης θα πρέπει να περιέχει 10-20*10⁹ σφαιρίδια ύδατος. Επιπλέον, μερικές μαργαρίνες περιέχουν 10% βούτυρο και διακέτυλο ή μονοακέτυλο μέθυλο καρβινόλη (carbinol) για να επιτευχθεί η απαιτούμενη γεύση. Για την αντιβακτηριακή προστασία της μαργαρίνης προστίθενται μαγειρικό άλας (2-3%) και το μέγεθος των σταγονιδίων ύδατος πρέπει να είναι μικρό. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσθήκη γαλακτοματοποιητών, συνήθως λεκιθίνη σόγιας, διγλυκερίδια και μονογλυκερίδια. (67).

Συνοπτικά, η αγορανομικώς επιτρεπόμενη σύσταση και τα πρόσθετα της μαργαρίνης είναι τα ακόλουθα:

- Λιπαρές ύλες τουλάχιστον 80%
- Υγρασία μέχρι 20% (συνήθως 16-18%)
- Σημείο Τήξεως, μέχρι 40°C και για τη μαργαρίνη ζαχαροπλαστικής μέχρι 44°C
- Οξύτητα ως έχει μέχρι 5 βαθμοί οξύτητας και επί λιπαρής ύλης μέχρι 2 βαθμοί
- Χλωριούχα, NaCl μέχρι 0,2% ως έχει και για την αλατισμένη μαργαρίνη μέχρι 2%
- Φυσικά αρωματικά ή βούτυρο μέχρι 5% και φυσικές χρωστικές (καροτένια)

- Αντιοξειδωτικό BHT μέχρι 0,1%
- Συντηρητικό σορβικό κάλιο μέχρι 0,1%
- Γαλακτωματοποιητές: μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, λεκιθίνες σόγιας
- Προϊόντα γαλακτικής ζύμωσης
- Βιταμίνες (κυρίως A, D)
- Ολικά σάκχαρα μέχρι 1%
- Ολική πρωτεΐνη 0,2%

(67,70)

Οι μαργαρίνες ανάλογα με το αν είναι σκληρές ή μαλακές και το είδος του περιεχομένου λίπους παρουσιάζουν τις διαφορές που φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας:4.1), ως προς την περιεκτικότητα κάποιων θρεπτικών συστατικών:

Πίνακας 4.1: Ποσοστιαία σύσταση της μαργαρίνης σε λιπαρά οξέα

Είδος μαργαρίνης	SFA (gr)	MUFA (gr)	PUFA (gr)	CHOL (mgr)
Σκληρή, ζωικού και φυτικού λίπους	30,4	36,5	10,8	285
Σκληρή φυτικού λίπους	35,9	33	9,4	15
Μαλακή, ζωικού και φυτικού λίπους	26,9	37,2	13,8	225
Μαλακή, φυτικού λίπους	25	31	21,8	9

(McCance & Widdowson's «The Composition of Foods»,p.114-115, 5th edition, Royal Society of Chemistry, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food).

Η μαργαρίνη παρασκευάζεται με βιομηχανικές εγκαταστάσεις συνήθως των ελαιοτριβείων, με ποσά ή όσα είναι απαραίτητα για κάθε εταιρεία αλλά με παρόμοιες βιομηχανικές απαιτήσεις, οι οποίες και χαρακτηρίζουν τα υλικά που αποτελούν χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Διαγραμματικά, η διαδικασία παρασκευής της μαργαρίνης έχει ως εξής (σχήμα 4.1)

Όσον αφορά τη σύσταση της μαργαρίνης σε λιπαρά οξέα και τοκοφερόλες αυτή έχει ως εξής (πίνακας 4.2):

Πίνακας 4.2

Τρόφιμο	Ελαϊκό %	Λινελαϊκό %	α- λινολενικό %	α τοκοφερόλη %	γ τοκοφερόλη %	δ τοκοφερόλη %
Μαργαρίνη	26	8,8	0,4	6,8	18,3	3,8

(Μαμαλάκης γ., Ζαμπέλας Α., Καφάτος Α., «Κρητικό Ελαιόλαδο, για την προαγωγή της Υγείας και την πρόληψη των ασθενειών») [71]

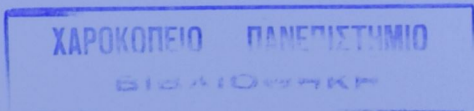
Οποιαδήποτε παρέκκλιση από τα παραπάνω καθιστά τη μαργαρίνη ως νοθευμένη. Συγκεκριμένα, μια μαργαρίνη θεωρείται νοθευμένη όταν έχει τουλάχιστον ένα από τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

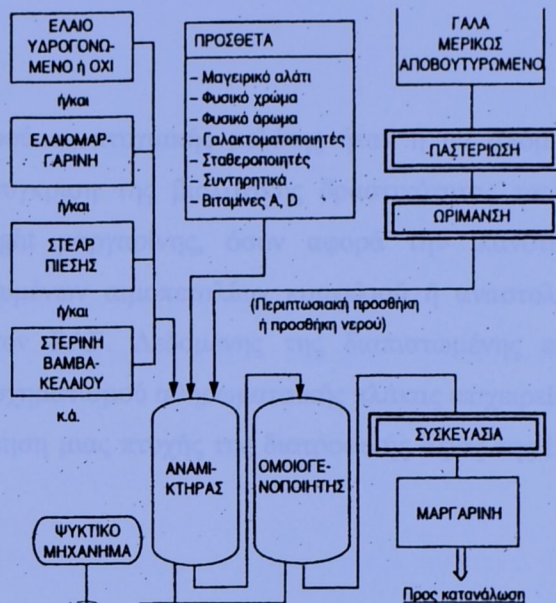
- Αυξημένη περιεκτικότητα σε νερό.
- Χρησιμοποίηση κατά την παρασκευή αλλοιωμένων η επιβλαβών ουσιών για την υγεία του ανθρώπου.
- Αυξημένη ποσότητα μαγειρικού αλατιού.
- Προσθήκη αντισηπτικών υλών πέρα από το αλάτι.
- Συνθετικές χρωστικές.
- Η προσθήκη ξένων υλών (π.χ παραφίνης).

4.4 Παρασκευή της μαργαρίνης

Η μαργαρίνη παρασκευάζεται σε βιομηχανικές εγκαταστάσεις, συνήθως των ελαιουργείων, με πορεία η οποία είναι παρόμοια για κάθε εταιρεία αλλά με παραλλαγές βιομηχανικού απορρήτου, οι οποίες και χαρακτηρίζουν τα ιδιαίτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά του προϊόντος.

Διαγραμματικά, η διαδικασία παρασκευής της μαργαρίνης έχει ως εξής (σχήμα 4.1)





Σχήμα 4.1: Διάγραμμα βιομηχανικής παρασκευής της μαργαρίνης: Ανδρικόπουλος Ν. «Χημεία & Τεχνολογία Τροφίμων», Τόμος Ι, Κεφάλαια Θεωρίας, κεφ.1, σ.26-27, Αθήνα-Καλλιθέα 1999 (70)

Η λιπαρή πρώτη ύλη αναμιγνύεται με τα πρόσθετα σε αναμικτήρα όπου οι γαλακτωματοποιητές (μονογλυκερίδια, διγλυκερίδια, λεκιθίνες σόγιας) αναμιγνύουν τα λιπαρά με το νερό ή/και το γάλα προς παρασκευή γαλακτώματος λιπαρών/νερού το οποίο στη συνέχεια ομογενοποιείται με φυγοκέντρωση σε ομογενοποιητή. Με την ομογενοποίηση τα λιποσφαίρια κατατέμνονται σε μικρότερα συσσωματώματα και έτσι δεν αποχωρίζονται από το γάλα και το νερό και συνθέτονται μαζί σε ενιαίο σώμα. Ο ομογενοποιητής και ο αναψυκτήρας λειτουργούν υπό ψύξη στους 5°C με τη βοήθεια ψυκτικών εγκαταστάσεων για να αποφευχθεί ο διαχωρισμός της φάσης των λιπαρών από τη φάση του νερού/γάλακτος. (67,69).

5) ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η ηα απομόνωση, ο διαχωρισμός, η μελέτη και η σύγκριση της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδικών κλασμάτων πλήρους και light μαργαρίνης, όσον αφορά την ικανότητά τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού ή αναστολή της συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF. Δεδομένης της διαπιστωμένης εμπλοκής του PAF στην παθογένεια του σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας επιχειρείται με αυτόν τον τρόπο να συγκριτική εκτίμηση μιας πτυχής της διατροφικής αξίας της light μαργαρίνης σε σχέση με την πλήρη.

Μία κατάλληλος ποσότητα μονοφασικού σάτηρου διαλυτών εκχυλίσματα η εκχύλιση όλων των λιποιδίων καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενόσεων όπως αλάτων, αμινοξέων κ.λ.π. Μία την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό, στην μεν χλωροφορμική φάση καταβύθονται όλα τα λιποειδή, στην δε υδατική επιπνέουνται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα καταργάζεται με μέγμα $\text{CHCl}_3\text{:CH}_3\text{OH:H}_2\text{O}$ (1:2:1,3, v/v/v), αναδίδεται έντονα και φυγοκεντρείται, αν χρειάζεται, ώστε να απομακρυνθούν οι υδατικά συστατικά. Στην συνέχεια προσθέτουμε υπολογισμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O (0,25 ml για κάθε 1 ml προστιθέμενου μίγματος διαλυτών) ώστε η αναλογία των διαλυτών να γίνει $\text{CHCl}_3\text{:CH}_3\text{OH:H}_2\text{O}$ (1:1:0,9, v/v/v) και το σύστημα να μετατραπεί σε διφασικό. Η χλωροφορμική (κάτω) φάση μεταφέρεται, ανάλογα των όγκο της, είτε σε γυάλινο σάββατο, είτε σε σφαιρική φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου ή σε ήπιο κενό, αντίστοιχα. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα μίγματος $\text{CHCl}_3\text{:CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία.

6.2 Κατανομή και αντανάραξη¹²

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες σφαιρικής καθαρότητας.

6) ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.1 Εκχύλιση λιποειδών κατά Bligh-Dyer⁷¹

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator)
Rotavapor Buchi R-114

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), αναδεύεται έντονα και φυγοκεντρείται, αν χρειάζεται, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Στην συνέχεια προσθέτονται 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. 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.

6.2 Κατανομή κατ'αντιρροή⁷³

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας.

- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Rotavapor Buchi -114.

Αρχή μεθόδου

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

Αναλυτική πορεία

Αρχικά γίνεται η εξισορρόπηση των διαλυτών : Σε δοκιμαστικό σωλήνα των 250ml αναμιγνύονται 100ml πετρελαϊκού αθέρρα με 100ml αιθανόλης 87% (κάτω φάση) και οι δύο μη αναμίξιμοι διαλύτες αναταράσσονται και εκτονώνονται 3 φορές και στη συνέχεια παραμένουν για εξισορρόπηση για 10 λεπτά. Μετά διαχωρίζονται και χρησιμοποιούνται στα επόμενα στάδια ως κορεσμένοι ο ένας στον άλλον.

Μετά την εξισορρόπηση των διαλυτών τα συνολικά λιποειδή διαλύονται σε 9ml πετρελαϊκού αθέρρα με 3ml προεξισορροπημένης αιθανόλης 87% σε μία πρώτη διαχωριστική χοάνη. Το διάλυμα αναδεύεται ισχυρά και αφήνεται να ηρεμήσει για 5 λεπτά. Στη συνέχεια παραλαμβάνεται η κάτω φάση (αιθανολική φάση) που περιέχει μία πρώτη ποσότητα πολικών λιποειδών και μεταφέρεται σε μία δεύτερη διαχωριστική χοάνη, η οποία περιέχει 9ml πετρελαϊκού αθέρρα. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3ml προεξισορροπημένης αιθανόλης 87% και οι δύο δοκιμαστικοί σωλήνες αναταράσσονται για να εκχυλισθεί ο πετρελαϊκός αιθέρας με την αιθανόλη 87%. Η κάτω φάση (αιθανολική φάση) από τη δεύτερη διαχωριστική χοάνη μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και η κάτω φάση από την πρώτη διαχωριστική χοάνη μεταφέρεται στη δεύτερη διαχωριστική χοάνη. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται άλλες 7 φορές με 3ml προεξισορροπημένης αιθανόλης 87% κάθε φορά και κάθε φορά η κάτω φάση (αιθανολική φάση) από τη δεύτερη δοκιμαστικό σωλήνα συλλέγεται στην ίδια κωνική φιάλη. Στο τέλος η αιθανόλη 87% στην κωνική φιάλη (8*3 ml) περιέχει περισσότερο από 97% των πολικών λιποειδών του δείγματος ενώ ο πετρελαϊκός αιθέρας (2*9 ml) στους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες περιέχονται τα ουδέτερα λιποειδή που απόμειναν, τα οποία αναμιγνύονται σε δεύτερη κωνική φιάλη. Οι διαλύτες εξατμίζονται στους 40°C σε συσκευή rotary evaporator και τα λιποειδή αναδιαλύονται σε 2-3ml $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 1:1

και μεταφέρονται σε προζυγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες. Ακολουθεί εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα N_2 , επαναζύγιση, εύρεση ξηρού βάρους πολικών και ουδετέρων λιποειδών, αναδιάλυση σε 1ml $CHCl_3/CH_3OH$ 1:1 και φύλαξη στην κατάψυξη για χρήση σε επόμενα πειράματα.

6.3 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες αναλυτικής καθαρότητας
- Προσροφητικό υλικό : πηκτή SiO_2 με γύψο (Silica Gel 60 G, Merck) και χωρίς γύψο (Silica Gel H, Merck)
- Κρύσταλλοι ιωδίου
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC Desaga
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20x20cm
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25x25x10 cm
- Γυάλινοι σωλήνες φυγοκέντρου 50 ml
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont

Αρχή μεθόδου

Η TLC ανήκει στις τεχνικές της χρωματογραφίας κατανομής κατά τις οποίες ο διαχωρισμός των ενώσεων είναι αποτέλεσμα της κατανομής τους σε δύο μη μιγνυόμενους διαλύτες. Ένας διαλύτης, η στατική φάση, πλένεται διαδοχικά με μια κινούμενη φάση με τέτοιο τρόπο ώστε οι διαλυμένες ουσίες να κατανέμονται ή να χωρίζονται σε διαφορετικές περιοχές με την διαδοχή των διαλυτών, ανάλογα τον συντελεστή κατανομή τους. Στην TLC το μίγμα των ουσιών τοποθετείται σε διάλυμα κατά μήκος μίας γραμμής βάσης πάνω σε μία λεπτή στιβάδα κοκκοποιημένου ξηρού υλικού και ένα κατάλληλο μίγμα διαλυτών αφήνεται να προχωρήσει και να περάσει από την κηλίδα ανοδικά λόγω τριχοειδικών φαινομένων. Η απόσταση που διατρέχει κάθε ουσία από την αρχή ή τη γραμμή βάσης ως προς το μέτωπο του διαλύτη ορίζεται σαν R_f . Η ανίχνευση των κηλίδων πάνω στην πλάκα μπορεί να γίνει οπτικά, φθορισμομετρικά ή με διάφορες χρωμοφόρες δοκιμές που γίνονται με ψεκασμό της πλάκας με ανάλογα αντιδραστήρια.

Αναλυτική πορεία

Το διοξείδιο του πυριτίου αναμιγνύεται με απιονισμένο νερό σε αναλογία 60:120 (w/v) για την Silica Gel 60 G και σε αναλογία 35:95 (w/v) για την Silica gel H, αναταράσσεται έντονα για 2 min και επιστρώνεται στις πλάκες με την συσκευή Desaga. Το πάχος επίστρωσης είναι για τις παρασκευαστικές TLC 0,5mm. Οι πλάκες παραμένουν για 24 h σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια ενεργοποιούνται σε πυριαντήριο 110 °C για 1 h.

Το δείγμα ή τα πρότυπα λιποειδή, διαλυμένα σε μικρό όγκο κατάλληλου διαλύτη, τοποθετούνται στις πλάκες (σε ύψος 2 cm περίπου από την κάτω άκρη της πλάκας), οι οποίες έχουν χωριστεί σε παράλληλες λωρίδες. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη οι πλάκες αναπτύσσονται (μέχρι τα 18 cm περίπου) σε προκεκορεσμένο θάλαμο με το κατάλληλο σύστημα ανάπτυξης. Όταν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη οι πλάκες αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να εξατμιστεί ο διαλύτης ανάπτυξης.

Η εμφάνιση των ουσιών στις πλάκες γίνεται : Με τοποθέτηση της πλάκας σε θάλαμο που περιέχει ατμούς ιωδίου οπότε όλα τα λιποειδή εμφανίζονται ως ιώδεις κηλίδες.

Αν επιθυμείται η ανάκτηση των λιποειδών από την πλάκα τότε οι κηλίδες ή οι οριζόντιες λωρίδες των διαχωριζόμενων λιποειδών αποξύνονται, μεταφέρονται σε σωλήνες φυγοκέντρου και εκχυλίζονται κατά Bligh-Dyer. Το διοξείδιο του πυριτίου απομακρύνεται με φυγοκέντρηση πριν την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος εκχύλισης σε διφασικό.

6.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Όργανα - Αντιδραστήρια

- Υγρός χρωματογράφος Hewlett-packard series 1100, με 100 μl βρόγχο τοποθέτησης δείγματος
- Καταγραφέας-ολοκληρωτής: Hewlett-packard, HP-3396A
- Μικροσύριγγα ακρίβειας 200μl
- Στήλη κατιοανταλλαγής: MZ-ANALYSENTECHNIK, HPLC COLUMN 250x4,5mm, partisil SCX 10μm
- Στήλη προσρόφησης: Analytical Column, Silica 250*4,6mm, 100sil 5μm

- Οργανικοί διαλύτες χρωματογραφικής καθαρότητας (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη)
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας
- Πρότυπες ενώσεις: πολικά λιποειδή αυγού

Αρχή μεθόδου

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) ανήκει στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία η κινητή φάση, υπό την επίδραση ελεγχόμενης πίεσης, περνάει μέσα από μία σχετικά στενή στήλη που περιέχει την στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι είτε στερεή, είτε υγρή ενωμένη χημικά σε στερεό υπόστρωμα. Η HPLC θεωρείται σήμερα η καλύτερη μέθοδος υγρής χρωματογραφίας αλλά και ο πιο δόκιμος τρόπος χρωματογραφικού διαχωρισμού και ημιποσοτικού προσδιορισμού χημικών ενώσεων, αντικαθιστώντας την TLC.

Αναλυτική πορεία

Αρχικά, η στήλη καθαρίζεται με κατάλληλους διαλύτες, ανάλογα με το υλικό πλήρωσης της και σταθεροποιείται με τον πρώτο διαλύτη έκλουσης. Ακολουθεί η τοποθέτηση του δείγματος, το οποίο είναι διαλυμένο σε μικρό όγκο (της τάξης των μL) του κατάλληλου διαλύτη, με την βοήθεια της μικροσύριγγας ακριβείας. Η έκλουση του δείγματος γίνεται, είτε με σταθερή, είτε με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών και με ροή 1 ml/min . Η έκλουση των διαχωρισμένων ουσιών ελεγχόταν με την μεταβολή της οπτικής απορρόφησης στα 208 nm και η παραλαβή τους γινόταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Σε περίπτωση μη μεταβολής της οπτικής απορρόφησης, λαμβανόνταν κλάσματα κατά τακτά χρονικά διαστήματα.

6.5 Βιολογική δοκιμασία συσώρευσης πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού⁵

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Διάλυμα $10\times$ Tyrodes stock : Σε 1 lt νερού διαλύονται 80 g NaCl , $1,9\text{ g MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ και 10 g γλυκόζης
- Διάλυμα $100\times$ CaCl_2 stock : Σε 100 ml νερού διαλύονται $1,911\text{ g CaCl}_2$

- Διάλυμα 0,2M EGTA stock : Ποσότητα 0,76g EGTA διαλύεται σε 10ml νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5M
- 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 80ml νερό προστίθενται 10ml Tyrodes 10x stock. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα κατά τη διάρκεια της προσθήκης, προσθέτονται 2,5ml ζελατίνης 10% (λιωμένης στο σημείο βρασμού). Κατόπιν, προσθέτονται 5ml διαλύματος NaHCO_3 (0,203 g NaHCO_3 σε 10ml νερό) που πρέπει να χρησιμοποιείται αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100ml με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 ml. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25μL EGTA 0,2M. Ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 16ml 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 5ml Tyrodes 10x προστίθενται 40ml νερό. Χρησιμοποιώντας μαγνητικό αναδευτήρα προστίθενται 1,25ml διαλύματος ζελατίνης 10%. Στη συνέχεια προσθέτονται 0,5ml διαλύματος CaCl_2 100x. Κατόπιν προστίθενται 2,5ml διαλύματος NaHCO_3 (παρασκευάζεται όπως παραπάνω). Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50ml με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1N. Διατηρείται στους 37°C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες.
- Αντιπηκτικό διάλυμα ACD: Σε 1000ml νερού διαλύονται 13,65g κιτρικού οξέος, 25 gκιτρικού νατρίου και 20g δεξτρόζης.
- Διάλυμα βοείου αλβουμίνης ορού (BSA) 100mg/ml: Ποσότητα 100mg BSA ελεύθερης λιπαρών οξέων (Sigma) διαλύεται σε 1ml φυσιολογικού ορού. Φυλάσσεται στους -20°C
- Διάλυμα BSA 2,5mg/ml : Από 10ml φυσιολογικού ορού αφαιρούνται 250μL και προστίθενται 250μL BSA stock
- Ficoll-Paque (Pharmacia)
- Υγρό επίστρωσης σιλικόνης (Serva)
- Πλαστικοί σωλήνες των 50ml
- Πλαστικά σιφόνια των 20ml
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log

- pHμετρο ORION 410A
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb
- Υδρόλουτρο 37°C
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont

Αναλυτική πορεία

Απομόνωση πλυμμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50ml προστίθενται 7ml ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού, ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50ml και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 500g (~ 1800 στροφές ανά λεπτό, rpm). Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2ml Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14ml. Αναρροφούνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος (πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια, PRP) με πλαστικό σιφώνιο των 20ml και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50ml. Τοποθετείται το πλάσμα πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό πλάσματος τα 9ml για κάθε 2ml 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 20min στους 24°C στα 750g (2200rpm). 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 20ml. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Αν υπάρχουν 2 σωλήνες προστίθενται 7ml 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 14ml, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Αν υπάρχουν 3 σωλήνες προστίθενται 3ml 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 14ml του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3ml Tg EGTA pH=6,5. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα

μεταφέρεται σε 2ml Ficoll (8ml αιμοπεταλίων σε κάθε σωλήνα) και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 2400rpm. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται. Διαπερνάται το στρώμα αιμοπεταλίων με πιπέτα pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Στην συνέχεια προστίθενται ίσοι όγκοι (~ 8ml) 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 14ml και καλύπτεται με parafilm. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15min στους 24°C στα 2350rpm. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Προστίθενται 0,8ml 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 10μL τα οποία αραιώνονται με 990μL Tg pH=6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10μL 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.

Συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Σε γυάλινες κυψελίδες συσσωρευματομέτρου προστίθενται 100μL από το εναιώρημα αιμοπεταλίων και 400μL Tg Ca pH=7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1200rpm. Επωάζονται για 15min 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 2,5mg/ml και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.

Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100 % συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα, γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική 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. Υπολογίζεται το % ποσοστό αναστολής στον PAF για κάθε ποσότητα δείγματος και κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς % αναστολής σε συνάρτηση με την ποσότητα δείγματος. Από την καμπύλη αυτή, υπολογίζεται το IC50 δηλαδή η συγκεντρωση του αναστολέα που απαιτείται για το 50% της αναστολής της δράσης του PAF.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Πρώτης Μετρήσης

Το χρησιμοποιούμενόν δείγμα είναι η μαργαρίνη Βούτυ κοφ (ΕΛΑΠΕ) της οποίας η συσκευασία δίνει την περιεκτικότητα σε λιπαρά (70%) και επίσης η υγρασία θεωρείται γνωστή από τη βιβλιογραφία και ίση με 10% κατά εκτίμηση. Ζυγίστηκαν 7gr μαργαρίνης σε μικρή κανονική ψάλη, όπου σύμφωνα με τη συσκευασία περιέχονται 4,9gr ολικών λιπιδίων, οπότε συνοχτικώς προκύπτει ότι:

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 7gr

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 10%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 0,7gr

Στη συνέχεια εκχρίστηκαν τα ολικά λιπαρά της κίτρου μαργαρίνης με τη μέθοδο High-Dry, που περιλαμβάνει λιπαντικές τη μεθοδολογία, από όπου προέκυψαν 3,1gr ολικών λιπιδίων, ήτοι 72,5% των TL, ήτοι 2,5% του αρχικού δείγματος μαργαρίνης. Τα TL, που σήμερα χρησιμοποιούν πρόκειται να δύο σφάλματα, όπου ο καθένας περιέχει 2,55gr TL. Τα ολικά λιπαρά από κάθε σφάλμα αποτελούν την αρχική όλη ενέργεια της παρασκευαστικής μέτρησης. Προς συνοχτικώς η πειραματική πορεία από ακολουθήθηκε έτσι ως εξής:

Αρχικά, τα TL (2,55gr) αφού εξηχίστηκαν μέχρι ζυγιστεί σε μέρη αέριου και σταδιακά έδωσαν σε 9ml περιελαστικό στήριμα και λοιπών περιελαστικών, πιθανόως 87%, διαχωρίστηκαν με κατανομή κατά αντίστροφο (CCX). Δεν είναι αναφέρεται στη μεθοδολογία, σε κολακί (PL₂) και στήριμα (NL₂) λιπιδίων των οποίων τα βάρη έχουν ως εξής:

PL₂ = 0,6646gr (2,5% των TL)

NL₂ = 1,4554gr (57% των TL).

Στη συνέχεια, ακολουθώντας ο παρακάτω διαχωρισμός των PL₂ με τη μέθοδο της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας κατανομιλλαστική στήλη (SCX) και στήριμα δείκτης, SCX/C₁₈/MnCl₂ (60:38:2) με ροή 1ml/λεπτό. Εννοείται, μετά από άφιξη PL₂ στο δείκτη, το χρωματογράφημα (σχήμα 1) διαπιστώθηκε ότι με την κατανομή είναι αναφέρεται τον επίλυσε πλήρης διαχωρισμός των κολακί (PL₂) από το στήριμα (NL₂) λιπιδίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

Πλήρης Μαργαρίνη

Το χρησιμοποιηθέν δείγμα είναι η μαργαρίνη Βιτάμ soft (ΕΛΑΪΣ) της οποίας η συσκευασία δίνει την περιεκτικότητα σε λιπαρά (70%) και επίσης η υγρασία θεωρείται γνωστή από τη βιβλιογραφία και ίση με 10% κατά εκτίμηση. Ζυγίστηκαν 7gr μαργαρίνης σε μικρή κωνική φιάλη, όπου σύμφωνα με τη συσκευασία περιέχονται 4,9gr ολικών λιποειδών, οπότε συνοπτικά προκύπτει ότι:

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 7gr

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 10%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 0,7gr

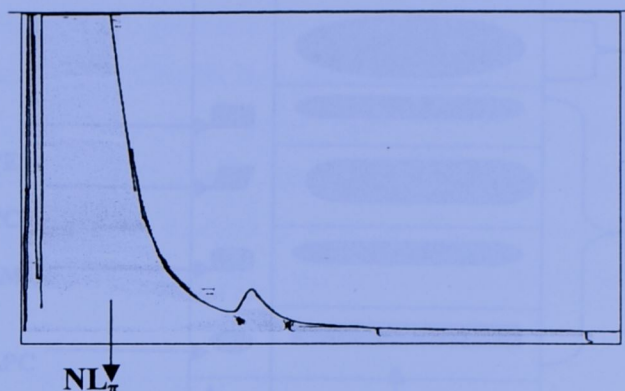
Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή της πλήρους μαργαρίνης με τη μέθοδο Bligh-Dyer, που περιγράφηκε λεπτομερώς στη μεθοδολογία, από όπου προέκυψαν 5,1gr ολικών λιποειδών (TL), τα οποία αποτελούν το 72,8% του αρχικού δείγματος μαργαρίνης. Τα TL στη συνέχεια χωρίστηκαν ισόποσα σε δύο σωλήνες, όπου ο καθένας περιείχε 2,55gr TL. Τα ολικά λιποειδή του ενός σωλήνα αποτέλεσαν την αρχική ύλη επεξεργασίας της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Έτσι, συνοπτικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Αρχικά, τα TL (2,55gr) αφού εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 9ml πετρελαϊκού αιθέρα και 3ml προεξισορροπημένης αιθανόλης 87%, διαχωρίστηκαν με κατανομή κατά αντιρροή (CCD), έτσι όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία, σε πολικά (PL_{π}) και ουδέτερα (NL_{π}) λιποειδή, των οποίων τα βάρη έχουν ως εξής:

$PL_{\pi} = 0,0646\text{gr}$ (2,5% των TL)

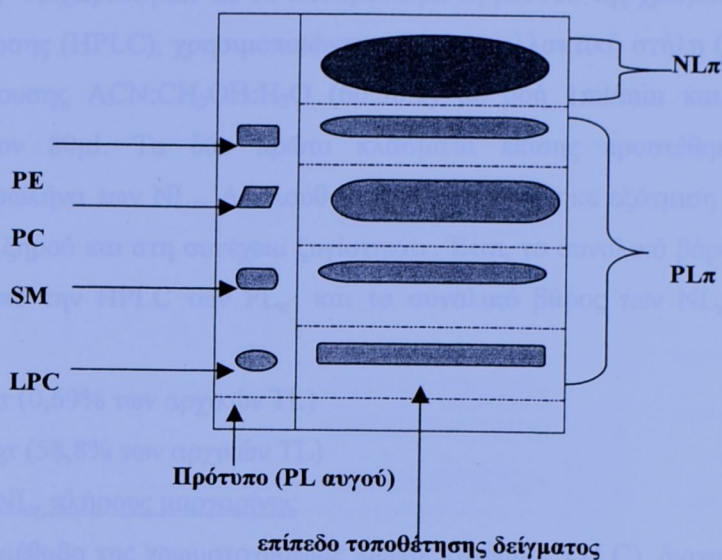
$NL_{\pi} = 1,4554\text{gr}$ (57% των TL).

Στη συνέχεια, ακολούθησε ο περαιτέρω διαχωρισμός των PL_{π} με τη μέθοδο της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας κατιοανταλλακτική στήλη (SCX) και σύστημα έκλουσης $ACN:CH_3OH:H_2O$ (60:38:2) με ροή 1ml/min. Εντούτοις, μετά από ένεση 10μl PL_{π} και μελετώντας το χρωματογράφημα (σχήμα 1) διαπιστώθηκε ότι με την κατανομή κατά αντιρροή δεν επήλθε πλήρης διαχωρισμός των πολικών (PL_{π}) από τα ουδέτερα (NL_{π}) λιποειδή.



Σχήμα 1: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των PL_π σε στήλη SCX με σύστημα έκλουσης ACN:CH₃OH:H₂O (60:38:2) v/v/v

Έτσι, για τον πλήρη διαχωρισμό των PL_{π} από τα NL_{π} προστέθηκε το κλάσμα των NL_{π} από την HPLC και ακολουθήσαμε τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), όπου σε 3 πλάκες 20*20cm στρωμένες με Silica Gel 60H τοποθετήθηκαν στην καθεμία με πιπέτα Pasteur τρεις λεπτές στρώσεις δείγματος PL_{π} στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σύστημα διαλυτών $CHCl_3:CH_3OH:H_2O$ (65:35:6). Μετά την εμφάνιση των πλακών σε ατμούς ιωδίου προέκυψε η εξής εικόνα (σχήμα 2)



Σχήμα 2: Διαχωρισμός των πολικών λιποειδών από τα ουδέτερα λιποειδή της πλήρους μαργαρίνης με TLC και σύστημα ανάσχυσης $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:35:6) v/v/v

Αποξύστηκαν οι δύο περιοχές των PL και των NL. Όσον αφορά την περιοχή των PLπ σε αυτήν ήταν ορατή η εμφάνιση 4 ζωνών που όταν συγκρίνονται με την TLC των PL του αυγού εμφανίζονται στο ίδιο ύψος οι περιοχές 1, 2, 3, 4 των PLπ με τις ενώσεις PE, PC, SM και LPC αντίστοιχα. Τα PLπ που συλλέχθηκαν από την TLC τοποθετήθηκαν σε νέο προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια ζυγίστηκαν, ενώ τα NLπ μεταφέρθηκαν στον αρχικό δοκιμαστικό σωλήνα με τα NLπ, όπου όπως και PLπ εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια ζυγίστηκαν. Έτσι τα νέα βάρη των PLπ και NLπ έχουν ως εξής:

$\text{PL}_\pi = 0,0198\text{gr}$ (3,8% των αρχικών TL)

$\text{NL}_\pi = 1,4971\text{gr}$ (57,9% των αρχικών TL).

Τα νέα PLπ είναι λιγότερα από τα αρχικά δεδομένου ότι ένα μεγάλο ποσοστό στην αρχική ποσότητα ήταν NLπ, τα οποία απομακρύθηκαν μετά την TLC. Η πορεία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια για τα PLπ είναι διαφορετική από εκείνη των NLπ.

Διαχωρισμός PLπ πλήρους μαργαρίνης

Τα PL_{π} διαχωρίστηκαν σε 12 κλάσματα με τη μέθοδο της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας κατιονταλλακτική στήλη (SCX) και σύστημα έκλουσης $ACN:CH_3OH:H_2O$ (60:38:2) με ροή 1ml/min και ενέσιμες ποσότητες των 80μl. Τα δύο πρώτα κλάσματα επίσης προστέθηκαν στον δοκιμαστικό σωλήνα των NL_{π} . Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια ζυγίστηκαν. Έτσι, το συνολικό βάρος των 10 κλασμάτων από την HPLC των PL_{π} και το συνολικό βάρος των NL_{π} είναι τα παρακάτω:

$PL_{\pi} = 0,0177\text{gr}$ (0,69% των αρχικών TL)

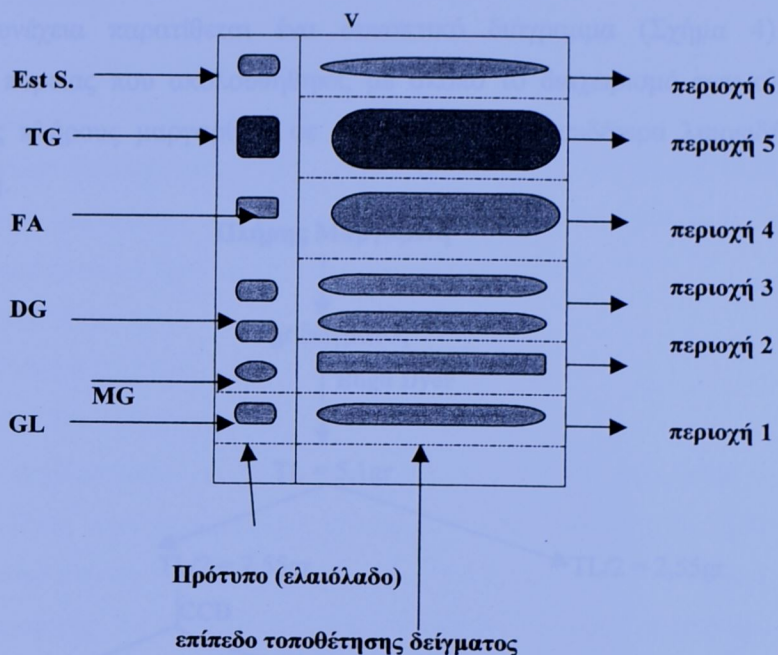
$NL_{\pi} = 1,4994\text{gr}$ (58,8% των αρχικών TL)

Διαχωρισμός NL_{π} πλήρους μαργαρίνης

Με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), διαχωρίστηκαν τα ουδέτερα λιποειδή (NL_{π}) της πλήρους μαργαρίνης στα επιμέρους κλάσματα. Σε 15 πλάκες 20x20cm στρωμένες με Silica Gel 60G τοποθετήθηκαν στην καθεμία με πιπέτα Pasteur τρεις λεπτές στρώσεις δείγματος NL_{π} και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v. Μετά την εμφάνιση των πλακών σε ατμούς ιωδίου προέκυψε η εξής εικόνα (σχήμα 3).

Αποφασίστηκαν 6 περιοχές. Η περιοχή 1 περιλαμβάνει ελαστά λιπαρά τα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα τυχόν υπάρχοντα γλυκεροειδή από τις άλλες 5 περιοχές αποξίστηκαν σύμφωνα με τη μετακίνηση των μονογλυκεριδίων (MG), διγλυκεριδίων (DG), λιπαρών οξέων (FA), τριγλυκεριδίων (TG) και εστέρων στερολών (ES) αντίστοιχα, όπως φαίνεται και από τη μορφή του χρωματογράμματος προτύπου ελαιολάδου.

Μετά την TLC οι περιοχές 2-6 φυλάσσονται στην κατάψυξη, ενώ η περιοχή 1 αναλύεται περαιτέρω με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στήλη αντάμμισης (Silica) και η έκλουση του δείγματος γίνεται με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών (τα 15 πρώτα λεπτά 100% ACN και στη συνέχεια αυξάνει η CH_3OH μέχρι να φτάσει στα 100% όπου και διατηρείται μέχρι



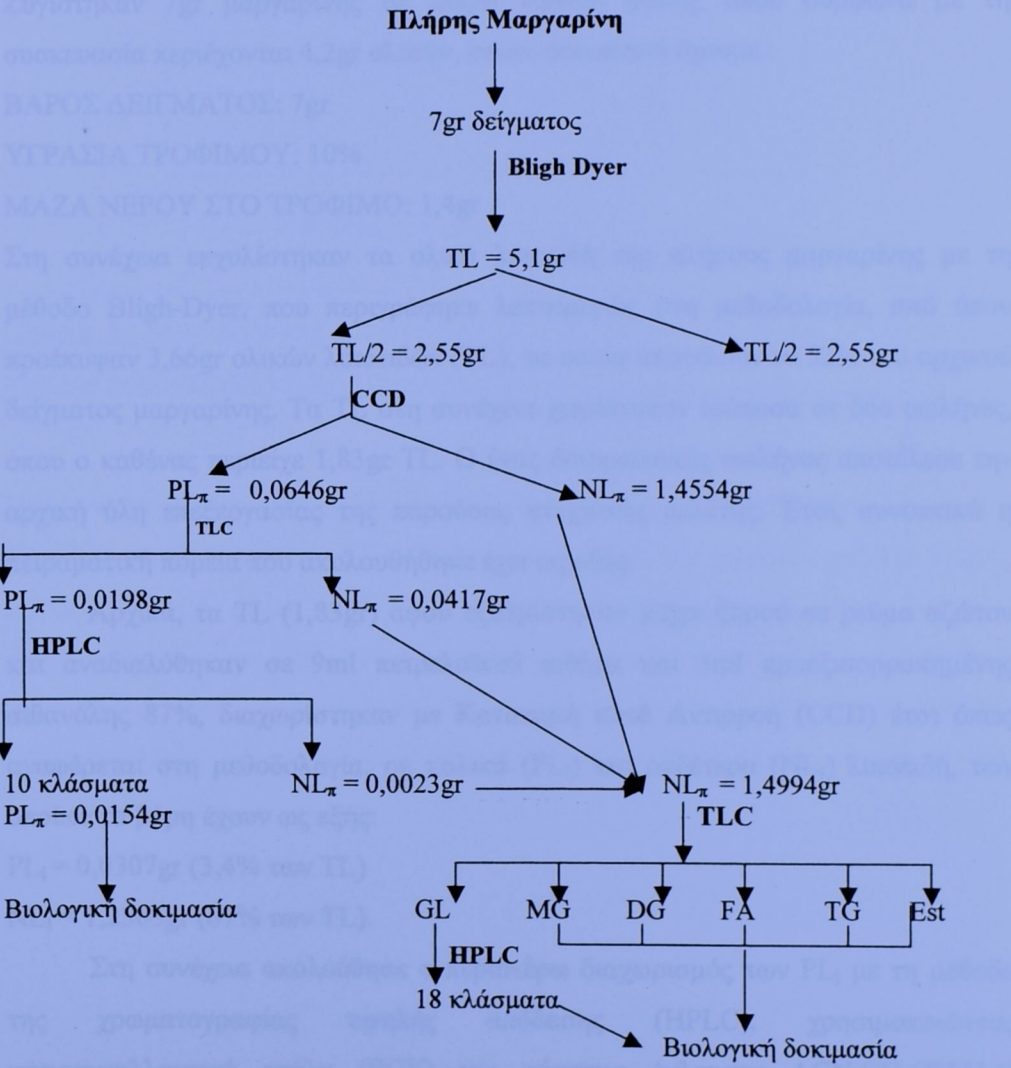
Σχήμα 3: Διαχωρισμός των ουδετέρων λιποειδών από την πλήρη μαργαρίνη με την TLC, χρησιμοποιώντας σύστημα ανάπτυξης πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v.

Αποξύστηκαν 6 περιοχές: Η περιοχή 1 περιλαμβάνει πολικά λιποειδή τα οποία συμπεριλαμβάνουν και τα τυχόν υπάρχοντα γλυκολιποειδή, ενώ οι άλλες 5 περιοχές αποξύστηκαν σύμφωνα με τη μετακίνηση των: μονογλυκεριδίων (MG), διγλυκεριδίων (DG), λιπαρών οξέων (FA), τριγλυκεριδίων (TG) και εστέρων στερολών (Est) αντίστοιχα, όπως φαίνεται και από τη μορφή του χρωματογραφήματος προτύπου ελαιολάδου.

Μετά την TLC οι περιοχές 2-6 φυλάσσονται στην κατάψυξη, ενώ η περιοχή 1 αναλύεται περαιτέρω με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στήλη προσρόφησης (Silica) και η έκλυση του δείγματος γίνεται με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών (τα 15 πρώτα λεπτά 100% ACN και στη συνέχεια αυξάνει η CH_3OH μέχρι να φτάσει το 100% όπου και διατηρείται μέχρι

το τέλος της ένεσης-σύστημα Gradient) με ροή 1ml/min και ενέσιμες ποσότητες των 60μl. Από την HPLC προκύπτουν 19 κλάσματα.

Στη συνέχεια παρατίθεται ένα συνοπτικό διάγραμμα (Σχήμα 4) της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε, με σκοπό το διαχωρισμό των ολικών λιποειδών της πλήρους μαργαρίνης σε πολικά λιποειδή, ουδέτερα λιποειδή και γλυκολιποειδή.



Σχήμα 4: Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών της πλήρους μαργαρίνης σε πολικά λιποειδή, ουδέτερα λιποειδή και γλυκολιποειδή.

2.2 Light Μαργαρίνης

Το χρησιμοποιηθέν δείγμα είναι η μαργαρίνη Βιτάμ soft light (ΕΛΑΪΣ), της οποίας η συσκευασία δίνει την περιεκτικότητα σε λιπαρά (60%) και επίσης η υγρασία θεωρείται γνωστή από τη βιβλιογραφία και ίση με 20% κατά εκτίμηση. Ζυγίστηκαν 7gr μαργαρίνης σε μικρή κωνική φιάλη, όπου σύμφωνα με τη συσκευασία περιέχονται 4,2gr ολικών, οπότε συνοπτικά έχουμε :

ΒΑΡΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ: 7gr

ΥΓΡΑΣΙΑ ΤΡΟΦΙΜΟΥ: 10%

ΜΑΖΑ ΝΕΡΟΥ ΣΤΟ ΤΡΟΦΙΜΟ: 1,4gr

Στη συνέχεια εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή της πλήρους μαργαρίνης με τη μέθοδο Bligh-Dyer, που περιγράφηκε λεπτομερώς στη μεθοδολογία, από όπου προέκυψαν 3,66gr ολικών λιποειδών (TL), τα οποία αποτελούν το 52% του αρχικού δείγματος μαργαρίνης. Τα TL στη συνέχεια χωρίστηκαν ισόποσα σε δύο σωλήνες, όπου ο καθένας περιείχε 1,83gr TL. Ο ένας δοκιμαστικός σωλήνας αποτέλεσε την αρχική ύλη επεξεργασίας της παρούσας πτυχιακής μελέτης. Έτσι, συνοπτικά η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε έχει ως εξής:

Αρχικά, τα TL (1,83gr) αφού εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκαν σε 9ml πετρελαϊκού αιθέρα και 3ml προεξιsorροπημένης αιθανόλης 87%, διαχωρίστηκαν με Κατανομή κατά Αντιρροή (CCD) έτσι όπως αναφέρεται στη μεθοδολογία, σε πολικά (PL_1) και ουδέτερα (NL_1) λιποειδή, των οποίων τα βάρη έχουν ως εξής:

$PL_1 = 0,0307\text{gr}$ (3,4% των TL)

$NL_1 = 1,2365\text{gr}$ (67% των TL).

Στη συνέχεια ακολούθησε ο περαιτέρω διαχωρισμός των PL_1 με τη μέθοδο της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας κατιοανταλλακτική στήλη (SCX) και σύστημα έκλουσης $ACN:CH_3OH:H_2O$ (60:38:2) με ροή 1ml/min. Εντούτοις, μετά από ένεση 15μl PL_1 και μελετώντας το χρωματογράφημα (σχήμα 5) διεξήχθη το συμπέρασμα ότι με την Κατανομή κατά Αντιρροή δεν επήλθε πλήρης διαχωρισμός των πολικών (PL_1) από τα ουδέτερα (NL_1) λιποειδή.

Τα PL₁ διαχωρίστηκαν σε 12 κλάσματα με τη μέθοδο της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας κατιον ανταλλακτική στήλη (SCX) και σύστημα έκλουσης ACN:CH₃OH:H₂O (60:38:2) με ροή 1ml/min και ενέσιμες ποσότητες των 70μl. Το πρώτο κλάσμα επίσης προστέθηκε στον δοκιμαστικό σωλήνα των NL_π. Ακολούθως πραγματοποιήθηκε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια ζυγίστηκαν. Έτσι, το συνολικό βάρος των 11 κλασμάτων από την HPLC των PL₁ και το συνολικό βάρος των NL₁ είναι τα παρακάτω:

PL₁ = 0,0136gr (0,74% των αρχικών TL)

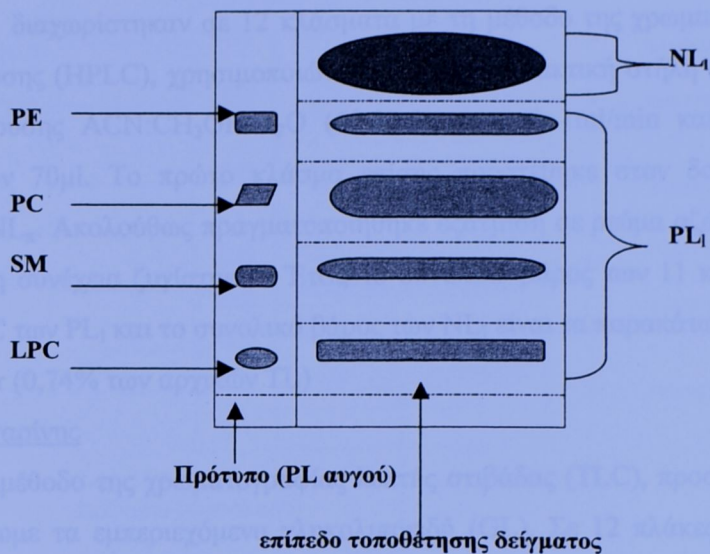
NL₁ light μαργαρίνης

Με τη μέθοδο της χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC), προσπαθήσαμε να διαχωρίσουμε τα εμπεριεχόμενα γλυκολιποειδή (GL). Σε 12 πλάκες 20x20cm στρωμένες με Silica Gel 60G τοποθετήθηκαν στην καθεμία με πιπέτα Pasteur τρεις λεπτές στρώσεις δείγματος NL₁ και στη συνέχεια αναπτύχθηκαν σε σύστημα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1). Μετά την εμφάνιση των πλακών σε ατμούς ιωδίου προέκυψε η εξής εικόνα (σχήμα 7).

Αποδείχτηκαν 6 περιοχές. Η περιοχή 1 περιλαμβάνει κυρίως λιπαρά τα οποία παρατηρούνται και τα τρία υπόλοιπα γλυκολιποειδή, ενώ οι άλλες 5 περιοχές αποδείχτηκαν σύμφωνα με τη μετακίνησή των μονο/δι/τρι/τετρα/πενταγλυκεριδίων (DG), λιπαρών οξίων (FA), τριγλυκεριδίων (TG) και στέριων στερολών (Est) αντίστοιχα, όπως φαίνεται και από τη μορφή του χρωματογράμματος αντίστοιχου ελαιολάδου.

Μετά την TLC οι περιοχές 2-6 φυλάσσονται στην κατάψυξη, ενώ η περιοχή 1 αναλύεται περαιτέρω με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στήλη προσρόφησης (Silica) και η έκλουση του δείγματος γίνεται με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών (τις 15 πρώτα λεπτά 100% ACN και στη συνέχεια αυξάνει η CH₃OH μέχρι να φτάσει στο 100% όπου και διατηρείται μέχρι το τέλος της διακρί-συστήμας Gradient) με ροή 1ml/min και ενέσιμες ποσότητες των 70μl. Από την HPLC προέκυψαν 18 κλάσματα.

Στη συνέχεια παρατίθεται ένα συνοπτικό διάγραμμα της παραγωγής κορεάς (Σχήμα 8) που ακολουθήθηκε με σκοπό το διαχωρισμό των οξέων



Σχήμα 6: Διαχωρισμός των πολικών λιποειδών από τα ουδέτερα λιποειδή της light μαργαρίνης με TLC και σύστημα ανάπτυξης $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (65:35:6) v/v/v

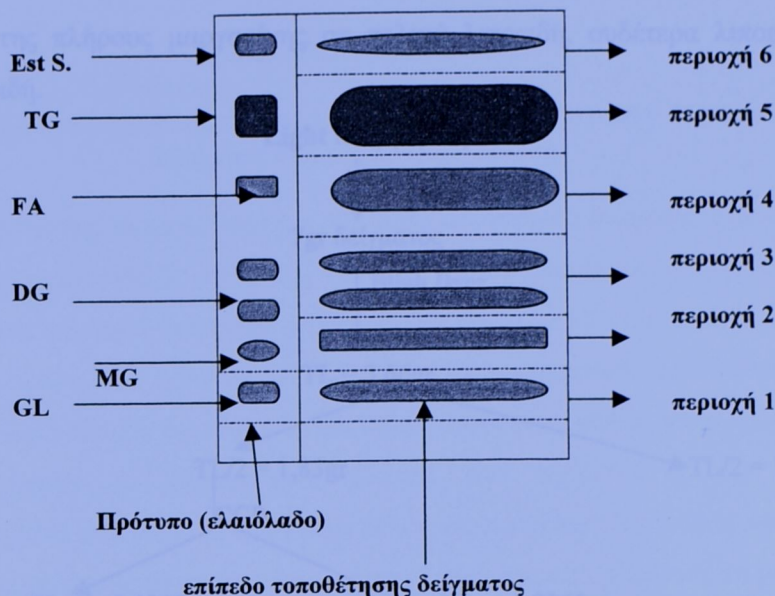
Αποξύστηκαν οι δύο περιοχές των PL και των NL. Όσον αφορά την περιοχή των PL_1 , σε αυτήν ήταν ορατή η εμφάνιση 4 ζωνών που όταν συγκρίνονται με την TLC των PL του αυγού εμφανίζονται στο ίδιο ύψος οι περιοχές 1, 2, 3, 4 των PL_1 , με τις ενώσεις PE, PC, SM και LPC αντίστοιχα. Τα PL_1 που συλλέχθηκαν από την TLC τοποθετήθηκαν σε νέο προζυγισμένο δοκιμαστικό σωλήνα εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια ζυγίστηκαν, ενώ τα NL_1 μεταφέρθηκαν στον αρχικό δοκιμαστικό σωλήνα με τα NL_1 , όπου όπως και PL_1 εξατμίστηκαν σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια ζυγίστηκαν. Έτσι τα νέα βάρη των PL_1 και NL_1 έχουν ως εξής:

$$\text{PL}_\pi = 0,0251\text{gr} \text{ (4,6\% των αρχικών TL)}$$

$$\text{NL}_\pi = 1,2365\text{gr} \text{ (67,6\% των αρχικών TL)}.$$

Τα νέα PL_1 είναι λιγότερα από τα αρχικά δεδομένου ότι ένα μεγάλο ποσοστό στην αρχική ποσότητα ήταν NL_1 , τα οποία απομακρύθηκαν μετά την TLC. Η πορεία που ακολουθήθηκε στη συνέχεια για τα PL_1 είναι διαφορετική από εκείνη των NL_1 .

Διαχωρισμός PL_π light μαργαρίνης



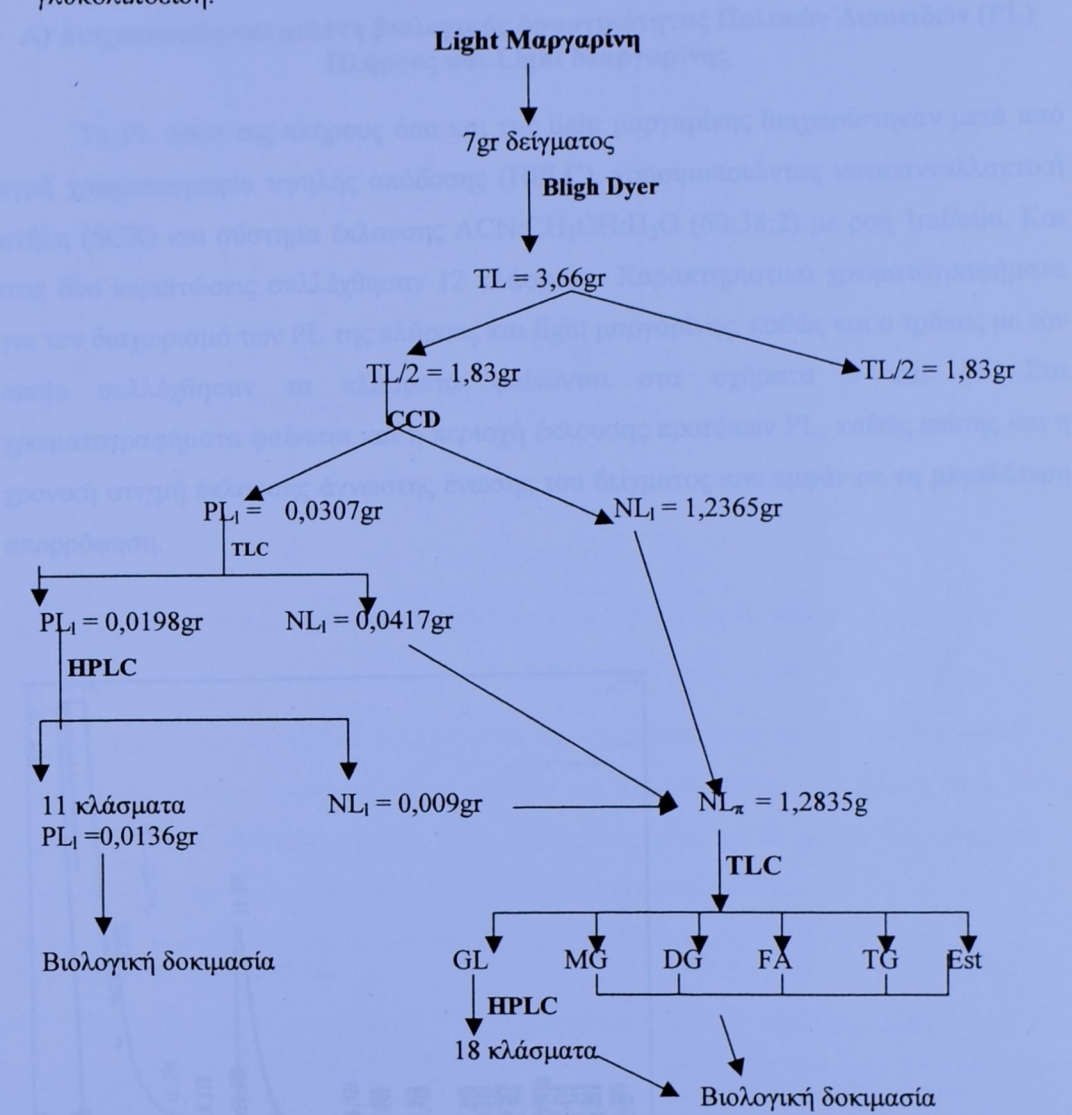
Σχήμα 7: Διαχωρισμός των ουδετέρων λιποειδών από την πλήρη μαργαρίνη με την TLC, χρησιμοποιώντας σύστημα ανάπτυξης πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v.

Αποξύστηκαν 6 περιοχές: Η περιοχή 1 περιλαμβάνει πολικά λιποειδή τα οποία συμπεριλαμβάνουν και τα τυχόν υπάρχοντα γλυκολιποειδή, ενώ οι άλλες 5 περιοχές αποξύστηκαν σύμφωνα με τη μετακίνηση των: μονογλυκεριδίων (MG), διγλυκεριδίων (DG), λιπαρών οξέων (FA), τριγλυκεριδίων (TG) και εστέρων στερολών (Est) αντίστοιχα, όπως φαίνεται και από τη μορφή του χρωματογραφήματος προτύπου ελαιολάδου.

Μετά την TLC οι περιοχές 2-6 φυλάσσονται στην κατάψυξη, ενώ η περιοχή 1 αναλύεται περαιτέρω με χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στήλη προσρόφησης (Silica) και η έκλυση του δείγματος γίνεται με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών (τα 15 πρώτα λεπτά 100% ACN και στη συνέχεια αυξάνει η CH_3OH μέχρι να φτάσει το 100% όπου και διατηρείται μέχρι το τέλος της ένεσης-σύστημα Gradient) με ροή 1ml/min και ενέσιμες ποσότητες των 70μl. Από την HPLC προκύπτουν 18 κλάσματα.

Στη συνέχεια παρατίθεται ένα συνοπτικό διάγραμμα της πειραματικής πορείας (Σχήμα 8) που ακολουθήθηκε με σκοπό το διαχωρισμό των ολικών

λιποειδών της πλήρους μαργαρίνης σε πολικά λιποειδή, ουδέτερα λιποειδή και γλυκολιποειδή.

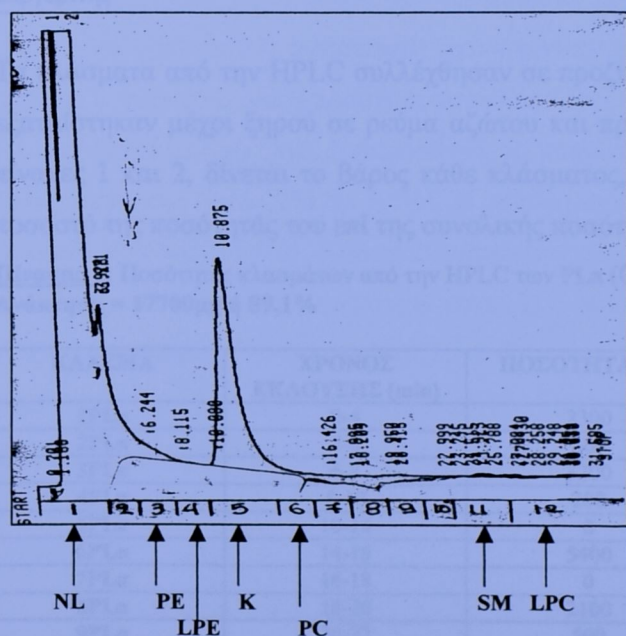


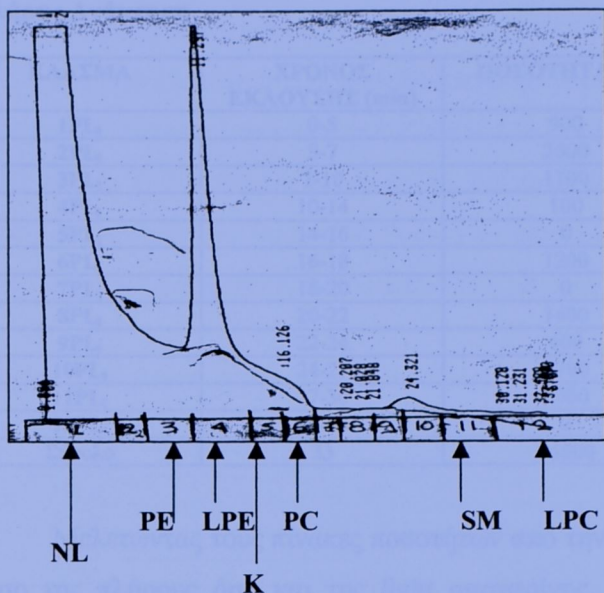
Σχήμα 8: Διαχωρισμός των ολικών λιποειδών της light μαργαρίνης σε πολικά λιποειδή, ουδέτερα λιποειδή και γλυκολιποειδή.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A) Διαχωρισμός και μελέτη βιολογικής δραστηρότητας Πολικών Λιποειδών (PL) Πλήρους και Light Μαργαρίνης

Τα PL τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης διαχωρίστηκαν μετά από υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας κατιοανταλλακτική στήλη (SCX) και σύστημα έκλουσης ACN:CH₃OH:H₂O (60:38:2) με ροή 1ml/min. Και στις δύο περιπτώσεις συλλέχθηκαν 12 κλάσματα. Χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα για τον διαχωρισμό των PL της πλήρους και light μαργαρίνης, καθώς και ο τρόπος με τον οποίο συλλέχθηκαν τα κλάσματα φαίνονται στα σχήματα 9 και 10. Στα χρωματογραφήματα φαίνεται και η περιοχή έκλουσης προτύπων PL, καθώς επίσης και η χρονική στιγμή έκλουσης άγνωστης ένωσης του δείγματος που εμφάνισε τη μεγαλύτερη απορρόφηση.





Σχήμα 10: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα για τον διαχωρισμό των PL της light μαργαρίνης

Τα κλάσματα από την HPLC συλλέχθηκαν σε προζυγισμένους δοκιμαστικούς σωλήνες , εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και προσδιορίστηκε το βάρος τους. Στους πίνακες 1 και 2, δίνεται το βάρος κάθε κλάσματος, μαζί με το χρόνο έκλουσης και το ποσοστό της ποσότητάς του επί της συνολικής ποσότητας των PL.

Πίνακας 1: Ποσότητες κλασμάτων από την HPLC των PLπ (Ολικά PL = 19800μg)
Ανάκτηση = 17700μg ή 89,1%

ΚΛΑΣΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μg)	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
1PLπ	0-4	2300	11,6
2PLπ	4-6	400	2
3PLπ	6-8	3200	16
4PLπ	8-10	200	1
5PLπ	10-14	0	0
6PLπ	14-16	5400	27
7PLπ	16-18	0	0
8PLπ	18-20	2100	11
9PLπ	20-22	500	2,5
10PLπ	22-24	0	0
11PLπ	24-27	3600	18
12PLπ	27-32	0	0
Σύνολο	32	17700	89,1

Πίνακας 2: Ποσότητες κλασμάτων από την HPLC των PL_I (Ολικά PL = 13600μg)

Πλήρης Ανάκτηση

ΚΛΑΣΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΕΚΛΟΥΣΗΣ (min)	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (μg)	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
1PL _I	0-5	900	6,6
2PL _I	5-7	2600	19
3PL _I	7-10	1700	12,5
4PL _I	10-14	100	0,73
5PL _I	14-16	0	0
6PL _I	16-18	1200	8,8
7PL _I	18-20	0	0
8PL _I	20-22	1400	10
9PL _I	22-24	600	4,4
10PL _I	24-27	3700	27
11PL _I	27-30	2300	17
12PL _I	30-33	0	0
Σύνολο	33	14500	106

Μελετώντας τους πίνακες ποσοτήτων από την HPLC των πολικών λιποειδών (PL) τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης, παρατηρείται ότι τα ποσοστά των εκλουόμενων κλασμάτων είναι παρόμοια για τις περιοχές συλλογής 3, 4, 5, 7, 8, 9, 11, και 12. Αντίθετα, τα ποσοστά των κλασμάτων 2 και 10 είναι μεγαλύτερα στη light μαργαρίνη (19 και 27, αντίστοιχα) από ότι στην πλήρη όπου το μεν ποσοστό για το κλάσμα 2 ήταν 2%, ενώ η ποσότητα του κλάσματος 10 ήταν πολύ μικρή και δεν μπόρεσε να ανιχνευθεί από το ζυγό. Επιπρόσθετα, το ποσοστό του κλάσματος 6 έχει μειωθεί στη light μαργαρίνη (από 27% σε 8,8%). Η μείωση στο κλάσμα 6 της light μαργαρίνης και αντίστοιχα η αύξηση στο κλάσμα 10, εξηγείται από το γεγονός ότι αν θεωρήσουμε πως πράγματι το κλάσμα 6 αντιστοιχεί στην PC, όπως έχει φανεί από χρωματογραφική ανάλυση πρότυπης ένωσης (πολικά λιποειδή αυγού), τότε οι μεταβολές αυτές μπορεί να οφείλονται στο ότι κατά την επεξεργασία της πλήρους μαργαρίνης για να γίνει light, ενδεχομένως οξειδώνεται η PC, με αποτέλεσμα να μειώνεται το κλάσμα 6 και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή τα οποία προκύπτουν να εκλούνται σε μεταγενέστερο χρόνο (24-27 λεπτά).

Στη συνέχεια ακολούθησε βιολογική δοκιμασία (η ακριβής πορεία αναφέρεται στη μεθοδολογία), για τα 11 κλάσματα των PL τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης, με σκοπό την ανεύρεση του αν, τελικά, τα κλάσματα προκαλούν συσσώρευση των αιμοπεταλίων ή αναστολή της δράσης του PAF. Από κάθε κλάσμα χρησιμοποιήθηκε η μισή ποσότητα (0,5ml) η οποία εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και στη συνέχεια αναδιαλύθηκε σε 200λ BSA. Ο έλεγχος της βιολογικής

δραστηριότητας του πρώτου κλάσματος δεν πραγματοποιήθηκε, διότι μετά την HPLC, προστέθηκε στα συνολικά NL.

Για όσα κλάσματα είχε προσδιοριστεί το βάρος τους, το IC₅₀ υπολογίζεται σε µg κλάσματος. Αντίθετα, στα κλάσματα στα οποία δεν είχε προσδιοριστεί το βάρος τους, το IC₅₀ και το EC₅₀ υπολογίζεται ως % ποσοστό του συνολικού κλάσματος. Έτσι, τα αποτελέσματα από τη βιολογική δοκιμασία των κλασμάτων των PL της πλήρους και light μαργαρίνης φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 3 και 4.

Πίνακας 3: Βιολογική δραστηριότητα των κλασμάτων που προήλθαν από το διαχωρισμό των PL της πλήρους μαργαρίνης.

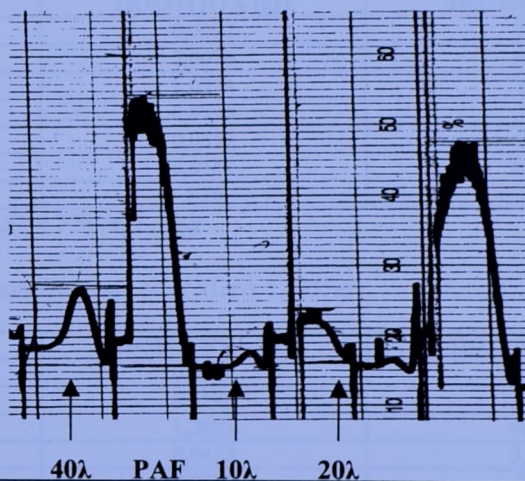
ΚΛΑΣΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	IC ₅₀	EC ₅₀
2PLπ	Αναστολή	31,4 µg	-
3PLπ	Αναστολή	116 µg	-
4PLπ	Αναστολή	13,4 µg	-
5PLπ	Αναστολή	4,9 % αρχικής ποσότητας	-
6PLπ	Αναστολή	265 µg	-
7PLπ	Αναστολή	9,4 % αρχικής ποσότητας	-
8PLπ	Αναστολή	182 µg	-
9PLπ	Αναστολή	31 µg	-
10PLπ	Αναστολή	9,6 % αρχικής ποσότητας	-
11PLπ	Αναστολή	454 µg	-
12PLπ	Αναστολή	6,1 % αρχικής ποσότητας	-

Πίνακας 4: Βιολογική δραστηριότητα των κλασμάτων που προήλθαν από το διαχωρισμό των PL της Light Μαργαρίνης

ΚΛΑΣΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	IC ₅₀	EC ₅₀
2PL _l	Αναστολή	310 µg	-
3PL _l	Αναστολή	67,5 µg	-
4PL _l	Αναστολή	3,4375 µg	-
5PL _l	αντιστρεπτή συσσώρευση	-	0,1125% αρχικής ποσότητας
6PL _l	Αναστολή	56 µg	-
7PL _l	Αναστολή	60,5 µg	-
8PL _l	Αναστολή	29 µg	-
9PL _l	Αναστολή	143 µg	-
10PL _l	Αναστολή	259 µg	-
11PL _l	Αναστολή	0,065 µg	-
12PL _l	-	-	-

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη σύγκριση των πινάκων 3 και 4 είναι τα ακόλουθα. Τα κλάσματα των PL από την HPLC της πλήρους μαργαρίνης προκαλούν όλα αναστολή σε αντίθεση με τα τα κλάσματα των PL της light μαργαρίνης, όπου ένα κλάσμα (5PL_l) προκαλεί αντιστρεπτή συσσώρευση και μάλιστα δοσοεξαρτώμενη, εφόσον όσο αυξανόταν η ποσότητα (10λ, 20, 40λ) τόσο πιο ισχυρή ήταν η συσσώρευση (αύξηση του ύψους της καμπύλης – σχήμα 11). Επιπλέον, τα κλάσματα 2 και 10 της

πλήρους μαργαρίνης είναι καλύτεροι αναστολείς από τα αντίστοιχα κλάσματα της light μαργαρίνης, εφόσον έχουν μικρότερο IC50 (31,4 και 0,095μg αντίστοιχα), δηλαδή σε πολύ μικρότερες ποσότητες συγκριτικά με τα αντίστοιχα κλάσματα της light μαργαρίνης, μπορούν να προκαλέσουν αναστολή. Αντίθετα, τα κλάσματα 3, 4, 6 και 8 της light μαργαρίνης είναι ισχυρότεροι αναστολείς (μικρότερα IC50: 67,5, 3,4375, 56,60,5 αντίστοιχα) συγκριτικά με τα αντίστοιχα κλάσματα της πλήρους μαργαρίνης (IC50:116, 13,4, 265 και 182 αντίστοιχα). Τέλος, παρόμοια αναστολή (παρόμοια IC50) προκαλούν τα κλάσματα 5, 7, ενώ το κλάσμα 12 της light μαργαρίνης δεν είναι βιολογικά δραστικό. Στη συνέχεια παρατίθεται ένα χαρακτηριστικό διάγραμμα της συσσώρευσης που προκαλείται από το κλάσμα 5PL₁ της light μαργαρίνης (σχήμα 11).



Σχήμα 11: Βιολογική δραστηριότητα του κλάσματος 5PL₁ που προήλθε από το διαχωρισμό με HPLC των PL light μαργαρίνης.

Β) Διαχωρισμός και μελέτη ποσοτήτων και βιολογικής δραστηρότητας Περιοχών από την TLC των Ουδετέρων Λιποειδών (NL) Πλήρους και Light Μαργαρίνης

Μετά από χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v των NL τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης, πραγματοποιήθηκε με σκοπό τον περαιτέρω διαχωρισμό των ουδετέρων λιποειδών. Από τη ζύγιση των αντίστοιχων περιοχών προκύπτουν τα εξής αποτελέσματα (πίνακες 5, 6).

Πίνακας 5: Περιοχές από την TLC των NLπ με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v (NLπ = 1,4994gr)

ΜΠΑΝΤΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (gr)	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
Περιοχή 1	0,0092	0,6
Περιοχή 2	0,0076	0,5
Περιοχή 3	1,0354	69
Περιοχή 4	0,0396	2,6
Περιοχή 5	0,0557	3,7
Περιοχή 6	0,0144	0,96
Σύνολο	1,16	77

Ανάκτηση NLπ από TLC = 77% ή 1,16gr

Πίνακας 6: Περιοχές από την TLC των NL₁ (NLπ = 1,2835gr)

ΜΠΑΝΤΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (gr)	ΠΟΣΟΣΤΟ (%)
Περιοχή 1	0,0222	1,73
Περιοχή 2	0,0193	1,5037
Περιοχή 3	1,2632	98,4
Περιοχή 4	0,0453	3,53
Περιοχή 5	0,0281	2,2
Περιοχή 6	0,0086	0,7
Σύνολο	1,3867	108%

Πλήρης Ανάκτηση NL₁ από TLC

Παρατηρείται ότι η συνολική ποσότητα των περιοχών από την TLC των NL₁ είναι περισσότερη από την αρχική. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην παρουσία υπολειμμάτων της silica. Επειδή η απόκλιση είναι μικρή δε λαμβάνεται υπόψιν στους υπολογισμούς.

Από τη ποσοτική σύγκριση των περιοχών τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης παρατηρείται ότι και στις δύο περιπτώσεις, σε μεγαλύτερη ποσότητα βρίσκεται η περιοχή 3 που αντιστοιχεί στην περιοχή εμφάνισης των DG όταν χρησιμοποιείται ελαιόλαδο. Αντίθετα, οι περιοχές 5, 6 υπάρχουν σε μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα της πλήρους μαργαρίνης, ενώ οι περιοχές 1, 2, 4 υπερτερούν στο δείγμα της light μαργαρίνης. Γενικά η ποσοτική κατάταξη των περιοχών και στα δύο δείγματα έχει ως εξής:

Πλήρης Μαργαρίνη: περιοχή 3> περιοχή 5> περιοχή 4> περιοχή 6> περιοχή 1 περιοχή >2

Light Μαργαρίνη: περιοχή 3> περιοχή 4> περιοχή 5> περιοχή 2> περιοχή 1 >περιοχή 6

Οι περιοχές που προέκυψαν από την TLC της πλήρους και light μαργαρίνης των ουδετέρων λιποειδών ακολούθησαν βιολογική δοκιμασία σε πλύμενα αιμοπετάλια κουνελιού. Η μισή ποσότητα από κάθε περιοχή εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύθηκε σε 300λ BSA με εξαίρεση την περιοχή 4, όπου λόγω μεγάλης ποσότητας αναδιαλύθηκε σε 500λ BSA.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα από τη βιολογική δοκιμασία των κλασμάτων των περιοχών της TLC της πλήρους και light μαργαρίνης αυτά φαίνονται αναλυτικά στους πίνακες 7 και 8.

Πίνακας 7: Βιολογική δραστικότητα των Περιοχών από την TLC των NLπ με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v (NLπ = 1,4994gr) : πλήρης μαργαρίνης.

ΚΛΑΣΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	IC50 (μg)	EC50 (μg)
Περιοχή 2	αναστολή	72,2	-
Περιοχή 3	αναστολή	9491	-
Περιοχή 4	αναστολή	805	-
Περιοχή 5	αντιστρεπτή συσσώρευση	-	228
Περιοχή 6	αντιστρεπτή συσσώρευση	-	240

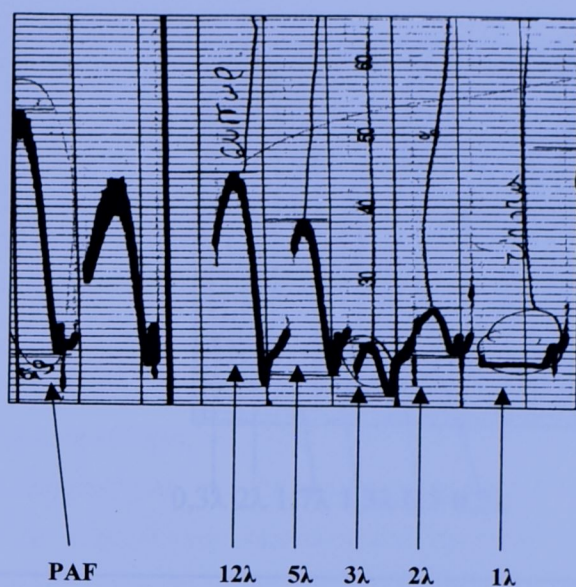
Πίνακας 8: Βιολογική δραστικότητα των περιοχών από την TLC των NLπ με σύστημα διαλυτών πετρελαϊκό αιθέρα: διαίθυλο αιθέρα: οξικό οξύ (70:30:1) v/v/v (NLπ = 1,4994gr) ::

ΚΛΑΣΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	IC50 (μg)	EC50 (μg)
Περιοχή 2	αναστολή	73,15	-
Περιοχή 3	αναστολή	29,475	-
Περιοχή 4	αντιστρεπτή συσσώρευση	-	60,4
Περιοχή 5	αναστολή	78,68	-
Περιοχή 6	αναστολή	186	-

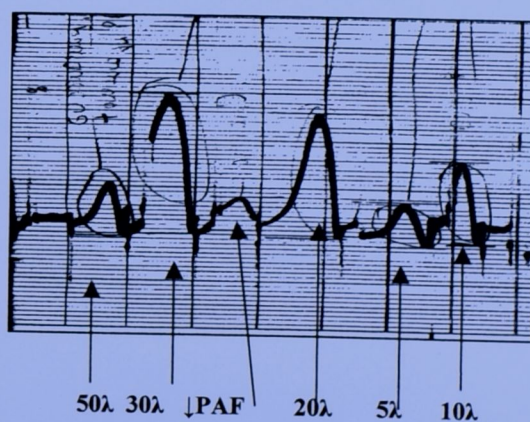
Στους πίνακες 7 και 8 δεν παρατίθενται τα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας της περιοχής 1 εφόσον, αυτή αναλύθηκε περαιτέρω με HPLC και μετά υπέστη βιολογική δοκιμασία.

Όσον αφορά τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη σύγκριση των πινάκων 7 και 8 είναι ότι τόσο στην πλήρη όσο και στη light μαργαρίνη οι περιοχές 2 προκαλούν παρόμοια αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (παρόμοια IC50, 72,2μg και

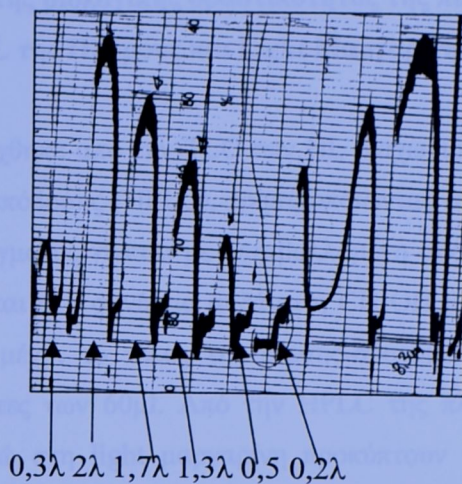
73,15μg αντίστοιχα). Επίσης, και οι περιοχές 3 προκαλούν αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, όμως η περιοχή 3 της light μαργαρίνης είναι ισχυρότερος αναστολέας (μικρότερο IC₅₀, 29,475μg). Επιπρόσθετα, στη περίπτωση της πλήρους μαργαρίνης η περιοχή 4 είναι ασθενής αναστολέας (μεγάλο IC₅₀, 805μg), ενώ αντίθετα η περιοχή 4 της light μαργαρίνης προκαλεί ισχυρή συσσώρευση, αφού σε πολύ μικρή ποσότητα προκαλεί συσσώρευση (EC₅₀ = 60,4μg). Τέλος, ισχυρή συσσώρευση προκαλούν και οι περιοχές 5, 6 της πλήρους μαργαρίνης (EC₅₀ 228μg και 240μg αντίστοιχα). Στην περίπτωση αντίθετα της light μαργαρίνης οι ίδιες περιοχές προκαλούν αναστολή. Στη συνέχεια, παρατίθενται σχήματα με τις συσσωρεύσεις που προκάλεσαν οι ζώνες από την TLC των NL της πλήρους και της light μαργαρίνης (σχήματα 12, 13 και 14)



Σχήμα 12: Βιολογική δραστηριότητα της περιοχής 5 που προήλθε από το διαχωρισμό με TLC των NL της πλήρους μαργαρίνης



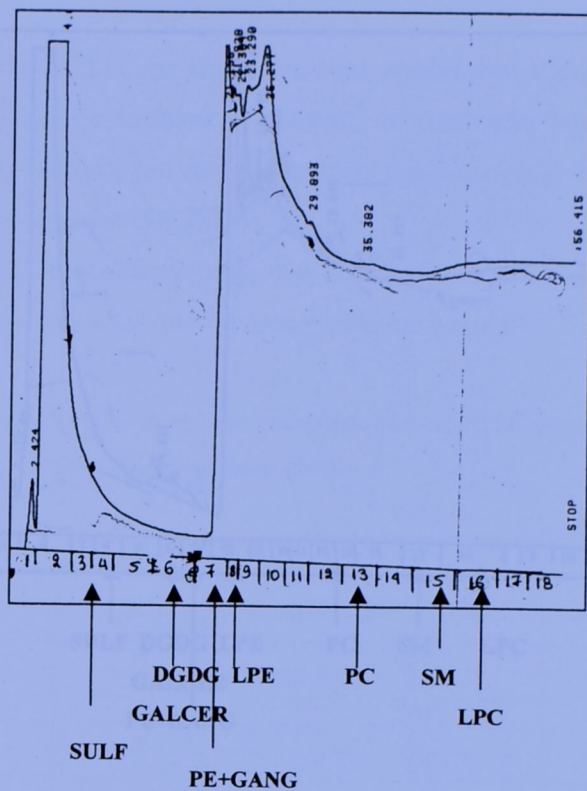
Σχήμα 13: Βιολογική δραστηριότητα της περιοχής 6 που προήλθε από το διαχωρισμό με TLC των NL της πλήρους μαργαρίνης



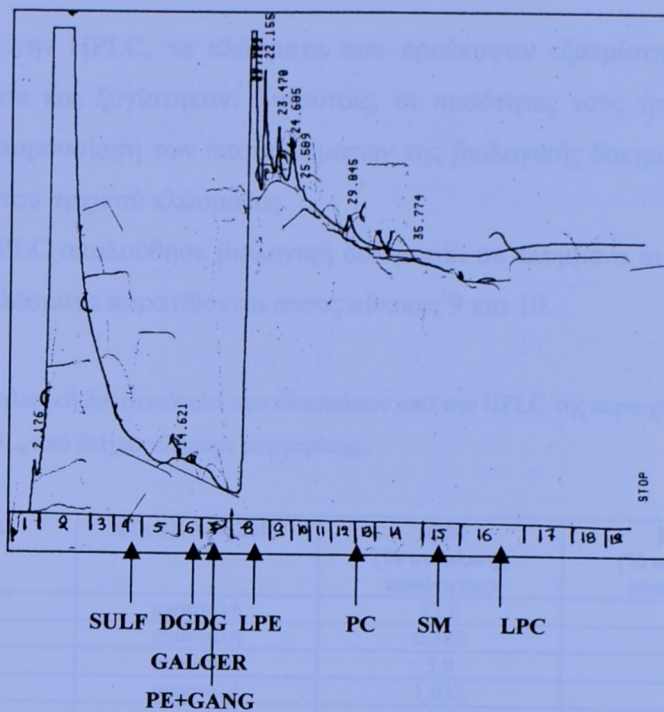
Σχήμα 14: Βιολογική δραστικότητα της περιοχής 4 που προήλθε από το διαχωρισμό με TLC των NL της light μαργαρίνης

Γ) Διαχωρισμός και μελέτη της βιολογικής δραστηριότητας της περιοχής 1 από την TLC των NL της Πλήρους και Light Μαργαρίνης

Η περιοχή 1 που συλλέχθηκε από την TLC των NL διαχωρίστηκε με τη μέθοδο της χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), χρησιμοποιώντας στήλη προσρόφησης (Silica) και η έκλουση του δείγματος γίνεται με μεταβαλλόμενη σύσταση διαλυτών (τα 15 πρώτα λεπτά 100% ACN και στη συνέχεια αυξάνει η CH₃OH μέχρι να φτάσει στο 100%, όπου και διατηρείται μέχρι το τέλος της ένεσης-σύστημα Gradient) με ροή 1ml/min και ενέσιμες ποσότητες των 60μl. Από την HPLC της πλήρους μαργαρίνης προκύπτουν 19 κλάσματα, ενώ στη light μαργαρίνη προκύπτουν 18 κλάσματα. Στα σχήματα 15 και 16 παρατίθενται κάποια χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία. Επιπλέον, στα χρωματογραφήματα φαίνονται και οι χρόνοι έκλουσης πρότυπων ενώσεων.



Σχήμα 15: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα για την περιοχή 1 από την TLC των NL₁ της light μαργαρίνης.



Σχήμα 16: Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα για την περιοχή 1 από την TLC των ΝΛπ της πλήρους μαργαρίνης.

Μετά την HPLC, τα κλάσματα που προέκυψαν εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και ζυγίστηκαν. Εντούτοις, οι ποσότητες τους ήταν μη ανιχνεύσιμες. Συνεπώς, η παρουσίαση των αποτελεσμάτων της βιολογικής δοκιμασίας θα εκφραστούν ως ποσοστά του αρχικού κλάσματος.

Μετά την HPLC ακολούθησε βιολογική δοκιμασία σε πλυμμένα αιμοπετάλια κουνελιού και τα αποτελέσματα παρατίθενται στους πίνακες 9 και 10.

Πίνακας 9: Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων από την HPLC της περιοχής 1 που συλλέχθηκε από την TLC των NL_π από δείγμα πλήρους μαργαρίνης..

ΚΛΑΣΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	IC50 (% συνολικής ποσότητας)	EC50 (% συνολικής ποσότητας)
1GLπ	αναστολή	12,0	-
2GLπ	αναστολή	0,385	-
3GLπ	αναστολή	5,9	-
4GLπ	αναστολή	1,032	-
5GLπ	αναστολή	4,0	-
6GLπ	αναστολή	4,4	-
7GLπ	αναστολή	1,43	-
8GLπ	αναστολή	5,2	-
9GLπ	αναστολή	3,5	-
10GLπ	αναστολή	6,25	-
11αGL	αναστολή	7,6	-
12GLπ	αναστολή	1,8	-
13GLπ	αναστολή	6,0	-
14GLπ	αναστολή	6,0	-
15GLπ	αναστολή	4,4	-
16GLπ	Αντιστρεπτή συσσώρευση	-	0,8
17GLπ	αναστολή	7,5	-
18GLπ	-	-	-
19GLπ	αναστολή	14,25	-

αποφασίστηκαν κατά τη βιολογική δοκιμασία των κλασμάτων από την HPLC των NL της κλάσης και light μαργαρίνης, όπου στα σημαντικά ήταν και η παρουσία συσσωρεύσεων στο κλάσμα 16 (αντιστρεπτή συσσώρευση) της κλάσης μαργαρίνης και στο κλάσμα 14 (μη αντιστρεπτή συσσώρευση) της light μαργαρίνης. Και τα δύο είδη συσσωρεύσεων είναι κερδές εφόσον τα κλάσματα 16 και 14 σε πολύ μικρές ποσότητες μπορούν να προκαλέσουν συσσώρευση (μικρό EC50: 0,02μg και 0,05μg αντίστοιχα.)

Στη συνέχεια παρατίθενται 2 χαρακτηριστικά γραμματογράμματα και των δύο δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το κλάσμα 4 και στα δύο δείγματα εκλύεται στον ίδιο χρόνο με τη σουλφονίδια (SULF), το κλάσμα 6 συμπίπτει χρονικά με τις διεσπολυνοκερόλες (DODO) και τους γαλακτοκυρεβράζους (GALCER), το κλάσμα 7 με

Πίνακας 10: Βιολογική δραστικότητα των κλασμάτων από την HPLC της περιοχής 1 που συλλέχθηκε από την TLC των NL₁ από δείγμα light μαργαρίνης.

ΚΛΑΣΜΑ	ΕΙΔΟΣ ΔΡΑΣΗΣ	IC50 (% συνολικής ποσότητας)	EC50 (% συνολικής ποσότητας)
1GL ₁	αναστολή	5,5	-
2GL ₁	αναστολή	3,8	-
3GL ₁	αναστολή	8,0	-
4GL ₁ (ΔΑ)	αναστολή	8,0	-
5GL ₁	αναστολή	41,25	-
6GL ₁	αναστολή	6,0	-
7GL ₁	αναστολή	0,5	-
8GL ₁	αναστολή	3,3	-
9GL ₁	αναστολή	5,5	-
10GL ₁	αναστολή	2,0	-
11GL ₁ (ΔΑ)	αναστολή	5,8	-
12GL ₁	αναστολή	6,3	-
13GL ₁ (ΔΑ)	αναστολή	5,8	-
14 GL ₁	αναστολή	1,25	-
14 GL ₁ (20λ)	Μη Αντιστρεπτή συσσώρευση	-	5,0
15GL ₁	αναστολή	13,1	-
16 GL ₁ (ΔΑ)	αναστολή	0,144	-
17GL ₁	αναστολή	0,079	-
18GL ₁	αναστολή	15,3	-

Παρατηρώντας τους πίνακες 9 και 10 προκύπτουν τα εξής συμπεράσματα: Τα κλάσματα 2, 5, 6, 13 τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης εμφανίζουν παρόμοια αναστολή (περίπου ίσα IC₅₀) της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων. Όσον αφορά το δείγμα της πλήρους μαργαρίνης, αυτό εμφανίζει καλύτερη αναστολή, δηλαδή μικρότερο IC₅₀ συγκριτικά με το δείγμα της light μαργαρίνης, στα κλάσματα 3, 4, 9, 12. Αντίθετα, τα κλάσματα από την HPLC των NL της light μαργαρίνης που προκαλούν καλύτερη αναστολή είναι τα 1, 7, 8, 10 και 11. Πέρα όμως από τις αναστολές που εμφανίστηκαν κατά τη βιολογική δοκιμασία των κλασμάτων από την HPLC των NL της πλήρους και light μαργαρίνης, ιδιαίτερα σημαντική ήταν και η παρουσία συσσωρεύσεων στο κλάσμα 16 (αντιστρεπτή συσσώρευση) της πλήρους μαργαρίνης και στο κλάσμα 14 (μη αντιστρεπτή συσσώρευση) της light μαργαρίνης. Και τα δύο είδη συσσωρεύσεων είναι ισχυρές εφόσον τα κλάσματα 16 και 14 σε πολύ μικρές ποσότητες μπορούν να προκαλέσουν συσσώρευση (μικρό EC₅₀: 0,02μg και 0,05μg αντίστοιχα.)

Στη συνέχεια παρατίθενται 2 χαρακτηριστικά χρωματογραφήματα και των δύο δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι το κλάσμα 4 και στα δύο δείγματα εκλύεται στον ίδιο χρόνο με τα σουλφατίδια (SULF), το κλάσμα 6 συμπίπτει χρονικά με τις διάκυλογλυκερόλες (DGDG) και τους γαλακτοκερεβροζίτες (GALCER), το κλάσμα 7 με

ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

Στις σύγχρονες δυτικές κοινωνίες το προσδόκιμο επιβίωσης έχει αυξηθεί και είναι πλέον γεγονός ότι οι συνηθέστερες αιτίες θανάτου είναι οι μη μολυσματικές ασθένειες, όπως ο καρκίνος, τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο σακχαρώδης διαβήτης και η παχυσαρκία. Στην αιτιολογία αυτών των ασθενειών εμπλέκονται σε μεγάλο βαθμό οι περιβαλλοντικοί παράγοντες με κύριο εκπρόσωπο τη σύνθεση της διατροφής [47].

Οι καταναλωτές, έχοντας γνώση των παραπάνω, υιοθετούν ολοένα και περισσότερο την ιδέα ότι τα τρόφιμα χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος (Light foods) συμβάλλουν στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας, τα οποία σχετίζονται με τα υψηλά επίπεδα ενεργειακής πρόσληψης και λίπους [49]. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα να εξελιχθεί η παραγωγή των light τροφίμων τα οποία παρέχουν λιγότερη ενέργεια και ποσότητα λίπους συγκριτικά με τα αντίστοιχα πλήρη προϊόντα. Ένα ερώτημα που διατυπώνεται στις μέρες μας, λόγω της ευρείας κατανάλωσης των light τροφίμων, είναι κατά πόσο ωφελούν ή βλάπτουν τελικά την υγεία. Εντούτοις, η διαχωριστική γραμμή για τη σωστή και λάθος απάντηση στο παραπάνω ερώτημα είναι πολύ λεπτή.

Αφενός μεν διεξήχθησαν έρευνες οι οποίες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι όταν οι δίαιτες χαμηλές σε λίπος συνδυαστούν με υψηλή κατανάλωση light τροφίμων μπορούν να συμβάλλουν στην επαρκή πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, στη μειωμένη διαιτητική πρόσληψη λίπους, χοληστερόλης και κορεσμένων λιπαρών οξέων και στη διατήρηση του δείκτη μάζας σώματος (BMI) μεταξύ των φυσιολογικών ορίων ($19-25\text{kg/m}^2$) [56,58]. Ωστόσο, οι άνθρωποι τείνουν να τρώνε περισσότερο από ένα τρόφιμο όταν γνωρίζουν ότι αυτό είναι χαμηλής περιεκτικότητας σε λίπος και ταυτίζουν τον όρο light τρόφιμα με εκείνο των προϊόντων με μηδενικό θερμιδικό περιεχόμενο με άμεσο αποτέλεσμα να παρατηρείται, παρά τη μείωση του συνολικού προσληφθέντος λίπους, αύξηση των επιπέδων παχυσαρκίας («Αμερικάνικο Παράδοξο») και άλλων χρόνιων νοσημάτων που προκύπτουν από την παχυσαρκία (διαβήτης, αθηρωμάτωση) [60].

Όπως προαναφέρθηκε μία από τις συχνότερες αιτίες θανάτου στις δυτικές κοινωνίες είναι η αθηρωμάτωση. Δύο σημαντικοί παράγοντες που εμπλέκονται στο μηχανισμό της αθηρογένεσης είναι η συσσώρευση των αιμοπεταλίων και ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) των οποίων η σχέση είναι αλληλένδετη.

Όσον αφορά τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων, αυτή σχετίζεται με την αθηρογένεση λόγω του ότι συμβάλλει στη δημιουργία θρόμβων. Συγκεκριμένα, η

ενεργοποίηση (συσσώρευση) των αιμοπεταλίων, αρχίζει όταν μία κάκωση του αγγείου διακόψει το ενδοθήλιο και επιτρέψει στο αίμα να έλθει σε επαφή με τον υποκείμενο ιστό. Αυτή η επαφή αποτελεί το εναρκτήριο σήμα για έναν «καταρράκτη» χημικών αντιδράσεων. Σε κάθε στάδιο του καταρράκτη, μία ανενεργός πρωτεΐνη του πλάσματος μετατρέπεται σε ένα πρωτεολυτικό ένζυμο, το οποίο κατόπιν καταλύει τη δημιουργία του επόμενου ενζύμου στη αλληλουχία, μέχρι την στιγμή που η πρωτεΐνη του πλάσματος προθρομβίνη μετατρέπεται στο ένζυμο θρομβίνη και αυτή με τη σειρά της συμβάλλει στο σχηματισμό σταθερού ινώδους. Έτσι, η θρομβίνη ασκεί θετική ανατροφοδότηση στον ίδιο το σχηματισμό της ενεργοποιώντας τα αιμοπετάλια. Αυτή η ενεργοποίηση των αιμοπεταλίων έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση των υποδοχέων της κυτταροπλασματικής τους μεμβράνης δεσμεύοντας με αυτόν τον τρόπο αρκετούς από τους παράγοντες της θρόμβωσης [32].

Ο Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF), όπως προαναφέρθηκε είναι ένας πιθανός σημαντικός μεσολαβητής στην αθηρογένεση δρώντας ως αγωνιστής της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων [6,74].

Ωστόσο μπορεί να αναρωτηθεί κανείς, με ποιον τρόπο τα τρόφιμα και συγκεκριμένα τα light συσχετίζονται με τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων και τον PAF.

Μία πρώτη απάντηση δίνεται από το ότι προηγούμενες μελέτες που διεξήχθησαν σε διάφορα τρόφιμα της μεσογειακής διαίτας, όπως το ελαιόλαδο [40], κρασιού [43], μελιού [45] και γιαουρτιού [45] απέδειξαν αφενός μεν την παρουσία ενώσεων (γαγγλιοζίτες) με δράση ανάλογη του PAF (γαγγλιοζίτες), αφετέρου δε την παρουσία ενώσεων που δρουν ανταγωνιστικά στον PAF ύστερα από βιολογική δοκιμασία που έγινε σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Επιπλέον, μελέτες παρέμβασης έδειξαν ότι μόνο οι ειδικοί αναστολείς του PAF (πολικά λιποειδή ελαιολάδου και στατίνες) μπορούν να μειώσουν την αθηρογένεση *in vivo*, σε αντίθεση με τα ω-3 λιπαρά οξέα. Έτσι, η κατανάλωση ανταγωνιστών του PAF προερχομένων από φυσικές πηγές (τρόφιμα) έχει ευεργετικές δράσεις στην υγεία και κυρίως στην πρόληψη της αθηρωμάτωσης [14].

Όσον αφορά τα light τρόφιμα και κυρίως τη μαργαρίνη που ανήκει στην κατηγορία τροφίμων ευρείας κατανάλωσης, μέσα από αυτήν την πτυχιακή μελέτη γίνεται μία πρώτη προσέγγιση του κατα πόσο η light μαργαρίνη περιέχει ενώσεις που αναστέλουν ή ενεργοποιούν τη συσσώρευση των αιμοπεταλίων που επάγεται από τον PAF, καθώς και η σύγκρισή της με την πλήρη μαργαρίνη. Επίσης, αξίζει να αναφερθεί

ότι δεν έχουν διεξαχθεί άλλες έρευνες που να μελετούν την συσχέτιση της μαργαρίνης (πλήρες και light κλάσμα) με την προώθηση ή μη της αθηρογένεσης.

Πράγματι μετά τη βιολογική δοκιμασία των κλασμάτων τόσο της πλήρους όσο και της light μαργαρίνης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών ανευρέθησαν βιολογικά δραστικά λιποειδή.

Όσον αφορά τα κλάσματα των πολικών λιποειδών της πλήρους μαργαρίνης, όλα εμφάνισαν αναστολή, γεγονός που επιβεβαιώνει αποτελέσματα προηγούμενης πτυχιακής μελέτης, στην οποία τα συνολικά PL σε μεγάλες ποσότητες εμφάνισαν αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων ενώ σε μικρές ποσότητες αναστολή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που επάγεται από τον PAF. Στην παρούσα πτυχιακή μελέτη, η απουσία κλαμάτων που να επάγουν την αλλαγή του σχήματος των αιμοπεταλίων μπορεί να οφείλεται στις πολύ μικρότερες ποσότητες που προέκυψαν.

Τα αντίστοιχα αποτελέσματα για τη light μαργαρίνη έχουν ως εξής: τα περισσότερα κλάσματα προκάλεσαν αναστολή της δράσης του PAF, ενώ υπήρχε και ένα κλάσμα PL το οποίο προκάλεσε συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Αντίστοιχα, στην προηγούμενη πτυχιακή μελέτη τα συνολικά PL όσο αυξανόταν η ποσότητά τους προωθούσαν τη διαδικασία συσσώρευσης των αιμοπεταλίων (αυξημένη αναστολή PAF, αλλαγή σχήματος αιμοπεταλίων και τελικά συσσώρευση). Φαίνεται, λοιπόν, ότι η βιολογική δραστικότητα της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων που εμφανίζουν τα ολικά PL της light μαργαρίνης οφείλεται αποκλειστικά και μόνο στο κλάσμα PL (5PL₁) του οποίου η δομή θα ήταν ενδιαφέρον να μελετηθεί. Η χρωματογραφική συμπεριφορά του κλάσματος αυτού δείχνει ότι στη light μαργαρίνη η δράση των συσσωρευτικών παραγόντων στα κλάσματα των PL είναι πιο ισχυρή από ότι στην πλήρη μαργαρίνη.

Η βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών των NL της πλήρους μαργαρίνης, έδειξαν την παρουσία τόσο αναστολέων της δράσης του PAF όσο και συσσωρευτικών παραγόντων. Στην προηγούμενη πτυχιακή μελέτη τα αντίστοιχα αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας του κλάσματος των συνολικών NL έδειξαν την παρουσία ενώσεων που προκάλεσαν αλλαγή της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων καθώς επίσης και αναστολή της δράσης του PAF.

Τέλος, όσον αφορά τη βιολογική δοκιμασία σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιών των NL της light μαργαρίνης παρατηρείται ύπαρξη ισχυρών συσσωρευτικών παραγόντων αλλά και αναστολέων. Στην προηγούμενη πτυχιακή μελέτη, τα

αποτελέσματα της βιολογικής δοκιμασίας για τα συνολικά NL της light μαργαρίνης ήταν η ενεργοποίηση της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων, αφενός μεν προωθώντας τη δράση του PAF, αφετέρου δε, σε μεγάλες ποσότητες, δημιουργώντας έντονη συσσώρευση των αιμοπεταλίων.

Είναι χαρακτηριστικό ότι, αν και στα NL της πλήρους μαργαρίνης εμφανίζονται δύο κλάσματα με συσσωρευτική ικανότητα στην περιοχή των TG και των St. Est, στη light εμφανίζεται ένα νέο κλάσμα στην περιοχή των FA αλλά τουλάχιστον τέσσερις φορές πιο ισχυρό σύμφωνα με το EC50 των κλασμάτων. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει ότι οι διαφοροποιήσεις που παρατηρούνται μεταξύ πλήρους και light μαργαρίνης δεν οφείλονται μόνο σε αλλαγές στις σχετικές ποσότητες των λιποειδικών κλασμάτων, αλλά και σε διαφοροποιήσεις στη δομή των βιολογικά δραστικών μορίων.

Αντίστοιχα αποτελέσματα λαμβάνονται και από τη μελέτη των GL κλασμάτων όπου εμφανίζουν ανασταλτική δράση τόσο στη light όσο και στην πλήρη μαργαρίνη, εκτός από ένα κλάσμα σε κάθε είδος μαργαρίνης το οποίο εμφανίζει ισχυρή συσσώρευση και εδώ, τα δύο κλάσματα διαφοροποιούνται δομικά, όπως φαίνεται, τόσο από τη διαφορετική χρωματογραφική συμπεριφορά τους όσο και από τη διαφορετική μορφή συσσώρευσης που εμφανίζουν.

Συνολικά λοιπόν, μπορεί να διατυπωθεί το συμπέρασμα ότι η light μαργαρίνη περιέχει περισσότερους συσσωρευτικούς παράγοντες από την πλήρη μαργαρίνη, δεδομένου ότι τόσο στα κλάσματα των PL όσο και σε εκείνα των NL υπήρχαν συσσωρευτικοί παράγοντες και μάλιστα ισχυρότεροι από εκείνους της πλήρους μαργαρίνης. Φαίνεται λοιπόν, ότι κατά τις βιομηχανικές διεργασίες παραγωγής της light μαργαρίνης σχηματίζονται στο τελικό προϊόν λιποειδικές ενώσεις με ισχυρότερη δράση συσσώρευσης αιμοπεταλίων έναντι της πλήρους μαργαρίνης.

Δεδομένου ότι η συσσώρευση αιμοπεταλίων *in vivo* θα μπορούσε να αποτελέσει έναν προαθηρωγενετικό παράγοντα, η ύπαρξη αυξημένων παραγόντων συσσώρευσης αιμοπεταλίων στη light μαργαρίνη υποβαθμίζει τη διατροφική τους αξία έναντι της πλήρους. Η ανάλυση και ο δομικός χαρακτηρισμός των ενώσεων αυτών θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες για το σε ποια στάδια της βιομηχανικής τους παραγωγής της light μαργαρίνης θα μπορούσαν αυτές οι ενώσεις να σχηματιστούν και, μελλοντικά, να οδηγήσουν στην ανάπτυξη μεθόδων που θα έδιναν light μαργαρίνη αμφοτέρης διατροφικής αξίας όσον αφορά τα λιποειδικά μικροθρεπτικά συστατικά της.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η απομόνωση, ο διαχωρισμός και η σύγκριση της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδικών κλασμάτων πλήρους και light μαργαρίνης. Κυρίως αφορούσε τη διερεύνηση της ικανότητάς τους να προκαλούν συσσώρευση πλυμένων αιμοπεταλίων ή αναστολή της συσσώρευσης που επάγεται από τον PAF. Δεδομένου ότι ο PAF εμπλέκεται στην αθηρογένεση, αντικείμενο της παρούσας πτυχιακής ήταν και η συγκριτική εκτίμηση της διατροφικής αξίας ενός ευρέως διαδεδομένου light προϊόντος, της light μαργαρίνης, με το πλήρες σε λίπος ανάλογό της. Στα πλαίσια επίτευξης των παραπάνω χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι διαχωρισμού (HPLC, TLC) των πολικών και ουδετέρων λιποειδών, καθώς επίσης και ανίχνευση της βιολογικής τους δραστηριότητας σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού. Τα αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν ήταν η παρουσία κλασμάτων με ανασταλτική ή συσσωρευτική δράση. Τα πολικά λιποειδή της πλήρους μαργαρίνης ήταν καλύτεροι αναστολείς (χαμηλότερα IC₅₀), ενώ αντίθετα στην light μαργαρίνη ανευρέθηκε κλάσμα με συσσωρευτική δράση. Επιπλέον, μετά την ανάλυση των ουδετέρων λιποειδών διαπιστώθηκε η παρουσία συσσωρευτικών παραγόντων τόσο στην πλήρη όσο και στη light μαργαρίνη με μία ακόμη φορά προκαλούμενη συσσώρευση από κλάσματα των NL 4 φορές πιο ισχυρά. Εν τούτοις η παρουσία βιολογικά δραστικών κλασμάτων αυξάνει την ανάγκη για τον προσδιορισμό της δομής τους, δεδομένου ότι οι ενώσεις με συσσωρευτική δράση ενδεχομένως παράγονται κατά τη διάρκεια επεξεργασίας της πλήρους μαργαρίνης για να γίνει light. Κατ' επέκταση αντικείμενο μελέτης μεταγενέστερων ερευνών αποτελεί και η ανάπτυξη μεθόδων παρασκευής light μαργαρίνης υψηλότερης διατροφικής αξίας όσο αφορά τα λιποειδικά μικροθρεπτικά συστατικά.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Αντωνοπούλου Σ., Δημόπουλος Κ., «Βασική Βιοχημεία», Αθήνα 2000
2. Μπόσκου Δ. "Χημεία Τροφίμων", Θεσσαλονίκη 1997, σ.126
3. L. Kathleen Mahan.Sylvia Escott-Stump, "Krause's: Food, Nutrition & Diet Therapy, 10th edition, p.53-54.
4. Ανδρικόπουλος Ν. «Οργανική Χημεία & Δομική Βιοχημεία», Τόμος Ι, Κεφάλαια Θεωρίας, Αθήνα-Καλλιθέα 1998
5. Caret R.L, Denniston K.J, Topping J.J «Principles & Applications of Inorganic, Organic & Biological Chemistry» p.494-495, 499)
6. C.A. Demopoulos, R.N. Pinckard, D.G Hanahan: Platelet activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphorylcholine as the active component [a new class of lipid chemical mediators].J.Biol.Chem. **254**,1979, 9355-9358.
7. McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN, PAF molecular heterogeneity. Pathobiological implications. Lab.Invest., 1993, 69, 639-650.
8. 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.
9. Snyder F, Chemical and biochemical aspects of platelet activating factor, a novel class of acetylated ether-linked choline-phospholipids. Med.Res.Rev., 1985, 5, 107-140.
10. Hanahan DJ, Platelet activating factor, a biologically active phosphoglyceride. Ann.Rev.Biochem., 1986, 55, 483-509
11. Kulikov VI, Muzia GI, Acyl and plasmalogen analogs of platelet activating factor-new lipid cellular bioregulators. Biokhimiia, 1992, 57, 803-816.
12. Tokumura A, A family of phospholipid autacoids, occurrence, metabolism and bioactions. Prog.Lipid.Res., 1995, 34, 151-184.
13. A.Zanglis, E.A. Lianos, C.A Demopoulos: The biological activity of acetylated sphingosylphosphorycholine derivatives. Int.J.Biochem Cell Biol. **28**, 1996, 63-74.

14. Eur.J.Lipid Sci. Technol **105** (2003) 705-716, «Platelet activating factor – a molecular link between atherosclerosis theories», Constantinos.A Demopoulos., Haralabos C.Karantonis, Smaragdi Antonopoulou.
15. Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Platelet-activating factor, a phospholipid autacoid with diverse actions. J.Lipid.Res., 1993, 34, 691-702.
16. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM. Platelet-activating factor. J.Biol.Chem., 1990, 265, 17381-17384.
17. Snyder F, Platelet-activating factor, the biosynthetic and catabolic enzymes. Biochem.J., 1995, 305, 689-705
18. Feuerstein G, Rabinovici R, Leor J, Winkler JD, Vonhof S: Platelet-activating factor and cardiac diseases: therapeutic potential for PAF inhibitors, J Lipid Mediat Cell signal,1997;15:255-84
19. Koltai M, Hosford D, Guinot P, Esanu A, Braquet P. PAF, a review of its effects, antagonists and possible future clinical implications (Part II). Drugs, 1991, 42, 174-204.
20. Sturk A, Ten Cate JW, Hosford D, Mencia-Huerta JM, Braquet P, The synthesis, catabolism, and pathophysiological role of Platelet-Activating Factor. Adv.Lipid.Res., 1989, 23, 219-276
21. Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, Tzortziw Nomikos and Constantinos.A Demopoulos: «Structure elucidation of phenolic compound from red/white wine with antiatherogenic properties», BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids **1632** 1-3 (June 2003) pp90-99
22. J.L. Witztum: «The oxidation hypothesis of atherosclerosis», Lancet **344** 8925 (1994), pp.793-795)
23. (D.Steinberg, S.Parthasarathy, T.E Carew, J.C. Khoo and J.L.Witztum: «Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity», N.Engl.J.Med **320** 14 (1989), pp915-924)
24. Liapikos TA, Antonopoulou S, Demopoulos C.A, Tsoukatos DC, Karabina S-AP and Tselepis AD: « Platelet activating factor formation during oxidative modification of low-density lipoprotein when PAF-acetylhydrolase has been inactivated», BBA **1212** (1994) 353-360.
25. Marathe GK,Davies SS,Harrison KA, Silva AR, Murphy RC, Castro-Faria-Neto H, Prescott SM, Zimmerman GA and McIntyre TM, «Inflammatory Platelet

- activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines», *F Biol Chem* **254** (1999) pp.28395-28404).
26. Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM and Stafforini DM: «Inflammation in the vascular wall as an early event in atherosclerosis», *Diabetologia* **40** (1997) S111-S112.
 27. Montrucchio G, Alloati G, Gamussi G, “Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology”, *Physiol Rev* 80,2000, p.1669-99.
 28. Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, Tzortzis Nomikos and Constantinos.A Demopoulos: «Structure elucidation of phenolic compound from red/white wine with antiatherogenic properties», *BBA-Molecular and Cell Biology of Lipids* **1632** 1-3 (June 2003) pp90-99
 29. Stremler K.E., Prescott SM, Stafforini DM, T.M. McIntyre: «The Platelet activating factor – acetylhydrolase. Oxidatively fragmented phospholipids as substrates» *J Biol Chem* **266** (1991) pp.11095-11103.
 30. C.Dentan, P. Lesnic, M.J.Chapman, E.Ninio: «PAF-acether-degrading acetylhydrolase in plasma LDL is inactivated by copper – and cell-mediated oxidation», *Arterioscler.Thromb.* **14** (1994) pp.353-360.
 31. G. Ambrosio et al, “Oxygen radicals inhibit human plasma acetylhydrolase, the enzyme that catabolizes platelet-activating factor”, *J.Clin.Invest.* ,**93**, (1994) 2408-2416
 32. Vander A., Sherman J, Luciano D, “Human Physiology: The Mechanisms of Body Function”, 8th edition).
 33. Miwa M, Kumar R, Sugatani J, Olson M.S., Hanahan D.J, *J.Biol. Chem*, 1987, 262-257.
 34. Hanahan D.J, , Olson M.S, Tsuji H 3rd International Conference on PAF and Structurally Related Alkyl Ether lipids, Japan, Abstract, 1989.
 35. Tsoukatos D, Demopoulos CA, Tselepis AD, Moschidis M.C, Donos A, Evangelou A, Benveniste J, *Lipids*: 28:119.
 36. Saunders RN, Handley DA, Platelet-Activating Factor antagonists. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 1987, 27, 237-255.
 37. Koltai M, Guinot P, Hosford D, Braquet PG. Platelet-Activating Factor antagonists, scientific background and possible clinical applications. *Adv.Pharmacol.*, 1994, 28, 81-167

38. Summers JB, Albert DH, Platelet Activating Factor antagonists. *Adv.Pharmacol.*, 1995, 32, 67-168
39. Guinot P, Clinical experience with Platelet-Activating Factor antagonists. Past, present, and near future. *Clin.Rev.Allergy*, 1994, 12, 397-417.
40. Karantonis HC, Zabetakis I, Nomikos T, Demopoulos CA: Antiatherogenic properties of lipid minor constituents from seeds oils, *J Sci Food Agric* 83, 2003, 1192-1204.
41. Koussissis S, Semidalas CE, Antonopoulou S, Kapoulas VM, Demopoulos CA, Kalyvas V, PAF antagonists in food , isolation and identification of PAF antagonists in virgin olive oil. *Revue Francaise Des Corps Gras*, 1994, 9/10, 323
42. Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, Tzortzis Nomikos, Christiana A. Mitsopoulou and Constantinos.A Demopoulos:Separation of biologically active lipids from Red wine:*J.Agric. Food Chem.*,48,2000, 1234-1238).
43. Elizabeth Fragopoulou, Smaragdi Antonopoulou, Constantinos.A Demopoulos: Biologically Active Lipids with Antiatherogenic Properties from White Wine and Must, *J.Agric. Food Chem.*,50,2002, 2684-2694
44. Koussissis S, Semidalas CE, Hadzistavrou EC, Kalyvas V, Antonopoulou S, Demopoulos CA. PAF antagonists in food , isolation and identification of PAF antagonists in honey and wax. *Revue Francaise Des Corps Gras*, 1994, 5/6, 127.
45. S.G.Koussissis, C.E. Semidalas, S. Antonopoulou, C.A. Demopoulos: PAF antagonists in foods: A study of Lipids with PAF or Anti- PAF-like activity in Cow's Milk and Yogurt, *J.Agric. Food Chem.*, 44, 1996, 3047-3051.
46. Panayiotou A, Samartzis D, Nomikos T, Fragopoulou E, Karantonis HC, Demopoulos CA, Zabetakis I: Lipid fractions with aggregatory and antiaggregatory activity toward platelets in fresh and fried cod - *Cadus Morhua*: Correlation with platelet-activating factor and athiogenesis: *J.Agric. Food Chem.*,2000 Dec;48,12,6372-9
47. C.J.K Henry, N.J. Heppell, "Nutritional aspects of food processing and ingredients".
48. (C.J.K Henry, N.J. Heppell, "Nutritional aspects of food processing and ingredients"/ Bloukas J.G., Paneras E.D., "Quality Characteristics of low-fat frankfurters manufactured with potato starch, finely ground toasted bread and rice brand", *J.Muscle Foods*, 1996, 7: 109-129).

49. D.K. Sandrou, I.S.Arvanitoyannis, "Low-Fat/Calorie Foods: Current State and Perspectives", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **40**[5], September 2000, p.427-447
50. Nancy E., Susan T.Borra: "What do consumers really think about dietary fat?", *Journal of the American Dietetic Association* **97**,7, July 1997 p.S73-S75.
51. Yackel W.C., Cox C., "Application of starch based fat replacers", *Food Technol.*, 1992, **6**:146-148.
52. Akoh C.C, "Lipid based fat substitutes", *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **35**, 1995,405-430.
53. Huyghebaert A., Dewettinck K., and De Greyt W., "Fat Replacers", *Bull. IDF*, 1996, 317, 10-15.
54. Fallat R.W., Gluek C.J., Lutmer R., Mattson F.H., "short-term study of sucrose polyester: a nonabsorbable fat-like material as a dietary agent for lowering plasma cholesterol", *American Journal of Clinical Nutrition*, **29**, 1976, 1204-1215.
55. Walter T., "New Application specific fat replacers for the dairy industry", *Int. Food Inged.*, 1993,4: 29-32.
56. Kennedy E, Bowman S., "Assessment of the effect of fat modified foods on diet quality in adults 19 to 50 years, using data from the Continuing Survey of Food Intake by Individuals", *J Am Diet Assoc.* 2001 Apr; 101(4): 55-60.
57. Bellisle F., Preziosi P., Galan P., Fieux B., "Use of Light foods and drinks in French adults: biological, anthropometric and nutritional correlates", *J Hum Nutr Diet.*, 2001 June; 14(3):191-206.
58. Rodriguez LM, Castellanos VM, "Use of low fat foods by people with diabetes decreases fat, saturated fat and cholesterol intakes", *J Am Diet Assoc.* 2000 Oct; 100(10):1137
59. Matti J. Tikkkanen, Jaako Touomilehto, Sudvall J., "Effect of a diet based on low-fat foods enriched with nonesterified plant sterols and mineral nutrients on serum cholesterol", *The American Journal of Cardiology*, **88**(10), 15 November 2001, p.1157-1162).
60. Astrup A., "The American Paradox: the role of energy dense fat reduced food in the increasing prevalence of obesity", *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*: 1(6), 1998, p.573-577.

61. D.Neumark-Sztainer, A.R. Kristal, P.E Patterson, M.L. Neuhouser, J.C. Peters, "Is olestra consumption associated with changes in dietary intake, serum lipids and body weight?", *Nutrition*, 19(9), September 2003, p.754-759.
62. D.Neumark-Sztainer, A.R. Kristal, M.L. Thornquist et al, "Early adopters of olestra containing foods: who are they?", *J Am Diet Assoc.* 100, 2000, p.198
63. Miller KW, Algood G.S., "Nutritional assessment of Olestra, a non-caloric fat substitute", *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 44(1), 1993 p.77-82).
64. Blaxter K, "Energy Metabolism in Animals and Man", Cambridge University Press, Cambridge, UK.
65. Giese J. "Fats, oils and fat replacers", *Food Technol.* 4,1996, p.78-83
66. Baljit S.Ghotra, Sandra S.Dyal, Suresh S.Narine "Lipid Shortenings: a review", *Food Research International*, 35,10,2002, 1015-1048).
67. Γαλανός Δ.Σ. «Θέματα Χημείας Τροφίμων», σ.138-140, Αθήνα 1977, Ανδρικόπουλος Ν. «Χημεία & Τεχνολογία Τροφίμων», Τόμος Ι, Κεφάλαια Θεωρίας, κεφ.1, σ.25, Αθήνα-Καλλιθέα 1999.
68. Pearson's «Composition and Analysis of Food», 9th edition, p.589-595.
69. Ανδρικόπουλος Ν. «Χημεία & Τεχνολογία Τροφίμων», Τόμος Ι, Κεφάλαια Θεωρίας, κεφ.1, σ.26-27, Αθήνα-Καλλιθέα 1999.
70. McCance & Widdowson's «The Composition of Foods», p.114-115, 5th edition, Royal Society of Chemistry, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food).
71. Μαμαλάκης γ., Ζαμπέλας Α., Καφάτος Α., «Κρητικό Ελαιόλαδο, για την προαγωγή της Υγείας και την πρόληψη των ασθενειών».
72. Bligh EG, Dyer WJ, "A rapid method of Total Lipids extraction and purification", *Can.J Bioch Physical*, 37, 911-917, 1959.
73. Galanos D.S., Kapoulas VM, "Isolation of Polar Lipids from Total Lipids Mixtures", *J. Lipid Res.* 1962, 3, 134-137.

light τροφίμα

ΠΕΥ ΚΑΠ

Κακώτη Γ.

13036

10161

**ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ**

ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ



★13036★