



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Χημεία τροφίμων»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων
ελληνικών τυριών**

**ΤΣΟΡΟΤΙΩΤΗ ΣΟΦΙΑ-ΕΛΕΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΙΑΝΟΥΑΡΙΟΣ 2014
ΑΘΗΝΑ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Μελέτη των καρδιοπροστατευτικών ιδιοτήτων
ελληνικών τυριών**

ΤΣΟΡΟΤΙΩΤΗ ΣΟΦΙΑ-ΕΛΕΝΗ

A.M:51102

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Ζαμπετάκης Ιωάννης, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. Ζαμπετάκης, Επίκουρος Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Κ.Α. Δημόπουλος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ

Χ. Προεστός, Λέκτορας, ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 22/01/2014

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογήσει τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες δύο ελληνικών τυριών, του Κεφαλοτυριού και του Λαδοτυριού. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της μελέτης της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών των δύο τυριών ενάντια στην αθηροσκλήρωση. Αρχικά εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή από δείγματα των δύο τυριών μέσω της εκχύλισης Bligh-Dyer και με κατανομή κατά αντιρροή διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών και των ολικών ουδέτερων λιποειδών όλων των δειγμάτων μέσω της αέριας χρωματογραφίας (GC). Τα ολικά πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν περαιτέρω με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε επιμέρους λιποειδικά κλάσματα. Τέλος, τα ολικά, τα ολικά πολικά, τα ολικά ουδέτερα λιποειδή και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί με βιολογικό προσδιορισμό σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού η ικανότητά τους να αναστέλλουν ή όχι την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας έδειξαν ότι και τα δύο τυριά έχουν έντονη βιολογική δραστηριότητα έναντι της αθηροσκλήρωσης και ότι τα λιποειδή τους είναι πολύ καλοί ανταγωνιστές του PAF. Συγκρίνοντας τα δύο τυριά, τα πολικά λιποειδικά κλάσματα του Λαδοτυριού εμφάνισαν πιο έντονη ανασταλτική δράση έναντι αυτών του Κεφαλοτυριού. Καταλήγοντας, το γεγονός ότι και τα δύο τυριά έχουν πολύ καλή ικανότητα να αναστέλλουν την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων, δηλώνει την καλή τους διατροφική αξία και αποδεικνύει την ευεργετική δράση που μπορούν να έχουν ως τρόφιμα κατά την πρόληψη των καρδιαγγειακών παθήσεων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Βιολογική δραστηριότητα έναντι της αθηρογένεσης του Κεφαλοτυριού και του Λαδοτυριού.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Κεφαλοτύρι, Λαδοτύρι, λιποειδή, καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, PAF, αθηρογένεση

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antiatherogenic properties of two different types of greek cheese: Kefalotyri and Ladotyri. Total lipids (TL) of both types of cheese were extracted by the method of Bligh and Dyer and further separated into total polar lipids (TPL) and total neutral lipids (TNL) by counter-current distribution. TPL were further separated by preparative thin-layer chromatography (TLC). TL, TPL, TNL and the obtained polar lipid fractions after TLC separation were tested to determine the biological activity against atherosclerosis based on the *in vitro* inhibition of Platelet Activating Factor (PAF)-induced platelet aggregation. Both types of cheese exhibited strong biological activity and their lipids were good PAF inhibitors. Comparing the two types of cheese, Ladotyri lipid fractions showed stronger inhibitory properties than those of Kefalotyri. The fact that both types of cheese contain PAF inhibitors proves their nutritional value in terms of protection against cardiovascular diseases, since PAF is a crucial inflammatory phospholipids mediator that is implicated in the mechanism of atherogenesis.

SUBJECT AREA: The biological activity of kefalotyri and ladotyri cheese.

KEYWORDS: cheese, lipids, cardioprotective properties, platelet activating factor, atherosclerosis

**Στους γονείς μου Ντίνα και Γιάννη,
την αδερφή μου Μελένια
και τη γιαγιά μου Λιλή**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης εκπονήθηκε στο εργαστήριο Χημείας Τροφίμων, του τμήματος Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κατά την περίοδο 2011-2013.

Η ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής αυτής εργασίας θα ήταν αδύνατη χωρίς τη βοήθεια κάποιων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Ζαμπετάκη για τη δυνατότητα που μου έδωσε να συμμετέχω στο μεταπτυχιακό αυτό πρόγραμμα και για την πρακτική εμπειρία που μπόρεσα να αποκτήσω μέσα από αυτό. Επίσης τον ευχαριστώ για όλες αυτές τις γνώσεις που μας μετέδιδε όλο αυτό τον καιρό, οι οποίες ξεπερνούσαν τα όρια του "κόσμου" των τροφίμων, όπως και για τη συνεχή καθοδήγηση και υποστήριξή του.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Δημόπουλο για την πολύτιμη βοήθειά του και την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας. Επίσης για τη δυνατότητα που μου έδωσε να πραγματοποιήσω ένα μέρος της πειραματικής διαδικασίας στο εργαστήριο της Βιοχημείας και για τον χρόνο και τη βοήθεια που μου παρείχαν εκείνος και οι υποψήφιοι διδάκτορες του εργαστηρίου Βιοχημείας Βασιλική Παπακωνσταντίνου και Γεώργιος Σταματάκης.

Επιπλέον θέλω να ευχαριστήσω το Λέκτορα κ. Χαράλαμπο Προεστό για την τιμή που μου έκανε να συμμετέχει στην Τριμελή Εξεταστική Επιτροπή αυτής της ερευνητικής εργασίας, αλλά για τις γνώσεις που μου μετέδωσε στα πλαίσια των μαθημάτων του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Τις θερμές μου ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στη Μεταδιδακτορική Ερευνήτρια Κωνσταντίνα Νασοπούλου για την πολύτιμη βοήθειά της και για τις γνώσεις που μου πρόσφερε με τόσο υπομονή και χαρά καθ' όλη τη διάρκεια της πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να πω στους διδακτορικούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές που ήταν μαζί μου στο εργαστήριο, την Ελένη, την Κωνσταντίνα, τη Μαρία, την Κωνσταντίνα και το Γρηγόρη. Τους ευχαριστώ πραγματικά για την πρακτική τους βοήθεια στην πειραματική διαδικασία, αλλά κυρίως για όλες εκείνες τις χαρούμενες στιγμές που έκαναν τόσο υπέροχες τις ώρες που περνούσαμε μαζί στο εργαστήριο, οι οποίες σίγουρα θα μου λείψουν.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω μέσα από την καρδιά μου του φίλου μου και ιδιαιτέρως τον Άγγελο, οι οποίοι ήταν μαζί μου από την πρώτη στιγμή που ξεκίνησα τις σπουδές μου στο πανεπιστήμιο, έγιναν η δεύτερη οικογένειά μου και πίστεψαν σε έμένα όσο πίστεψα κι εγώ σε αυτούς.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στην οικογένεια μου, του γονείς μου Ντίνα και Γιάννη και την αδερφή μου Μελένια, για την ηθική και οικονομική στήριξη που μου πρόσφεραν όλα αυτά τα χρόνια και για τη συμπαράσταση και τη δύναμη που μου δώσανε ώστε να εκπληρώσω τους στόχους μου. Κυρίως όμως τους ευχαριστώ επειδή πότε δε σταμάτησαν να κυνηγούν μαζί με εμένα τα όνειρά μου, όποιες και να ήταν οι συνθήκες και μου έμαθαν ότι μπορώ να πετύχω τα πάντα αρκεί να πιστέψω σε αυτά.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο: ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΤΥΡΙΑ

1.1 Μεσογειακή Διατροφή.....	1
1.2 Ιστορικά Στοιχεία.....	2
1.3 Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα.....	5
1.3.1 Ορισμός.....	5
1.3.2 Τα συστατικά του γάλακτος.....	5
1.3.3 Προϊόντα γάλακτος.....	11
1.4 Τυριά.....	12
1.4.1 Ιστορική Αναδρομή.....	12
1.4.2 Παραδοσιακά Ελληνικά Τυριά.....	15
1.4.3 Είδη και κατηγορίες τυριών.....	17
1.4.4 Χημική Σύσταση και Διατροφική Αξία.....	18
1.4.5 Παρασκευές Τυριών και Μικροοργανισμοί.....	20
1.4.6 Τα είδη και ο ρόλος των μικροοργανισμών.....	21
1.4.7 Μικροοργανισμοί στα ελληνικά τυριά.....	25
1.4.7.1 Κεφαλοτύρι.....	25
1.4.7.2 Λαδοτύρι Μυτιλήνης.....	27

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο: ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΡΑΦ

2.1 Ορισμοί – Γενικά στοιχεία.....	29
2.2 Η παθογένεια της αρτηριοσκλήρωσης.....	30
2.3 Κυτταρική επικοινωνία στην αθηροσκλήρωση.....	31
2.4 Κυτταρικό και μοριακό επίπεδο της αθηρογένεσης.....	33
2.5 Γενικά στοιχεία για τον ΡΑΦ.....	38
2.6 Η σχέση του ΡΑΦ με την ox-LDL.....	41
2.7 Ο ρόλος της ακετυλοϋδρολάσης.....	42
2.8 Μηχανισμός σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας.....	43

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο: ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ.....	47
--	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο: ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	51
--	-----------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ - ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δειγματοληψία τυριών.....	53
5.2 Εκχύλιση Λιποειδών Bligh-Dyer.....	53
5.3 Κατανομή κατά αντιρροή.....	54
5.4 Αέρια Χρωματογραφία (G.C) Λιπαρών Οξέων.....	55
5.4.1 Μέθοδος Εστεροποίησης Λιπαρών Οξέων.....	55
5.4.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μεθυλεστέρων των Λιπαρών Οξέων με Αέρια Χρωματογραφία (G.C.).....	56
5.5 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) Λιποειδών.....	58
5.6 Βιολογική Δοκιμασία Συσσώρευσης Πλυμένων Αιμοπεταλίων Κουνελιού.....	60

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

6.1 Δειγματοληψία τυριών.....	67
6.2 Πειραματική Πορεία Απομόνωσης Λιποειδικών Κλασμάτων.....	67
6.2.1 Αποτελέσματα της Κατανομής κατά αντιρροή.....	69
6.2.2 Αποτελέσματα της Αέριας Χρωματογραφίας (GC).....	69
6.2.3 Αποτελέσματα της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (TLC).....	73
6.2.4 Αποτελέσματα της Βιολογικής Δοκιμασίας.....	74

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο: ΕΠΙΛΟΓΟΣ.....	81
-----------------------------------	-----------

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	85
---	-----------

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	87
-----------------------	-----------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	93
--------------------------	-----------

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Διατροφική Πυραμίδα Μεσογειακής Διατροφής.....	1
Σχήμα 1.2: Ποσοστά θανάτου από στεφανιαία νόσο αντρών και γυναικών στην Ευρώπη (European cardiovascular disease statistics 2008).....	2
Σχήμα 2.1: Η δομή της αρτηρίας.....	29
Σχήμα 2.2: Σχηματισμός θρόμβου.....	30
Σχήμα 2.3: Η χημική δομή του PAF.....	38
Σχήμα 2.4: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας με εμπλοκή του PAF.....	45
Σχήμα 5.1: Τρανσεστεροποίηση των τριακυλογλυκερολών καταλυόμενη από βάση.....	56
Σχήμα 5.2: Ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και απόδοση της καταγραφόμενης καμπύλης ως αύξησης της διαπερατότητας με το χρόνο.....	62
Σχήμα 6.1: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε.....	68
Σχήμα 6.2: Ποσότητες των λιπαρών οξέων σε mg/kg δείγματος που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των πολικών λιποειδών του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου.....	72
Σχήμα 6.3: Ποσότητες των λιπαρών οξέων σε mg/kg δείγματος που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των ουδέτερων λιποειδών του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου.....	72
Σχήμα 6.4: Σχηματική απεικόνιση των πολικών λιποειδικών κλασμάτων των δύο τυριών...	74
Σχήμα 6.5: Σχηματική αναπαράσταση των IC ₅₀ των TL, TPL, TNL των δύο δειγμάτων.....	75
Σχήμα 6.6: Σχηματική αναπαράσταση των IC ₅₀ και EC ₅₀ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Κεφαλοτυρίου.....	77
Σχήμα 6.7: Σχηματική αναπαράσταση των IC ₅₀ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Λαδοτυρίου.....	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1: Τα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος.....	6
Πίνακας 1.2: Λιπαρά οξέα και αναλογία τους στο λίπος του γάλακτος.....	8
Πίνακας 1.3: Ελληνικά παραδοσιακά τυριά ΠΟΠ.....	16
Πίνακας 1.4: Κατάταξη τυριών με βάση την υγρασία.....	18
Πίνακας 1.5: Σύσταση γνωστών τυριών.....	20
Πίνακας 2.1: Δράση PAF in vivo.....	40
Πίνακας 5.1: Συγκέντρωση των λιπαρών οξέων 17:0 και 21:0 στα πρότυπα διαλύματα.....	57
Πίνακας 6.1: Ποσότητες TL, TPL, TNL που απομονώθηκαν από τα δείγματα τυριών.....	69
Πίνακας 6.2: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL και TNL του Κεφαλοτυριού σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης.....	70
Πίνακας 6.3: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL και TNL του Λαδοτυριού σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης.....	70
Πίνακας 6.4: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των TPL του Κεφαλοτυριού και του Λαδοτυριού εκφρασμένα ως mg ανά kg δείγματος.....	71
Πίνακας 6.5: Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των TNL του Κεφαλοτυριού και του Λαδοτυριού εκφρασμένα ως mg ανά kg δείγματος.....	71
Πίνακας 6.6: Τιμές των IC ₅₀ σε μg των ολικών (TL), των ολικών πολικών (TPL) και των ολικών ουδέτερων λιποειδών (TNL) και των δύο δειγμάτων.....	75
Πίνακας 6.7: Τιμές των IC ₅₀ και EC ₅₀ σε μg των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Κεφαλοτυριού.....	76
Πίνακας 6.8: Τιμές των IC ₅₀ σε μg των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Λαδοτυριού.....	76

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Λογότυπα για ΠΟΠ, ΠΓΕ, ΕΠΙΠ προϊόντα.....	15
Εικόνα 1.2: Εμπορική εμφάνιση Κεφαλοτυρίου.....	27
Εικόνα 1.3: Εμπορική εμφάνιση Λαδοτυρίου.....	28
Εικόνα 2.1: Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση και αιμοπετάλια συσσωρευμένα.....	35
Εικόνα Α: Χρωματογράφημα GC των TPL του Κεφαλοτυρίου.....	87
Εικόνα Β: Χρωματογράφημα GC των TNL του Κεφαλοτυρίου.....	88
Εικόνα Γ: Χρωματογράφημα GC των TPL του Λαδοτυρίου.....	89
Εικόνα Δ: Χρωματογράφημα GC των TNL του Λαδοτυρίου.....	90
Εικόνα Ε: Χρωματογραφική Πλάκα μετά από TLC.....	91

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΚΑΙ ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΤΥΡΙΑ

1.1 Μεσογειακή διατροφή

Η μεσογειακή διατροφή αντιπροσωπεύει τις τυπικές διατροφικές συνήθειες των κατοίκων της Μεσογείου και βασίζεται στα μοντέλα διατροφής των κατοίκων της Κρήτης και της νότιας Ιταλίας κατά δεκαετία του 1960. Η ελληνική εκδοχή της μεσογειακής διατροφής έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, ενώ ταυτόχρονα είναι πλούσια σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, τα οποία προέρχονται κυρίως από το ελαιόλαδο. Αυτό σημαίνει ότι ενώ το συνολικό ποσοστό του λίπους μπορεί να είναι υψηλό (~40% της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης), η αναλογία μονοακόρεστων προς κορεσμένα λίπη είναι περίπου 2:1. Επίσης είναι πλούσια σε σύνθετους υδατάνθρακες, κυρίως από τα όσπρια, ενώ ταυτόχρονα έχει υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες, οι οποίες προέρχονται κυρίως από τα λαχανικά και τα φρούτα. Στα πλαίσια της διατροφής αυτής καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες ψωμιού, ζυμαρικών, δημητριακών, όσπριων, λαχανικών και, τόσο στα μαγειρεμένα φαγητά όσο και στις σαλάτες, χρησιμοποιούνται μεγάλες ποσότητες ελαιολάδου^{1,2}.

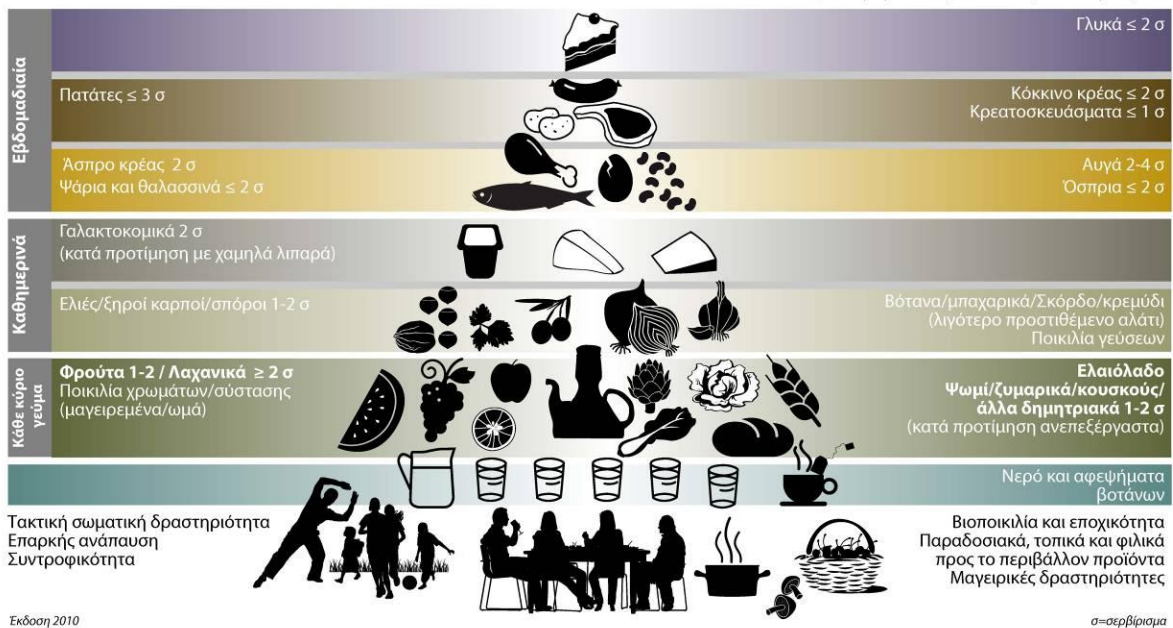
Μεσογειακή διατροφή: ένας τρόπος ζωής για το σήμερα

Διατροφικές οδηγίες για ενήλικες

Σερβίρισμα (σ): μικρότερο της τυπικής μερίδας εστιατορίου, ποικίλει ανά τρόφιμο



Κατανάλωση κρασιού με μέτρο, σεβόμενοι τις κοινωνικές πεποιθήσεις



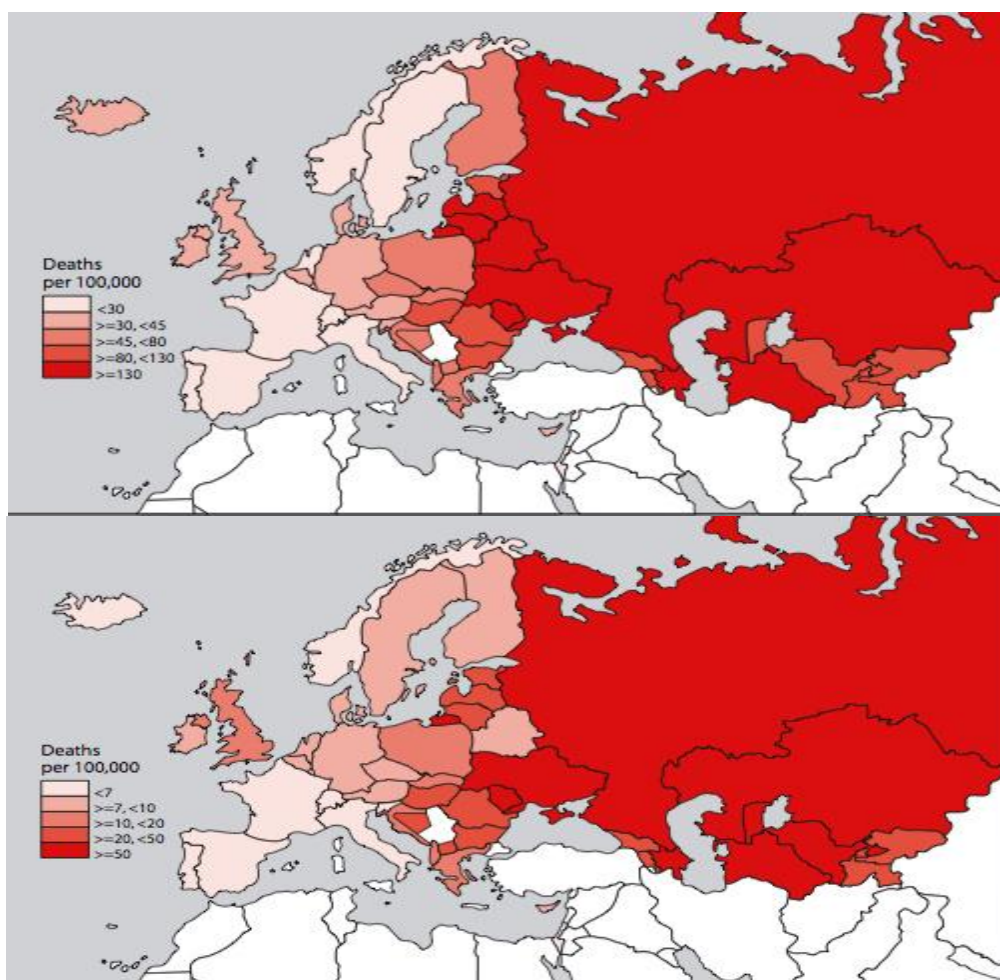
Έκδοση 2010

σ=σερβίρισμα

Σχήμα 1.1: Διατροφική Πυραμίδα Μεσογειακής Διατροφής

Το υψηλό αυτό ποσοστό λαχανικών, φρέσκων φρούτων, δημητριακών και ελαιολάδου, εγγυάται ένα σχετικά υψηλό επίπεδο πρόσληψης β-καροτενίου, βιταμινών Β6, Β12, C και Ε, πολυφαινόλων και διάφορων σημαντικών μετάλλων. Η πρόσληψη γάλακτος είναι αρκετά χαμηλή, όμως καταναλώνονται μεγάλες ποσότητες γιαουρτιού και τυριού. Όσοι ακολουθούν τη συγκεκριμένη διατροφή δεν προτιμούν τόσο το κρέας αλλά τα ψάρια, τα οποία με τη σειρά τους εγγυώνται υψηλή πρόσληψη σε απαραίτητα λιπαρά οξέα, όπως τα ω-3³.

Η μεσογειακή διατροφή έχει αποδειχτεί βάσει πολλών ερευνών ότι είναι ωφέλιμη για την υγεία του ανθρώπου, καθώς εμφανίζει ευεργετική δράση έναντι πολλών σοβαρών ασθενειών, όπως του καρκίνου, των καρδιαγγειακών παθήσεων και της στεφανιαίας νόσου⁴⁻⁹. Ενδεικτικά εμφανίζονται δύο διαγράμματα που παρουσιάζουν τα ποσοστά θανάτου από στεφανιαία νόσο αντρών και γυναικών στην Ευρώπη. Παρατηρούνται όντως μειωμένα ποσοστά θανάτου στις χώρες της Μεσογείου σε σχέση με τις υπόλοιπες χώρες της Ευρώπης.



Σχήμα 1.2: Ποσοστά θανάτου από στεφανιαία νόσο αντρών και γυναικών στην Ευρώπη (European cardiovascular disease statistics 2008)

1.2 Ιστορικά στοιχεία

Μία από τις πιο σημαντικές μελέτες που αποδεικνύουν τη σχέση μεταξύ της διατροφής και της υγείας του ανθρώπου είναι η μελέτη, η οποία ξεκίνησε το 1958 από τον Καθηγητή του Πανεπιστημίου της Μινεσότα (ΗΠΑ) Ancel Keys, την εποχή που στις ΗΠΑ είχαν παρατηρηθεί πολλά κρούσματα καρδιαγγειακών παθήσεων. Η μελέτη αυτή έδωσε τις βάσεις ώστε να δημιουργηθεί το μοντέλο της μεσογειακής διατροφής, όπως το ξέρουμε σήμερα. Πραγματοποιήθηκε σε διεθνές επίπεδο και είναι γνωστή ως «μελέτη των επτά χωρών», δηλαδή της Ιταλίας, Ελλάδας, Γιουγκοσλαβίας, Ολλανδίας, Φιλανδίας, ΗΠΑ και Ιαπωνίας^{10,11}. Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής καταγράφηκαν, μεταξύ άλλων οι διατροφικές συνήθειες πληθυσμιακών ομάδων των παραπάνω χωρών και μετά από παρακολούθηση 15 ετών και στατιστική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι η συχνότητα θνησιμότητας από καρδιαγγειακά νοσήματα στις ΗΠΑ ανέρχεται στο 46%, στη Βόρεια Ευρώπη στο 40%, ενώ στη Νότια Ευρώπη στο 17%, ποσοστό πολύ μικρότερο από τα δύο προηγούμενα^{12,13}.

Οι περιοχές από την Ελλάδα που συμμετείχαν στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν η Κρήτη και η Κέρκυρα. Οι περιοχές αυτές επιλέχθηκαν, επειδή βρίσκονταν μακριά από το κέντρο, ώστε να μην έχουν την επίδραση της ζωής του κέντρου. Συγκεκριμένα επιλέχθηκε η Κρήτη επειδή η διατροφή των κατοίκων της ήταν μια τυπική διατροφή επαρχιακού λαού με μεγάλη κατανάλωση ελαιολάδου σε συνδυασμό με σκληρή αγροτική εργασία - σωματική άσκηση σε καθημερινή βάση. Επίσης καταναλώνονταν σε μεγάλο βαθμό ψάρια, φρέσκα φρούτα, λαχανικά, χόρτα και κόκκινο κρασί καθώς και πολύ μικρή ποσότητα ζωικών λιπών¹⁰. Τελικώς επιλέχθηκε μια αγροτική περιοχή 50 χλμ. έξω από το Ηράκλειο, το Καστέλι Πεδιάδος. Το δείγμα ήταν της τάξεως των 620 ατόμων. Ένα χρόνο αργότερα ξεκίνησε η έρευνα και στην Κέρκυρα, σε μια περιοχή 45 χλμ. έξω από την πόλη της Κερκύρας, όπου περιελήφθησαν αλλά τόσα άτομα. Τα αποτελέσματα της έρευνας έδειξαν ότι οι κάτοικοι της Κρήτης και της Κέρκυρας εμφάνισαν πολύ μικρότερη συχνότητα θνησιμότητας από καρδιαγγειακές παθήσεις (θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα/ολική θνησιμότητα = 0,04 και 0,14 αντίστοιχα), συγκριτικά με τους πληθυσμούς των ΗΠΑ (θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα/ολική θνησιμότητα = 0,46) και των βόρειων Ευρωπαϊκών χωρών (θνησιμότητα από καρδιαγγειακά νοσήματα/ολική θνησιμότητα = 0,38), που έχουν υψηλή κατανάλωση ζωικών λιπών^{12,13}.

Ανάλογα αποτελέσματα με τους κατοίκους της Κρήτης εμφάνισαν και πληθυσμιακές ομάδες Ιαπώνων, η διατροφή των οποίων ήταν διαφορετική μεν από αυτή των κατοίκων της Κρήτης, αλλά ήταν πλούσια σε ψάρια. Συγκεκριμένα το ποσοστό θανάτων από καρδιαγγειακά νοσήματα στην Ιαπωνία καταγράφηκε λιγότερο από 5%, ποσοστό εξαιρετικά χαμηλό σε σχέση με τα αντίστοιχα των ΗΠΑ και της Βόρειας Ευρώπης^{12,13}.

Μια από τις πιο πρόσφατες σημαντικές έρευνες, που δείχνουν τη σπουδαιότητα της μεσογειακής διατροφής μέσω διατροφικής παρέμβασης ασθενών με υψηλό κίνδυνο για στεφανιαία νόσο, είναι η Μελέτη Lyon Heart, τα αποτελέσματα της οποίας δημοσιεύτηκαν στο Lancet, στο American Journal of Clinical Nutrition και στο Circulation¹⁴. Για τη μελέτη αυτή, 605 ασθενείς που είχαν υποστεί έμφραγμα του μυοκαρδίου χωριστήκαν τυχαία σε δύο ομάδες: η μια ακλουθούσε δίαιτα μεσογειακού τύπου εμπλουτισμένη με αλφα-λινολενικό οξύ και η άλλη διατροφή πρώτης βαθμίδας της American Heart Association, ενώ και οι δύο εξακολουθούσαν την ενδεδειγμένη φαρμακευτική αγωγή. Έπειτα από διάστημα τεσσάρων ετών, αν και δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα λιπίδια και τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος, η ομάδα που ακολουθούσε διατροφή μεσογειακού τύπου παρουσίασε μια μείωση κατά 70% στους θανάτους από καρδιά και στα μη θανατηφόρα εμφράγματα του μυοκαρδίου. Τα πολύ σημαντικά αυτά ευρήματα δείχνουν ότι μια αποτελεσματική στρατηγική για τη μείωση των θανάτων από καρδιαγγειακά θα πρέπει πρωτίστως να περιλαμβάνει ένα καρδιοπροστατευτικό διαιτολόγιο^{14,15}.

Οι δύο παραπάνω έρευνες έδωσαν τις βάσεις ώστε να δημιουργηθεί το μοντέλο της μεσογειακής διατροφής και να γίνει γνωστό στον ευρύτερο κόσμο, με αποτέλεσμα όλο και περισσότεροι άνθρωποι να ακολουθούν το μοντέλο αυτό διατροφής, λόγω του ότι γνώριζαν τις ευεργετικές του επιδράσεις στην υγεία τους. Μάλιστα το 2010 η UNESCO συμπεριέλαβε τη μεσογειακή διατροφή στον Κατάλογο της Άυλης Πολιτιστικής Κληρονομιάς της Ανθρωπότητας, ύστερα από αίτημα που υπέβαλαν από κοινού οι χώρες Ελλάδα, Ισπανία, Ιταλία και Μαρόκο¹⁶.

1.3 Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα

Τα γαλακτοκομικά προϊόντα κατέχουν σημαντική θέση στο σύγχρονο μοντέλο της μεσογειακής διατροφής και συνιστάται η καθημερινή τους πρόσληψη. Η έρευνα του Ευρωπαϊκού Προγράμματος Dafne (το οποίο καταγράφει τις διατροφικές συνήθειες των Ευρωπαίων πολιτών) συστήνει ημερήσια κατανάλωση γαλακτοκομικών 55-60 γρ., δείκτης ο οποίος υποδεικνύεται και από τον Π.Ο.Υ (Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας). Στον όρο «γάλα και προϊόντα γάλακτος» περιλαμβάνεται μεγάλος αριθμός προϊόντων που κυκλοφορεί στην αγορά. Η πρώτη ύλη για όλα αυτά τα προϊόντα είναι το γάλα.

Το γάλα μπορεί να καταναλωθεί αυτούσιο αφού υποβληθεί σε κάποια κατεργασία (ομογενοποίηση, παστερίωση) ή μπορεί να διαχωριστεί στα δύο κύρια κλάσματά του: το αποβουτυρωμένο γάλα και το λίπος. Από το αυτούσιο γάλα ή τα ενδιάμεσα αυτά προϊόντα με κατάλληλη επεξεργασία προκύπτουν το βούτυρο, το τυρί, τα παγωτά και άλλα γαλακτοκομικά προϊόντα.

1.3.1 Ορισμός²⁰

Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων, στο άρθρο 80, ορίζει ότι «γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου», που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δε βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Με τον όρο «γάλα», απλά χωρίς να συνοδεύεται αυτό από κάποιο επίθετο, νοείται αποκλειστικά και μόνο το γάλα το οποίο:

- α) προέρχεται από αγελάδα
- β) είναι νωπό
- γ) είναι πλήρες
- δ) δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση και
- ε) δεν περιέχει άλλες ύλες που έχουν προστεθεί απ' έξω.

1.3.2 Τα συστατικά του γάλακτος^{17,18,19}

Το γάλα αποτελεί πολυσύνθετη βιολογική έκκριση στην οποία απαντούν όλες οι μορφές διαμερισμού (αδρομερής, κολλοειδής, μοριακός). Περιλαμβάνει μεγάλη ποικιλία συστατικών, μερικά από τα οποία υπάρχουν σε μεγάλες ποσότητες και χαρακτηρίζονται

κύρια, ενώ άλλα, πολύ περισσότερα σε αριθμό, απαντούν σε μικρές έως πολύ μικρές ποσότητες και ονομάζονται δευτερεύοντα.

Πίνακας 1.1: Τα συστατικά του αγελαδινού γάλακτος¹⁷

Κύρια	Δευτερεύοντα
<ul style="list-style-type: none"> • Νερό (88%) • Λίπος (3,7%) • Πρωτεΐνες (3,2%) <ul style="list-style-type: none"> - Καζεΐνες - Πρωτεΐνες ορού • Υδατάνθρακες (4,7%) <ul style="list-style-type: none"> - Λακτόζη • Άλατα (0,75%) <ul style="list-style-type: none"> - Φωσφορικά - Θειικά - Χλωριούχα - Κιτρικά - Ανθρακικά 	<ul style="list-style-type: none"> • Αέρια (οξυγόνο, άζωτο, διοξείδιο του άνθρακα) • Λιπίδια εκτός λίπους (φωσφολιπίδια, βιταμίνες D, E, K, A, στερόλες, καροτινοειδή, κερεβροσίτες) • Ένζυμα (καταλάση, υπεροξειδάση, ξανθίνη οξειδάση, φωσφατάσες, αμυλάσες, λιπάσες, εστεράσες, πρωτεάσες, αλδολάσες, καρβονική ανύδραση) • Υδατοδιαλυτές βιταμίνες (θειαμίνη, βιοτίνη, ριβοφλαβίνη, φολικό οξύ, νιασίνη, πυριδοξίνη, παντοθενικό οξύ, βιταμίνη B₁₂ και C) • Μη πρωτεϊνικές αζωτούχες ουσίες (αμμωνία, αμινοξέα, ουρία, ουρικό οξύ) • Ίχνη μετάλλων (χαλκός, σίδηρος, ψευδάργυρος, μαγνήσιο, μόλυβδος κ.ά.) • Ορμόνες • Αντιβακτηριακές ουσίες • Μικροοργανισμοί (βακτήρια, ζύμες, μύκητες) • Σωματικά κύτταρα (επιθηλιακά, λευκοκύτταρα)

Τα διάφορα είδη γάλακτος, ιδιαίτερα αυτά που χρησιμοποιούνται για ανθρώπινη διατροφή, έχουν αποτελέσει κατά καιρούς αντικείμενο πολλών ερευνών, από τις οποίες αποδείχτηκε ότι περιέχουν τα ίδια συστατικά σε διαφορετικές όμως αναλογίες. Κατά κανόνα όσο ταχύτερη είναι η ανάπτυξη των νεογνών ενός θηλαστικού, τόσο πλουσιότερο είναι το γάλα σε πρωτεΐνες, τέφρα, ασβέστιο και φώσφορο. Είναι όμως αδύνατον να παραθέσει κανείς μία σύσταση γάλακτος που να καλύπτει όλες τις περιπτώσεις. Το μόνο σίγουρο, το οποίο έχει αποδειχτεί και επιστημονικά, είναι ότι το γάλα αποτελεί εξαιρετική τροφή για τον άνθρωπο, καθώς περιέχει ένα ευρύ φάσμα θρεπτικών συστατικών που αποτελούν πηγή ενέργειας και δομικών υλικών για τον οργανισμό του.

a) Νερό

Είναι το κύριο συστατικό που απαντά σε μεγαλύτερη αναλογία στο γάλα και αποτελεί μέσο διασποράς όλων των άλλων. Ένα μικρό ποσοστό από αυτό είναι δεσμευμένο στις πρωτεΐνες και στη λακτόζη του.

β) Λίπος

Στη λιπαρή φάση του γάλακτος περιλαμβάνονται τρεις κατηγορίες ενώσεων, τα ουδέτερα λίπη (τριγλυκερίδια, διγλυκερίδια, μονογλυκερίδια), τα πολικά λιπίδια (φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια), τα ασαπωνοποίητα συστατικά (στερόλες, λιποδιαλυτές βιταμίνες, καροτινοειδή), που απαντούν σε αναλογία περίπου 98%, 1% και 1%, αντίστοιχα.

Το λίπος του γάλακτος, που είναι το δεσπόζων συστατικό της λιπαρής φάσης του, είναι μίγμα τριγλυκεριδίων (97 έως 98%), διγλυκεριδίων (1 έως 2%) και μονογλυκεριδίων (ίχνη). Από διατροφική άποψη έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, γιατί αποτελεί πηγή ενεργειας (κατά προσέγγιση 9 kcal/g), είναι φορέας λιποδιαλυτών βιταμινών (A, D, E και K), ενώ περιέχει και αξιόλογη ποσότητα απαραίτητων λιπαρών οξέων. Θεωρείται το πιο εύγεστο φυσικό λίπος.

Στη δομή του λίπους του γάλακτος συμμετέχουν περισσότερα από 250 λιπαρά οξέα, από τα οποία άλλα σε σημαντική ποσότητα και άλλα σε ίχνη. Η φύση και η αναλογία των οξέων αυτών προσδιορίζουν τις ιδιότητές του. Στην πραγματικότητα είναι ένα συνονθύλευμα χιλιάδων διαφορετικών μορίων. Αυτός είναι και ο λόγος που δεν έχει σταθερό σημείο τήξης.

Πίνακας 1.2: Λιπαρά οξέα και αναλογία τους στο λίπος του γάλακτος¹⁷

Λιπαρά οξέα	% συνόλου λιπαρών οξέων
Κορεσμένα	
Βουτυρικό (4:0)	3,0-4,5
Καπροικό (6:0)	1,3-2,2
Καπριλικό (8:0)	0,8-2,5
Καπρικό (10:0)	1,8-3,8
Λαυρικό (12:0)	2,0-5,0
Μυριστικό (14:0)	7,0-11,0
Παλμιτικό (16:0)	25,0-29,0
Στεατικό (18:0)	3,0-7,0
Μονοακόρεστα	
Ελαϊκό (18:1 cis, ω-9)	30,0-40,0
Πολυακόρεστα	
Λινολεϊκό (18:2, ω-6)	2,0-3,0
Λινολενικό (18:3, ω-3)	Μέχρι 1,0
Αραχιδονικό (20:4, ω-6)	Μέχρι 1,0

γ) Πρωτεΐνες

Το γάλα περιέχει μεγάλη ποικιλία αζωτούχων ενώσεων από τις οποίες το 95% περίπου είναι πρωτεϊνικής φύσεως και 5% μη πρωτεϊνικής. Γύρω από την ονοματολογία των πρωτεϊνών του γάλακτος υπήρξε για μεγάλο χρονικό διάστημα σύγχυση, που φαίνεται ότι ξεπεράστηκε. Σήμερα είναι γνωστό ότι περιέχει, σε σημαντική μάλιστα αναλογία, καζεΐνες (πρωτεΐνες που κατακρημνίζονται σε pH 4,6 και θερμοκρασία 20°C) και πρωτεΐνες του ορού (δεν κατακρημνίζονται σε pH 4,6 και θερμοκρασία 20°C). Πέραν της διαφορετικής τους συμπεριφοράς στο pH οι καζεΐνες διαφέρουν από τις πρωτεΐνες του ορού και στο ότι τα πρωτεολυτικά ένζυμά τους προκαλούν πολύ μικρές αλλά εξειδικευμένες μεταβολές, που έχουν ως αποτέλεσμα την κατακρήμνισή τους παρουσία ιόντων ασβεστίου.

Καζεΐνη

Είναι χαρακτηριστική πρωτεΐνη του γάλακτος, στο οποίο απαντά σε μορφή κολλοειδούς φωσφοροκαζεϊνικού ασβεστίου. Αρχικά θεωρήθηκε ότι είναι ομοιογενής. Με την εξέλιξη όμως των μεθόδων των μέσων ανάλυσης διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν πολλά κλάσματα καζεΐνης που διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στην ηλεκτροφορητική κινητικότητα και στις τυροκομικές ιδιότητες. Αργότερα διαπιστώθηκε η ύπαρξη και γενετικών παραλλαγών τους. Οι καζεΐνες που απαντούν στο γάλα σε μεγαλύτερη αναλογία είναι οι α_{s1} -, α_{s2} -, β - και κ -καζεΐνες. Από αυτές η κ -καζεΐνη δεν κατακρημνίζεται παρουσία ιόντων ασβεστίου και σταθεροποιεί όλες τις άλλες στο γάλα.

Πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος

Μετά την καταβύθιση της καζεΐνης του γάλακτος το υγρό που παραμένει χαρακτηρίζεται σαν «ορός του γάλακτος». Οι πρωτεΐνες του ορού του γάλακτος είναι οι γαλακτογλοβουλίνες και οι γαλακταλβουμίνες.

A. Γαλακτογλουβίνες. Είναι δυσδιάλυτες στο νερό, αλλά διαλυτές στα αραιά ουδέτερα διαλύματα των αλάτων. Δεν πήζουν με τη ρεννίνη (πυτιά), πήζουν όμως κατά τη θέρμανση. Οι γαλακτογλουβίνες έχουν μεγάλη βιολογική αξία, γιατί μοιάζουν με τις γ -γλοβουλίνες του αίματος που είναι γνωστές σαν ανοσογλοβουλίνες και χρησιμεύουν ως φορείς των αντισωμάτων που προστατεύουν τα νεογνά των θηλαστικών από τους παθογόνους μικροοργανισμούς.

B. Γαλακταλβουμίνες. Είναι διαλυτές στο νερό και τα αραιά ουδέτερα διαλύματα των αλάτων. Κατά τη θέρμανση του γάλακτος πήζουν και σχηματίζουν μικρούς κόκκους. Το ποσοστό κατά το οποίο πήζουν οι γαλακταλβουμίνες είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας. Στη θερμοκρασία της παστερίωσης πήζουν κατά 10% περίπου, ενώ στη θερμοκρασία βρασμού πήζουν κατά 100%. Οι γαλακταλβουμίνες δεν πήζουν με το ένζυμο ρεννίνη.

Με ηλεκτροφορητικές μεθόδους δείχθηκε ότι οι γαλακταλβουμίνες αποτελούνται από β -γαλακτογλοβουλίνη, α -γαλακτογλοβουλίνη και οροαλβουμίνη.

δ) Υδατάνθρακες – Λακτόζη

Η λακτόζη είναι ο χαρακτηριστικός υδατάνθρακας του γάλακτος, ο μόνος που υπάρχει ελεύθερος και σε σημαντικές ποσότητες σε αυτό. Αποτελείται από ένα μόριο d-γλυκόζης και ένα μόριο d-γαλακτόζης. Στο κανονικό γάλα υπάρχει συνήθως σε αναλογία 4,4% έως 5,2%. Αντιπροσωπεύει το 50-52% των στερεών συστατικών του άπαχου γάλακτος.

Αποτελεί πηγή ενέργειας, πλην όμως, για να χρησιμοποιηθεί πρέπει πρώτα να διασπαστεί σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Αυτό επιτυγχάνεται με τη συμβολή του ενζύμου της λακτάσης, που αφθονεί στο πεπτικό σύστημα των νεογνών και λαμβάνεται σήμερα σε βιομηχανική κλίμακα από καλλιέργειες επιλεγμένων μικροοργανισμών.

Η παρουσία λακτόζης στο γάλα αποτελεί προϋπόθεση για την παρασκευή διάφορων ζυμωμένων προϊόντων, όπως τα τυριά. Υπό την επίδραση διαφόρων μικροοργανισμών υφίσταται διάφορες ζυμώσεις από τις οποίες άλλες θεωρούνται ωφέλιμες για τις γαλακτοβιομηχανίες και αξιοποιούνται από αυτές κατά την παρασκευή διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων (τυριά, γιαούρτι, κεφίρ, ξινόγαλα κ.ά.) και άλλες επιβλαβείς που πρέπει με κάθε τρόπο να αποφεύγονται.

ε) Ένζυμα

Τα ένζυμα στο γάλα βρίσκονται είτε ελεύθερα σαν πρωτεΐνες είτε δεσμευμένα σε σύμπλοκα, όπως τις λιποπρωτεΐνες. Από αυτά τα σπουδαιότερα είναι:

1. Η αλκαλική φωσφατάση

Καταλύει την υδρόλυση ορισμένων οργανικών φωσφορικών ενώσεων. Αδρανοποιείται κατά ποσοστό 99,9% με την παστερίωση του γάλακτος.

2. Η λιπάση

Προκαλεί την υδρόλυση του λίπους του γάλακτος προς ελεύθερα οξέα, γλυκερίνη, μονο- και διγλυκερίδια. Η λιπολυτική δράση της λιπάσης επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, το pH, το βαθμό ομογενοποίησης του γάλακτος κ.ά.

3. Η πρωτεάση

Προκαλεί την αργή διάσπαση των πρωτεϊνών του γάλακτος και κατά κύριο λόγο της καζεΐνης.

στ) Ανόργανα συστατικά της τέφρας

Η τέφρα αποτελείται από οξείδια του Na, K, Ca, Mg, Fe, P και S. Τα ανόργανα άλατα είναι τα PO_4^{4-} , Cl, κητρικά και εκείνα του K, Na, Ca, Mg.

ζ) Βιταμίνες

Οι μεν λιποδιαλυτές βιταμίνες είναι συστατικά του λίπους στο γάλα (A, D, E, K), ενώ οι βιταμίνες B και C απαντούν στην υδατική φάση του γάλακτος.

1.3.3 Προϊόντα Γάλακτος^{18,19}

α) Γάλα Εβαπορέ (συμπυκνωμένο γάλα)

Προκύπτει από το νωπό γάλα ύστερα από συμπύκνωση μέχρι του μισού του αρχικού του όγκου.

β) Γάλα σκόνη

Παρασκευάζεται μετά από ξήρανση σε ειδικές εγκαταστάσεις.

γ) Παγωτά

Περιέχουν γάλα (σκόνη γάλακτος), βούτυρο, γλυκαντικές ύλες, αρωματικές ύλες, σταθεροποιητές και γαλακτωματοποιητές. Το περιεχόμενο σε λίπος είναι τουλάχιστον 10%, τα συνολικά στερεά 20%, οι σταθεροποιητές λιγότερο από 0,5% και οι γαλακτωματοποιητές λιγότερο από 0,2%. Από άποψη δομής το παγωτό είναι ένας στερεός αφρός, στον οποίο η συνεχής φάση είναι ένα παγωμένο γαλάκτωμα.

δ) Γιαούρτι

Παρασκευάζεται από πρόβειο ή αγελαδινό γάλα με την προσθήκη καθαρής καλλιέργειας των μικροοργανισμών *Lactobacillus bulgaricus* και *Streptococcus thermophilus*. Το γιαούρτι πρέπει να περιέχει λίπος και στερεό υπόλειμμα χωρίς λίπος (ΣΥΧΛ), σε ποσοστό ανώτερο κατά 10% τουλάχιστον από το αντίστοιχο γάλα από το οποίο παρασκευάστηκε.

ε) Βούτυρο

Είναι γενικά το προϊόν που λαμβάνεται με απόδραση του γάλακτος, με περιεκτικότητα σε λίπος τουλάχιστον 80%. Διακρίνεται σε νωπό ή φρέσκο βούτυρο, αλατισμένο νωπό βούτυρο και τετηγμένο (λιωμένο) βούτυρο.

στ) Τυρί

Το προϊόν αυτό είναι αποτέλεσμα της προσπάθειας του ανθρώπου να συντηρήσει το ευαλλοιώτο γάλα σε μια πιο σταθερή μορφή, πολύ μικρότερου βάρους και όγκου, εύπεπτη, γευστική και μεγάλης θεραπευτικής αξίας. Τα τυριά ανάλογα με το ποσό υγρασίας που περιέχουν διακρίνονται σε μαλακά (υγρασία 45-80%) και σκληρά (υγρασία 30-45%).

1.4 Τυριά

1.4.1 Ιστορική Αναδρομή

Από την αρχαία εποχή το γάλα θεωρούνταν η καλύτερη τροφή που υπάρχει για τον άνθρωπο. Δεν μπορούσε όμως να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα, διότι αλλοιώνεται εύκολα και γίνεται ακατάλληλο για κατανάλωση. Έτσι προέκυψε η ανάγκη να μετατραπεί το γάλα σε κάποιο προϊόν που να διατηρείται και να έχει την υψηλή βιολογική αξία του γάλακτος. Ένα τέτοιο προϊόν είναι και το τυρί, που η ανακάλυψή του έγινε τυχαία.

Η πιθανή πατρίδα του τυριού είναι κάποια από τις θερμές χώρες στη λεκάνη της Μεσογείου. Σύμφωνα με κάποιο αρχαίο μύθο το τυρί έγινε συμπτωματικά από έναν Άραβα έμπορο, ο οποίος έβαλε το γάλα του σε ένα ασκί από στομάχι προβάτου και ξεκίνησε για ένα ταξίδι μέσα από την έρημο. Η πυτιά στα τοιχώματα του ασκιού και η ζέστη προκάλεσαν την πήξη του γάλακτος και το διαχωρισμό του σε πήγμα και τυρόγαλα. Κατά την πορεία του διαπίστωσε ότι το τυρόγαλα και το πήγμα (τυρί) έκοψε την πείνα του, μάλιστα το τυρί είχε και ευχάριστη γεύση. Έτσι κατά το μύθο άρχισε η παραγωγή ενός από τα πιο σπουδαία τρόφιμα του ανθρώπου^{17,18}.

Μπορεί όμως και να ανακαλύφθηκε το τυρί κατά την προσπάθεια του ανθρώπου να βρει τρόπους να διατηρήσει το γάλα, όπως με αποξήρανση στο ήλιο μέσα σε ρηγά πήλινα ή ξύλινα δοχεία. Με τις συνθήκες αυτές τα βακτήρια μπορούσαν εύκολα να πήξουν το γάλα και να δώσουν κάποιο όξινο πήγμα από όπου ξεκίνησε το τυρί.

Η τυροκομία στην Ελλάδα έχει μια μακραίωνη παράδοση. Σύμφωνα με την ελληνική μυθολογία την τέχνη της τυροκομίας ανακάλυψε ο γιός του Απόλλωνα, ο Αριστέας. Έχουν βρεθεί αναφορές σε τυριά από τον Όμηρο στην Οδύσσεια (8ος αιώνας π. Χ.) αλλά και από τον ιστορικό Διόδωρο Σικελιώτη (1ος αιώνας π. Χ.). Δεδομένης της αξίας του τυριού ως τροφή, οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν το τυρί ως μια θεϊκή εφεύρεση και δώρο. Το τυρί που

περιγράφει ο Όμηρος φαίνεται δυνατό να είναι ο πρόγονος του τυριού Φέτα, ένα από τα βασικότερα τυριά που παρασκευάζονται στην Ελλάδα από τα αρχαία χρόνια μέχρι σήμερα²².

Μέχρι τα μέσα του 19^{ου} αιώνα η τυροκομία ήταν χωρικής μορφής. Το 1851 αναφέρεται ότι δημιουργήθηκε η πρώτη βιομηχανία τυριού στις ΗΠΑ και φαίνεται πως από τότε άρχισε η αλματώδης πρόοδος της τυροκομίας. Στην αρχή η διάδοση της τεχνολογίας των τυριών γινόταν από τον ένα πολιτισμό στον άλλο με μικρές παραλλαγές για να ικανοποιήσει τις τοπικές ανάγκες και απαιτήσεις, αλλά γίνονταν και παραλλαγές που σκοπό είχαν τις βελτιώσεις. Η πρόοδος όμως της τυροκομίας οφείλεται κυρίως στις προόδους της επιστήμης και της τεχνολογίας. Τη σημαντικότερη ώθηση έδωσε η εξέλιξη της επιστήμης, η οποία αφενός αύξησε τη γαλακτοπαραγωγή και αφετέρου προώθησε την τυροκομία από το επίπεδο της «τέχνης» στο επίπεδο της «τέχνης και επιστήμης». Το τελευταίο έγινε ιδίως μετά τις εργασίες του Pasteur το 1860-1870 στο κρασί και την μύρα, που με τη θερμική επεξεργασία τους ρύθμιζε τις ζυμώσεις τους. Τα φαινόμενα αυτά διαπιστώθηκε ότι οφείλονταν σε μικροοργανισμούς κι έτσι δημιουργήθηκε η κατηγορία των ζυμούμενων τροφίμων μεταξύ των οποίων και τα τυριά.

Η τεχνολογική εξέλιξη των τελευταίων δεκαετιών άλλαξε τη μορφή της τυροκομίας σε πολύ μεγάλο βαθμό. Σε εξελιγμένες γαλακτοκομικά χώρες οι μικρές βιοτεχνίες παρασκευής τυριών αντικαταστάθηκαν από σύγχρονες βιομηχανίες πολύ μεγάλης δυναμικότητας, με πλήρως μηχανοποιημένη διαδικασία. Τους παραδοσιακούς τεχνίτες τυροκόμους αντικατέστησαν ειδικευμένοι χειριστές σύγχρονων μηχανημάτων με τη βοήθεια των οποίων είναι δυνατός ο έλεγχος όλων των σταδίων της τυροκόμησης. Σήμερα είναι συνήθης η περίπτωση βιομηχανιών που τυροκομούν άνω των 2000 τόνων γάλακτος την ημέρα, κάτι που σε άλλες εποχές, ακόμα και κοντινές, φαινόταν φανταστικό^{17,18}.

Σε παγκόσμιο επίπεδο η τυροκομία είναι ένας από τους πιο σημαντικούς παραγωγικούς κλάδους. Η κάθε χώρα και πολλές φορές η κάθε περιοχή παράγει διαφορετικούς τύπους τυριών με ιδιαίτερα και ξεχωριστά χαρακτηριστικά. Έτσι με το πέρασμα των αιώνων παρατηρούμε ότι πολλές περιοχές δημιούργησαν μεγάλη παράδοση στη δημιουργία συγκεκριμένων τύπων τυριών. Ο τοπικός χαρακτήρας πολλών εξ αυτών μάλιστα προστατεύεται και από ειδική νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ο κανονισμός 2081/92 της Ευρωπαϊκής Ένωσης θέσπισε το 1992 για πρώτη φορά το καθεστώς για την προστασία των γεωγραφικών ενδείξεων και των ονομασιών προέλευσης των γεωργικών προϊόντων και των τροφίμων και ο κανονισμός 2082/92 το καθεστώς για τις βεβαιώσεις ιδιοτυπίας των γεωργικών προϊόντων και τροφίμων. Το 2006 με στόχο τη βελτίωση του συστήματος οι παραπάνω κανονισμοί αντικαταστάθηκαν από τους 510/06 και 509/06

αντίστοιχα, χωρίς ωστόσο να μεταβληθεί το πεδίο εφαρμογής τους και η σκοπιμότητά τους. Οι ΠΟΠ (προστασία ονομασίας προέλευσης), ΠΓΕ (προστατευόμενη γεωγραφική ένδειξη) και ΕΠΠ (Εγγυημένο Παραδοσιακό Ιδιότυπο Προϊόν) ετικέτες εγγυώνται συγκεκριμένες αισθητικές ιδιότητες και υποδηλώνουν ότι το προϊόν περιέχει ιδιαίτερα χαρακτηριστικά²³.

Ως «Όνομασία Προέλευσης» νοείται η ονομασία που ταυτοποιεί ένα προϊόν:

- α) το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή σε εξαιρετικές περιπτώσεις χώρα
- β) του οποίου η ποιότητα ή τα χαρακτηριστικά οφείλονται κυρίως ή αποκλειστικά στο ιδιαίτερο γεωγραφικό περιβάλλον που συμπεριλαμβάνει τους εγγενείς φυσικούς και ανθρώπινους παράγοντες και
- γ) του οποίου όλα τα στάδια της παραγωγής εκτελούνται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής²³.

Ως «Γεωγραφική Ένδειξη» νοείται η ονομασία που ταυτοποιεί ένα προϊόν:

- α) το οποίο κατάγεται από συγκεκριμένο τόπο, περιοχή ή χώρα
- β) του οποίου ένα συγκεκριμένο ποιοτικό χαρακτηριστικό, η φήμη ή άλλο χαρακτηριστικό μπορεί να αποδοθεί κυρίως στη γεωγραφική του προέλευση και
- γ) του οποίου ένα τουλάχιστον από τα στάδια της παραγωγής εκτελείται εντός της οριοθετημένης γεωγραφικής περιοχής²³.

Ως «εγγυημένο παραδοσιακό ιδιότυπο προϊόν» νοείται ένα ιδιότυπο προϊόν ή τρόφιμο το οποίο:

α) παρασκευάζεται με τρόπο παραγωγής, μεταποίησης ή σύνθεσης που αντιστοιχεί στην παραδοσιακή πρακτική για το εν λόγω προϊόν ή τρόφιμο ή

β) παράγεται από πρώτες ύλες ή συστατικά που είναι τα χρησιμοποιούμενα παραδοσιακά.

Για να μπορεί να καταχωρισθεί μια ονομασία ως ονομασία εγγυημένου παραδοσιακού ιδιότυπου προϊόντος, πρέπει:

α) να χρησιμοποιείται κατά παράδοση για την περιγραφή του ιδιότυπου προϊόντος ή

β) να προσδιορίζει τον παραδοσιακό χαρακτήρα ή τον ιδιότυπο χαρακτήρα του προϊόντος²³.



Εικόνα 1.1: Λογότυπα για ΠΟΠ, ΠΓΕ, ΕΠΙΠ προϊόντα

Σήμερα παρασκευάζονται πολλά παραδοσιακά τυριά σε όλη την Ελλάδα. Κάποια είναι τύποι της ίδιας ποικιλίας με διαφοροποιημένα βήματα στην τεχνολογία παρασκευής ή ενδεχομένως με την ίδια τεχνολογία, αλλά είναι γνωστά με διαφορετικές τοπικές ονομασίες. Είκοσι από αυτά τα τυριά έχουν αναγνωριστεί ως τυριά ΠΟΠ και υπάρχουν και άλλα, που περιμένουν για την αναγνώρισή τους²².

1.4.2 Παραδοσιακά Ελληνικά Τυριά

Τα παραδοσιακά ελληνικά τυριά χαρακτηρίζονται για την υψηλή τους ποιότητα και τα πρωτότυπα χαρακτηριστικά τους. Χαρακτηρίζονται για την μοναδική και ιδιαίτερη γεύση τους, αλλά και το πλούσιο άρωμά τους. Για την παρασκευή των τυριών αυτών χρησιμοποιείται, σχεδόν αποκλειστικά, πρόβειο και γίδινο γάλα τα οποία διαφέρουν σημαντικά στη σύσταση και στα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά από το αγελαδινό. Πέραν αυτού, οι ιδιόρρυθμες εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας, οι εκτρεφόμενες φυλές προβάτων, η μεγάλη ποικιλία των ενδημικών φυτών της, οι συνθήκες παραγωγής και επεξεργασίας του γάλακτος σε συνδυασμό με τη μακρόχρονη εμπειρία των ελλήνων τυροκόμων στην αξιοποίηση αιγοπρόβειου γάλακτος είναι παράγοντες που επηρεάζουν και διαμορφώνουν τα πρωτότυπα χαρακτηριστικά τους. Μέχρι στιγμής έχουν κατοχυρωθεί ως Π.Ο.Π. 21 ελληνικά παραδοσιακά τυριά που παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1.3: Ελληνικά παραδοσιακά τυριά ΠΟΠ²⁰

Όνομα Τυριού	Περιοχή
Ανεβατό	Νομός Γρεβενών και Επαρχία Βοΐου Κοζάνης
Γαλοτύρι	Ήπειρος & Θεσσαλία
Γραβιέρα Αγράφων	Άγραφα (Θεσσαλία)
Γραβιέρα Κρήτης	Κρήτη
Γραβιέρα Νάξου	Νάξος
Καλαθάκι Λήμνου	Λήμνος
Κασέρι	Μακεδονία, Θεσσαλία, Λέσβος & Ξάνθη
Κατίκι Δομοκού	Δομοκός
Κεφαλογραβιέρα	Δυτική Μακεδονία, Ήπειρος, Ν.Αιτωλοακαρνανίας & Ν.Ευρυτανίας
Κοπανιστή	Κυκλάδες
Λαδοτύρι Μυτιλήνης	Μυτιλήνη
Μανούρι	Θεσσαλία, Κεντρική & Δυτική Μακεδονία
Μετσοβόνη	Μέτσοβο (Ήπειρος)
Μπάτζος	Θεσσαλία, Κεντρική & Δυτική Μακεδονία
Εύγαλο ή Ξίγαλο Σητείας	Σητεία (Κρήτη)
Ευνομυζήθρα Κρήτης	Κρήτη
Πηχτόγαλο Χανίων	Χανιά (Κρήτη)
Σαν Μιχάλη	Σύρος
Σφέλα	Μεσσηνία & Λακωνία
Φορμαέλλα Αράχωβας Παρνασσού	Αράχωβα
Φέτα	Μακεδονία, Θράκη, Ήπειρος, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησος, Ν. Λέσβου & Θεσσαλία

1.4.3 Είδη και κατηγορίες τυριών

Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, τυρί είναι το προϊόν ωρίμανσης του πήγματος του γάλακτος, που είναι απαλλαγμένο από τυρόγαλα σε επιθυμητό κάθε φορά επίπεδο και το οποίο παράγεται με την επενέργεια πυτιάς ή άλλων ενζύμων με ανάλογη δράση (ή και με οξίνιση) (Γενικό Χημείο του Κράτους, 2004). Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (World Health Organization, WHO), ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (Food & Agriculture Organization, FAO) και η Διεθνής Επιτροπή Γάλακτος (International Dairy Committee, IDF), χαρακτηρίζουν ως τυρί το φρέσκο ή ώριμο προϊόν που λαμβάνεται με:

α) Πήξιμο γάλακτος, αποβουτυρωμένου ή μερικώς αποβουτυρωμένου γάλακτος, κρέμας από γάλα ή τυρόγαλα ή από παρασκευή βουτύρου ή από συνδυασμό των παραπάνω υλών, μετά από δράση πυτιάς ή άλλων κατάλληλων πηκτικών παραγόντων και με τη μερική στράγγιση του τυρογάλακτος μετά το πήξιμο,

β) Μεθόδους επεξεργασίας που περιλαμβάνουν πήξιμο του γάλακτος ή/και πρώτων υλών που λαμβάνονται από γάλα και που οι μέθοδοι επεξεργασίας οδηγούν στην παρασκευή τελικού προϊόντος με παραπλήσια φυσικοχημικά και οργανοληπτικά χαρακτηριστικά με αυτά του προϊόντος που ορίζεται στο (α) (FAO/WHO, 2000).

Για την παρασκευή των τυριών ακολουθούνται με κάποιες μικρές ίσως διαφορές τα εξής στάδια¹⁷:

- 1) Προετοιμασία του γάλακτος (παραλαβή, τυποποίηση, θερμική επεξεργασία),
- 2) Προσθήκη καλλιεργείων (εκκινητών και βοηθητικών),
- 3) Προσθήκη πυτιάς ή άλλων κατάλληλων ενζύμων,
- 4) Διαίρεση, Αναθέρμανση και Στράγγιση του τυροπήγματος,
- 5) Τοποθέτηση σε καλούπια και Πίεση,
- 6) Αλάτισμα του τυριού (ξηρό ή με άλμη),
- 7) Ωρίμανση του τυριού σε κατάλληλο περιβάλλον (θερμοκρασία, υγρασία κ.τ.λ.).

Η τεράστια ποικιλία τυριών που παράγονται παγκοσμίως και οι διαφορές που παρουσιάζουν μεταξύ τους, προσφέρουν μεγάλο αριθμό κριτηρίων για την κατάταξη τους. Τέτοια κριτήρια είναι η συνεκτικότητα, η υγρασία, το είδος του γάλακτος, η λιποπεριεκτικότητα, ο χρόνος ωρίμανσης και ο τρόπος πήξης. Συνήθως, η κατάταξη γίνεται με βάση την υγρασία (Πίνακας 1.4) σε μαλακά, ημι-σκληρά, σκληρά και πολύ σκληρά τυριά, ενώ υπάρχουν και ξεχωριστές κατηγορίες, όπως τυριά τυρογάλακτος, κρέμας, ανακατεργασμένα και αλοιφώδη.

Πίνακας 1.4: Κατάταξη τυριών με βάση την υγρασία²¹

Κατηγορίες	Υγρασία Μεγίστη (%)	Ονομασία τυριού	Παρατηρήσεις
Πολύ σκληρά	32	Parmesan, Reggiano, Romano, Asiago	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Σκληρά	40	Κεφαλοτύρι, Κασέρι, Γραβιέρα, Cheddar, Colby, Cacciocavallo Gruyere	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Ημίσκληρα	41 - 46	Emmental (Swiss) Edam, Gouda, Brick, Muester, Nuworld, Provolone, Roquefort, Gorgonzola, Blue cheese	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Μαλακά	56	Φέτα, Τελεμές, Κοπανιστή, Mozzarella, Scarmorza	Παρασκευάζονται μετά από ωρίμανση
Τυριά από τυρόγαλα	65	Μυζήθρα, Μανούρι, Μανουρομυζήθρα, Ανθότυρος	Παρασκευάζονται μετά από αναθέρμανση του τυρογάλακτος με ή χωρίς προσθήκη προσγάλακτος
Τυρός κρέμα	60±5	Cream cheese (Neufchatel)	Είναι ένας τύπος μαλακού τυριού που παρασκευάζεται από μίγμα κρέμας και αποβουτυρωμένου γάλακτος - Συνήθως δεν είναι προϊόν ωρίμανσης
Ανακατεργασμένα ή λυωμένα τυριά ή τυριά τρόφιμα	60±5	Processed cheeses, cheese foods	Παρασκευάζονται μετά από ανάμιξη και λιώσιμο περισσότερων ειδών τυριών. Επιτρέπεται η προσθήκη και άλλων τροφίμων σε ποσοστό όχι μεγαλύτερο του 49%
Τυριά που αλείφονται	60%	Cheese spreads	Παρασκευάζονται όπως και τα cheese foods με λιγότερο συνήθως λίπος από αυτές

1.4.4 Χημική σύσταση και Διατροφική Αξία

Το τυρί είναι ιδιαίτερα πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνες, λίπος, άλατα ασβεστίου και φωσφόρου και βιταμίνες. Συγκεκριμένα, η υδρόλυση της καζεΐνης σε πεπτίδια και αμινοξέα παρέχει σε μεγάλες αναλογίες όλα τα απαραίτητα αμινοξέα, γεγονός το οποίο καθιστά το τυρί τρόφιμο εξαιρετικά υψηλής βιολογικής αξίας. Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης υδρολύεται και το λίπος σε ελεύθερα λιπαρά οξέα, τα οποία συνεισφέρουν στο άρωμα και στη γεύση του τυριού. Μετά την απομάκρυνση του τυρογάλακτος η παραμένουσα

λακτόζη μεταβολίζεται σε γαλακτικό, οξικό και προπιονικό οξύ και σε άλλες ουσίες, που συμβάλλουν στη διαμόρφωση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του τυριού²⁴.

Επίσης, αποτελεί σημαντική πηγή αλάτων ασβεστίου και φωσφόρου. Τα συστατικά αυτά παρουσιάζουν ιδιαίτερο διατροφικό ενδιαφέρον, γιατί συμμετέχουν σε πλήθος φυσικοχημικών και βιοχημικών διεργασιών που πραγματοποιούνται στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα άλατα του ασβεστίου και του φωσφόρου αποτελούν δομικό συστατικό του σκελετού και των δοντιών και συμβάλλουν στη διατήρησή τους. Οι ανάγκες του ανθρώπου στα συστατικά αυτά είναι υψηλές και διαφοροποιούνται με την ηλικία²⁵.

Το ασβέστιο που δεν απορροφάται από τον οργανισμό υποστηρίζεται ότι παραμένει ενεργό στον ειλεό και το παχύ έντερο, όπου σχηματίζει αδιάλυτα άλατα με τα κορεσμένα λιπαρά οξέα που υπάρχουν εκεί, ελαττώνει την απορρόφησή τους και έμμεσα συμβάλλει στην μείωση των στεφανιαίων παθήσεων²⁵. Υπό την έννοια αυτή τα κορεσμένα λιπίδια των τυριών είναι λιγότερο επικίνδυνα από αυτά του γάλακτος. Το μη αφομοιώσιμο ασβέστιο θεωρούν ότι επηρεάζει επίσης το ρυθμό πολλαπλασιασμού των επιθηλιακών κυττάρων στο απευθυσμένο. Εξουδετερώνει τα λιπαρά οξέα και τα χολικά άλατα και καθιστά το περιβάλλον λιγότερο ευνοϊκό για τον πολλαπλασιασμό τους. Αλλά και άμεσα μπορεί να δράσει επί των κυττάρων αυτών, όταν λαμβάνεται σε μεγάλες δόσεις, άνω του 1 g/ημέρα.

Πέραν του ασβεστίου και του φωσφόρου, τα τυριά αποτελούν καλή πηγή νατρίου, καλίου, ενώ η περιεκτικότητά τους σε μαγνήσιο είναι μικρή. Σε ό,τι αφορά τα ιχνοστοιχεία είναι καλή πηγή ψευδαργύρου, ιωδίου και σεληνίου, ενώ η περιεκτικότητά τους σε σίδηρο είναι χαμηλή²⁴.

Από τις βιταμίνες του γάλακτος οι λιποδιαλυτές A, D, E και K μεταφέρονται κατά την τυροκόμηση με το λίπος, σε ποσοστό 80-85%, στο τυρί. Κατά συνέπεια, η περιεκτικότητα των τυριών σε βιταμίνες της κατηγορίας αυτής εξαρτάται από την λιποπεριεκτικότητά τους. Όσο μεγαλύτερη είναι αυτή, τόσο μεγαλύτερη είναι και η περιεκτικότητα των τυριών σε λιποδιαλυτές βιταμίνες. Οι υδατοδιαλυτές βιταμίνες θειαμίνη και ριβοφλαβίνη βρίσκονται και αυτές σε μεγάλη αναλογία, λόγω της σύνδεσής τους με τα πηγνύομενα συστατικά. Αντίθετα, οι βιταμίνες του συμπλέγματος B και το ασκορβικό οξύ καταστρέφονται σε μεγάλο βαθμό κατά τις επεξεργασίες της παρασκευής¹⁷.

Γενικότερα, η αξιολόγηση του τυριού σε σχέση με άλλα τρόφιμα δεν είναι εύκολη, γιατί εξαρτάται από το είδος του τυριού. Για παράδειγμα, τα σκληρά τυριά επειδή έχουν χαμηλότερο ποσοστό υγρασίας σε σύγκριση με τα μαλακά, αποτελούν πιο συμπυκνωμένη και πλούσια σε θρεπτικά συστατικά τροφή. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τις ενδεικτικές συστάσεις γνωστών τυριών που αναφέρονται στον Πίνακα 1.5.

Πίνακας 1.5: Σύσταση γνωστών τυριών¹⁷

Είδος τυριού	Υγρασία	Λίπος	Λεύκωμα	Τέφρα	Αλάτι	Ασβέστιο	Φώσφορο
Parmesan	31	27	37,5	3,0	1,8	1,20	1,00
Γραβιέρα	34	34,6	26,7	4,4	1,6	1,45	—
Gorgonzola	35,8	32,0	26,0	2,6	2,4	—	—
Roquefort	39,5	33,0	22,0	2,3	4,2	0,65	0,45
Edam	39,5	23,8	30,6	2,3	2,8	0,85	0,55
Brick	41,3	31,0	22,1	1,2	1,8	0,73	0,45
Limburger	45,5	28,0	22,0	2,0	2,1	0,5	0,4
Camembert	50,8	26,0	10,8	1,2	2,5	0,68	0,50
Brie	51,3	26,1	19,6	1,5	1,5	—	—
Φέτα	52,1	26,0	21,0	0,9	2,7	0,70	—
Cottage άπαχο	79,5	0,3	15,0	0,8	1,0	0,10	0,15
» με λίπος	79,2	4,3	13,2	0,8	1,0	0,12	0,15

1.4.5 Παρασκευές Τυριών και Μικροοργανισμοί

Όπως αναφέρθηκε η παρασκευή των τυριών αποτελείται από επτά συνήθως στάδια. Αυτά είναι:

- 1) Προετοιμασία του γάλακτος (παραλαβή, τυποποίηση, θερμική επεξεργασία),
- 2) Προσθήκη καλλιεργείων (εκκινητών και βοηθητικών),
- 3) Προσθήκη πυτιάς ή άλλων κατάλληλων ενζύμων,
- 4) Διαίρεση, Αναθέρμανση και Στράγγιση του τυροπήγματος,
- 5) Τοποθέτηση σε καλούπια και Πίεση,
- 6) Αλάτισμα του τυριού (ξηρό ή με άλμη),
- 7) Ωρίμανση του τυριού σε κατάλληλο περιβάλλον (θερμοκρασία, υγρασία κ.τ.λ.).

Τα κυριότερα συστατικά που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία παραγωγής είναι το γάλα, η πυτιά, η καλλιέργεια μικροοργανισμών και το αλάτι. Τα υπόλοιπα συστατικά που μπορεί να χρησιμοποιηθούν, όπως χρωστικές, γλωριούχο ασβέστιο και διάφορα πρόσθετα θεωρούνται δευτερεύοντα, διότι δεν είναι απαραίτητη η χρησιμοποίησή τους.

Η παρασκευή της πλειοψηφίας των τυριών (εκτός των μαλακών τυριών που καταναλώνονται φρέσκα) μπορεί ουσιαστικά να υποδιαιρεθεί σε δυο φάσεις, τη δημιουργία και την ωρίμανση. Η περίοδος της δημιουργίας του πρώτου πήγματος ορίζεται ως η χρονική διάρκεια των 24 πρώτων ωρών κατά τις οποίες διενεργούνται συγκεκριμένες εργασίες όπως το αλάτισμα, η αφυδάτωση κ.α., ανεξάρτητα από τον τύπο τυριού που θέλουμε να παρασκευάσουμε. Η δημιουργία του πρώτου πήγματος του τυριού είναι μια διαδικασία

αφυδάτωσης κατά την οποία το λίπος και η καζεΐνη συμπυκνώνονται από 6 ως 12 φορές, ανάλογα με το είδος του τυριού. Η δημιουργία αυτού του πρώτου πήγματος συμβαίνει μετά την διάσπαση της κ-καζεΐνης από τα πρωτεολυτικά ένζυμα της πυτιάς, κυρίως τη χυμοσίνη ή την πεψίνη ή άλλες μικροβιακής φύσεως πρωτεϊνάσες. Η πρωτεολυτική δράση της χυμοσίνης παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην ωρίμανση του τυριού, αφού είναι αυτή που ουσιαστικά δημιουργεί το πρώτο πήγμα που αποτελεί τη βάση για το τελικό ώριμο τυρί. Στο στάδιο της ωρίμανσης του τυριού, συμβαίνουν διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις οι κυριότερες από τις οποίες είναι η πρωτεόλυση, λιπόλυση και η γλυκόλυση²⁴.

1.4.6 Τα είδη και ο ρόλος των μικροοργανισμών στην τυροκομία

Το τυρί αποτελεί χαρακτηριστική περίπτωση ζυμωμένου προϊόντος, δεδομένου ότι οι ιδιότητες του τροποποιούνται στον επιθυμητό, κατά περίπτωση βαθμό με τη δράση μικροοργανισμών ή/και ενζύμων. Οξυγαλακτικά βακτήρια, ζύμες και μύκητες εμπλέκονται στις ζυμώσεις αυτές, ενώ και άλλα βακτήρια είναι δυνατόν να παίζουν σημαντικό ρόλο σε ειδικούς τύπος τυριών. Τα μικρόβια αυτά προστίθενται σήμερα στο γάλα της τυροκόμησης ή στο τυρόπηγμα σε μορφή καθαρών καλλιιεργειών, που έχουν απομονωθεί από ειδικά για το σκοπό αυτό εργαστήρια. Παλαιότερα χρησιμοποιούσαν φυσικές καλλιέργειες, πρακτική που σπανίζει σήμερα¹⁸.

Οι δύο πιο σημαντικές μικροβιακές ομάδες στην παραγωγή και ωρίμανση του τυριού είναι η χλωρίδα εκκίνησης και η δευτερεύουσα μικροχλωρίδα. Η χλωρίδα εκκίνησης αποτελείται από τα οξυγαλακτικά βακτήρια, που ονομάζονται εκκινητές (startets), ενώ η δευτερεύουσα μικροχλωρίδα από τα βακτήρια μη εκκινητές (Non-Starter Lactic Acid Bacteria – NSLAB), τα προπιονικά βακτήρια (Propionic Acid Bacteria – PAB), τις ζύμες, τα βακτήρια επιχρύσματος, τους μικρόκοκκους, τους πεδιόκοκκους και τους μύκητες²⁶.

α) Χλωρίδα Εκκίνησης – Βακτήρια Εκκινητές

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια (εκκινητές) αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μικροοργανισμών, από άποψη μορφολογίας και φυσιολογίας, που χαρακτηρίζονται για την ικανότητά τους να παράγουν μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος κατά τη ζύμωση της λακτόζης. Μερικά από αυτά παράγουν πολύ περισσότερο γαλακτικό οξύ, 1,8 mol γαλακτικού οξέος από 1 mol γλυκόζης (ομοζυγωτικά), ενώ άλλα λιγότερο, 1 mol γαλακτικού οξέος από 1 mol γλυκόζης (ετεροζυγωτικά). Επίσης, συμβάλλουν στην ωρίμανση του τυριού

καθώς τα ένζυμά τους εμπλέκονται στην πρωτεόλυση και τη μετατροπή των αμινοξέων σε αρωματικές ενώσεις.

Τα κριτήρια για την επιλογή τους είναι:

- α) η έλλειψη παθογένειας ή τοξικότητας για τον άνθρωπο
- β) η ικανότητα ταχείας παραγωγής γαλακτικού οξέος στην επιθυμητή κατά περίπτωση ποσότητα
- γ) η ικανότητα επικράτησης της ανταγωνιστικής τους μικροχλωρίδας
- δ) η ευκολία πολλαπλασιασμού τους
- ε) η σταθερότητα των επιθυμητών ιδιοτήτων τους κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού και της αποθήκευσής τους¹⁷.

Τα οξυγαλακτικά βακτήρια που παρουσιάζουν σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Γάλακτος σημαντικό ενδιαφέρον για τις γαλακτοβιομηχανίες ανήκουν στα γένη *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* και *Enterococcus*.

Τα βακτήρια αυτά είτε προστίθενται επίτηδες κατά την έναρξη της παρασκευής ή μπορεί να είναι φυσικές προσμίξεις του γάλακτος και ανάλογα με το είδος των τυριών χρησιμοποιούνται είτε μεσόφιλες είτε θερμοφιλες καλλιέργειες εκκίνησης.

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Lactococcus* είναι μεσόφιλοι ομοζυγωτικοί μικροοργανισμοί, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή οξύτητας. Στο γένος αυτό ανήκουν πέντε είδη, από τα οποία μόνο το ένα, το *Lactococcus lactis* είναι σημαντικό και χρησιμοποιείται ευρύτατα από τις γαλακτοβιομηχανίες. Από το γένος *Streptococcus* ενδιαφέρον για τις γαλακτοβιομηχανίες παρουσιάζει μόνο ο *S. salivarius subsp thermophilus*. Είναι μικροοργανισμός με μικρή πρωτεολυτική ικανότητα και ανθεκτικός στη θερμοκρασία²⁶.

Στο γένος *Lactobacillus* κατατάσσονται διάφορα οξυγαλακτικά βακτήρια, τα οποία παρουσιάζουν μεταξύ τους γενετικές και φυσιολογικές διαφορές. Είναι οι πλέον οξυάντοχοι από τα γαλακτικά βακτήρια και μπορούν να μειώσουν το pH του γάλακτος κάτω από το 4. Ανάλογα με τα τελικά προϊόντα ζύμωσης διακρίνονται σε ομοζυγωτικούς, προαιρετικά ετεροζυμωτικούς και υποχρεωτικά ετεροζυμωτικούς.

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Leuconostoc* είναι μεσόφιλοι ετεροζυγωτικοί κόκκοι, οι οποίοι χρησιμοποιούν το κιτρικό οξύ και παράγουν διακετύλιο, διοξειδίο του άνθρακα, οξικό οξύ και ακετοΐνη. Από το γένος αυτό μόνο δύο χρησιμοποιούνται ως εκινητές σε περιπτώσεις που χρειάζεται παράλληλα με την οξίνιση του γάλακτος και η παραγωγή διακετυλίου και διοξειδίου του άνθρακα, οι *Ln. mesenteroides subsp cremoris* και οι *Ln. lactis*.

Οι μικροοργανισμοί του γένους *Enterococcus* είναι βακτήρια που ενδημούν στο έντερο των ανθρώπων και των ζώων. Είναι θερμοάντοχοι μικροοργανισμοί και επιβιώνουν κατά την παστερίωση. Το γένος αυτό περιλαμβάνει παθογόνους μικροοργανισμούς, εκτός από κάποια στελέχη του *E. faecalis* που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών²⁶.

β) Δευτερεύουσα Μικροχλωρίδα

Γαλακτικά βακτήρια μη-εκκινητές (*Non-Starter Lactic Acid Bacteria – NSLAB*)

Η ομάδα των γαλακτικών βακτηρίων μη εκκινητών ασκεί άμεση επίδραση στην ανάπτυξη των οργανοληπτικών χαρακτηριστικών του τυριού κατά την ωρίμανσή του²⁶. Οι βασικές ομάδες βακτηρίων της κατηγορίας αυτής, είναι οι μη εκκινητές λακτοβάκιλλοι (π.χ. *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* και *Lactobacillus curvatus*), *Leuconostocs* (*Leuconostoc lactis*), πεδιόκοκκοι (*Pediococcus acidilactici* και *Pediococcus pentosaceus*) και εντερόκοκκοι (π.χ. *Enterococcus faecalis*). Εκτός από τα *leuconostocs*, τα βακτήρια αυτά δεν αποτελούν μέρος της χλωρίδας εκκίνησης αλλά βρίσκονται τυχαία στο γάλα, όπου αναπτύσσονται κατά την ωρίμανση του τυριού. Ο αριθμός τους στο τυρί, εξαρτάται από τον αρχικό πληθυσμό τους στο γάλα, και την μόλυνση του γάλακτος μετά την παστερίωση²⁷. Οι NSLAB λακτοβάκιλλοι που απαντώνται συνήθως στα τυριά είναι μέλη της ομάδας των προαιρετικά ετεροζυμωτικών λακτοβακίλλων και αποτελούν την πλειοψηφία του πληθυσμού των NSLAB στα περισσότερα τυριά κατά την διαδικασία της ωρίμανσης. Σε γενικές γραμμές φαίνεται ο πληθυσμός των NSLAB να ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία του τυριού, την διαδικασία παρασκευής καθώς και την χρονική περίοδο ωρίμανσης του τυριού²⁸.

γ) Ζύμες

Είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση. Υπάρχουν στον αέρα, στο έδαφος, στα φυτά, στο νερό και αλλού, από όπου μεταφέρονται στο γάλα και στο τυρί. Πρόκειται για αερόβιους μικροοργανισμούς με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 22-30°C, ανάλογα με το στέλεχος μπορούν να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες από 0-42°C. Οι περισσότερες καταστρέφονται κατά την παστερίωση, όμως ένα μικρό ποσοστό τους γύρω στο 5% επιβιώνει κατά τη θέρμανση του γάλακτος στους 63°C/30 min. Η ανάπτυξή τους έχει μελετηθεί σε πολλά είδη τυριών και έχει διαπιστωθεί ότι υπάρχουν σε σημαντικά μεγάλο αριθμό στην επιφάνεια από ότι στο κέντρο τους. Ζύμες του γένους *Kluyveromyces* και στελέχη του *Deb. hanseii* που

ζυμώνουν τη λακτόζη είναι δυνατόν να αναπτυχθούν κατά τη διάρκεια της στράγγισης του τυροπήγατος ή τις πρώτες ημέρες της ωρίμανσης και να παράξουν αλκοόλη και CO₂, με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολυάριθμων οπών στη μάζα του τυριού και ανωμαλίες στην οσμή και τη γεύση¹⁷.

Οι ζύμες στα τυριά, ευνοούν και την παραγωγή διεγερτικών ενώσεων ανάπτυξης, οι οποίες φαίνεται να είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη της γαλακτικής μικροχλωρίδας. Χρησιμοποιούν ως πηγή άνθρακα το γαλακτικό οξύ με συνέπεια η ανάπτυξή τους να επιφέρει αύξηση του pH. Αυτό ευνοεί την ανάπτυξη ευαίσθητων στην οξύτητα βακτηρίων και επιταχύνει τη δράση των πρωτεολυτικών και λιπολυτικών ενζύμων, συμβάλλοντας έτσι στη διαδικασία ωρίμανσης. Επιπλέον, προστατεύουν την επιφάνεια του τυριού από την ξήρανση και επηρεάζουν τη γεύση με την παραγωγή πτητικών οξέων και καρβονυλικών ενώσεων¹⁷.

δ) Προπιονικά Βακτήρια (PAB)

Είναι αναερόβιοι έως προαιρετικά αναερόβιοι θετικοί κατά Gram βάκιλλοι. Η χρησιμοποίησή τους στην παραγωγή ορισμένων τυριών, όπως το Emmental, Comte, Γραβιέρας και άλλων, οφείλεται στην ικανότητά τους να ζυμώνουν το γαλακτικό οξύ προς προπιονικό, το οποίο προσδίδει χαρακτηριστική γεύση στο τυρί, αλλά και προς διοξειδίο του άνθρακα, στο οποίο οφείλεται η δημιουργία των οπών τους.

Τα PAB χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, τα «δερματικά» και τα «κλασικά» ή «γαλακτοκομικά» προπιονικά βακτήρια. Τα «κλασικά» PAB είναι τα πιο σημαντικά στην μικροβιολογία του τυριού και τα είδη που έχουν αναγνωριστεί είναι τα *P. freudenreichii*, *P. jensenii*, *P. thoenii*, *P. acidipropionici* και *P. cyclohexanicum* και ένα *P. coccoides*. Προστίθενται στο γάλα τυροκόμησης μόνο σε περιπτώσεις τυριών που επιδιώκουμε τη δημιουργία οπών στη μάζα τους. Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι στα τυριά της κατηγορίας αυτής προηγείται πάντοτε της προπιονικής ζύμωσης η οξυγαλακτική, που οδηγεί στην πτώση του pH και στην παραγωγή γαλακτικού οξέος. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ταυτόχρονα οξυγαλακτικά και προπιονικά βακτήρια κατά την τυροκόμηση²⁶.

ε) Μικρόκοκκοι και Σταφυλόκοκκοι

Οι μικρόκοκκοι και οι σταφυλόκοκκοι ανήκουν στην οικογένεια *Micrococcaceae* και τα περισσότερα στελέχη τους είναι ανθεκτικά σε αυξημένες συγκεντρώσεις χλωριούχου

νατρίου. Οι μικρόκοκκοι είναι αυστηρώς αερόβιοι και εκκρίνουν πρωτεολυτικά και λιπολυτικά ένζυμα συμβάλλοντας έτσι τόσο στη γεύση όσο και στο άρωμα των τυριών. Οι σταφυλόκοκκοι είναι προαιρετικά αναερόβιοι και έχουν την ικανότητα τόσο να ζυμώνουν γλυκόζη προς γαλακτικό οξύ κάτω από αναερόβιες συνθήκες όσο και να σχηματίζουν οξικό οξύ σε βάρος της γλυκόζης σε αερόβιες συνθήκες²⁴.

στ) Μύκητες

Οι κυριότερες καλλιέργειες μυκήτων που χρησιμοποιούνται στην τυοκόμηση είναι το *Penicillium roqueforti* για τα τυριά με τις μπλε ζώνες μύκητος σε όλη τη μάζα τους, δηλαδή τα τυριά τύπου Roquefort και το *P. Camemberti* για τα τυριά με τη λευκή επικάλυψη μύκητος, δηλαδή τα τυριά τύπου Camembert. Οι καλλιέργειες αυτές κυκλοφορούν στο εμπόριο υπό μορφή σπορίων¹⁸.

1.4.7 Μικροοργανισμοί στα ελληνικά τυριά

Η μικροχλωρίδα των ελληνικών τυριών περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο γαλακτικά βακτήρια, ζύμες, προπιονικά βακτήρια, μικρόκοκκους και σταφυλόκοκκους. Τα γαλακτικά βακτήρια, τόσο οι εκκινητές όσο και οι μη-εκκινητές, βρίσκονται σε πολλά ελληνικά τυριά όπως η Φέτα, η Γραβιέρα, ο Τελεμές, το Κεφαλοτύρι, το Τουλουμεύσιο, το Ξυνοτύρι, η Κοπανιστή, ο Μπάτζος, το Κρασοτύρι, το Λευκό τυρί άλμης από κατσικίσιο γάλα, το Ανεβατό, η Μανούρα, το Κατίκι Δομοκού και το Λαδοτύρι Μυτιλήνης. Οι ζύμες απαντώνται στη Φέτα, στο Κασέρι, στη Γραβιέρα Νάξου και στο Κεφαλοτύρι. Οι μικρόκοκκοι και οι στρεπτόκοκκοι εντοπίζονται στο Κεφαλοτύρι, στο Κασέρι και στη Γραβιέρα Νάξου^{17,18}.

1.4.7.1 Κεφαλοτύρι

Το Κεφαλοτύρι είναι ένα παραδοσιακό τυρί που παράγεται σε πολλές περιοχές της Ελλάδας. Ανήκει στην κατηγορία των σκληρών τυριών και καταναλώνεται μετά από ωρίμανση τουλάχιστον 3 μηνών. Παράγεται από πρόβειο γάλα ή μίγμα του με κατσικίσιο έως 30%. Έχει μέγιστη περιεκτικότητα σε υγρασία 36% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40%. Η γεύση του είναι αλμυρή και πικάντικη και έχει έντονο άρωμα, ανάλογα με την ωρίμανση. Είναι υπόλευκο τυρί με μικρές τρύπες ή σχισμές και σκληρό περίβλημα. Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγική του διαδικασία είναι ο θερμοφίλοι εκκινητές *Str. thermophilus* και *Lb. bulgaricus* ή οι *Str. thermophilus*, *Str. diacetylactis* and *Str. Durans*²².

Η παραγωγή του Κεφαλοτυριού γίνεται από παστεριωμένο γάλα. Κατά την παστερίωση το γάλα θερμαίνεται στους 72 με 75°C για 20 δευτερόλεπτα. Με αυτή την διαδικασία τα παθογόνα βακτήρια σκοτώνονται και βελτιώνεται η ασφάλεια και η ομοιομορφία του ώριμου τυριού. Κατόπιν το γάλα θερμαίνεται στους 30°C όπου προστίθεται η πτυιά. Η πτυιά παράγεται από στομάχια μικρών μοσχαριών και αγελάδων και περιέχει το ένζυμο χυμοσίνης, το οποίο βοηθά την πρωτεΐνη στο γάλα να πήξει, δίνοντας στο τυρί την λεία του υφή. Όταν το τυρί έχει πήξει, ο τυροκόμος αφαιρεί τις μάζες του πηγμένου γάλακτος, τα οποία βγήκαν στην επιφάνεια του καζανιού. Το επόμενο βήμα ονομάζεται το στάδιο σπασίματος ή κοψίματος. Για να παραχθεί το Κεφαλοτύρι, χρησιμοποιούνται ειδικά σκεύη για να κοπούν οι μικρές μάζες του πηγμένου γάλακτος σε πολύ μικρά κομματάκια και θερμαίνονται αναδεύοντας συνεχόμενα. Όταν τα κομμάτια αυτά βυθιστούν, η μάζα που

δημιουργείται από αυτά αφαιρείται από το καζάνι και τοποθετείται στην “τσαντίλα” , ύφασμα φτιαγμένο από λινό, το οποίο λειτουργεί ως στραγγιστήρι με φίλτρο για στράγγιση του ορού από το πηγμένο τυρί, το οποίο συγκρατείται μέσα στο ύφασμα.

Με τη αφαίρεση του από το καζάνι το τυρί τοποθετείται σε ειδικά δοχεία τα οποία θα του δώσουν το σχήμα του. Το τυρί αφήνεται σε αυτά τα καλούπια στα οποία τοποθετούνται ειδικές ξύλινες πρέσες για όσο το δυνατόν καλύτερης στράγγισης από την υγρασία. Όταν πλέον το τυρί έχει κρυσώσει αφαιρείται από τα καλούπια και αλατίζεται.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αλατίσματος, το Κεφαλοτύρι μεταφέρεται στα ωριμαντήρια. Σε αυτό το στάδιο οι κύριες διαδικασίες ζύμωσης ολοκληρώνονται οι οποίες θα δώσουν στο τυρί την γεύση και το άρωμα. Τα ωριμαντήρια έχουν ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Η θερμοκρασία ορίζεται στους 15 με 18°C για σκληρά τυριά όπως το Κεφαλοτύρι και η υγρασία στο 80 με 85 %. Η διαδικασία ωρίμανσης του τυριού παίρνει αρκετό χρόνο ούτως ώστε το τυρί να πάρει τις γεύσεις του. Για να ολοκληρωθεί η διαδικασία ωρίμανσης του χρειάζεται μεταξύ δύο και τριών μηνών. Τέλος καλύπτεται με μια στρώση παραφίνης ή κεριού πριν φύγει από το γαλακτοκομείο προς κατανάλωση²⁹.



Εικόνα 1.2: Εμπορική εμφάνιση Κεφαλοτυρίου

1.4.7.2 Λαδοτύρι Μυτιλήνης

Το Λαδοτύρι είναι ένα παραδοσιακό τυρί, που παράγεται αποκλειστικά στο νησί της Μυτιλήνης. Έχει κατοχυρωθεί οριστικά ως Προϊόν Ονομασίας Προέλευσης (Π.Ο.Π.) σύμφωνα με την απόφαση 313058/17.1.94 του Συμβουλίου της Επιτροπής των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων. Το βασικό χαρακτηριστικό του παραδοσιακού Λαδοτυριού είναι ότι διατηρείται σε ελαιόλαδο²³.

Είναι ένα σκληρό τυρί που παράγεται από πρόβειο γάλα ή μίγμα του με γίδινο. Παρουσιάζει μέγιστη υγρασία 38% και ελάχιστη λιποπεριεκτικότητα επί ξηρού 40%. Έχει δριμεία, αλμυρή γεύση και ευχάριστο άρωμα και καταναλώνεται ως επιτραπέζιο. Η επιδερμίδα του είναι σκληρή και ξηρή και έχει μικρές οπές. Το χρώμα του είναι λευκό έως λευκοκίτρινο. Επίσης είναι γνωστό και με το όνομα "κεφαλάκι".

Κατά την παραγωγική διαδικασία του Λαδοτυριού το γάλα που χρησιμοποιείται πήζει με προσθήκη πυτιάς στους 32-34 °C σε 30 λεπτά. Ακολουθεί διαίρεση και αναθέρμανση μέχρι τους 45 °C. Στη συνέχεια αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος του τυρογάλακτος και πιέζονται οι κόκκοι στον πυθμένα του τυρολέβητα για να αποτελέσουν συμπαγή μάζα, η οποία κόβεται σε κομμάτια βάρους 5-7 χιλιογραμμάρων, τα οποία μεταφέρονται σε τυροτράπεζα και τεμαχίζονται πάλι ώστε κάθε τεμάχιο να αντιστοιχεί σε ένα λαδοτύρι. Τέλος τοποθετούνται σε ειδικά καλούπια, πιέζονται ισχυρά με το χέρι, αλατίζονται και τοποθετούνται σε θάλαμο ωρίμανσης όπου παραμένουν τουλάχιστον 3 μήνες. Συνήθως το τυρί αυτό διατηρείται μέσα σε ελαιόλαδο²².



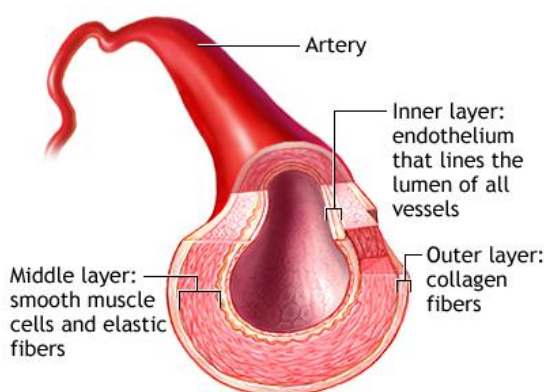
Εικόνα 1.3: Εμπορική εμφάνιση Λαδοτυριού

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΡΑΦ

2.1 Ορισμοί – Γενικά στοιχεία

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



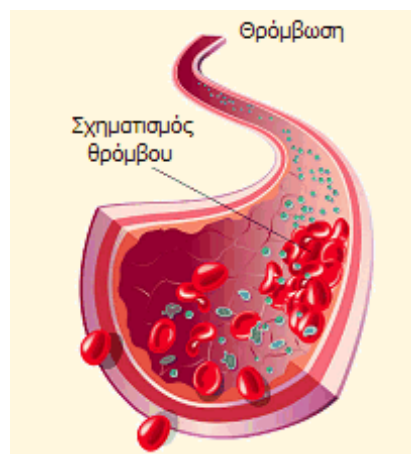
Σχήμα 2.1: Η δομή της αρτηρίας

Η αθηρογένεση αναφέρεται στη διαδικασία έναρξης του σχηματισμού αθηρωματοδών βλαβών στα αρτηριακά τοιχώματα. Οι βλάβες αυτές χαρακτηρίζονται από συσσώρευση λιπιδίων, κυττάρων και συστατικά της εξωκυττάριας ύλης³⁰.

Η αθηροσκλήρωση στους ανθρώπους εντοπίζεται σε αρτηρίες μετρίου μεγέθους όπως η στεφανιαία, καθώς και σε αρτηρίες των κάτω άκρων. Οι λιπαρές λωρίδες (fatty streaks) και η ινώδης πλάκα ή αθηρωματική πλάκα είναι οι σχηματισμοί της αθηροσκληρωτικής βλάβης που έχουν μελετηθεί περισσότερο.

Στις δυτικές χώρες η αθηροσκλήρωση και οι διαταραχές που τη συνοδεύουν αποτελούν τα κύρια αίτια νοσηρότητας και θνησιμότητας. Μελέτες σε κυτταρικό και μοριακό επίπεδο που αφορούν το αγγειακό τοίχωμα και τις διαταραχές του μεταβολισμού των λιποειδών έχουν δώσει πληροφορίες για την κατανόηση της παθογένεσης της αθηροσκλήρωσης. Σήμερα πιστεύεται ότι η ασθένεια αυτή εμφανίζεται μετά από φλεγμονώδη αντίδραση στο αγγειακό τοίχωμα και επομένως είναι αποτέλεσμα της απόκρισης του αγγειακού τοιχώματος στον τραυματισμό^{31,32}.

Οι επιδημιολογικές μελέτες δείχνουν ότι τα πρώτα στάδια της αθηροσκλήρωσης μπορούν να επιστευτούν από διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως τα υπερβολικά αυξημένα επίπεδα χοληστερόλης (LDL), ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση και το κάπνισμα, οι οποίες θα πρέπει να ληφθούν υπόψη σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες όπως ο τρόπος ζωής και οι συνήθειες του ατόμου, η σωματική άσκηση, η κατανάλωση οξυγόνου και το ψυχοκοινωνικό άγχος προκειμένου να είναι αποτελεσματικές οι στρατηγικές πρόληψης³³.



Σχήμα 2.2: Σχηματισμός θρόμβου

2.2. Η παθογένεια της αρτηριοσκλήρωσης

Ο μηχανισμός της αθηροσκλήρωσης δεν έχει διευκρινιστεί, λόγω της εξαιρετικής πολυπλοκότητας αυτής της νόσου. Επικρατέστερη είναι η θεωρία της απόκρισης του αγγειακού τοιχώματος, για την οποία έκανε λόγο πρώτος ο Virchow. Παλαιότερα πίστευαν ότι το ενδοθήλιο των αρτηριών απογυμνώνεται ύστερα από τραυματισμό, που μπορεί να γίνει με μηχανικό, χημικό, τοξικό, ανοσολογικό παράγοντα ή από ιούς. Στη συνέχεια

ακολουθεί προσκόλληση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων καθώς και ελευθέρωση του αιμοπεταλιακού παράγοντα ανάπτυξης (PDGF), ο οποίος μεταναστεύει στα λεία μυϊκά κύτταρα, όπου συνδεόμενος στον υποδοχέα του, προκαλεί αυξημένο πολλαπλασιασμό των κυττάρων αυτών τα οποία εκκρίνουν συστατικά του συνδετικού ιστού. Η επανάληψη αυτού του φαινομένου οδηγεί στο σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας. Σήμερα γνωρίζουμε ότι τα ενδοθηλιακά κύτταρα αποκρίνονται και σε πλήθος από διεγέρτες ικανούς να οδηγήσουν σε δυσλειτουργία αυτών των κυττάρων. Ακόμα, εκτός από τον PDGF υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που προέρχονται από άλλα κύτταρα, όπως τα μακροφάγα τα οποία ρυθμίζουν την ανάπτυξη των λείων μυϊκών κυττάρων και παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της αθηροσκλήρωσης. Σύμφωνα με τη νέα εκδοχή της θεωρίας των Ross και Glomset τα κύτταρα που εμπλέκονται στον τραυματισμό είναι τα ενδοθηλιακά, τα μονοκύτταρα/μακροφάγα, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα κύτταρα αυτά αλληλεπιδρούν μεταξύ τους έχοντας ως μεσολαβητές μόρια "προσκόλλησης", πρωτεϊνικής φύσης^{31,32}.

2.3. Κυτταρική επικοινωνία στην αθηροσκλήρωση

Στην ανάπτυξη της διαδικασίας της αθηροσκλήρωσης σημαντικό ρόλο παίζουν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων των αρτηριών και του αίματος. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα κύτταρα του αίματος δεν αλληλεπιδρούν με τα αρτηριακά τοιχώματα. Μετά όμως από κάποια αθηρογόνο διέγερση τα αιμοπετάλια, τα λεμφοκύτταρα και τα μονοκύτταρα λευκοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τα τοιχώματα των αρτηριών και προκαλούν αλλαγές που σχετίζονται με το σχηματισμό αθηρώματος. Οι αλλαγές αυτές περιλαμβάνουν την αύξηση της διαπερατότητας του ενδοθηλίου, τη μετατροπή του από αντιθρομβωτικό σε προθρομβωτικό, την επαγωγή μετανάστευσης ενδοθηλιακών κυττάρων και λείων μυϊκών κυττάρων και την παραγωγή εξωκυττάριας ύλης από τα λεία μυϊκά κύτταρα. Υπεύθυνα για τις παραπάνω αλλαγές είναι τα ενδοκυτταρικά-μηνυματοφόρα μόρια γνωστά ως κυτοκίνες³⁴.

a) Κυτοκίνες

Οι κυτοκίνες ορίζονται ως οι διαλύτες (γλυκο)πρωτεΐνες που ελευθερώνονται από τα κύτταρα για να ρυθμίσουν κυτταρικές λειτουργίες και δρουν σε συγκεντρώσεις της τάξεως

των η_h ή η_h. Οι κυτοκίνες διαχωρίζονται σε τέσσερις κατηγορίες: τις ιντερλευκίνες (IL), τις ιντερφερόνες(INF), τους παράγοντες διέγερσης των αποικιών (colony stimulating factor, CFS) και τους πεπτιδικούς αυξητικούς παράγοντες (GF).

Οι κυτοκίνες παράγονται από τα ενδοθηλιακά, τα λεία μυϊκά κύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα και τα αιμοπετάλια. Τα μόρια αυτά συμμετέχουν στην μετανάστευση των ενδοθηλιακών και των λείων μυϊκών κυττάρων, στον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων και στην ενεργοποίηση των μονοκυττάρων. Η προσκόλληση των κυττάρων αυτών σε μόρια της εξωκυττάριας ύλης, σε άλλα κύτταρα ή η έκθεση κυτοκινών στην επιφάνειά τους, οδηγούν στην παραγωγή κυτοκινών από τα κύτταρα που εμπλέκονται στην αθηρογένεση. Οι κυτοκίνες στη συνέχεια επιδρούν με τα κύτταρα που τροποποιούν την εξωκυττάρια ύλη, εκφράζοντας στην επιφάνεια τους μόρια προσκόλλησης και παράγοντας και άλλες κυτοκίνες. Αποτέλεσμα αυτών είναι η μετανάστευση και ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων³⁵.

β) Μόρια προσκόλλησης

Τα μόρια προσκόλλησης των κυττάρων του αίματος και των αρτηριών διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες: τις σελεκτίνες (Selectins), τις ιντεγκρίνες (Integrins) και την υπερικογενεία των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulin superfamily).

Η Ε-σελεκτίνη συντίθεται από τα ενδοθηλιακά κύτταρα ως απόκριση στην IL-1 και στον TNF-α. Όταν εκφράζεται, προωθείται η προσκόλληση ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων, ηοσινόφιλων και T-λεμφοκυττάρων.

Η Ρ-σελεκτίνη συντίθεται από τα μεγακαρυοκύτταρα (με αποτέλεσμα να απαντά και στα αιμοπετάλια) και από τα ενδοθηλιακά κύτταρα. Αποθηκεύεται στις μεμβράνες εκκριτικών κοκκίων, όπως τα α-κοκκία των αιμοπεταλίων και τα σωμάτια Weibel-Palade των ενδοθηλιακών κυττάρων. Η Ρ-σελεκτίνη εκφράζεται γρήγορα στην επιφάνεια των κυττάρων αυτών μετά από διέγερση με θρομβίνη ή ισταμίνη. Η έκφραση αυτή προωθεί την προσκόλληση ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων, ηοσινόφιλων και T-λεμφοκυττάρων.

Η L-σελεκτίνη εκφράζεται κυρίως στην επιφάνεια ουδετερόφιλων, μονοκυττάρων και λεμφοκυττάρων και προωθεί την προσκόλληση λευκοκυττάρων σε ενεργοποιημένα από κυτοκίνες ενδοθηλιακά κύτταρα.

Οι ιντεγκρίνες είναι ετεροδιμερή που αποτελούνται από δύο υποομάδες α και β, οι οποίες συνδέονται μη ομοιοπολικά. Είναι ευρέως διαδεδομένοι υποδοχείς που ρυθμίζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και εξωκυττάριας ύλης.

Οι β-2 ιντεγκρίνες ή CD11/CD18 βρίσκονται μόνο και συνδέονται σε μία από τις α-αλυσίδες(LFA-1, Mac-1, p150,95). Οι υποδοχείς αυτοί συζευγμένοι με τον VLA-4 και την γλυκοπρωτεΐνη Ib/IIIa είναι υπεύθυνοι για την προσκόλληση των αιμοπεταλίων και των λευκοκυττάρων στο σημείο της αρτηριακής βλάβης. Γι' αυτό το λόγο παίζουν κεντρικό ρόλο στη δημιουργία αθηρωματικής πλάκας.

Οι ιντεγκρίνες στα ενεργοποιημένα λευκοκύτταρα αλληλεπιδρούν με τους συμπληρωματικούς υποδοχείς των ενδοθηλιακών κυττάρων που ανήκουν στην υπερικογένεια των ανοσοσφαιρινών³⁵.

2.4. Κυτταρικό και μοριακό επίπεδο της αθηρογένεσης

Σήμερα είναι γνωστό ότι τα κύτταρα που συμμετέχουν στην παθογένεση της αθηροσκλήρωσης είναι τα ενδοθηλιακά, τα αιμοπετάλια, τα μονοκύτταρα, τα μακροφάγα, τα λεμφοκύτταρα και τα λεία μυϊκά κύτταρα. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα καθώς και τα αιμοπετάλια θεωρείται ότι παίζουν τον καθοριστικότερο ρόλο στην έναρξη της αθηροσκλήρωσης. Ακόμη φαίνεται ότι η ox-LDL έχει σχέση με το γενεσιουργό αίτιο της αθηρογένεσης.

α) Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL)

Η έρευνα που αφορά τη στεφανιαία νόσο υποδεικνύει ότι η ox-LDL παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παθογένεση της αρτηριοσκλήρωσης. Η ox-LDL μπορεί να προκαλέσει μετά από την πρόσληψή της μέσω ειδικών εκκαθαριστικών φορέων, οι οποίοι βρίσκονται στην επιφάνεια των μονοκυττάρων/μακροφάγων, τη δημιουργία αφρωδών κυττάρων.

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

Στην κατανόηση της δράσης της ox-LDL βοήθησε η προστατευτική δράση της HDL. Η HDL έχει ενζυμική δράση PAF-ακετυλοϋδρολάσης, η οποία υδρολύει τον PAF προς φωσφολιποειδή. Το γεγονός αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι η δράση της ox-LDL οφείλεται στη δημιουργία PAF ή αναλόγων του κατά την οξείδωση της LDL³⁶.

β) Ενδοθηλιακά κύτταρα^{37,38,39}

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

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

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

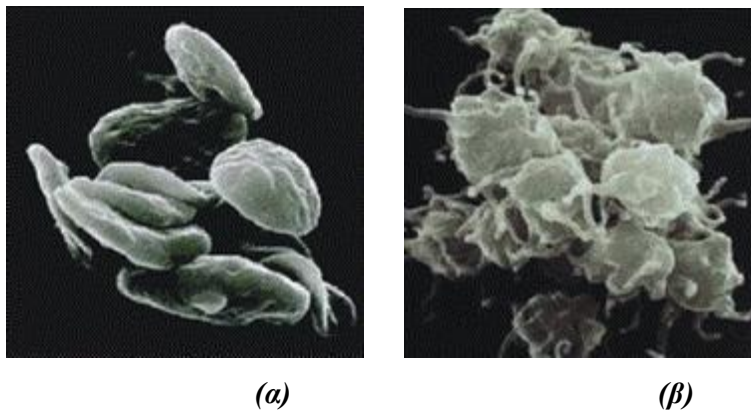
Αντίθετα από το φυσιολογικό ενδοθήλιο, το ενδοθήλιο που έχει υποστεί διατάραξη φυσική ή λειτουργική αποκτά προθρομβωτικό, προσυσσωρευτικό και προφλεγμονώδη χαρακτήρα λόγω των μηχανισμών αγγειοσυστολής που κυριαρχούν. Ο χαρακτήρας αυτός του ενδοθηλίου μπορεί να διεγείρει την προσκόλληση αιμοπεταλίων,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

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

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

γ) Αιμοπετάλια

Τα αιμοπετάλια εμπλέκονται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην έναρξη του σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας. Αρχικά αλληλεπιδρούν με το τραυματισμένο ενδοθήλιο και προσκολλώνται στα αφρώδη κύτταρα και στην εξωκυττάρια ουσία. Η προσκόλληση συνεχίζεται έως ότου όλη η τραυματισμένη επιφάνεια καλυφθεί με ένα μονό ή ένα διπλό στρώμα αιμοπεταλίων⁴⁰.



Εικόνα 2.1: Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση (α) και αιμοπετάλια συσσωρευμένα (β)⁴²

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

Ο τραυματισμός του ενδοθηλίου χαρακτηρίζεται από επακόλουθη μετανάστευση φλεγμονώδων κυττάρων, όπως είναι και τα αιμοπετάλια, στην περιοχή της βλάβης του αρτηριακού τοιχώματος. Στη συνέχεια τα αιμοπετάλια δρουν ως πηγή αυξητικών παραγόντων, οι οποίοι συνεργάζονται και διεγείρουν τα λεία μυϊκά κύτταρα του αγγείου και προωθούν την μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό τους⁴¹. Επίσης ο έλεγχος που ασκούν τα αιμοπετάλια στο να προσελκύουν τα φλεγμονώδη κύτταρα γίνεται μέσω μιτογόνων και χημειοτακτικών ουσιών, όπως ο PDGF και ο PAF.

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

μονοκυττάρων, παραγωγή ανιόντων υπεροξειδίων από ηωσινόφιλα καθώς και αναστολή της συσώρευσης των αιμοπεταλίων, που προκαλείται από θρομβίνη.

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

Η ισταμίνη, που παράγεται επίσης από τα αιμοπετάλια ενεργοποιεί τα ενδοθηλιακά κύτταρα ώστε να εκφράσουν μόρια προσκόλλησης όπως η P- και E σελεκτίνη και ο PAF. Σε αυτά τα μόρια οφείλεται η αυξημένη συγκολλητικότητα του ενδοθηλίου⁴³.

δ) Μονοκύτταρα και μακροφάγα κύτταρα

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

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

Τα κύτταρα που έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και είναι ορατά στις αθηροσκληρωτικές βλάβες είναι τα αφρώδη κύτταρα. Μετά από διάφορα πειράματα που έγιναν σε κουνέλια, αρουραίους και πιθήκους με τη βοήθεια ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, αναγνωρίστηκε ότι προσκολλημένα μονοκύτταρα στο ενδοθήλιο μετανάστευαν μεταξύ των ενδοθηλιακών κυττάρων και μετασχηματίζονταν σε μακροφάγα και τελικά σε αφρώδη κύτταρα μετά την πρόσληψη λιποπρωτεϊνών. Τα λιποειδή αυτά είναι συνήθως οξειδωμένες LDLs (ox-LDL)⁴⁴. Ανοσοϊστοχημικές μέθοδοι απέδειξαν ότι τα αφρώδη κύτταρα που σχηματίζονται στα πρώιμα στάδια προέρχονται από μακροφάγα, ενώ είναι περιορισμένα τα αφρώδη κύτταρα που σχηματίζονται από λεία μυϊκά κύτταρα σε προχωρημένα στάδια.

Τα ενεργοποιημένα μακροφάγα που έχουν προσκολληθεί μέσω μορίων προσκόλλησης πρωτεϊνικής φύσης, παράγουν διάφορα συστατικά τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη

διαδικασία της παθογένεσης. Κάποια από αυτά τα συστατικά, όπως τα μόρια IL-1 και TNF- α , επάγουν την έκφραση μορίων στην επιφάνεια των ενδοθηλιακών κυττάρων που αυξάνουν προσκόλληση των μονοκυττάρων και των λευκοκυττάρων, όπως επίσης και τη δευτερογενή παραγωγή μορίων όπως PAF και PDGF από άλλα κύτταρα. Επιπλέον, παράγονται χημειοτακτικοί παράγοντες για τα λευκοκύτταρα, όπως ο PDGF και ουσίες που αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων όπως PGE₂, ιντερφερόνη- α και TGF- β ^{45,46,47}.

ε) Λεία μυϊκά κύτταρα

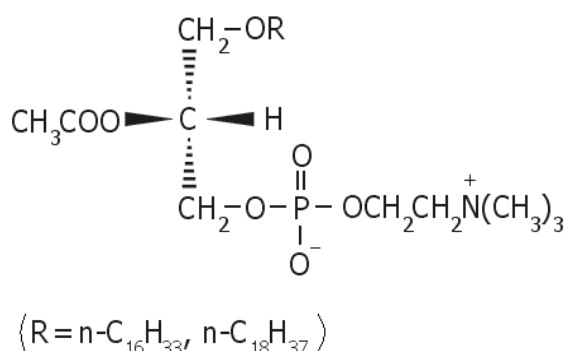
Τα λεία μυϊκά κύτταρα συνεισφέρουν στην ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης με δύο τρόπους. Πρώτον μπορούν να αποκριθούν σε μόρια που δρουν σε αιμοφόρα αγγεία, όπως το NO και να μεταβάλλουν τον αγγειακό τόνο. Δεύτερον, τα λεία μυϊκά κύτταρα εκφράζουν γονίδια που εμπλέκονται στο ρυθμό ανάπτυξης, όπως τα γονίδια του FGF και του PDGF⁴⁹.

στ) T- λεμφοκύτταρα

Τα T-λεμφοκύτταρα μπορούν να βρεθούν στην αθηρωματική πλάκα, γεγονός που δηλώνει ότι μπορεί να υπάρχει κάποια ανοσολογική απόκριση στην αρτηριοσκλήρωση⁴⁸.

2.5 Γενικά στοιχεία για τον PAF

Ο παράγοντας ενεργοποίησης αιμοπεταλίων (Platelet-Activating Factor, PAF) συντίθεται από διάφορους τύπους κυττάρων μετά από διέγερση, συμπεριλαμβανομένων των μονοκυττάρων, των ενδοθηλιακών και των αιμοπεταλίων^{50,51}. Είναι μία 1-O-αλκυλο-2-ακετυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη⁵² και αποτελεί ένα δραστικό μεσολαβητή της φλεγμονής.



Σχήμα 2.3: Η χημική δομή του PAF

Η κύρια οδός βιοσύνθεσης του PAF είναι η οδός του ανασχηματισμού, που περιλαμβάνει την ενεργοποίηση της ακετυλοτρανσφεράσης, η οποία ακετυλιώνει τον λύσο-PAF (1-O-αλκυλο-sn-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη) προς PAF⁵³. Στη συνέχεια, μία σημαντική ποσότητα του κυτταρικού PAF εκκρίνεται και μεταφέρεται στην κυκλοφορία του αίματος συνδεδεμένος με αλβουμίνη, ενώ μία μικρή ποσότητα είναι συνδεδεμένη με τις λιποπρωτεΐνες του πλάσματος⁵⁴.

Ο PAF επιδρά στα κύτταρα στόχους σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις της τάξεως του 10^{-12} - 10^{-9} M μέσω ειδικών υποδοχέων που έχουν ανιχνευθεί σε πολλά είδη κυττάρων. Τα ανθρώπινα μονοκύτταρα που κυκλοφορούν στο αίμα εκφράζουν τον PAF στην επιφάνειά τους και περιέχουν το αντίστοιχο m-RNA⁵⁵.

Τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού και του εκκρινόμενου PAF ελέγχονται και από την ακετυλοϋδρολάση, η οποία είναι ένα ένζυμο ανεξάρτητο ασβεστίου που υδρολύει τον PAF μετατρέποντάς τον σε λύσο-PAF⁵⁶. Εκκρίνεται από διάφορα κύτταρα όπως τα ανθρώπινα μακροφάγα⁵⁷, αιμοπετάλια⁵⁸ και ηπατοκύτταρα⁵⁹ και μεταφέρεται στην κυκλοφορία του

αίματος συνδεδεμένη κυρίως με λιποπρωτεΐνες χαμηλής (LDL) και υψηλής (HDL) πυκνότητας του πλάσματος⁶⁰. Στις παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπου ο PAF έχει κεντρικό ρόλο ως μεσολαβητής, η ακετυλοϋδρολάση φαίνεται να είναι ένζυμο κλειδί.

Είναι πλέον κοινά αποδεκτό ότι ο PAF παίζει κύριο ρόλο σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, όπως το αναφυλακτικό σοκ, το άσθμα, οι αλλεργίες, ισχαιμία και οξείες φλεγμονώδεις καταστάσεις⁶¹ (Πίνακας 2.1). Φαίνεται ότι εμπλέκεται στις φλεγμονώδεις καταστάσεις της αθηρογένεσης, οι οποίες είναι γνωστό ότι σχετίζονται με την ενεργοποίηση των μονοκυττάρων, των μακροφάγων, των ενδοθηλιακών κυττάρων και των αιμοπεταλίων καθώς και με την έκκριση κυτοκινών. Τέτοιου είδους ενεργοποιημένα κύτταρα βιοσυνθέτουν PAF, κάνοντας φανερό πως ένα λανθασμένο σήμα μπορεί να ενισχυθεί και να επιφέρει καταστροφή σε κάποιον ιστό.

Επιπλέον πληθώρα ισχυρών ενδείξεων έχουν ενισχύσει την άποψη ότι ο PAF έχει προαθηρογόνο δράση στο μικροπεριβάλλον του αρτηριακού έσω χιτώνα, καθώς και σημαντική συμμετοχή στις επιπλοκές που επακολουθούν και σχετίζονται με σχηματισμό θρόμβων, επάγοντας την ελευθέρωση διάφορων συστατικών, όπως η ελαστάση και οι ενώσεις του ενεργού οξυγόνου^{62,63}. Έτσι υποδεικνύεται σαν γενεσιουργό αίτιο για την αθηρωμάτωση και την αρτηριοσκλήρυνση. Επίσης μετά από μελέτες που έγιναν σε πειραματόζωα αποδείχθηκε η προστατευτική δράση διαφόρων ανταγωνιστών του PAF έναντι της αθηροσκλήρωσης⁶⁴.

Οι δράσεις PAF εκδηλώνονται μετά από σύνδεσή του σε ειδικό υποδοχέα που ανήκει στην κατηγορία των επταδιαμεμβρανικών υποδοχέων, που συνδέονται με πρωτεΐνες⁶⁵. Ο υποδοχέας του PAF ανταποκρίνεται σε συνθετικά ανάλογα που περιέχουν στην sn-2 θέση λιπαρές αλυσίδες μικρού μεγέθους. Τα ανάλογα του PAF με αυτή τη δομή είναι κυρίως διάκυλο παράγωγα και παράγονται κατά την οξειδωση της φωσφατιδυλοχολίνης, η οποία βρίσκεται στα κύτταρα⁶⁶ και στην LDL⁶⁷. Τα ανάλογα αυτά του PAF ενεργοποιούν μονοκύτταρα⁶⁸, λευκοκύτταρα⁶⁹ και αιμοπετάλια⁷⁰. Επιπλέον, βρίσκονται στις αθηροσκληρωτικές πλάκες⁷¹ και κυκλοφορούν στο πλάσμα του ανθρώπου σε ανιχνεύσιμες ποσότητες⁷².

Πίνακας 2.1 : Δράση PAF in vivo⁷³

Βρογχοσπασμός	(χωρίς μεσολάβηση ισταμίνης ή σεροτονίνης)
Θρομβοπενία	
Ουδετεροπενία	
Βασεοφιλοπενία	
Αναφυλακτικές αντιδράσεις	<p>Στο αναπνευστικό</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μείωση αναπνευστικής συχνότητας • Βρογχοσπασμό • Αύξηση των πνευμονικών αντιστάσεων • Μείωση της ενδοτικότητας του πνεύμονα • Αύξηση της πίεσης στις πνευμονικές αρτηρίες με αποτέλεσμα πρόκληση πνευμονικού οιδήματος <p>Στο κυκλοφορικό</p> <ul style="list-style-type: none"> • Άμεση, σχεδόν αλλαγή του ηλεκτροκαρδιογραφήματος (αρχικά παροδική βραδυκαρδία και μετά ταχυκαρδία με αρρυθμία αγωγιμότητας και πτώση της ανάσπασης) • Αιμοδυναμικές αλλαγές: 1) μείωση της συστολικής πίεσης της αριστερής κοιλίας, 2) μείωση της συστολικής και της διαστολικής αρτηριακής πίεσης στις μηριαίες που στη συνέχεια παροδικά αυξάνουν και μειώνονται, 3) αύξηση της κεντρικής φλεβικής πίεσης, 4) αύξηση της πίεσης στο δεξιό κόλπο, 5) μείωση της τελοδιαστολικής πίεσης στη δεξιά κοιλία
Επίδραση στη συστηματική κυκλοφορία	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση της μέσης αρτηριακής πίεσης • Μείωση του κατά λεπτό όγκου αίματος • Μείωση των περιφερειακών αντιστάσεων
Επίδραση στο πεπτικό σύστημα	<ul style="list-style-type: none"> • Βλάβη γαστρικού βλεννογόνου • Ισχαιμική νέκρωση εντέρου (σχετίζεται με σηπτικό shock) • Μορφολογικές αλλοιώσεις στην άνω παγκρεατοδωδεκα-δακτυλική αρτηρία
Επίδραση στο	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση νεφρικής ροής αίματος

νεφρικό σύστημα	<ul style="list-style-type: none"> • Μείωση σπειραματικής διήθησης • Ελάττωση ποσού ούρων και αύξηση της επαναρρόφησης $\text{Na}^{2+}, \text{K}^{+}$ • Συμμετοχή στη νεφρική ανοσολογική βλάβη • Πρόκληση ιστολογικών αλλοιώσεων • Εναπόθεση ανοσοσμπλεγμάτων στα σπειράματα
Επίδραση στο σύστημα αναπαραγωγής	<ul style="list-style-type: none"> • Συμμετοχή στην κινητοποίηση του σπέρματος, • Στην ωορρηξία, • Στη εμφύτευση ωαρίου και • Στην υπέρταση της εγκυμοσύνης • Παίζει ρόλο στην έναρξη και διατήρηση του τοκετού
Επίδραση στην εγκεφαλική λειτουργία	<ul style="list-style-type: none"> • Καταστροφή νευρώνων, • Συμμετοχή στην ανάπτυξη και στην αναγέννηση των νευρώνων • Ενεργοποίηση του άξονα υποθάλαμος-υπόφυση επινεφρίδια και έκκριση ορμονών • Αλλαγές φαινοτύπων στο κεντρικό νευρικό σύστημα • Αύξηση διαπερατότητας εγκεφαλικών αγγείων και • Συμμετοχή στη σκλήρυνση κατά πλάκας

2.6 Η σχέση του PAF με την ox-LDL

Μελέτες που αφορούν την αθηριοσκλήρωση δείχνουν ότι σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξή της παίζει η οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας (ox-LDL). Είναι αποδεδειγμένο ότι η ox-LDL προσλαμβάνεται με γρήγορους ρυθμούς μέσω του εκκαθαριστή υποδοχέα των μακροφάγων του υποενδοθηλιακού χώρου του αρτηριακού τοιχώματος και τα μετατρέπει σε αφρώδη κύτταρα που είναι χαρακτηριστικά της αθηροσκληρωτικής βλάβης. Επιπλέον, η ox-LDL είναι κυτταροτοξική και μεταβάλλει τις λειτουργίες διάφορων κυττάρων⁷⁴.

Κατά την οξείδωση της ανθρώπινης LDL παράγονται προφλεγμονώδεις μεσολαβητές που ενεργοποιούν τα πολυμορφοπύρηνια λευκοκύτταρα και κύτταρα που εκτός σωστής

θέσης και χρόνου εκφράζουν τον υποδοχέα του PAF. Η απόδειξη της παραγωγής PAF κατά την οξείδωση της LDL, έπαιξε καθοριστικό παράγοντα στην εξήγηση των βιολογικών της ιδιοτήτων. Αυτό αποδείχθηκε με την *in vitro* οξείδωση της LDL παρουσία ειδικού αναστολέα της PAF- ακετυλοϋδρολάσης, οπότε η παραγόμενη ποσότητα PAF δεν υδρολύεται από την ακετυλοϋδρολάση που υπάρχει στην LDL. Ο μηχανισμός για την παραγωγή PAF στην ox-LDL περιλαμβάνει τη δράση μίας τρανσακετυλάσης, η οποία μεταφέρει ακετυλομάδα από την sn-2 θέση της 1-ακυλο-2-ακετυλο-γλυκερο-3-φωσφοχολίνη στην θέση της sn-2 θέση του λύσο-PAF, ο οποίος αποτελεί αναστολέα της ακετυλοϋδρολάσης⁷⁵.

Σήμερα η λήψη φασμάτων MS των οξειδωμένων λιποειδών της ox-LDL, έδειξε και την παραγωγή C4 αναλόγων του PAF με δράση όμοια με αυτόν που συντελείται στον υποδοχέα του. Οι ενώσεις αυτές είναι αγωνιστές του PAF με 10 φορές μικρότερη δραστηριότητα, απαντούν όμως στην ox-LDL σε ποσότητα 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του PAF. Ακόμη αποδείχθηκε ότι τα μικροσυστατικά της φωσφατιδυλοχολίνης της ox-LDL είναι πρόδρομοι των ενώσεων της με δράση όμοια με αυτή του PAF⁷⁵.

Επομένως καταλήγουμε στο συμπέρασμα ότι η οξείδωση της LDL παράγει και οξειδωμένα φωσφολιποειδή, τα οποία δρώντας μέσω του υποδοχέα του PAF αποτελούν, όπως και ο PAF, γενεσιουργό αίτιο του σχηματισμού αρωματικών πλακών^{76,77}. Οι ενώσεις αυτές προκαλούν υπερπλασία των λείων μυϊκών κυττάρων καθώς και την ενεργοποίηση των λευκοκυττάρων⁷⁸. Ακόμη, είναι υπεύθυνες όπως και ο PAF, για την αύξηση της διαπερατότητας των αγγείων και την πρόκληση φλεγμονής⁷⁹.

2.7 Ο ρόλος της ακετυλοϋδρολάσης

Η ακετυλοϋδρολάση του πλάσματος του ανθρώπου είναι ένα ένζυμο που αποκοιδομεί τον PAF και τα οξειδωμένα φωσφολιποειδή, τα οποία είναι ανάλογα του PAF. Παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην αθηρισκλήρωση, γιατί σταματάει τη διαδικασία της φλεγμονής.

Η ακετυλοϋδρολάση είναι στενά συνδεδεμένη με την LDL (70%) και την HDL (30%), αφού έχει υψηλή εξειδίκευση μόνο στα παραπάνω οξειδωμένα φωσφολιποειδή. Επιπλέον πειράματα δείχνουν ότι εμποδίζει τις οξειδωτικές αλλαγές της LDL, εμποδίζοντας έτσι και την παραγωγή του PAF και των αναλόγων του, που λαμβάνουν χώρα συνεχώς και τα οποία συνδέονται με αυξημένη αθηρογόνο δράση. Ενώ όμως η ακετυλοϋδρολάση προστατεύει τον

οργανισμό από τον PAF και τα ανάλογά του κατά τα πρώτα στάδια οξειδωσης της LDL, δεν φαίνεται να συνεχίζει να έχει την ίδια δράση σε προχωρημένα στάδια οξειδωσης της LDL, επειδή τότε καταστρέφεται. Άρα, η δραστηκότητα του ενζύμου είναι αντιστρόφως ανάλογη της οξειδωτικής κατάστασης της LDL, σε αντίθεση με την ακετυλοϋδρολάση της HDL που φαίνεται να έχει συνεχώς προστατευτική δράση^{80,81}.

2.8 Μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας

Ο πιθανός μηχανισμός για το σχηματισμό της αθηρωματικής πλάκας δίνεται στο σχήμα της εικόνας 4.2. Σύμφωνα με το σχήμα αυτό, τα αιμοπετάλια και τα μακροφάγα κύτταρα εκκρίνουν ακετυλοϋδρολάση, η οποία ενσωματώνεται στις LDL και HDL και με τη μορφή αυτή κυκλοφορεί στο πλάσμα.

Κατά την οξειδωση της LDL, η οποία είναι μία φυσιολογική διαδικασία που λαμβάνει χώρα στον οργανισμό, παράγεται PAF, ενώ ταυτόχρονα μειώνεται η δραστηκότητα της ακετυλοϋδρολάσης, η οποία είναι ένα από τα ένζυμα που ρυθμίζουν τα επίπεδα του PAF. Σημαντικό ρόλο στην έκταση της οξειδωσης της LDL διαδραματίζουν τα αντιοξειδωτικά του αίματος, τα οποία προέρχονται κυρίως από την τροφή.

Αν όμως η οξειδωση της LDL για κάποιο λόγο επεκταθεί σε μη φυσιολογικά επίπεδα, τότε και ο PAF παράγεται άκαιρα και άτοπα σε υψηλότερα από τα φυσιολογικά επίπεδα. Εκτός από την ακετυλοϋδρολάση ο οργανισμός μας έχει και άλλους μηχανισμούς προστασίας έναντι της ανεξέλεγκτης δράσης του PAF, όπως οι ενδογενείς και άλλοι αναστολείς αυτού που υπάρχουν στο αίμα. Αν όμως τελικά τα επίπεδα του PAF αυξηθούν πάνω από τα φυσιολογικά τότε μπορεί στη συνέχεια να συμβούν τα ακόλουθα: Ο PAF ενεργοποιώντας τα ενδοθηλιακά κύτταρα του αρτηριακού τοιχώματος διαμέσου του υποδοχέα του μετατρέπει το ενδοθήλιο από αντιθρομβωτικό σε προθρομβωτικό. Τότε παρατηρείται παραγωγή του PAF από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, ο οποίος δεν ελευθερώνεται, αλλά παραμένει συνδεδεμένος στην περικυτταρική μεμβράνη τους. Στα ενεργοποιημένα πλέον ενδοθηλιακά κύτταρα παράγονται επίσης κυτοκίνες, όπως είναι οι IL και εκφράζονται μόρια προσκόλλησης, όπως η P-σελεκτίνη, η E-σελεκτίνη και ο vWF. Συγχρόνως, ο PAF που παράγεται από την οξειδωση της LDL διεγείρει την παραγωγή κυτοκινών και την έκφραση μορίων προσκόλλησης στα κύτταρα του αίματος που εμπλέκονται στο μηχανισμό της αθηρωμάτωσης. Ο PAF είναι ικανός να προκαλέσει χημειοτακτισμό στα παρακάτω

κύτταρα. Έτσι τα κύτταρα προσελκύονται από τον PAF, που είναι συνδεδεμένος στην περικυτταρική μεμβράνη των ενδοθηλιακών κυττάρων, στο χώρο του ενδοθηλίου. Το κρίσιμο σημείο φαίνεται να είναι η παραγωγή του PAF από την οξείδωση της LDL και η διατάραξη του ενδοθηλίου. Οι διεργασίες που ακολουθούν στη συνέχεια είναι εξαιρετικά πολύπλοκες, διότι λαμβάνει χώρα ένα δίκτυο βιοχημικών αντιδράσεων, όπου το αρχικό σήμα συνεχώς ενισχύεται μέσω ανάδρομων μηχανισμών.

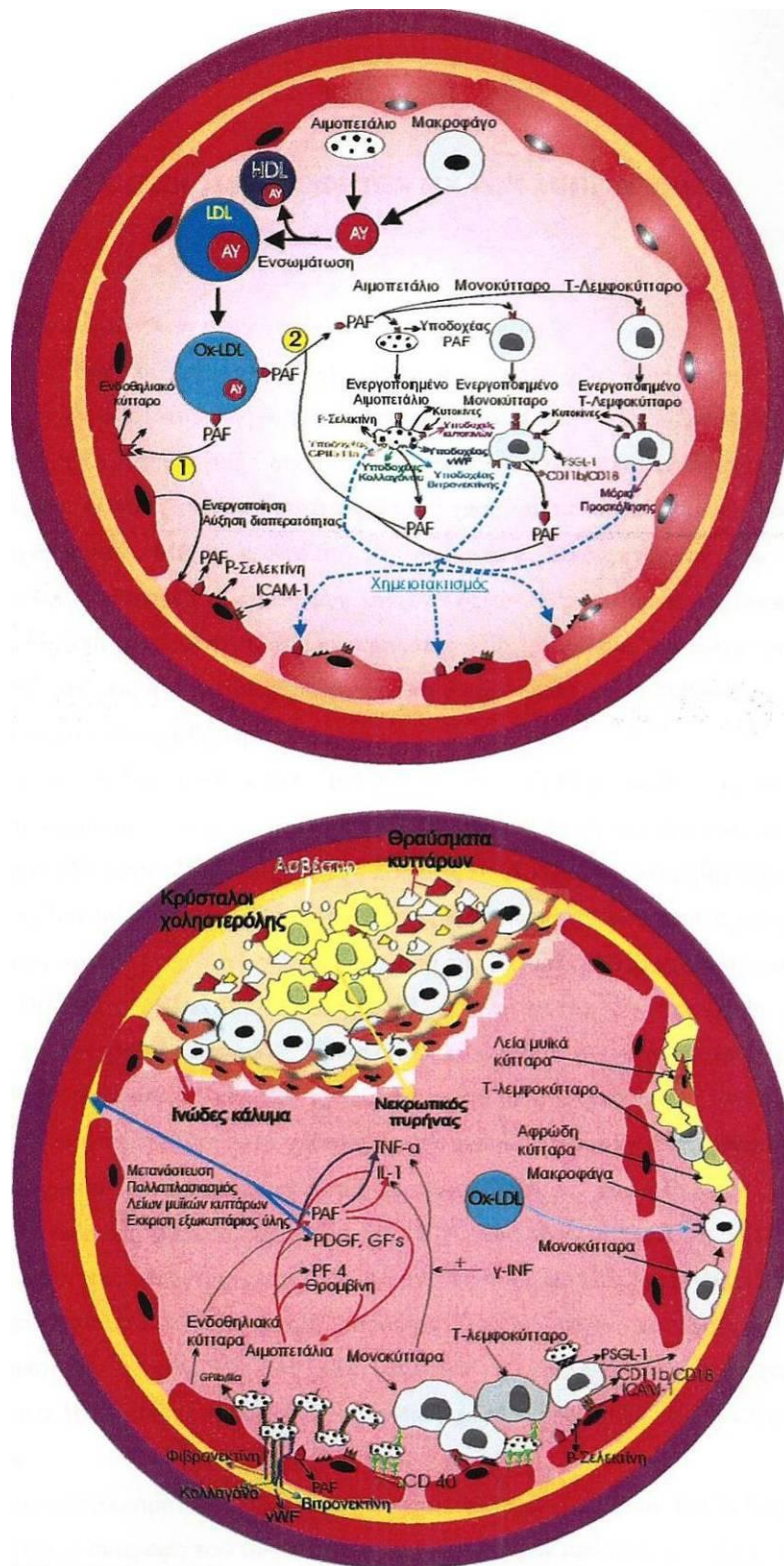
Τα κύτταρα του αίματος συνδέονται κατόπιν στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των σελεκτινών, οπότε παρατηρείται μία κυλιόμενη κίνηση. Στο σημείο αυτό το παρατεταμένο σήμα από τον PAF και τα μόρια των κυτοκινών οδηγούν στην περαιτέρω ενεργοποίηση και καθήλωση στο ενδοθήλιο μετά τη σύνδεση μέσω των ιντεγκρινών.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

Με αυτό τον τρόπο η διατάραξη του ενδοθηλίου λόγω φλεγμονής, οδηγεί στην αύξηση της διαπερατότητας του. Η οξειδωμένη LDL και τα προσκολλημένα στο ενδοθήλιο κύτταρα διαπερνούν το ενδοθήλιο και μεταναστεύουν στον υποενδοθηλιακό χώρο.

Εκεί τα μονοκύτταρα μετατρέπονται σε μακροφάγα, τα οποία προσλαμβάνουν την οξειδωμένη LDL, διαμέσου του ειδικού εκκαθαριστή υποδοχέα και σχηματίζονται τα αφρώδη κύτταρα. Η ενεργοποίηση όλων αυτών των κυττάρων οδηγεί στην παραγωγή μορίων, όπως ο PDGF, που μαζί με τον PAF προκαλούν μετανάστευση και πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία στη συνέχεια εκκρίνουν εξωκυττάρια ύλη. Στο χώρο λοιπόν των αφρωδών κυττάρων μεταναστεύουν λίγα λεία μυϊκά κύτταρα καθώς και πολύ λίγα T-λεμφοκύτταρα.

Το παρατεταμένο σήμα προκαλεί τη μετανάστευση των λείων μυϊκών κυττάρων, τα οποία μαζί με λίγα λευκοκύτταρα και συνδετικό ιστό δημιουργούν ένα ινώδες κάλυμμα, κάτω από το οποίο δημιουργείται ένα στρώμα από μακροφάγα και λεία μυϊκά κύτταρα, επιπλέον κάτω από αυτό το στρώμα των κυττάρων νεκρώνονται διάφορα είδη κυττάρων που βρίσκονται σε αυτό το σημείο και συσσωρεύονται θραύσματα κυττάρων, χοληστερόλη, ασβέστιο και λίγα αφρώδη κύτταρα δημιουργώντας έναν πυρήνα, το νεκρωτικό πυρήνα.

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



Σχήμα 2.4: Πιθανός μηχανισμός σχηματισμού αθηρωματικής πλάκας με εμπλοκή του PAF⁷⁹

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΣΧΕΣΗ ΜΕ ΤΗΝ ΑΘΗΡΟΓΕΝΕΣΗ

Τα τελευταία χρόνια τα ποσοστά της καρδιοπάθειας σε όλο τον κόσμο έχουν πολλαπλασιαστεί επικίνδυνα, για αυτό εμφανίζεται μια αυξανόμενη τάση για την εύρεση ενός φαρμάκου ή κάποιας διατροφής που να μειώνει τους θανάτους και ενδεχομένως να αναστέλλει την ασθένεια. Πολλές μελέτες έχουν επικεντρωθεί στην εύρεση των τροφίμων αυτών που έχουν την ικανότητα να αναστείλουν τη δημιουργία ή ακόμα και να μειώσουν το μέγεθος της αθηρωματικής πλάκας.

Όσον αφορά το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα λόγω του ότι περιέχουν αυξημένη περιεκτικότητα σε λίπος παλαιότερα είχαν κατηγορηθεί ότι μπορεί να προκαλέσουν αθηρογένεση^{82,83}. Παρ' όλα αυτά υπάρχουν πολύ λίγα στοιχεία από επιστημονικές μελέτες που υποστηρίζουν κάτι τέτοιο και μάλιστα νεότερες μελέτες έχουν αποδείξει ότι όταν τα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται σε συνήθεις ποσότητες μπορούν να βοηθήσουν και στην εξάλειψη της νόσου⁸⁴. Μία ενδιαφέρουσα επιστημονική μελέτη που παρουσιάστηκε από τον Guir⁸⁵ είχε δείξει ότι οι άνθρωποι που καταναλώνουν τακτικά γάλα είχαν πολύ λιγότερες πιθανότητες να πάθουν καρδιακή προσβολή από εκείνους που δεν το κατανάλωναν τόσο συχνά. Η προστατευτική αυτή ικανότητα του γάλακτος μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες και διαδικασίες που συμβαίνουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Αρχικώς το λίπος του γάλακτος ενώ χαρακτηρίζεται από μεγάλη περιεκτικότητα σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο το ένα τρίτο από αυτά μπορούν να αυξήσουν τη χοληστερόλη. Αυτά είναι το λαυρικό (12:0), το μυριστικό (14:0) και το παλμιτικό (16:0) οξύ^{86,87,88}. Επιπλέον το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν και συστατικά, τα οποία είναι προστατευτικά για τον οργανισμό και μπορούν να μειώσουν και τη χοληστερόλη. Τέτοια συστατικά είναι το ασβέστιο, το λινολεϊκό οξύ, το λινελαϊκό οξύ, τα αντιοξειδωτικά και τα γαλακτικά ή προβιοτικά βακτήρια.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι τα διάφορα συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων μπορούν να έχουν ευεργετική δράση έναντι διάφορων ασθενειών, όπως και να βοηθήσουν πολλές λειτουργίες του οργανισμού. Συγκεκριμένα το ασβέστιο παίζει σημαντικό ρόλο στη πραγματοποίηση της αγγειακής συστολής και διαστολής, συστολής των μυών, μετάδοσης των νευρικών σημάτων και έκκρισης των αδένων⁸⁹. Από την άλλη υπάρχουν όλο

και περισσότερες αποδείξεις ότι το λινολεϊκό οξύ βοηθάει στη μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων. Ακόμα υπάρχουν και κάποιες ενδείξεις ότι προστατεύει ενάντια στην ανάπτυξη της πρόωρης αρτηριακής συσσώρευσης λιπιδίων, βοηθάει στη ρύθμιση του σωματικού βάρους και της κατανομής του λίπους^{90,91,92}.

Όσον αφορά τη χοληστερόλη είναι αποδεδειγμένο ότι ένα αυξημένο επίπεδο δεν εξηγεί τον υψηλό κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου ή τη σχέση μεταξύ διατροφής και στεφανιαίας νόσου. Σε πρόσφατη εργασία αποδεικνύεται ότι η χοληστερόλη, αν και σχετίζεται στατιστικά με αυξημένο καρδιαγγειακό κίνδυνο, δεν είναι ο παράγων που προκαλεί τα καρδιαγγειακά νοσήματα και ότι τα λειτουργικά τρόφιμα που μειώνουν την χοληστερόλη (π.χ. φυτοστερόλες) μπορεί ακόμα και να επιδεινώσουν την ασθένεια¹¹¹.

Από την άλλη μεριά πολλές έρευνες δείχνουν ότι η ανάπτυξη της αθηροσκλήρωσης σχετίζεται με τις ελεύθερες ρίζες, την υπεροξειδωση των λιπιδίων και τις οξειδωτικές μεταβολές των λιποπρωτεϊνών χαμηλής πυκνότητας (LDL). Η LDL είναι ο κύριος φορέας της χοληστερόλης, αλλά η αθηρογόνος δράση της προκύπτει από την αύξηση του αριθμού των LDL και όχι από το περιεχόμενό της σε χοληστερόλη. Η οξείδωση της LDL προάγει την τελική εναπόθεση της χοληστερόλης στο αρτηριακό τοίχωμα. Έχει αποδειχτεί ότι οι λιποπρωτεΐνες αυτές είναι πολύ ευαίσθητες στην οξειδωτική μεταβολή⁹³. Το κύτταρο όμως διαθέτει εξαιρετικά αποτελεσματικούς προστατευτικούς μηχανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των αντιοξειδωτικών, όπως η τοκοφερόλη, το καροτένιο, η γλουταθειόνη και μεταλλοδεσμευτικών πρωτεϊνών, όπως η τρανσερίνη και ενζύμων, όπως η υπεροξειδάση και η καταλάση⁹⁴. Η πλειοψηφία από αυτές τις ουσίες μπορεί να βρεθεί στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Βέβαια πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οι πρόοδοι που έχουν γίνει στον τομέα γενετικής και μοριακής βιολογίας έχουν δείξει ότι η ευαισθησία σε χρόνιες ασθένειες, όπως η στεφανιαία νόσος, η υπέρταση, ο διαβήτης, η οστεοπόρωση και ο καρκίνος, οφείλεται σε μεγάλο βαθμό και σε γενετικούς παράγοντες. Μελέτες στις Ηνωμένες Πολιτείες αποδεικνύουν ότι το 50% της διακύμανσης στη συγκέντρωση της χοληστερόλης στο πλάσμα του αίματος είναι γενετικά προκαθορισμένο⁹⁵.

Όπως αναφέρθηκε η υπέρταση, η οποία αποτελεί πλέον ένα σύγχρονο πρόβλημα υγείας, επηρεάζεται από γενετικούς και περιβαλλοντολογικούς παράγοντες. Οι άνθρωποι με μεγάλη αρτηριακή πίεση παρουσιάζουν αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών νοσημάτων, εγκεφαλικού επεισοδίου και νεφρικής ανεπάρκειας. Λόγω του υψηλού κόστους των φαρμάκων και τις πιθανές παρενέργειες που σχετίζονται με αυτά, οι άνθρωποι ενθαρρύνονται να επιλέξουν έναν πιο υγιεινό τρόπο ζωής. Αυτό συνεπάγεται μείωση του

σωματικού βάρους, αύξηση της σωματικής δραστηριότητας, περιορισμένη κατανάλωση αλκοόλ και περιορισμένη πρόσληψη νατρίου σε συνδυασμό με επαρκή κατανάλωση ασβεστίου, καλίου και μαγνησίου. Πρόσφατες επιστημονικές μελέτες αποδεικνύουν ότι η υπέρταση δεν προκαλείται από περίσσεια ενός μόνο ηλεκτρολύτη, αλλά από υψηλά επίπεδα πολλών. Η επαρκής πρόσληψη ασβεστίου, καλίου και μαγνησίου έχει αποδειχτεί ότι μπορεί να μειώσει την πίεση του αίματος. Μάλιστα έχουν γίνει κλινικές δοκιμές, οι οποίες δείχνουν ότι η επίδραση του γάλακτος στην αρτηριακή πίεση ήταν μεγαλύτερη και πιο γρήγορη από εκείνη του ασβεστίου μόνο. Έτσι καταλήγουμε στο ότι αφού το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορούν να μειώσουν την αρτηριακή πίεση μπορούν και κατ' επέκταση προστατεύσουν τον οργανισμό από την εμφάνιση της καρδιαγγειακής νόσου^{96,97,98}.

Επίσης κάτι τέτοιο επιβεβαιώνεται και από μία πρόσφατη μελέτη που έγινε σε πειραματόζωα και έδειξε ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, και συγκεκριμένα τα τυριά, αν συμπεριληφθούν στη διατροφή εμφανίζουν μία προστατευτική δράση έναντι της υπερλιπιδαιμίας⁹⁹. Βέβαια έχουν πραγματοποιηθεί και κλινικές μελέτες, οι οποίες επιβεβαιώνουν ότι τα συστατικά των γαλακτοκομικών προϊόντων βοηθάνε στην πρόληψη της υπέρτασης, της αθηροσκλήρωσης, του διαβήτη τύπου 2 και της στεφανιαίας νόσου¹⁰⁰. Συγκεκριμένα μάλιστα έχει βρεθεί ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα μπορεί να έχουν ισχυρότερη ευεργετική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων από αυτή του γάλακτος. Αυτό οφείλεται στην παρουσία των μικροοργανισμών *Streptococcus thermophilus* και *Lactobacillus bulgaricus*, οι οποίοι συμμετέχουν στη διαδικασία της ζύμωσης και έχει αποδειχτεί ότι βοηθάνε στο σχηματισμό λιπιδίων, τα οποία είναι αναστολείς του PAF¹⁰¹.

Τέλος το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν τις βιταμίνες Β6 (πυριδοξίνη), Β12 (κυανοκοβαλαμίνη) και φολικό οξύ, οι οποίες συμβάλλουν στα χαμηλότερα επίπεδα ομοκυστεΐνης (τα αυξημένα επίπεδα στο αίμα ίσως σχετίζονται με αυξημένο κίνδυνο εμφράγματος)¹⁰⁷.

Συνεπώς τα γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελούν ένα σημαντικό τρόφιμο, το οποίο όχι μόνο αποτελεί πηγή ενέργειας για τον οργανισμό, αλλά ασκεί παράλληλα και ευεργετική δράση στη σωστή λειτουργία του.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η μεσογειακή διατροφή έχει αποδειχτεί βάσει πολλών ερευνών ότι είναι ωφέλιμη για την υγεία του ανθρώπου, καθώς εμφανίζει ευεργετική δράση έναντι πολλών σοβαρών ασθενειών. Σημαντική θέση στην πυραμίδα της μεσογειακής διατροφής κατέχει και το τυρί, το οποίο έχει πολύ μεγάλη θρεπτική αξία και είναι πλούσιο σε πρωτεΐνες, ασβέστιο και βιταμίνες, στοιχεία απαραίτητα για τη σωστή ανάπτυξη του οργανισμού. Επομένως αξίζει να μελετηθεί η πιθανή δράση των συστατικών του τυριού έναντι κάποιων σοβαρών ασθενειών, όπως η αθηρογένεση.

Για αυτό το λόγο σκοπός της εργασίας αυτής είναι να απομονωθούν τα ολικά λιποειδή από το τυρί, να προσδιοριστούν ποσοτικά, να διαχωριστούν και να μελετηθούν τα επιμέρους κλάσματα ως προς τη βιολογική δραστηρότητα τους δρώντας είτε ως αναστολείς είτε ως ανταγωνιστές του PAF, άρα και η βιολογική δράση τους έναντι της αθηρογένεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ – ΜΕΘΟΔΟΙ

5.1 Δειγματοληψία Τυριών

Τα τυριά που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της πειραματικής εργασίας αγοράστηκαν από super market. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι τυριών, το Κεφαλοτύρι Ελασσόνας και το Λαδοτύρι Μυτιλήνης (Π.Ο.Π.).

5.2 Εκχύλιση λιποειδών Bligh – Dyer¹⁰²

Αντιδραστήρια - Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (CHCl_3 , CH_3OH , H_2O) αναλυτικής καθαρότητας.
- Κυκλοαναδευτήρας.
- Αέριο άζωτο.
- Υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες των 10 mL ή 20 mL.
- Σφαιρικές φιάλες των 100 mL ή 250 mL.
- Περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης από ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) Heidolph Laborotora 4000 eco/WB/G1.

Αρχή Μεθόδου

Με κατάλληλης πολικότητας μονοφασικό σύστημα διαλυτών επιτυγχάνεται η εκχύλιση όλων των λιποειδών καθώς επίσης και η εκχύλιση μικρών ποσοτήτων υδατοδιαλυτών ενώσεων, όπως είναι διάφορα άλατα, αμινοξέα και σάκχαρα. Με την μετατροπή του μονοφασικού συστήματος σε διφασικό σύστημα, που αποτελείται από χλωροφορμική φάση όπου κατανέμονται όλα τα λιποειδή, και υδατική όπου κατανέμονται τα υδατοδιαλυτά συστατικά.

Αναλυτική πορεία

Το προς εκχύλιση δείγμα κατεργάζεται με μίγμα $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1/2/0.8 v/v/v), αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η έντονη ανάδευση επαναλαμβάνεται περιοδικά για διάστημα 10 min. Στη συνέχεια και εφόσον είναι απαραίτητο, το όλο δείγμα

φυγοκεντρείται, ώστε να απομακρυνθούν τα αδιάλυτα συστατικά. Ακολούθως προστίθενται συγκεκριμένες ποσότητες CHCl_3 και H_2O ώστε η αναλογία των διαλυτών $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ να γίνει 1/1/0.9 v/v/v, όποτε σχηματίζονται δύο φάσεις διαλυτών. Η κάτω φάση που είναι η χλωφορμική φάση και περιέχει τα λιποειδή, μεταφέρεται ανάλογα τον όγκο της, είτε σε δοκιμαστικό σωλήνα, οπότε το δείγμα εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου, είτε σε σφαιρική φιάλη οπότε ο διαλύτης εξατμίζεται έως μικρό όγκο σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση και στη συνέχεια γίνεται μεταφορά σε δοκιμαστικό σωλήνα όπου συνεχίζεται η εξάτμιση έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου.

Σε όλες τις περιπτώσεις, η θερμοκρασία εξάτμισης κυμαίνεται από 30-35°C. Τα λιποειδή αναδιαλύονται σε μικρή ποσότητα δείγματος $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1/1, v/v) για περαιτέρω επεξεργασία.

5.3 Κατανομή κατά αντιρροή¹⁰³

Αντιδραστήρια-Όργανα

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

Αρχή μεθόδου

Τα ολικά λιποειδή αναμιγνύονται με προεξισορροπημένους διαλύτες πετρελαϊκού αιθέρα και $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 87% σε αναλογία 3/1. Δημιουργείται διαφασικό σύστημα διαλυτών, όπου τα μεν πολικά λιποειδή κατανέμονται στη φάση της αιθανόλης, τα δε ουδέτερα λιποειδή στη φάση του πετρελαϊκού αιθέρα.

Αναλυτική πορεία

Σε διαχωριστική χοάνη, γίνεται εξισορρόπηση των διαλυτών του πετρελαϊκού αιθέρα με την αιθανόλη 87%. Σχηματίζονται δύο φάσεις, οπότε παραλαμβάνεται χωριστά η κάτω φάση, που είναι η εξισορροπημένη $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ και στη συνέχεια η άνω φάση, που είναι ο εξισορροπημένος πετρελαϊκός αιθέρας, για να ακολουθήσει η περαιτέρω κατεργασία των λιποειδών. Στη συνέχεια, τα ολικά λιποειδή εξατμίζονται και αναδιαλύονται σε 9 ml

προεξισορροπημένου πετρελαϊκού αιθέρα. Προστίθενται 3 ml προεξισορροπημένης $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 87% και ακολουθεί ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα. Η κάτω φάση, που είναι η αιθανολική φάση, παραλαμβάνεται με υάλινη πιπέτα Pasteur και μεταφέρεται σε δεύτερο σωλήνα που περιέχει 9 ml πετρελαϊκού αιθέρα. Ακολουθεί εκ νέου ισχυρή ανάδευση με τη βοήθεια κυκλοαναδευτήρα και παραλαβή της αιθανολικής φάσης, η οποία τοποθετείται σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα. Στον πρώτο δοκιμαστικό σωλήνα προστίθενται 3 ml προεξισορροπημένης αιθανόλης 87% για να επαναληφθεί η παραπάνω διαδικασία. Η διαδικασία αυτή γίνεται συνολικά 8 φορές. Μετά το πέρας της διαδικασίας, η αιθανολική φάση ($8 \times 3 \text{ ml}$), που περιέχει τα πολικά λιποειδή, εξατμίζεται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια, αναδιαλύεται σε μικρό όγκο διαλύτη $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 1:1 (v/v). Οι φάσεις του πετρελαϊκού αιθέρα ($2 \times 9 \text{ ml}$), που βρίσκονται στους πρώτους δύο δοκιμαστικούς σωλήνες, περιέχουν τα ουδέτερα λιποειδή, και αφού ενωθούν σε έναν υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα, εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και έπειτα αναδιαλύονται σε μικρό όγκο διαλύτη $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ αναλογίας 1:1 (v/v).

5.4 Αέρια Χρωματογραφία (G.C.) Λιπαρών Οξέων¹⁰⁴

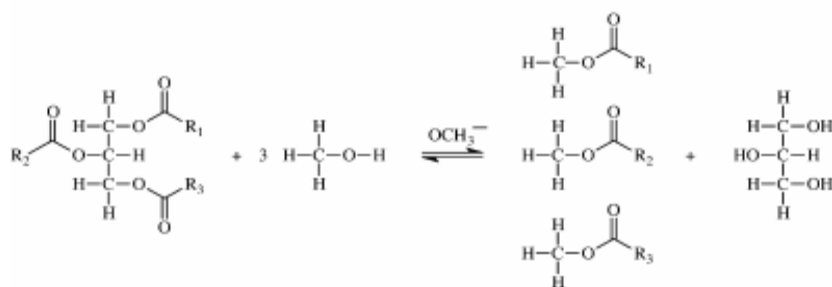
5.4.1 Μέθοδος Εστεροποίησης Λιπαρών Οξέων

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Διάλυμα KOH σε MeOH 0,5%N 90%.
- Κανονικό εξάνιο.
- Διάλυμα HCL 6N.
- Άνυδρο Na_2SO_3 .
- Πεχαμετρικό χαρτί.

Αρχή μεθόδου

Η μέθοδος παρασκευής μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων που χρησιμοποιήθηκε καταλύεται από βάση και συγκεκριμένα από KOH. Η μέθοδος αυτή επιδρά στα τριγλυκερίδια, με μια διαδικασία ενός βήματος προκαλώντας την τρανσεστεροποίησή τους (Σχήμα 5.1).



Σχήμα 5.1: Τρανσεστεροποίηση των τριακυλογλυκερολών καταλύομενη από βάση

Αναλυτική πορεία

Συγκεκριμένη ποσότητα λιποειδούς φέρεται σε μεγάλο δοκιμαστικό σωλήνα σε μορφή διαλύματος από το οποίο εξατμίζεται ο διαλύτης μέχρι ξηρού σε ρεύμα N₂. Στη συνέχεια προστίθεται στο δοκιμαστικό σωλήνα 1 ml κανονικού εξανίου, γίνεται ισχυρή ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα προκειμένου να διαλυτοποιηθούν τα λιποειδή και τέλος προστίθενται 4 ml διαλύματος KOH σε MeOH 0,5N 90%. Ακολουθεί ανάδευση σε κυκλοαναδευτήρα επί 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια ρυθμίζεται το pH=7 με διάλυμα HCL 6N, προσθέτονται 2ml νερό και 2 ml κανονικό εξάνιο, ισχυρή ανάδευση και παραλαβή της στιβάδας του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων. Στη συνέχεια προστίθενται στο δοκιμαστικό σωλήνα επιπλέον 2 ml κανονικού εξανίου, ανάδευση και παραλαβή της στιβάδας του εξανίου. Η συνολική ποσότητα του εξανίου που περιέχει τους μεθυλεστέρες των λιπαρών οξέων εκχυλίζονται με 2 ml νερό και τελικά η στιβάδα του εξανίου ξηραίνεται με άνυδρο στερεό Na₂SO₃. Ακολουθεί διήθηση και εξάτμιση της περίσσειας του διαλύτη και διαλυτοποίηση των μεθυλεστέρων σε μικρό όγκο κανονικού εξανίου.

5.4.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Μεθυλεστέρων των Λιπαρών Οξέων με Αέρια Χρωματογραφία (G.C.)¹⁰⁴

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φέρον αέριο H₂.
- Φέρον αέριο He₂.
- Φέρον αέριο αέρος.
- Πρότυπα διαλύματα μεθυλεστέρων λιπαρών οξέων:

α) παλμιτικού οξέος (16:0).

- β) παλμιτελαϊκού οξέος (16:1).
 γ) (17:0).
 δ) ελαϊκού οξέος (18:0).
 ε) ελαϊδικού οξέος (18:1).
 στ) λινελαϊκού οξέος (18:2).
 ζ) α-λινολενικού οξέος (18:3).
 η) αραχιδονικού οξέος (20:4).
 θ) εικοσιπεντανοϊκού οξέος (EPA) (20:5).
 ι) (21:0) και
 κ) εικοσιδυεξανοϊκού οξέος (DHA) (22:6).

- Εξάνιο.
- Πολική τριχοειδής στήλη DB-23 (Agilent J & W) (60 m x 0,25 I mm ID x 0,25 μm) και θερμοκρασιών 40 °C-250 °C.
- Αέριος χρωματογράφος Shimadzu CLASS-VP (GC-17A) (Kyoto, Japan) με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID).

Αναλυτική πορεία

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ξεκινούσε από τους 120 °C και παρέμενε εκεί για 5 min, στη συνέχεια η θερμοκρασία αυξανόταν με ρυθμό 10 °C/min μέχρι τους 180 °C και τέλος αυξανόταν με ρυθμό 20 °C/min μέχρι τους 220 °C και παρέμενε εκεί για 40 min. Η θερμοκρασία εισόδου του δείγματος και του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας ήταν 240 °C και 250 °C αντίστοιχα, ενώ η ροή του φέροντος αερίου είναι 1 ml/min¹⁵. Για την ποιοτική ταυτοποίηση των λιπαρών οξέων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα πρότυπα διαλύματα των μεθυλεστέρων και η ταυτοποίηση έγινε με βάση τους χρόνους έκλουσης.

Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν δύο λιπαρά οξέα το 17:0 και το 21:0, που δεν υπάρχουν στα ιχθυέλαια. Παρασκευάστηκαν πέντε διαλύματα, η σύσταση των οποίων φέρεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 5.1).

Πίνακας 5.1: Συγκέντρωση των λιπαρών οξέων 17:0 και 21:0 στα πρότυπα διαλύματα

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

Στη συνέχεια έγινε ένεση 1,5 μl από κάθε δείγμα στον αέριο χρωματογράφο και καταγράφηκαν τα εμβαδά κορυφών των δύο λιπαρών οξέων. Η διαδικασία αυτή γίνεται τέσσερις φορές. Ο μέσος όρος των λόγων του εμβαδού του 21:0 προς το εμβαδόν του 17:0 αποτελεί τις τεταγμένες των σημείων της καμπύλης αναφοράς, ενώ η συγκέντρωση του 21:0 (ppm) αποτελεί τις τετημημένες των σημείων αυτών.

Με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων υπολογίστηκε η εξίσωση της καμπύλης αναφοράς:
 $y = 0,0021x + 0,0210$ (1)

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

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

5.5 Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) Λιποειδών^{104,105}

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Οργανικοί διαλύτες (ακετόνη, μεθανόλη, χλωροφόρμιο)
- Πρότυπα λιποειδή: Merck, Supelco, Sigma
- Προσροφητικό υλικό: πηκτική SiO₂ (Silica gel G 60)
- Σύστημα επίστρωσης πλακών TLC: Desaga
- Γυάλινες πλάκες διαστάσεων 20× 20 cm, 20×10 cm
- Φούρνος
- Φυγόκεντρος: Sorvall RC-5B Refrigerated, Du Pont.
- Σωλήνες φυγόκεντρου
- Γυάλινοι θάλαμοι ανάπτυξης διαστάσεων 25×25×10 cm
- Θάλαμος ιωδίου

Αρχή Μεθόδου

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

Αναλυτική πορεία

Επίστρωση και ενεργοποίηση των πλακών

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

Προετοιμασία του θάλαμου χρωματογραφίας

Προετοιμάζεται ο θάλαμος χρωματογραφίας με το εξής σύστημα ανάπτυξης:

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

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

Τοποθέτηση των δειγμάτων και ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων

Οι πλάκες χωρίζονται σε δύο ζώνες και το δείγμα τοποθετείται στην αριστερή πλευρά, με μορφή κηλίδας σε μία ευθεία νοητή γραμμή περίπου 2cm από το κάτω μέρος της πλάκας. Η δεξιά πλευρά των πλακών έχει χωριστεί σε επιμέρους ισοπαχείς ζώνες και εκεί τοποθετούνται επίσης με μορφή κηλίδας τα πρότυπα δείγματα λιπιδίων. (Μετά την ανάπτυξη, η σύγκριση των Rf των προτύπων και των αγνώστων λιπιδίων εξυπηρετεί την ταυτοποίηση των τελευταίων). Χρησιμοποιούνται ως πρότυπα διαλύματα διάλυμα τριγλυκεριδίου (TG), διγλυκεριδίου (DG), μονογλυκεριδίου (MG) και λιπαρού οξέος (FA) για την ανάλυση των ουδέτερων λιπιδίων (NL) και φωσφατιδυλοχολίνης (PC), φωσφατιδυλοαιθανολαμίνης (PE) και σφιγγομυελίνης (SM) για την ανάλυση των πολικών λιπιδίων (PL). Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, οι πλάκες εισάγονται στους

χρωματογραφικούς θαλάμους και αναπτύσσονται. Απομακρύνονται δε από αυτούς όταν ο διαλύτης φτάσει σε προκαθορισμένο σημείο στο πάνω μέρος της πλάκας.

Εμφάνιση των χρωματογραφημάτων

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

5.6 Βιολογική Δοκιμασία Συσσώρευσης Πλωμένων Αιμοπεταλίων

Κουνελιού⁵²

Αντιδραστήρια – Όργανα

- Φυσιολογικός ορός (NaCl 0,1 %) ελεύθερος πυρετογόνων.
- Διάλυμα φύλαξης (stock) 10x Tyrodes : Σε 1 L νερού διαλύονται 80 g NaCl, 1,95 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ και 10 g γλυκόζης.
- Διάλυμα φύλαξης 100 x $CaCl_2$: Σε 100 mL νερού διαλύονται 1,911 g $CaCl_2$.
- Διάλυμα φύλαξης EGTA 0,2 M: Ποσότητα 0,76 g EGTA διαλύεται σε 10 mL νερό. Ρυθμίζεται το pH του διαλύματος στο 7,5 με NaOH 5 M.
- Υδατικό διάλυμα ζελατίνης 10 % (w/v).
- Διαλύματα Tyrodes με ζελατίνη pH = 6,5 (Tg pH = 6,5), και Tyrodes με ζελατίνη και EGTA pH = 6,5 (Tg EGTA pH = 6,5): Σε 80 mL νερό προσθέτονται 10 mL από το αντιδραστήριο φύλαξης Tyrodes 10x. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα, προστίθενται 2,5 mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10 % (w/v) που έχει υποστεί πήξη στο σημείο βρασμού. Ακολούθως, διαλύονται 0,2030 g $NaHCO_3$ σε 10 mL νερό και από το διάλυμα αυτό προστίθενται 5 mL αμέσως μετά την παρασκευή του. Συμπληρώνεται ο όγκος στα 100 mL με νερό και χωρίζεται σε δύο τμήματα των 50 mL. Στο ένα από τα δύο προσθέτονται 25 μ L EGTA 0,2 M και ρυθμίζεται το pH και των δύο κλασμάτων στο 6,46 με HCl 1 N. Αμέσως γεμίζονται γυάλινοι σωλήνες των 20 mL και

κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm), αποφεύγοντας τον εγκλεισμό φυσαλίδων αέρα. Τα διαλύματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου.

- Διάλυμα Tyrodes με ασβέστιο pH = 7,2 (Tg-Ca pH = 7,2): Σε 5 mL διαλύματος φύλαξης tyrodes 10x προστίθενται 40 mL νερό. Υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικούς αναδευτήρα προστίθενται 1,25 mL υδατικού διαλύματος ζελατίνης 10% (w/v). Στη συνέχεια προστίθενται 0,5 mL διαλύματος φύλαξης CaCl_2 100x και αμέσως μετά 2,5 mL διαλύματος NaHCO_3 που παρασκευάζεται εκείνη τη στιγμή διαλύοντας 0,2030 g NaHCO_3 σε 10 mL νερό. Συμπληρώνεται ο όγκος μέχρι τα 50 mL με νερό και ρυθμίζεται το pH στο 7,16 με HCl 1 N. Διατηρείται στους 37 °C σε ερμητικά κλειστούς σωλήνες με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm).
- Αντιπηκτικό διάλυμα κιτρικών με γλυκόζη (ACD): Σε 1000 mL νερού διαλύονται 13,65 g κιτρικού οξέος, 25 g κιτρικού νατρίου και 20 g δεξτρόζης.
- Διάλυμα φύλαξης βοείας αλβουμίνης ορού (BSA) 100 mg/mL: Ποσότητα 100 mg BSA (Sigma) ελεύθερης λιπαρών οξέων διαλύεται σε 1 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων. Φυλάσσεται στους -20 °C.
- Διάλυμα εργασίας βοείας αλβουμίνης ορού (BSA) 2,5 mg/mL: Από 10 mL φυσιολογικού ορού ελεύθερου πυρετογόνων αφαιρούνται 250 μL και προστίθενται 250 μL διαλύματος φύλαξης BSA.
- Ficoll-Paque (Pharmacia).
- Υγρό επίστρωσης σιλικόνης (Serva).
- Πλαστικοί σωλήνες των 50 mL.
- Πλαστικά σιφώνια των 20 mL.
- Συσσωρευματομέτρο, Chrono-log.
- Πεχάμετρο ORION 410A.
- Φωτόμετρο Bausch-Lomb.
- Θερμοστατούμενο υδρόλουτρο στους 37 °C.
- Φυγόκεντρος Sorvall RC-5B Refrigerated, DuPont.
- Διάλυμα φύλαξης PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M σε διαλύτη $\text{CH}_2\text{Cl}/\text{MeOH}$ 1/1 (v/v).
- Διαλύματα εργασίας PAF συγκεντρώσεων $6,25 \times 10^{-6}$ M, $6,25 \times 10^{-8}$ M, $6,25 \times 10^{-9}$ M, $6,25 \times 10^{-10}$ M σε διάλυμα εργασίας BSA. Σε υάλινο δοκιμαστικό σωλήνα παραλαμβάνονται 25 μL από το διάλυμα φύλαξης του PAF συγκέντρωσης 10^{-4} M τα οποία εξατμίζονται έως ξηρού σε ρεύμα αζώτου και αναδιαλύονται σε 400 μL διαλύματος εργασίας BSA. Μετά από παραμονή 10 min από το διάλυμα αυτό συγκεντρώσεως $6,25 \times 10^{-6}$ M, ετοιμάζονται σε

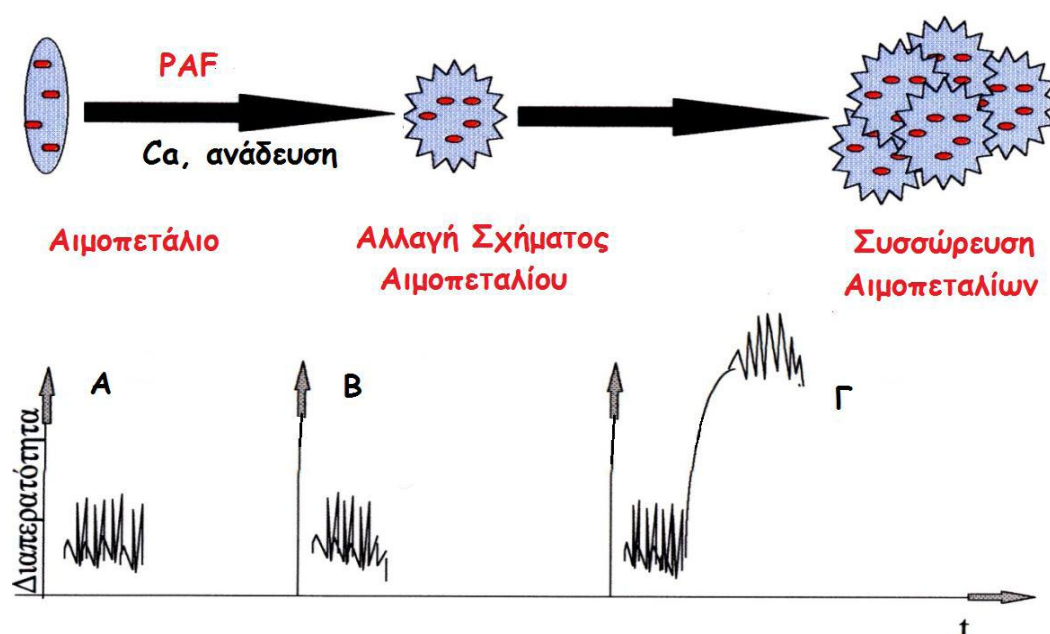
πλαστικούς σωλήνες και οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις με διάλυμα εργασίας BSA.

Αναλυτική πορεία

Ποσότητα των ολικών πολικών λιποειδών και των πολικών λιποειδικών κλασμάτων, ελέγχθηκαν ως προς τη βιολογική δραστηριότητα με κατάλληλη βιολογική μέθοδο, που αποτελεί διεθνώς το δόκιμο τρόπο μελέτης ενός συστατικού για το αν έχει ανάλογη δράση του PAF ή αν δρα ως αναστολέας αυτού.

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

Σε συγκεκριμένη ποσότητα αιμοπεταλίων προστίθεται ο PAF ή το δείγμα που εξετάζεται διαλυμένο σε υδατικό διάλυμα αλβουμίνης βοδινού (BSA) και ελέγχεται από τον καταγραφέα του οργάνου η αλλαγή της διαπερατότητας. Όταν τα αιμοπετάλια συσσωρεύονται, το περιεχόμενο της κυψελίδας διανυγάζεται, η οπτική διαπερατότητα αυξάνει απότομα και λαμβάνεται η καμπύλη του σχήματος 5.2. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα της συσσώρευσης, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα.



Σχήμα 5.2: Ενεργοποίηση και συσσώρευση των αιμοπεταλίων από τον PAF και απόδοση της καταγραφόμενης καμπύλης ως αύξησης της διαπερατότητας με το χρόνο. Α) Αιμοπετάλια σε φυσιολογική κατάσταση, Β) Αιμοπετάλια μετά από προσθήκη PAF, Γ) Συσσώρευση αιμοπεταλίων.

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

Απομόνωση πλυμένων αιμοπεταλίων από αίμα κουνελιού.

Σε πλαστικούς σωλήνες των 50 mL προστίθενται 7 mL αντιπηκτικού ACD. Το αίμα συλλέγεται από την κεντρική αρτηρία του αυτιού του κουνελιού. Ο σωλήνας γεμίζεται με αίμα μέχρι τα 50 mL και αναμιγνύεται ήπια με αναστροφή. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 500×g. Κατά την διάρκεια της φυγοκέντρησης μεταφέρουμε 2 mL Ficoll-Paque σε πλαστικούς σωλήνες των 14 mL. Αναρροφώνται τα 2/3 του υπερκείμενου πλάσματος που είναι πλάσμα πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP, Platelet Rich Plasma) με πλαστικό σιφόνιο των 20 mL και μεταφέρονται σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 50 mL. Το πλάσμα το πλούσιο σε αιμοπετάλια (PRP), τοποθετείται πάνω στο στρώμα του Ficoll, με μέγιστο ποσοστό PRP τα 9 mL για κάθε 2 mL Ficoll, χρησιμοποιώντας πλαστικά σιφόνια. Μεταφέρονται ίσοι όγκοι PRP σε 2 ή 3 σωλήνες ανάλογα με το συνολικό όγκο του πλάσματος. Οι πλαστικοί σωλήνες κλείνονται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm) και φυγοκεντρώνται για 20 min στους 24 °C στα 750×g. Μετά τη φυγοκέντρηση τα αιμοπετάλια εμφανίζονται σαν ταινία μεταξύ της στιβάδας του υπερκείμενου πλάσματος του φτωχού σε αιμοπετάλια (PPP, Platelet Poor Plasma) και του στρώματος του Ficoll. Το PPP αναρροφάται και απορρίπτεται με πλαστικό σιφόνιο των 20 mL. Το στρώμα των αιμοπεταλίων διαπερνάται με σιλικοναρισμένη πιπέτα Pausteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Αν υπάρχουν 2 σωλήνες προστίθενται 7 mL Tg-EGTA pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL, αφήνοντας έτσι τα ερυθρά αιμοσφαίρια στον αρχικό σωλήνα. Αν υπάρχουν 3 σωλήνες προστίθενται 3 mL Tg EGTA pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα. Το διάλυμα αφήνεται να τρέξει ήπια στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη αποχύνεται το αιώρημα σε άλλο πλαστικό σωλήνα των 14 mL του οποίου το περιεχόμενο χωρίζεται σε 2 ίσα μέρη που μεταφέρονται σε δύο ξεχωριστούς σωλήνες και προστίθενται περίπου 3 mL Tg EGTA pH = 6,5. Το περιεχόμενο του κάθε σωλήνα μεταφέρεται σε 2 mL Ficoll καλύπτεται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 750×g. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται με σιφόνιο των 20 mL. Διαπερνάται το

στρώμα αιμοπεταλίων με σιλικοναρισμένη πιπέτα pasteur, αναρροφάται το Ficoll και απορρίπτεται. Στην συνέχεια προστίθενται περίπου 8 mL διαλύματος Tg pH = 6,5 σε κάθε σωλήνα αφήνοντας το διάλυμα να τρέξει στα τοιχώματα του σωλήνα και χωρίς ανάμιξη μεταφέρεται το εναιώρημα σε καθαρό πλαστικό σωλήνα των 14 mL και καλύπτεται με απομονωτική ταινία στερεής παραφίνης (parafilm). Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 min στους 24 °C στα 750×g. Το υπερκείμενο ρυθμιστικό διάλυμα απορροφάται και απορρίπτεται μέχρι και την τελευταία σταγόνα. Ακολούθως προστίθενται 0,8 mL Tg pH = 6,5 σε κάθε συσσωμάτωμα αιμοπεταλίων αναδιασπείροντας τα κύτταρα με ήπιο τρόπο. Το περιεχόμενο των σωλήνων ενώνεται σε πλαστικό σωλήνα. Ετοιμάζεται εναιώρημα αιμοπεταλίων σε Tg pH = 6,5 που να περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL. Από το πυκνό διάλυμα αιμοπεταλίων λαμβάνονται 10 μ L τα οποία αραιώνονται με 990 μ L Tg pH = 6,5 και το διάλυμα φωτομετρείται στα 530 nm. Ο αριθμός των κυττάρων στα 10 μ L δίνεται από τον τύπο: $\text{κύτταρα}/10 \mu\text{L} = A \times 1,25 \times 10^8$ 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 των 0,5 mL προστίθενται 50 μ L από το εναιώρημα αιμοπεταλίων που περιέχει $1,25 \times 10^8$ κύτταρα/mL και 200 μ L διαλύματος Tg-Ca pH = 7,2 καθώς και μικρός μαγνητικός αναδευτήρας που περιστρέφεται με 1.200 στροφές το λεπτό (rpm, rounds per min). Ακολουθεί επώαση για 15 min σε θερμοστατούμενο υδρόλουτρο θερμοκρασίας 37 °C. Στη συνέχεια η κυψελίδα με το εναιώρημα των αιμοπεταλίων τοποθετείται στην ειδική θερμοστατούμενη κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου και προστίθενται διάφορες ποσότητες PAF ή του εκάστοτε δείγματος το οποίο είναι διαλυτοποιημένο σε BSA 2,5 mg/mL και καταγράφεται η καμπύλη συσσώρευσης, ως αύξηση της διαπερατότητας. Η αύξηση της διαπερατότητας στηρίζεται στο γεγονός ότι κατά την συσσώρευση των αιμοπεταλίων διαυγάζεται το περιεχόμενο της κυψελίδας μέσα από την οποία διέρχεται η δέσμη ακτινοβολίας. Το ύψος και η μορφή της καμπύλης είναι ανάλογα με την συσσώρευση, το δε φαινόμενο της συσσώρευσης των αιμοπεταλίων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα. Με βάση γνωστής συγκέντρωσης διαλύματα συνθετικού PAF σχεδιάζεται η καμπύλη της επί τοις εκατό συσσώρευσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του PAF. Ως 100 % συσσώρευση ορίζεται η μέγιστη αντιστρεπτή συσσώρευση των αιμοπεταλίων. Βάση της πρότυπης αυτής καμπύλης και το ύψος της καμπύλης συσσώρευσης που προκαλεί το εξεταζόμενο δείγμα,

γίνεται ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος, ως συγκέντρωση ανάλογη της συγκέντρωσης του PAF στην κυψελίδα του συσσωρευματομέτρου (τελική συγκέντρωση) που έχει την ίδια βιολογική 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). Τα αποτελέσματα μπορούν να εκφραστούν και σαν συγκέντρωση του συσσωρευτικού παράγοντα που μπορεί να προκαλέσει το 50% της μέγιστης συσσώρευσης που καλείται EC₅₀ (Equivalent Concentration for 50% aggregation).

Πειράματα απευαισθητοποίησης σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού

Με κάποια συγκέντρωση PAF ή άλλου συσσωρευτικού παράγοντα προκαλείται αντιστρεπτή συσσώρευση αιμοπεταλίων και όταν τα αιμοπετάλια επανέλθουν στην αρχική τους κατάσταση προστίθεται στην κυψελίδα η ίδια συγκέντρωση PAF ή του άλλου συσσωρευτικού παράγοντα. Παρατηρείται ότι η δεύτερη προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα προκαλεί μικρότερη συσσώρευση από την αρχική, λόγω απευαισθητοποίησης των αιμοπεταλίων. Στα πειράματα διασταυρούμενης απευαισθητοποίησης το ίδιο πείραμα επαναλαμβάνεται με προσθήκη δύο διαφορετικών συσσωρευτικών παραγόντων. Σε περίπτωση απευαισθητοποίησης συμπεραίνεται ότι ο συσσωρευτικός παράγοντας δρα και αυτός μέσα από τον δρόμο του PAF, δηλαδή μέσα από τον υποδοχέα του PAF.

Πειράματα αναστολής της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων κουνελιού

Στη σειρά αυτή των πειραμάτων πριν την προσθήκη του συσσωρευτικού παράγοντα, προστίθενται διάφορες ποσότητες του αναστολέα, ακολουθεί επώαση για 1 min και στη συνέχεια προστίθεται ο PAF που προκαλεί γνωστού ύψους συσσώρευση αιμοπεταλίων. Υπολογίζεται το ποσοστό αναστολής στον PAF για κάθε ποσότητα δείγματος. Σχεδιάζεται η καμπύλη της επί της εκατό αναστολής, συναρτήσει της ποσότητας και τα αποτελέσματα εκφράζονται ως ποσότητα δείγματος ικανή να προκαλέσει 50 % αναστολή της συσσώρευσης των πλυμένων αιμοπεταλίων που καλείται IC₅₀ (Inhibitory Concentration for 50% Inhibition).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο

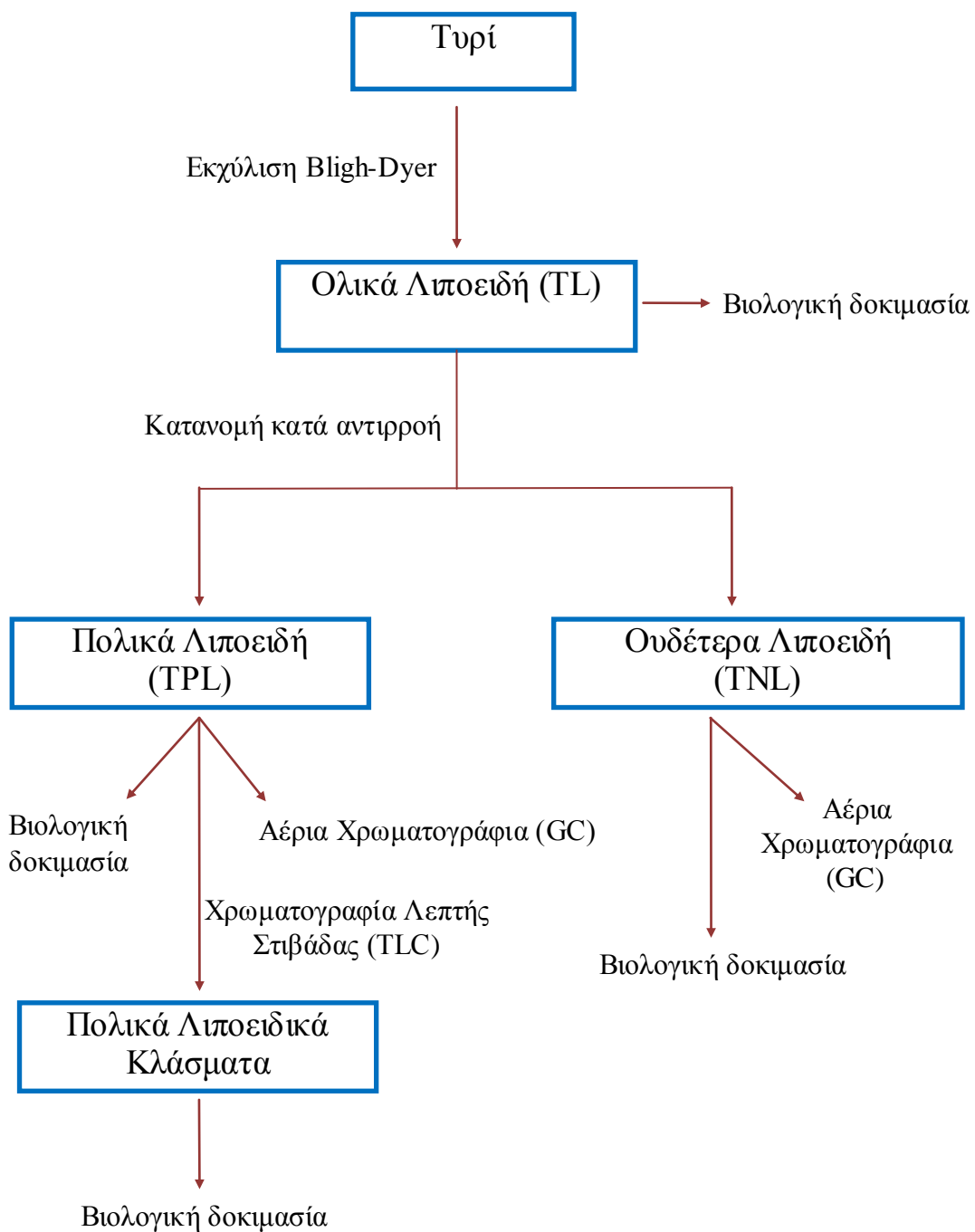
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ

6.1 Δειγματοληψία Τυριών

Χρησιμοποιήθηκαν δύο τύποι τυριών, το Κεφαλοτύρι Ελασσόνας και το Λαδοτύρι Μυτιλήνης (Π.Ο.Π.). Το δείγμα του κάθε τυριού ζύγιζε 200g.

6.2 Πειραματική Πορεία Απομόνωσης Λιποειδικών Κλάσμάτων

Αρχικός σκοπός των πειραμάτων ήταν η εκχύλιση των ολικών λιποειδών (TL) του Κεφαλοτυριού και του Λαδοτυριού με τη μέθοδο Bligh-Dyer¹⁰². Το κλάσμα των TL συμπυκνώθηκε σε μικρό όγκο με περιστροφική συσκευή εξάτμισης υπό ελαττωμένη πίεση (flash evaporator) και μεταφέρθηκε σε σκουρόχρωμο γυάλινο φιαλίδιο για να εξατμιστεί το δείγμα μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου. Ακολούθησε ο διαχωρισμός αυτών σε ολικά πολικά (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL) με τη μέθοδο της κατανομής κατ'αντιρροή¹⁰³ (Πίνακας 6.1). Ποσοτικός προσδιορισμός των μεθυλεστέρων των λιπαρών οξέων όλων των δειγμάτων τυριών με αέρια χρωματογραφία (G.C.) έγινε στα ολικά πολικά λιποειδή (TPL) και στα ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL), ενώ βιολογική δοκιμασία έγινε στα ολικά πολικά λιποειδή και στα επιμέρους πολικά λιποειδικά κλάσματα των δειγμάτων των τυριών μετά το διαχωρισμό με TLC. Η γενική πειραματική διαδικασία φαίνεται στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα 6.1).



Σχήμα 6.1: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε

6.2.1 Αποτελέσματα της Κατανομής Κατά Αντιρροή

Πίνακας 6.1: Ποσότητες TL, TPL, TNL που απομονώθηκαν από τα δείγματα τυριών

Δείγμα	Ζύγιση TL (g/200g τυριού)	Ζύγιση TPL (g/200g τυριού)	Ζύγιση TNL (g/200g τυριού)
Κεφαλοτύρι Ελασσόνας	50.35 ± 2.52	3.58 ± 0.18	40.68 ± 2.03
Λαδοτύρι Μυτιλήνης Π.Ο.Π.	51.98 ± 2.60	4.20 ± 0.21	43.03 ± 2.15

Όπως φαίνεται από τον παραπάνω πίνακα τα ολικά λιποειδή των δύο τυριών παρουσιάζουν κοντινές τιμές, με αυτές του Λαδοτυρίου να είναι λίγο μεγαλύτερες.

6.2.2 Αποτελέσματα της Αέριας Χρωματογραφίας (GC)

Στις εικόνες Α, Β, Γ και Δ (Παράρτημα) φαίνονται τα χρωματογράφημα των TPL και TNL των δειγμάτων του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου, στα οποία είναι σημειωμένοι οι χρόνοι έκλουσης και τα εμβαδά κάθε κορυφής.

Με τη βοήθεια των πρότυπων διαλυμάτων μεθυλεστέρων ταυτοποιήθηκαν οι κορυφές των λιπαρών οξέων με βάση τους χρόνους έκλουσης όπως φαίνονται στον πίνακα 6.2 και 6.3. Επίσης από τα εμβαδά των κορυφών των λιπαρών οξέων και με τη βοήθεια της καμπύλης αναφοράς προσδιορίστηκαν και ποσοτικά τα λιπαρά οξέα που περιέχονται στα TPL και TNL του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου και συνοψίζονται στον πίνακα 6.4 και 6.5.

Οι σημαντικότερες κορυφές των λιπαρών οξέων που ταυτοποιήθηκαν στο λιποειδικό κλάσμα των των TPL και TNL των δειγμάτων του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου ήταν το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0), το παλμιτελαϊκό (16:1, ω-7), το στεατικό (18:0), το ελαϊκό (18:1 cis, ω-9), το λινελαϊκό (18:2, ω-6) και το α-λινολενικό οξύ (18:3, ω-3). Ανάλογα αποτελέσματα όσον αφορά τη σύσταση των λιπαρών οξέων των τυριών βρέθηκαν και από άλλες μελέτες¹⁰⁶.

Πίνακας 6.2: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL και TNL του Κεφαλοτυρίου σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης.

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	TPL Χρόνος έκλουσης (min)	TNL Χρόνος έκλουσης (min)
14:0	16.116	16.182
16:0	18.457	18.515
16:1 (ω-7)	18.782	18.840
17:0 (Εσωτερικό πρότυπο)	19.765	19.824
18:0	21.140	21.174
18:1 cis (ω-9)	21.657	21.682
18:2 (ω-6)	22.549	22.590
18:3 (ω-3)	23.807	23.865

Πίνακας 6.3: Ταυτοποίηση των κορυφών των TPL και TNL του Λαδοτυρίου σύμφωνα με τους χρόνους έκλουσης.

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	TPL Χρόνος έκλουσης (min)	TNL Χρόνος έκλουσης (min)
14:0	16.149	16.082
16:0	18.499	18.449
16:1 (ω-7)	18.724	18.690
17:0 (Εσωτερικό πρότυπο)	19.799	19.757
18:0	21.165	21.115
18:1 cis (ω-9)	21.682	21.615
18:2 (ω-6)	22.582	22.524
18:3 (ω-3)	23.832	23.790

Πίνακας 6.4. Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των TPL του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου εκφρασμένα ως mg ανά kg δείγματος.

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ (mg/kg)	ΛΑΔΟΤΥΡΙ (mg/kg)
14:0	0.027 ± 0.001	0.025 ± 0.001
16:0	0.125 ± 0.006 ^a	0.054 ± 0.003
16:1 (ω-7)	MA	0.001 ± 0.0001
18:0	0.073 ± 0.004 ^a	0.021 ± 0.001
18:1 cis (ω-9)	0.211 ± 0.010 ^a	0.060 ± 0.003
18:2 (ω-6)	0.040 ± 0.002	0.015 ± 0.0008
18:3 (ω-3)	MA	0.001 ± 0.0001

* Τα “a” υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) ανάμεσα σε ίδια λιπαρά οξέα του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου.

MA: Μη Ανιχνεύσιμο

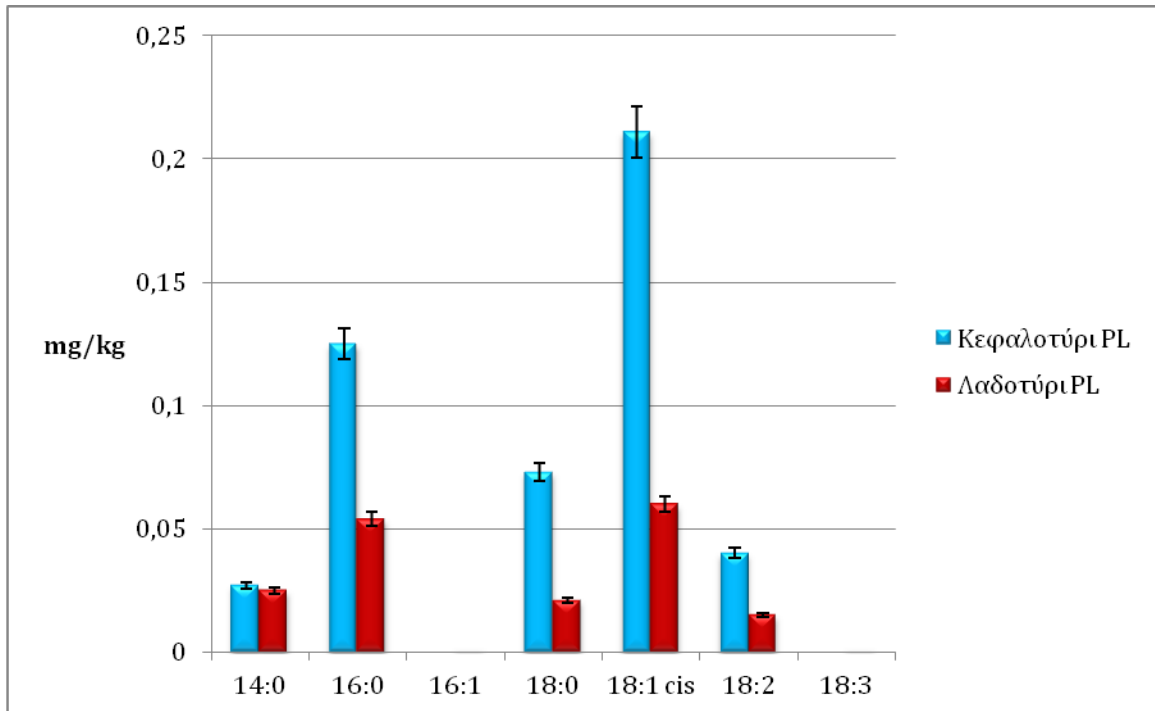
Πίνακας 6.5. Ποσοτικός προσδιορισμός των λιπαρών οξέων των TNL του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου εκφρασμένα ως mg ανά kg δείγματος.

ΛΙΠΑΡΟ ΟΞΥ	ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ (mg/kg)	ΛΑΔΟΤΥΡΙ (mg/kg)
14:0	0.131 ± 0.007	0.350 ± 0.018 ^b
16:0	0.348 ± 0.017	0.808 ± 0.040 ^b
16:1 (ω-7)	MA	0.002 ± 0.0001
18:0	0.082 ± 0.004	0.255 ± 0.013 ^b
18:1 cis (ω-9)	0.335 ± 0.017	0.599 ± 0.030 ^b
18:2 (ω-6)	MA	0.084 ± 0.004
18:3 (ω-3)	MA	MA

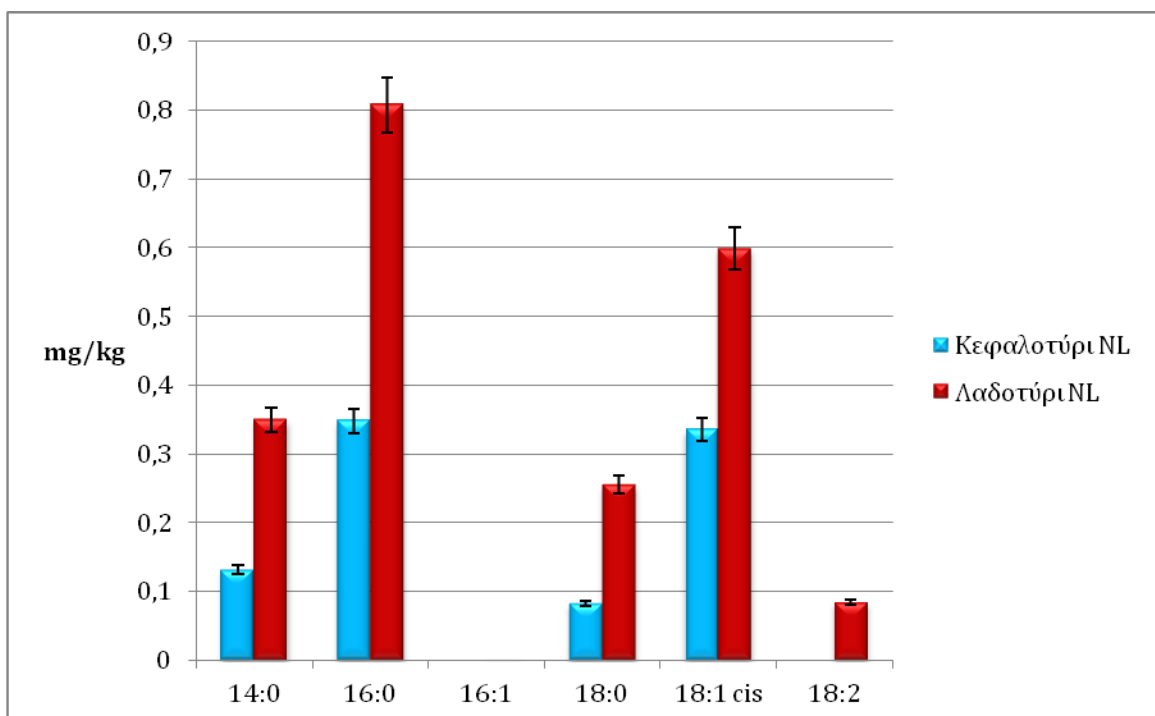
* Τα “b” υποδηλώνουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p < 0.05$) ανάμεσα σε ίδια λιπαρά οξέα του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου.

MA: Μη Ανιχνεύσιμο

Τα αποτελέσματα των πινάκων 6.4 και 6.5 παρουσιάζονται σχηματικά στα παρακάτω ραβδογράμματα (Σχήμα 6.2, 6.3).



Σχήμα 6.2: Ποσότητες των λιπαρών οξέων σε mg/kg δείγματος που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των πολικών λιποειδών του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου.



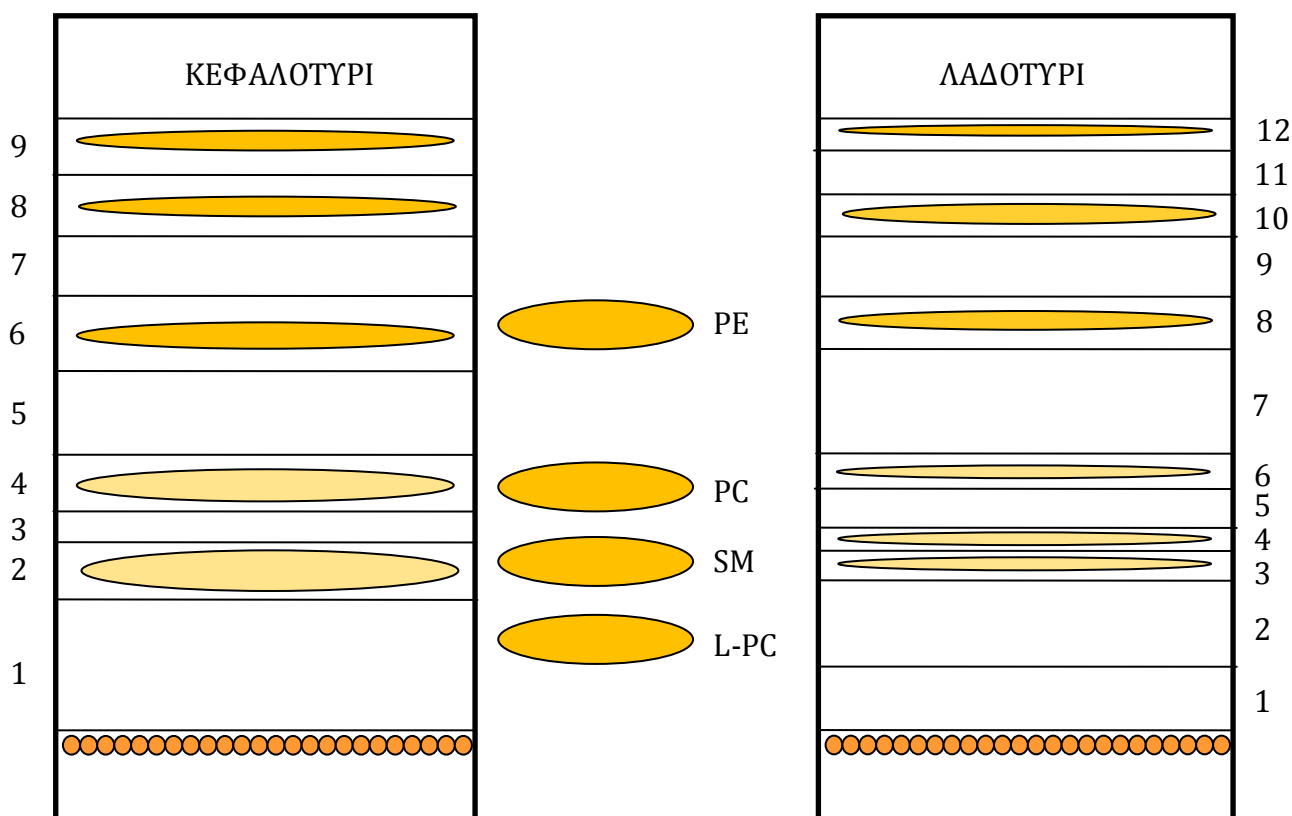
Σχήμα 6.3: Ποσότητες των λιπαρών οξέων σε mg/kg δείγματος που περιέχονται στα λιποειδικά κλάσματα των ουδέτερων λιποειδών του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου.

Από τους παραπάνω πίνακες και σχήματα προκύπτει ότι κατά την ανάλυση των πολικών λιποειδών (TPL) του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου τα λιποειδικά κλάσματα που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα ήταν το παλμιτικό οξύ (16:0) και το ελαϊκό (18:1cis – ω-9). Αυτά τα λιπαρά οξέα μάλιστα μαζί με το στεατικό (18:0) παρατηρούμε ότι βρίσκονται σε μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα του Κεφαλοτυρίου. Σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν το παλμιτελαϊκό (16:1 – ω-7) και το α-λινολενικό (18:3, ω-3). Τέλος παρατηρούμε ότι ενώ το παλμιτελαϊκό (16:1 - ω-7) και το α-λινολενικό (18:3, ω-3) ανιχνεύθηκαν στο δείγμα του Λαδοτυρίου, στο δείγμα του Κεφαλοτυρίου δεν ανιχνεύθηκαν.

Κατά την ανάλυση των ουδέτερων λιποειδών (TNL) τα λιποειδικά κλάσματα που βρέθηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα ήταν το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0 - ω-7) και το ελαϊκό οξύ (18:1cis – ω-9). Σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις βρέθηκαν το παλμιτελαϊκό (16:1) και το λινελαϊκό (18:2, ω-6). Επίσης παρατηρούμε ότι το μυριστικό (14:0), το παλμιτικό (16:0 - ω-7), το στεατικό (18:0) και το ελαϊκό (18:1cis – ω-9) βρίσκονται σε αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα στο δείγμα του Λαδοτυρίου σε σχέση με του Κεφαλοτυρίου. Τέλος βλέπουμε ότι δύο λιπαρά οξέα, το παλμιτελαϊκό (16:1 – ω-7) και το λινελαϊκό (18:2, ω-6), ανιχνεύθηκαν μόνο στο δείγμα του Λαδοτυρίου και όχι στο Κεφαλοτυρίου. Άρα συνολικά παρατηρούμε ότι βρέθηκε μεγαλύτερος αριθμός λιπαρών οξέων στο Λαδοτύρι και στα πολικά αλλά και στα ουδέτερα λιποειδικά κλάσματα.

6.2.3 Αποτελέσματα της Χρωματογραφίας Λεπτής Στιβάδας (TLC)

Για τη Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν 50mg πολικών λιποειδών από το κάθε δείγμα. Συνολικά στρώθηκαν 20 πλάκες TLC για κάθε δείγμα τυριού και συλλέχθηκαν τα επιμέρους λιποειδικά κλάσματα. Το δείγμα του Κεφαλοτυρίου εμφάνισε 9 ζώνες, ενώ του Λαδοτυρίου 12 ζώνες. Οι ζώνες που είχαν τα ίδια Rf από τις 20 πλάκες ενώθηκαν και ζυγίστηκαν ώστε να ακολουθήσει η βιολογική τους δοκιμασία. Το προφίλ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων που προέκυψε φαίνεται στο παρακάτω σχήμα. Οι φωτογραφίες των χρωματογραφικών πλακών μετά από TLC παρατίθενται στο Παράρτημα.



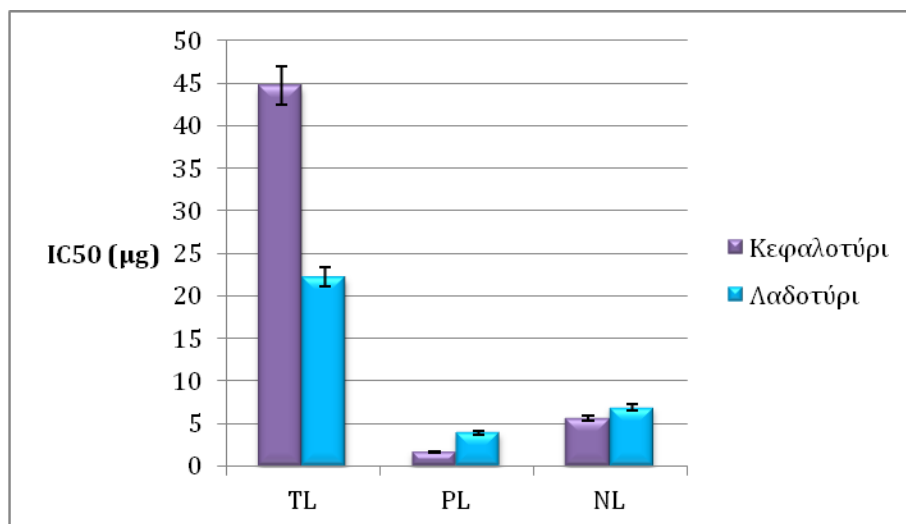
Σχήμα 6.4: Σχηματική απεικόνιση των πολικών λιποειδικών κλασμάτων των δύο τυριών. (L-PC: Λυσοφωσφατιδυλοχολίνη, SM: Σφριγγομελίνη, PC: φωσφατιδυλοχολίνη, LPE: Λυσοφωσφατιδυλοαιθανολαμίνη, PE: Φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη). Το σύστημα ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό των πολικών λιποειδών ήταν Χλωροφόρμιο-Μεθανόλη-Νερό (65:35:6 v/v/v).

6.2.4 Αποτελέσματα της Βιολογικής Δοκιμασίας

Όλα τα πολικά λιποειδικά κλάσματα που προέκυψαν δοκιμάστηκαν για τη βιολογική τους ικανότητα να προκαλούν συσσώρευση αιμοπεταλίων ή να αναστέλλουν την επαγομένη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων. Αφού βρέθηκαν οι τιμές συσσώρευσης και αναστολής για το κάθε λιποειδικό κλάσμα και των δύο δειγμάτων όπως και για τα ολικά, τα ολικά πολικά και τα ολικά ουδέτερα λιποειδή, υπολογίστηκαν οι τιμές EC₅₀ και IC₅₀ αντίστοιχα. Οι τιμές αυτές φαίνονται στους πίνακες 6.6, 6.7, 6.8 και σχηματικά διατυπώνονται στα αντίστοιχα ραβδογράμματα (σχήμα 6.5, 6.6, 6.7).

Πίνακας 6.6: Τιμές των IC_{50} σε μg των ολικών (TL), των ολικών πολικών (TPL) και των ολικών ουδέτερων λιποειδών (TNL) και των δύο δειγμάτων.

Δείγμα	Κεφαλοτύρι	Λαδοτύρι
	IC_{50} (μg)	
TL	44.68	22.19
TPL	1.69	3.92
TNL	5.6	6.9



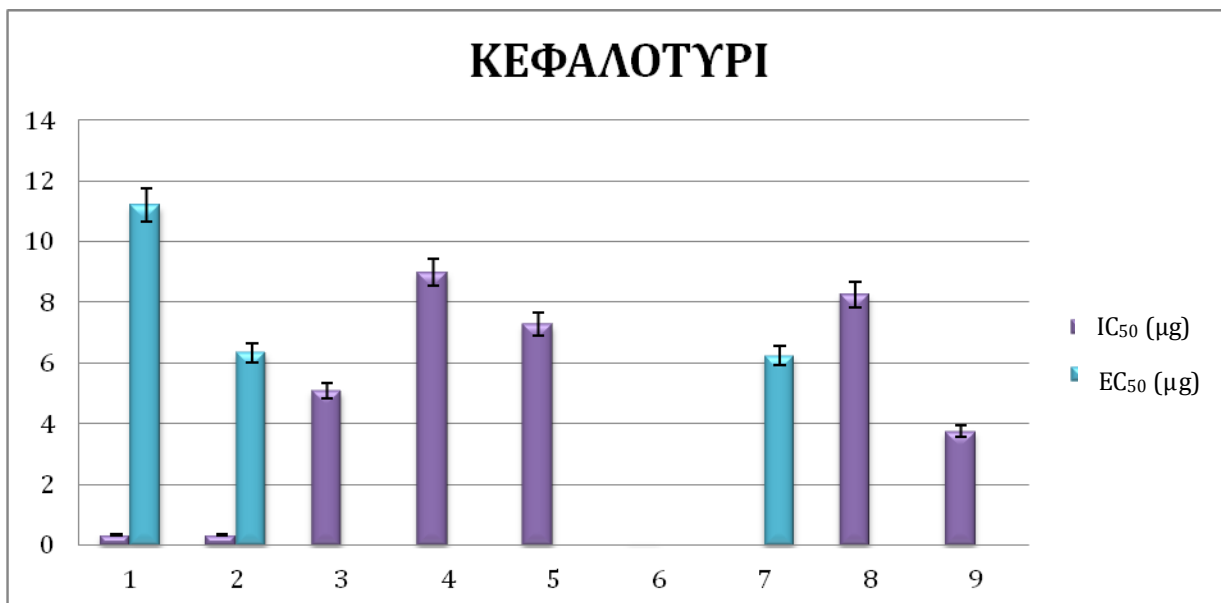
Σχήμα 6.5: Σχηματική αναπαράσταση των IC_{50} των TL, TPL, TNL των δύο δειγμάτων.

Πίνακας 6.7: Τιμές των IC₅₀ και EC₅₀ σε μg των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Κεφαλοτυρίου.

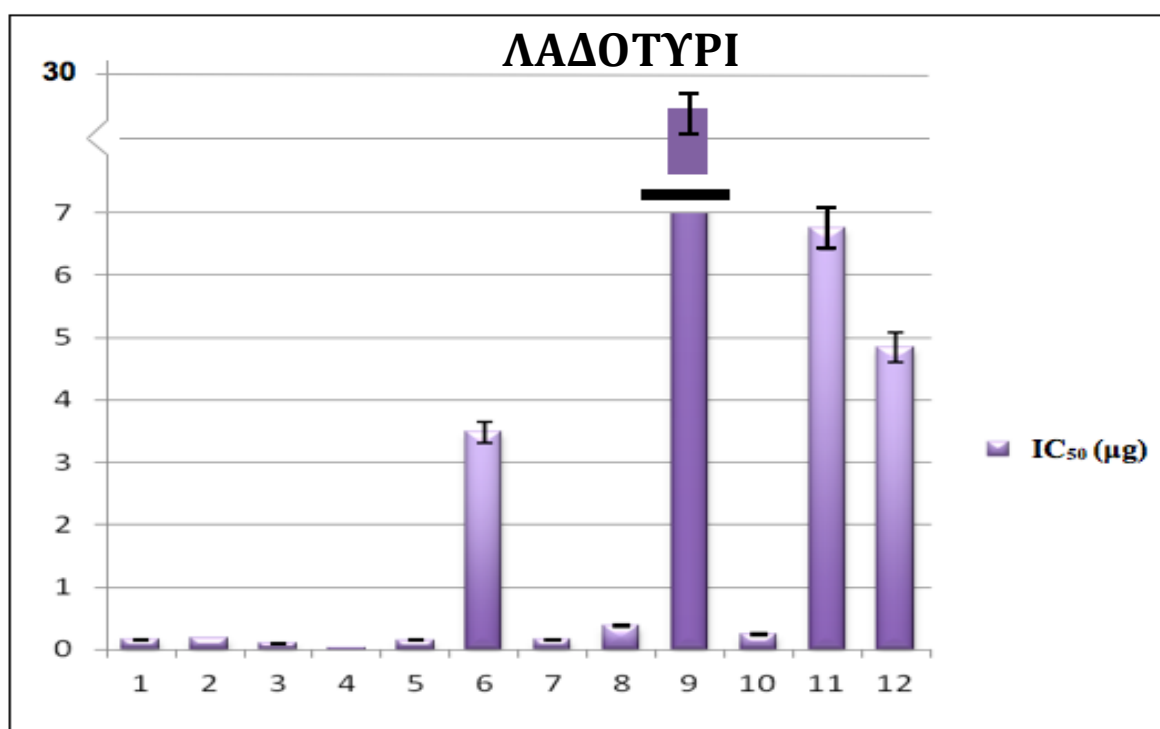
ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ		
Ζώνη	IC ₅₀	EC ₅₀
1	0.35	11.20
2	0.34	6.35
3	5.10	-
4	9.00	-
5	7.28	-
6	0.02	-
7	-	6.25
8	8.25	-
9	3.76	-

Πίνακας 6.8: Τιμές των IC₅₀ σε μg των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Λαδοτυρίου.

ΛΑΔΟΤΥΡΙ	
Ζώνη	IC ₅₀
1	0.16
2	0.19
3	0.10
4	0.03
5	0.15
6	3.48
7	0.16
8	0.39
9	29.25
10	0.24
11	6.75
12	4.84



Σχήμα 6.6: Σχηματική αναπαράσταση των IC₅₀ και EC₅₀ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Κεφαλοτυρίου.



Σχήμα 6.7: Σχηματική αναπαράσταση των IC₅₀ των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Λαδοτυρίου.

Πολλές χημικές ενώσεις, φυσικές και συνθετικές, αποτελούν αναστολείς του PAF δρώντας είτε ως ασθενείς αγωνιστές είτε αναστέλλοντας τη βιολογική δράση του PAF. Όταν δρουν ως αναστολείς του PAF εκδηλώνουν ανταγωνιστική δράση είτε επειδή προσδένονται

στον υποδοχέα του PAF είτε μέσω έμμεσων μηχανισμών. Στην τελευταία περίπτωση η βιολογική τους ικανότητα συνδέεται με αλλαγές στη μεμβράνη του υποδοχέα του PAF. Όταν αυτές οι ενώσεις είναι χίλιες φορές λιγότερο ενεργές από τον PAF τότε δρουν ως ασθενείς αγωνιστές και συμπεριφέρονται στην ουσία ως αναστολείς του PAF. Οι έρευνες δείχνουν ότι οι ασθενείς αγωνιστές του PAF (με συσσωρευτική δράση) εμφανίζουν καλύτερη *in vivo* αντιαθηρωματική ικανότητα από τους αναστολείς του PAF. Επομένως η ανίχνευση λιποειδών τόσο με συσσωρευτική όσο και με ανασταλτική ικανότητα αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι αυτά τα κλάσματα αποτελούν βιολογικά ενεργές ενώσεις κατά του PAF και επομένως κατά της αθηρογένεσης.

Οι τιμές IC_{50} και EC_{50} που αναγράφονται στους παραπάνω πίνακες και διαγράμματα δηλώνουν την ποσότητα του λιποειδικού κλάσματος, που απαιτείται για να προκαλέσει το 50% της μέγιστης αναστολής και της μέγιστης συσσώρευσης αντίστοιχα, ανάλογης αυτής που προκαλεί ο PAF. Έτσι είναι φανερό ότι όσο πιο μικρή είναι αυτή η τιμή τόσο καλύτερη δράση έχει το συγκεκριμένο κλάσμα, αφού θα απαιτείται μικρότερη ποσότητα για να προκαλέσει τη συγκεκριμένη αναστολή της δράσης του PAF, ή αντίστοιχα τη συγκεκριμένη συσσώρευση, η οποία θα ανταγωνίζεται τη δράση του PAF.

Αρχικά στον πίνακα 6.6 και στο σχήμα 6.5, φαίνεται η αναστολή που προκάλεσαν τα ολικά (TL), τα ολικά πολικά (TPL) και ολικά ουδέτερα λιποειδή (TNL) και των δύο τυριών. Τα δείγματα αυτά δεν είχαν καθόλου συσσωρευτική δράση. Παρατηρούμε ότι οι τιμές IC_{50} των TPL και TNL του Κεφαλοτυρίου και του Λαδοτυρίου είναι παρόμοιες. Όσον αφορά τα TL η τιμή IC_{50} για το δείγμα του Λαδοτυρίου είναι εμφανώς μικρότερη, άρα συμπεραίνουμε ότι το δείγμα αυτό έχει καλύτερη βιολογική δράση σε σχέση με του Κεφαλοτυρίου.

Στον πίνακα 6.7 βλέπουμε τις τιμές των IC_{50} και EC_{50} των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Κεφαλοτυρίου. Παρατηρούμε ότι όλες οι ζώνες παρουσίασαν ανασταλτική δράση, εκτός από τη ζώνη 7. Οι ζώνες 1, 2, 7 είχαν συσσωρευτική δράση. Καλύτερη ανασταλτική δράση (μικρότερες τιμές IC_{50}) είχαν οι ζώνες 1, 2 και 6, ενώ καλύτερη συσσωρευτική δράση (μικρότερες τιμές EC_{50}) είχαν οι ζώνες 2 και 7. Μάλιστα όπως φαίνεται στο σχήμα 6.4, οι ζώνες 1, 2 και 6 έχουν όμοια R_f με την L-PC (λυσωφωσφατιδυλοχολίνη), την SM (σφιγγομυελίνη) και την PE (φωσφατιδυλοαιθανολαμίνη) αντίστοιχα, ενώσεις που οι έρευνες δείχνουν ότι έχουν ανάλογη δράση με αυτή του PAF.

Στον πίνακα 6.8 αναγράφονται οι τιμές IC_{50} των πολικών λιποειδικών κλασμάτων του Λαδοτυρίου. Τα δείγματα αυτά εμφάνισαν μόνο ανασταλτική και όχι συσσωρευτική δράση. Παρατηρούμε ότι οι τιμές αυτές είναι πολύ μικρές για τα περισσότερα δείγματα (ζώνες 1, 2,

3, 4, 5, 7, 8, 10) δηλώνοντας έτσι ότι έχουν και πολύ καλή βιολογική δράση έναντι του PAF. Επίσης στο σχήμα 6.4 φαίνεται ότι οι ζώνες 2,4, 6 και 8 έχουν όμοια Rf με την L-PC ,την SM και την PE, άρα αναμένουμε να έχουν και παρόμοια δράση.

Συγκρίνοντας τα λιποειδικά κλάσματα των δύο τυριών βλέπουμε ότι τα κλάσματα που προέκυψαν από το δείγμα του Λαδοτυρίου έχουν πολύ χαμηλότερες τιμές IC₅₀ σε σχέση με του Κεφαλοτυρίου. Αυτό μας δείχνει ότι με πολύ μικρότερη ποσότητα από το δείγμα του Λαδοτυρίου επιτυγχάνεται εντονότερη ανασταλτική δράση έναντι του PAF. Συνολικά όμως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι και τα δύο τυριά εμφάνισαν πολύ καλή βιολογική δράση. Αυτό υποδηλώνει ότι έχουν καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες, μιας και αναστέλλοντας τη δράση του PAF αναστέλλεται και η διαδικασία της αθηρογένεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7^ο

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αξιολογήσει τις καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες δύο ελληνικών τυριών, του Κεφαλοτυριού και του Λαδοτυριού. Αυτό επιτεύχθηκε μέσω της μελέτης της βιολογικής δραστηριότητας των λιποειδών τους ενάντια στην αθηροσκλήρωση. Κατά την πειραματική διαδικασία εκχυλίστηκαν τα ολικά λιποειδή από δείγματα των δύο τυριών και με κατανομή κατά αντιρροή διαχωρίστηκαν σε πολικά και ουδέτερα. Στη συνέχεια προσδιορίστηκαν και συγκρίθηκαν οι συγκεντρώσεις των λιπαρών οξέων των ολικών πολικών και των ολικών ουδέτερων λιποειδών όλων των δειγμάτων. Τα ολικά πολικά λιποειδή διαχωρίστηκαν περαιτέρω με παρασκευαστική χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) σε επιμέρους λιποειδικά κλάσματα. Τέλος, τα ολικά, τα ολικά πολικά, τα ολικά ουδέτερα λιποειδή και τα πολικά λιποειδικά κλάσματα εξετάστηκαν ώστε να διαπιστωθεί με βιολογικό προσδιορισμό σε πλυμένα αιμοπετάλια κουνελιού η ικανότητά τους να αναστέλλουν ή όχι την επαγόμενη από τον PAF συσσώρευση αιμοπεταλίων.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής έδειξαν ότι και τα δύο τυριά μπορούν να αναστείλουν τη δράση του PAF, με το Λαδοτύρι να εμφανίζει πιο έντονη ανασταλτική δράση σε σχέση με το Κεφαλοτύρι. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι το Λαδοτύρι συσκευάζεται μέσα σε ελαιόλαδο, κάτι που υποδεικνύεται και από την ποσοτική ανάλυση των λιπαρών του οξέων, μιας και βρέθηκε σε μεγάλη συγκέντρωση στο δείγμα το ελαιϊκό οξύ (18:1). Έτσι καταναλώνοντας ένα τέτοιο τυρί παράλληλα καταναλώνεται και μία ποσότητα ελαιολάδου. Η παρουσία του ελαιολάδου αυξάνει τη διατροφική αξία του συγκεκριμένου τυριού, αφού πολλές έρευνες έχουν αποδείξει τις καρδιοπροστατευτικές του ιδιότητες^{108,109}. Από την άλλη πλευρά βέβαια το Κεφαλοτύρι, σε αντίθεση με το Λαδοτύρι, περιείχε και λιποειδικά κλάσματα, τα οποία προκάλεσαν συσσώρευση των αιμοπεταλίων, άρα είναι και αγωνιστές του PAF. Οπώς αναφέρθηκε και παραπάνω στο κείμενο, οι αγωνιστές του PAF φαίνεται να παρουσιάζουν πιο έντονη αντιαθηρογόνο δράση από τα μόρια που απλά ανταγωνίζονται τη δράση του.

Από διατροφικής απόψης το γεγονός ότι αυτά τα δύο τυριά έχουν τόσο καλές καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες είναι πολύ σημαντικό. Τα γαλακτοκομικά προϊόντα και κυρίως τα τυριά αποτελούν βάση της Μεσογειακής διατροφής και καταναλώνονται

καθημερινά στα ελληνικά σπίτια, για αυτό και έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες, οι οποίες μελετάνε τη θρεπτική τους αξία. Οι παλαιότερες μελέτες έδειχναν ότι τα κορεσμένα λιπαρά των τυριών οδηγούν σε αύξηση της χοληστερόλης και σε αύξηση του σωματικού βάρους. Έτσι δημιουργήθηκε η πεποίθηση ότι η καθημερινή κατανάλωση των τυριών μπορεί να αυξήσει τις πιθανότητες εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, για αυτό και δε θα πρέπει να προσλαμβάνονται σε τόσο συχνή βάση¹¹⁰. Τα αποτελέσματα όμως της έρευνας αυτής έδειξαν ότι όχι μόνο τα τυριά δεν είναι επιβλαβή για τον οργανισμό, αλλά ότι τα λιποειδή τους μπορεί να έχουν ευεργετική δράση έναντι της αθηροσκλήρωσης. Η άποψη αυτή ενισχύεται και από άλλες μελέτες που έχουν γίνει σε πειραματόζωα και δείχνουν ότι η κατανάλωση των τυριών μπορεί να μειώσει τον κίνδυνο εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων⁹⁹. Επίσης είναι αποδεδειγμένο ότι οι μικροοργανισμοί, που περιέχονται στα γαλακτοκομικά προϊόντα, βοηθάνε στη δημιουργία λιπιδίων, τα οποία αναστέλλουν τη δράση του PAF¹⁰¹. Τέλος κλινικές μελέτες δείχνουν ότι το γεγονός ότι τα γαλακτοκομικά προϊόντα περιέχουν τόσα πολλά θρεπτικά συστατικά, όπως ασβέστιο, μαγνήσιο, κάλιο, βιταμίνη D, διάφορα αμινοξέα και λιπίδια βοηθάνε στην πρόληψη της υπέρτασης, της αθηροσκλήρωσης, του διαβήτη τύπου 2 και της στεφανιαίας νόσου¹⁰⁰.

Τα παραπάνω συμπεράσματα είναι πολύ ενθαρρυντικά όσον αφορά τη θρεπτική αξία του Κεφαλοτυριού, του Λαδοτυριού και των τυριών γενικότερα. Παρ' όλα αυτά θα πρέπει να πραγματοποιηθεί περαιτέρω έρευνα ώστε να αποδειχθεί ότι θα είναι και πραγματικά ωφέλιμα για τον άνθρωπο. Μέσω της έρευνας αυτής θα μπορέσει να διαπιστωθεί αν τα λιποειδικά κλάσματα των τυριών που είχαν βιολογική δραστικότητα *in vitro* θα έχουν παρόμοια δράση και σε *in vivo* πειράματα σε πειραματόζωα, έτσι ώστε να αποσαφηνιστεί ποια λιποειδικά κλάσματα μπορούν να αναστείλουν το σχηματισμό των αθηρωματικών πλακών στις αρτηρίες. Επίσης, σε επόμενο στάδιο, κρίνεται απαραίτητη η πιστοποίηση της δομής των βιολογικά δραστικών κλασμάτων. Τέλος αν με αυτό τον τρόπο αποδειχθεί η ευεργετική δράση των τυριών στον ανθρώπινο οργανισμό, θα μπορούσε ίσως να δημιουργηθεί και ένα νέο προϊόν, όπως για παράδειγμα ένα τυρί το οποίο δε θα συσκευάζεται απλά σε ελαιόλαδο, αλλά θα περιέχει ελαιόλαδο μέσα στη σύστασή του και έτσι θα έχει ακόμα καλύτερες καρδιοπροστατευτικές ιδιότητες λόγω του ελαιολάδου ή ένα τυρί που θα αξιοποιεί τις καρδιοπροστατευτικές δράσεις του ελαιοπυρήνα¹¹².

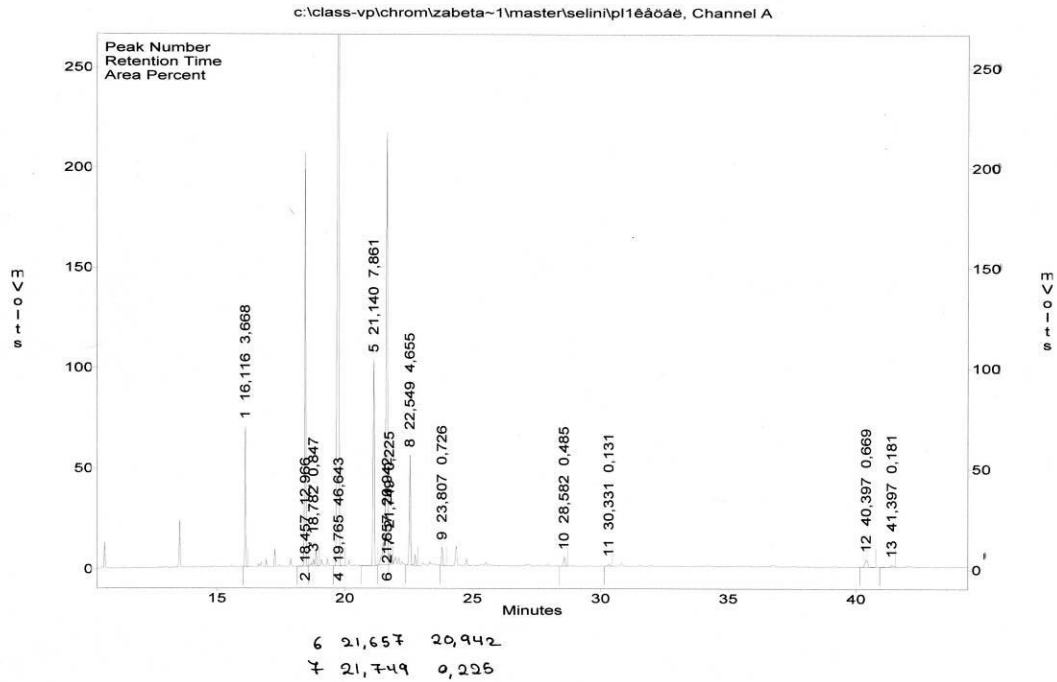
Από την παρούσα μελέτη έχει προκύψει μία επιστημονική εργασία με τίτλο: "***In vitro anti-atherogenic properties of traditional Greek cheese lipid fractions***" και συγγραφείς τους Tsorotioti Sofia-Eleni, Nasopoulou Constantina, Detopoulou Maria, Sioriki Eleni, Demopoulos Constantinos, Zabetakis Ioannis, η οποία έχει γίνει δεκτή και είναι υπό δημοσίευση στο περιοδικό Dairy Science and Technology.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AA	Αραχιδονικό οξύ
ACD	Αντιπηκτικό που περιέχει κιτρικό οξύ, κιτρικό νάτριο και δεξτρόζη
ACN	Ακετονιτρίλιο
BSA	Αλβουμίνη βοδινού ορού
HDL	Λιποπρωτεΐνη υψηλής πυκνότητας
LDL	Λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
TL	Total lipids
TPL	Total polar lipids
TNL	Total neutral lipids
PAF	Platelet activating factor
LDL	Low density lipoprotein
EPA	Eicosapentaenoic Acid
DHA	Docosahexaenoic acid
TLC	Thin-layer chromatography
L-PC	Lyo-phosphatidylcholine
SM	Sphingomyelin
PC	Phosphatidylcholine
L-PE	Lyo-phosphatidylethanolamine
PE	Phosphatidylethanolamine

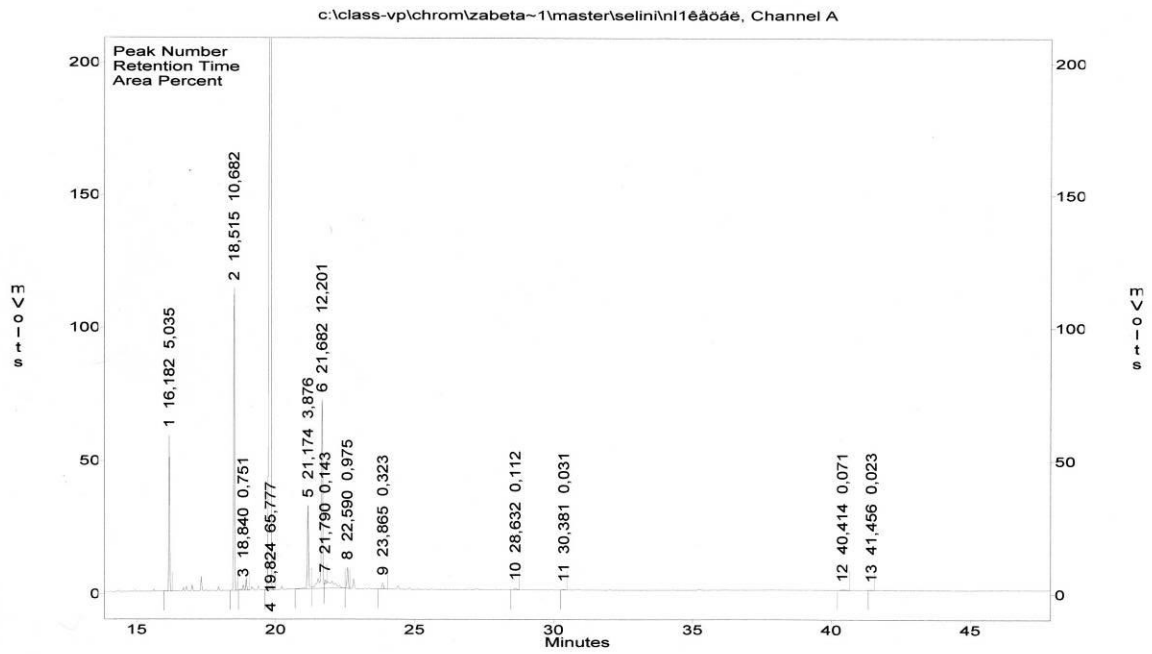
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΤΡΛ ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ



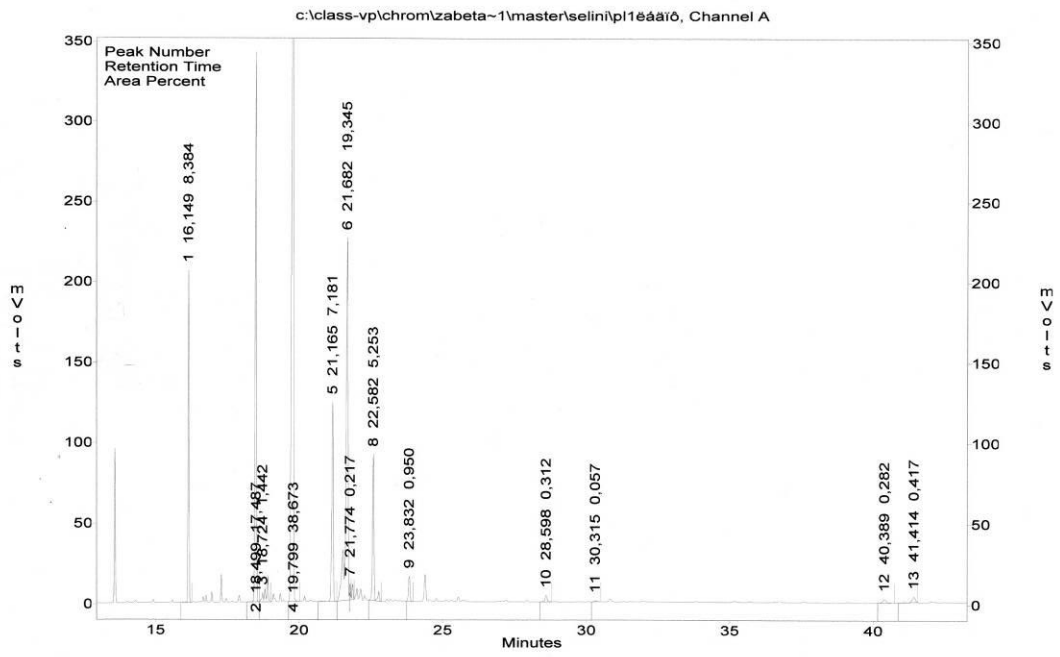
Εικόνα Α: Χρωματογράφημα GC των TPL του Κεφαλοτυρίου

NL1 ΚΕΦΑΛΟΤΥΡΙ

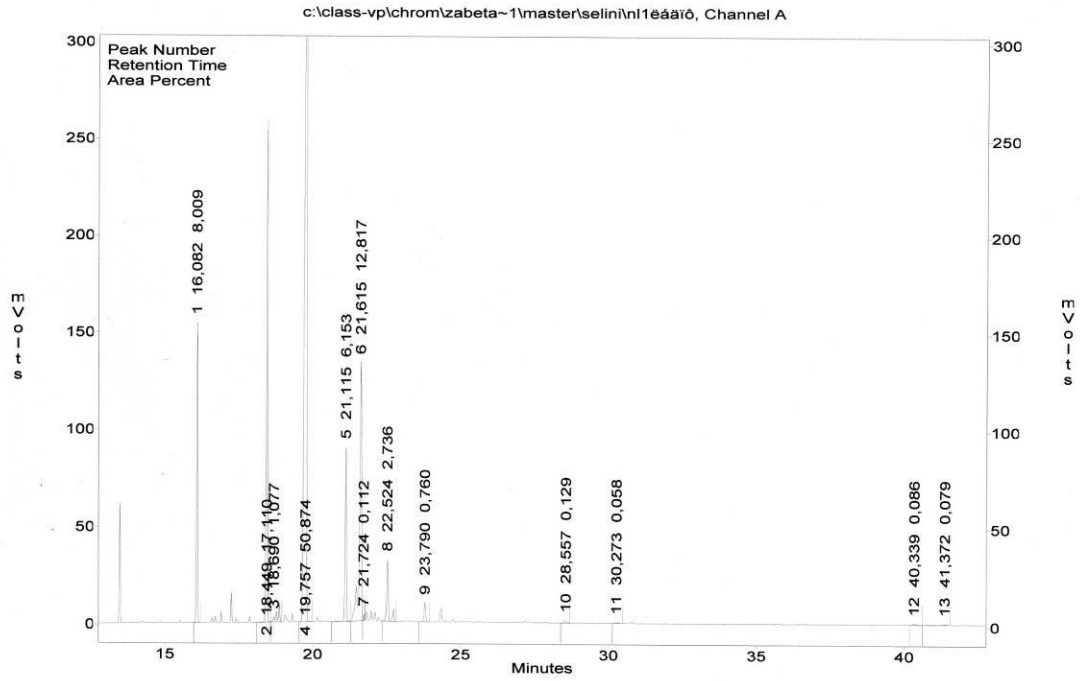


Εικόνα Β: Χρωματογράφημα GC των TNL του Κεφαλοτυρίου

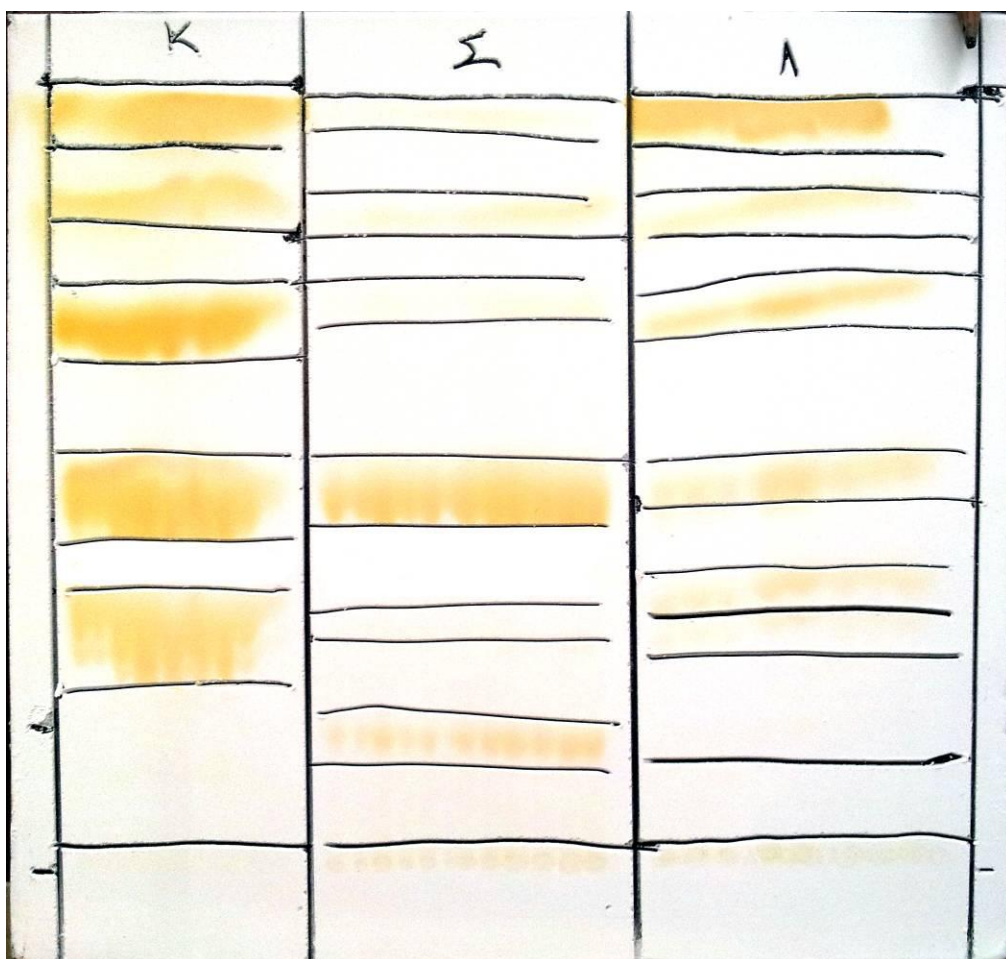
PL₁ ΛΑΔΟΤΥΡΙ



Εικόνα Γ: Χρωματογράφημα GC των TPL του Λαδοτύριου



Εικόνα Δ: Χρωματογράφημα GC των TNL του Λαδοτυρίου



Εικόνα Ε: Χρωματογραφική Πλάκα μετά από TLC

Πρώτη στήλη: Πολικά λιποειδικά κλάσματα από δείγμα Κεφαλοτυρίου

Δεύτερη στήλη: Πρότυπο δείγμα λιποειδών από στούκι

Τρίτη στήλη: Πολικά λιποειδικά κλάσματα από δείγμα Λαδοτυρίου

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Fidanza F., Alberti A., Lanti M., Menotti A., Mediterranean Adequacy Index: correlation with 25-year mortality from coronary heart disease in the Seven Countries Study, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.*, **2004**, 14, 254-258
2. Kastorini C.M., Milionis H.J., Goudevenos J.A., Panagiotakos D.B., Mediterranean diet and coronary heart disease: Is obesity a link? A systematic review, *Metabolism & Cardiovascular Diseases*, **2010**, 20, 536-551
3. Panagiotakos D.B., Dimakopoulou K., Katsouyanni K., et al., Mediterranean diet and inflammatory response in myocardial infarction survivors, *Int. Journal of Epidemiology*, **2009**, 38, 3, 856-866
4. Knuops K.T.B., de Groot L.C.P.G.M., Kromhout D., et al., Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *Journal of the American Medical Association*, **2004**, 292, 12, 1433-1439
5. Trichopoulou A., Bamia C., Trichopoulos D., Mediterranean Diet and Survival Among Patients With Coronary Heart Disease in Greece. *Archives of Internal Medicine*, **2005**, 165, 8, 929-935
6. Martinez-Gonzalez M.A., Sanchez-Villegas A., The emerging role of Mediterranean diets in cardiovascular epidemiology: monounsaturated fats, olive oil, red wine or the whole pattern? *European Journal of Epidemiology*, **2004**, 19, 1, 9-13
7. Panagiotakos D.B., Pitsavos C., Matalas A.L., et al., Geographical influences on the association between adherence to the Mediterranean diet and the prevalence of acute coronary syndromes, in Greece: The CARDIO2000 study. *Int. Journal of Cardiology*, **2005**, 100, 1, 135-142
8. Covas M.I., Olive oil and the cardiovascular system, *Pharmacological Research*, **2007**, 55, 175-186
9. Urpi-Sarda M., Casas R., Chiva-Blanch G., et al., Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis, *Pharmacological Research*, **2012**, 65, 577-583
10. Keys A., Coronary heart disease in seven countries. *Circulation*, **1970**, 41, 1-211

11. Willett W., Sacks F., Trichopoulou A., Drescher G., Ferro-Luzzi A., Helsing E., Trichopoulos D., Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating, *Am. J. Clin. Nutr.*, **1995**, 61, 1402-1406
12. Keys A., Menotti A., Aravanis C., Blackburn H., Djordevic B.S., Buzina R., Dontas A.S., Fidanza F., Karvonen M.J., Kimura N., Mohacek I., Nedeljkovic S., Puddu V., Punsar S., Taylor H.L., Conti S., Kromhout D. and Toshima H., . The Seven Countries Study: 2,289 deaths in 15 years *Preventive Medicine*, **1984**, 13, 141-154
13. Keys A., Menotti A., Karvonen M.J., Aravanis C., et al., The diet and 15 - year death rate in the Seven Countries Study. *Am. J. Epidemiol.*, **1986**, 124, 903-915
14. Leaf A., Dietary Prevention of Coronary Heart Disease. The Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, **1999**, 99, 6, 733-735.
15. Lorgeryl M., Salen P., Martin J.L., Monjaud I., Delaye J., Mamelle N., Mediterranean Diet, Traditional Risk Factors, and the Rate of Cardiovascular Complications After Myocardial Infarction Final Report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, **1999**, 99, 6, 779-785
16. UNESCO, List of the Intangible Cultural Heritage of Humanity, Decision 5COM 6.41, **2010**, www.unesco.org/culture/ich/en/RL/00394
17. Τυροκομία, Ανυφαντάκης Εμμανουήλ, 2004
18. Τεχνολογία Προϊόντων Γάλακτος, Ζεφυρίδης Γρηγόρης, 2001
19. Εισαγωγή στη Χημεία Τροφίμων, Βουδούρης, Κοντομηνά, 2008
20. **Γενικό Χημείο του Κράτους**. (2004). Μέρος Α' κώδικας Τροφίμων και Ποτών και Αντικειμένων Κοινής Χρήσεως. Εθνικό Τυπογραφείο. Αθήνα.
21. Ποιότητα Γάλακτος και Γαλακτοκομικών προϊόντων, Κεχαγιάς, 1997
22. Litopoulou-Tzanetaki E. and N. Tzanetakis., Microbiological characteristics of Greek traditional cheeses, *Small Ruminant Research*, **2011**, 101, 17-32
23. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων. Προστατευόμενη Ονομασία Προέλευσης (ΠΟΠ)- Προστατευόμενη Γεωγραφική Ένδειξη (ΠΓΕ)-Ιδιότυπο Παραδοσιακό Προϊόν (ΙΠΠ). <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/2012-02-02-07-52-07>
24. Fox P.F., *Cheese : chemistry, physics, and microbiology*. 3rd ed. 2004, Amsterdam ; London: Elsevier.
25. M. Fields, Role of trace elements in coronary heart disease, *Br. J. Nutr.*, **1999**, 81, 85-86

26. Beresford T.P., et al., Recent advances in cheese microbiology, *International Dairy Journal*, **2001**, 11, 259-274.
27. Peterson S.D. and R.T. Marshall, *Nonstarter Lactobacilli in Cheddar Cheese: A Review*, *Journal of dairy science*, **1990**, 73, 1395-1410
28. Casey M.G., et al., *Characterisation of the non-starter lactic acid bacteria (NSLAB) of Gruyère PDO cheese*. *Lait*, **2006**, 86, 6, 407-414
29. Arvanitoyannis I.S., Mavropoulos A.A., Implementation of the hazard analysis critical control point (HACCP) system to Kaseri/Kefalotyri and Anevato cheese production lines, *Food Control*, **2000**, 11, 31-40
30. Lippincott Williams and Wilkins, *Stedman's Medical Dictionary*, 27th ed., Kluwer, Baltimore, **2000**
31. Ross, R and Glomset, J. A., The Pathogenesis of Atherosclerosis. *N. Engl. Med.*, **1976**, 295, 369-377
32. Ross, R and Glomset, J. A., The Pathogenesis of Atherosclerosis. *N. Engl. Med.*, **1976**, 295, 420-425
33. Kannel W. B., McGee D.L., Diabetes and cardiovascular disease. *The Framingham study*, *JAMA*, **1979**, 241,19, 2035-2038
34. Ross, R, The Pathogenesis of Atherosclerosis — An Update. *N. Engl. Med.*, **1986**, 314, 488-500
35. Nathan, C. and Sporn, M., J. Cytokines in context. *Cell Biol.*, **1991**, 113, 981-986
36. Holvoet, P. and Collen, D., Oxidation of low density lipoproteins in the pathogenesis of Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **1998**, 137 Suppl.,S33-S38
37. Becker, B. F., Heindl, b., Kupatt, C. and Zahler, S., Endothelial function and hemostasis. *Z. Kardiol*, **2000**, 89, 160-167
38. Fuster, V., *Platelets and atherosclerosis*, **1981**, 1-20
39. Toborec, M. and Kaiser, S., Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res. Cardiol.*, **1999**, 94, 295-314
40. Consigny P.M., Pathogenesis of Atherosclerosis. *Advances in Clinical Medicine*, **1995**, 164, 553-558
41. Wissler, R. W., Update on the pathogenesis of atherosclerosis, *Am. J. Med.*, **1991**, 91, 18-35

42. Η χημική ένωση του μήνα: Παράγοντας Ενεργοποίησης Αιμοπεταλίων (PAF) (Οκτώβριος 2009), Κων/νος Δημόπουλος, Βαλαβανίδης Θανάσης, Ευσταθίου Κων/νος, http://www.chem.uoa.gr/chemicals/chem_PAF.htm
43. Geng, J. G., Bevilacqua, M. P., Moore, K. L., McIntyre, T. M., Prescott S. M., et al, Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140. *Nature*, **1990**, 343, 757-760
44. Quin, M. T., Parthasarathy, S., Fong, L. G and Steinberg, D., Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1987**, 84, 2995-8
45. Brown, M.S. and Goldstein, J.L., Lipoprotein metabolism in the macrophage: Implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Re. Biochem.*, **1983**, 52, 223-261
46. Bevilacqua, M. P., Pober, J. S., Wheeler, M. E., Cortan, R. S., and Gimbrone, M A., Interleukin-1 activation of vascular endothelium. Effects on procoagulant activity and leukocyte adhesion. *Am. J. Pathol.*, **1985**, 121, 394-403.
47. Pober, J. S., Bevilacqua, M. P., Medrick, D. L., Lapierre, L. A., Fiers, W. and Gimbrone, M, A., Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.*, **1986**, 136, 1680.
48. Ross, R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **1993**, 362, 801-809.
49. Rodriguez R., Fountoulaki E., Grigorakis K., et al., Season and size effects: changes in the quality of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Mediterranean Marine Science*, **2010**, 11, 1, 117-131
50. Benveniste, J., Paf-acether, an ether phospholipid with biological activity. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1988**, 282, 73-85
51. Bussolino, F. and Camusi, G., Platelet-activating factor produced by endothelial cells – A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur. J. Biochem.*, 1995, 229, 327–337
52. Demopoulos CA, Pinckard RN, Hanahan DJ. 1979. 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: 9355-9358.

53. Ninio, E. and Joly, F., Transmembrane signalling and pafacether biosynthesis. *Lipids*, **1991**, 26, 1034-1037
54. Benveniste, J., Nunez, D., Duriez, P., Korth, R., Bidault, J. and Fruchart, J. C., Preformed paf-acether and lyso paf-acether are bound to blood lipoproteins FEBS Lett., **1988**, 371-376
55. Thivierge, M., Alami, N., Muller, E., De Brum-Fernades, A. J and Rola-Pleszczynski, M., Transcriptional modulation of platelet-activating factor receptor gene expression by cyclic AMP. *J. Biol. Chem.*, **1993**, 268, 17457-17462.
56. Snyder, F., Platelet-activating factor and its analogs: metabolic pathways and related intracellular processes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1995** 1254, 231-249.
57. Elstad, M. R., Stafforini, D. M., McIntyre, T. M., Prescott, S.M and Zimmerman, G. A., Platelet-activating factor acetylhydrolase increase during macrophage differentiation: a novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. *J. Biol. Chem.*, **1989**, 264, 8467-8470
58. Korth, R., Bidault, J., Palmantier, R., Benveniste, J. and Ninio, E., Human platelets release a paf-acether: acetylhydrolase similar to that in plasma. *Lipids*, **1993**, 28, 193-199.
59. Tarbet, E. B., Stafforini, D. M., Elstad, M. ., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. and Prescott, S. M., Liver cells secrete the plasma form of platelet-activating factor acetylhydrolase. *Biol. Chm.*, **1991**, 266 16667-16673
60. Stafforini, D. M., Prescott, S. M. and McIntyre, T. M., Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase: purification and properties. *J Biol. Chem.*, **1987**, 262, 4223-4230
61. Tselepis, T. A., Dentan, C., Karabina, S. A., Chapman, M. J. and Ninio, E. PAF-degrading acetylhydrolase is preferentially associated with dense LDL and VHDL-1 in human plasma: catalytic characteristics and relation to the monocyte-derived enzyme. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1995**, 15, 1764-1773.
62. Mueller, H. W., Haught, C. A., McNatt, J. M., Cui, K. X., Gaskell, S. J., Johnston, D. A. and Williamson, J. T., Measurement of platelet-activating factor in a canine model of coronary thrombosis and in endarterectomy samples from patients with advanced coronary artery disease. *Circ. Res.*, **1995**, 77, 54-63.
63. Rouis, M., Nigon and Chapman, M. J., Platelet-activating factor is a potent stimulant of the production of active oxygen species by human monocyte-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1988**, 156, 1293-1301.

64. Steward, A. G., Dubbin, P. N., Harris, T. and Dusting, G. J., Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of icosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87, 3215-3219.
65. Feliste, R., Perret, B., Braquet, P and Chap, H., Protective effect of BN 52021, a specific antagonist of platelet-activating factor (PAF-acether) against diet-induced cholesteryl ester deposition in rabbit aorta. *Arteriosclerosis*, **1989**, 78, 151-158.
66. Honda, Z. I., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T. and Shimizu, T., Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature*, **1991**, 349, 342-346.
67. Patel, K. D., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. and McIntyre, Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. *M., Biol. Chem.*, **1992**, 267, 15168-15175
68. Heery, J. M., Kozak, M., Stafforini, D. M., Jones, D. A., Zimmerman, G. A., McIntyre, T.M. and Prescott, S. M., Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **1995**, 96, 2322-2330.
69. Lehr, H. A., Weyrich, A. S., Saetzler, R. K., Jurek, A., Arfors, K. E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T. M., and Prescott, S. M., Vitamin C blocks inflammatory platelet-activating factor mimetics created by cigarette smoking. *J. Clin. Invest.*, **1997** 99, 2358-2364
70. Smiley, P. L., Stremler, K. E., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. and McIntyre, T. M., Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. *J Biol. Chem.*, **1991**, 266, 11104-11110
71. Tanaka, T., Limori, M., Tsukatani, H. and Tokomura, A., Platelet-aggregating effects of platelet-activating factor-like phospholipids formed by oxidation of phosphatidylcholines containing an sn-2-polyunsaturated fatty acyl group. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1210, 202-208
72. Watson, A. D, Leitinger, N., Navab, M., Faull, K. F., Horjjo, S., Witzum, J. L., Palinski, W., SCwenke, D., Salomon, R, G., Sha, W., Suddanagounger, G., Foglman, A. M. and Berliner, J. A., Structural Identification by Mass Spectrometry of Oxidized Phospholipids in Minimally Oxidized Low Density Lipoprotein That Induce

- Monocyte/Endothelial Interactions and Evidence for Their Presence in Vivo. *J. Biol. Chem.*, **1997**, 272: 13597-13567
73. Δημόπουλος Κ., Παράγοντας Ενεργοποίησης των Αιμοπεταλίων (Platelet Activating Factor, PAF), Καρδιολογική γνώμη, **2012**, 7, 2, 84-93
74. Schlame, M., Haupt, R., Wiswedel, I., Kox, W. J. and Rustow, B., Identification of short-chain oxidized phosphatidylcholine in human plasma. *J. Lipid. Res.*, **1996**, 37, 2608-2615.
75. Brown, M.S. and Goldstein, J.L., Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **1983**, 52, 223-261
76. Marathe, G. K., Davies, S. S., Harisson, K. A., Silva, A. R., Murthy, R. C., Castro-Faria-Neto, H., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A. and McIntyre, T. M., Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274, 28395-28404
77. Antonopoulou, S. and Demopoulos, C. A., On the Mediterranean Diet. *INFORM*, **1997**, 8(7), 776-777.
78. Fragopoulou, E., Nomikos, T., Antonopoulou, S., Mitsopoulou, C. A. and Demopoulos, C. A., Separation of biologically active lipids from red wine. *J. Agric. Food Chem.*, **2000**, 48, 1234-1238.
79. Heery, J. M., Kozak, M., Stafforini, D. M., Jones, D. A., Zimmerman, G. A., McIntyre, T. M. and Prescott, S. M., Oxidatively modified LDL contains phospholipids with platelet-activating factor-like activity and stimulates the growth of smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.*, **1995**, 96: 2322-2330
80. Prescott S. M., McIntyre T. M., Zimmerman G.A. and Stafforini, D., Inflammation as an early component of atherosclerosis and vascular damage - A role for P-selectin and platelet-activating factor. *Japanese Circulation Journal* **1996**, 60, 137-141.
81. Liapikos, T. A., Antonopoulou, S., Karabina, S. A. P., Tsoukatos, D. C., Demopoulos, C. A., Tselepis, A. D., Platelet activating factor formation during oxidative modification of low density lipoprotein when PAF - acetylhydrolase has been inactivated. *Biochim. Biophys. Acta*, **1994**, 1212, 353-360
82. J. T. Snook, S. Park, G. Williams, Y. H. Tsai, N. Lee, Effect of synthetic triglycerides of myristic, palmitic, and stearic acid on serum lipoprotein metabolism, *Eur. J.Clin. Nutr.*, **1999**, 53, 597-605

83. K. D. Cashman, A. Flynn, Optimal nutrition: calcium, magnesium and phosphorus, *Proc. Nutr. Soc.*, **1999**, 58, 477
84. Dalmeijer G.W., Struijk E.A., et al., Dairy intake and coronary heart disease or stroke—A population-based cohort study, *International Journal of Cardiology*, **2012**, 167, 3, 925-929
85. L. L. Rudel, Atherosclerosis and conjugated linoleic acid, *Br. J. Nutr.*, **1999**, 81, 177-179
86. J. S. Munday, K. G. Thompson, K. A. C. James, Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model, *Br. J. Nutr.*, **1999**, 81, 3, 251-255
87. L. D. McBean, Emerging Dietary Benefits of Dairy Foods, *Nutr. Today*, **1999**, 34, 47-53
88. B. A. Griffin, Lipoprotein atherogenicity: an overview of current mechanisms, *Proc. Nutr. Soc.*, **1999**, 58, 163-169
89. M. Fields, Role of trace elements in coronary heart disease, *Br. J. Nutr.*, **1999**, 81, 85-86
90. J. Buttriss, Nutritional properties of fermented milk products, *Int. J. Dairy Technol.*, **1997**, 50, 21-27
91. G. R. J. Taylor, C. M. Williams, Effects of probiotics and prebiotics on blood lipids, *Br. J. Nutr.*, **1998**, 80, 225-230
92. A. C. Ouwehand, S. J. Salminen, The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria, *Int. Dairy J.*, **1998**, 8, 749-758
93. N. M. de Roos, G. Schouten, M. B. Katan, Yoghurt enriched with *Lactobacillus acidophilus* does not lower blood lipids in healthy men and women with normal to borderline high serum cholesterol levels, *Eur. J. Clin. Nutr.*, **1999**, 53, 277-280
94. A. P. Simopoulos, Genetic variation and nutrition, *Nutr. Rev.*, **1999**, 57, 10-19
95. T. Takano, Milk derived peptides and hypertension reduction, *Bull. Int. Dairy Fed.*, **1998**, 8, 375-381
96. O. Masuda, Y. Nakamura, T. Takano, Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats, *J. Nutr.*, **1996**, 126, 3063-3068
97. R. Sugai, ACE inhibitors and functional foods, *Bull. Int. Dairy Fed.*, **1998**, 336, 17-20
98. Haug A., Hostmark A., Harstad O., Bovine milk in human nutrition--a review, *Lipid Health Dis*, **2007**, 6, 25

99. Abd El-Salam M., Mohamed D., The protective effect of processed cheese against hyperlipidemia in rats, *Dairy Science & Technology*, **2009**, 89, 5 437-447
100. Chrysant S.G., Chrysant G.S., An update on the cardiovascular pleiotropic effects of milk and milk products, *J Clin Hypertens*, **2013**, 15, 7, 503-510.
101. Antonopoulou S, Semidalas CE, Koussissis S, Demopoulos CA, Platelet-Activating Factor (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*, **1996**, 44, 3047-3051
102. Bligh E. G., Dyer W. J., A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.*, **1959**, 37, 8, 911-917.
103. Galanos, D.S., Kapoulas V.M., Isolation of polar lipids from triglyceride mixtures, *J. Lipid. Res.*, **1962**, 3, 134-137
104. Κωνσταντίνα Νασοπούλου, Μελέτη των δραστικών λιποειδών ψαριών ιχθυοτροφείου και ελεύθερης αλιείας ως προς τα καρδιαγγειακά νοσήματα, *Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών*, **2009**
105. Nasopoulou, C., Nomikos, T., Demopoulos, C. A., Zabetakis, I. Comparison of antiatherogenic properties of lipids obtained from wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Food Chem*, **2007**, 100, 560-567
106. Hauff S., Vetter W., Quantification of fatty acids as methyl esters and phospholipids in cheese samples after separation of triacylglycerides and phospholipids, *Analytica Chimica Acta*, **2009**, 636, 229-235
107. Ebringer L., Fenencik M., Krajcovic J., Beneficial health effects of milk and fermented dairy products, *Folia Microbiol*, **2008**, 53, 378-94
108. Covas M.I., Olive oil and the cardiovascular system, *Pharmacol Res*, **2007**, 55, 175-186
109. Urpi-Sarda M, Casasa R, Chiva-Blanca G, Romero-Mamani ES, Valderas-Martínez P, Arranza S, Andres-Lacuevac C, Llorach R, Medina-Remónb A, Lamuela-Raventos RM, Estrucha R, Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis, *Pharmacol Res*, **2012**, 65, 577-583
110. Elwood PC, Pickering JE, Givens DI, Gallacher JE, The Consumption of Milk and Dairy Foods and the Incidence of Vascular Disease and Diabetes: An Overview of the Evidence, *Lipids*, **2010**, 45, 925-939

111. Keizer H., The “Mevalonate hypothesis”: A cholesterol – independent alternative to etiology of atherosclerosis, *Lipids in Health and Disease*, **2012**, 11, 149
112. Nasopoulou C., Zabetakis I., Agricultural and Aquacultural Potential of Olive Pomace A Review, *J Agric. Sci.*, **2013**, 5, 1-12