

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

***ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΣΤΗΝ ΤΡΙΤΗ
ΗΛΙΚΙΑ***

ΓΡΗΓΟΡΙΟΥ ΕΥΦΗΜΙΑ

dp425610

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΔΕΔΟΥΣΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: ΔΕΔΟΥΣΗΣ Γ.

ΜΑΝΙΟΣ Ι.

ΠΑΝΑΓΙΩΤΑΚΟΣ Δ.

ΑΘΗΝΑ 2008

Περιεχόμενα

Περίληψη

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αθηροσκλήρωση και οξειδωμένη LDL-C

Το ένζυμο MnSOD

Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης Ala16Val στην έκφρασή και τη δράση του

3^η ηλικία

Μεσογειακή διατροφή

2. ΠΕΙΡΑΜΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Έρευνα GHRAS

Κριτήρια εθελοντικής συμμετοχής

Ανθρωπομετρικές και κλινικές παράμετροι

Ερωτηματολόγια

Αιμοληψία

Απομόνωση ορού

Απομόνωση DNA

Βιοχημικές παράμετροι

Μέτρηση oxLDL-C με ανοσοενζυματική μέθοδο (ELIZA)

Γενετικές παράμετροι

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

Διαλύματα

Στατιστική επεξεργασία

Μεσογειακό σκορ

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Περίληψη

Το γήρας είναι μία πολυπαραγοντική διαδικασία έκπτωσης της λειτουργίας των κυττάρων, ο ρυθμός της οποίας εξαρτάται τόσο από εξωγενείς όσο και από ενδογενείς παράγοντες. Ένας από τους σημαντικότερους εξωγενείς παράγοντες είναι και η διατροφή. Η θεωρία του οξειδωτικού στρες και της παραγωγής ελευθέρων ριζών εξηγεί πολλές αλλαγές που σχετίζονται με το γήρας. Το MnSOD είναι ένα αντιοξειδωτικό ένζυμο το οποίο σχετίζεται με την προστασία από την αθηροσκλήρωση, στην πορεία της οποίας καθοριστικό ρόλο παίζει η οξείδωση των LDL λιποπρωτεϊνών. Στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού Ala16Val στο γονίδιο του MnSOD και η σχέση του πολυμορφισμού με τα επίπεδα oxLDL στο πλάσμα και τις διατροφικές συνήθειες 175 ηλικιωμένων ατόμων. Η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού (Ala: 0.53, Val: 0.47) είναι παρόμοια με άλλες μελέτες. Στους ηλικιωμένους (γυναίκες και άντρες) βρέθηκε αρνητική συσχέτιση του γονότυπου Val/Val με τα επίπεδα oxLDL-C (stand. $\beta = -0,271$, $p=0,010$ για τις γυναίκες και stand. $\beta = -0,210$, $p=0.050$ για τους άντρες). Παράλληλα, τα επίπεδα τριγλυκεριδίων στους άνδρες και στις γυναίκες με Val/Val γονότυπο είναι χαμηλότερα σε σχέση με τους φορείς του Ala αλληλομόρφου (Ala/Ala και Ala/Val).

Ο Val/Val γονότυπος φαίνεται πως έχει προστατευτική δράση έναντι στην οξείδωση της LDL στους ηλικιωμένους, ωστόσο περαιτέρω μελέτες είναι απαραίτητες για τη πλήρη διευκρίνιση του ακριβή ρόλου του πολυμορφισμού.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Αθηροσκλήρωση και οξειδωμένη LDL-C

Υπάρχουν πολλά στοιχεία τα οποία δείχνουν ότι τα υψηλά επίπεδα της λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL), σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση και κατά συνέπεια, την ανάπτυξη καρδιαγγειακής νόσου. Η LDL στην αρχική της μορφή δεν είναι επικίνδυνη αλλά όταν τροποποιηθεί από την οξείδωση, μετατρέπεται σε απειλή για το αρτηριακό τοίχωμα. Η οξειδωτική τροποποίηση της LDL ενισχύει την αθηροσκλήρωση μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Για παράδειγμα προτείνεται ότι η οξείδωση της LDL προσελκύει τα μονοκύτταρα μέσα στο ενδοθήλιο των αγγείων και τα μετατρέπει σε αφρώδη κύτταρα. Η ευαισθησία της LDL να οξειδώνεται, καθορίζεται τόσο από ενδογενείς όσο και από εξωγενείς παράγοντες, ιδιαίτερα λιπαρά οξέα και αντιοξειδωτικές βιταμίνες.

Η LDL χοληστερόλη, μέσω πολλαπλών μηχανισμών, μπορεί να τροποποιηθεί οξειδωτικά από μία πλειάδα παραγόντων όπως: ελεύθερες ρίζες, δραστικές οξυγονούχες ενώσεις (reactive oxygen species, ROS), μεταλλικά ιόντα στοιχείων μετάπτωσης (ελεύθερα ή με μορφή μεταλλοπρωτεϊνών). Η οξείδωση της LDL είναι μία πολυσύνθετη διεργασία κατά την οποία δημιουργούνται πολλά ετερογενή προϊόντα. Το σωματίδιο της

LDL αποτελείται από την απολιποπρωτεΐνη Β (apo B), από ουδέτερα και πολικά λιπίδια καθώς και από αντιοξειδωτικές ουσίες όπως α-τοκοφερόλη, β-καροτένιο, ουμπικινόνη 10. Κατά την οξείδωση της LDL, τόσο το λιπιδικό όσο και το πρωτεϊνικό μέρος μπορεί να τροποποιηθεί. Η λιπιδική υπεροξειδωση της LDL ξεκινά από τα ακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) των φωσφολιπιδίων της επιφάνειας του σωματιδίου (ελαφρά οξειδωμένες LDL) και προωθείται μέσω αλυσιδωτών αντιδράσεων προς τα λιπίδια του πυρήνα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την οξείδωση της χοληστερόλης καθώς και μεταβολή στη δομή και στις ιδιότητες της apoB. (15)

Η μεγάλη ποικιλία των βιολογικά δραστικών μορίων που μπορούν αρχικά να σχηματισθούν περιλαμβάνει: α) υπεροξειδία λιπαρών οξέων και β) οξειδωμένες στερόλες (πχ. 3-τριόλες, ουσίες με υψηλό βαθμό τοξικότητας). Τα λιπιδικά υπεροξειδία είναι ασταθή, διασπόμενα δε, σχηματίζουν εκ νέου ελεύθερες ρίζες καθώς και αλδεϋδικές ενώσεις. Τέτοιες ενώσεις είναι η μηλονική διαλδεϋδη (MDA), η εξανάλη, η 4-υδροξυνοενάλη (HNE), α,β-ακόρεστες αλδεϋδες και κετόνες. Οι περισσότερες από τις ενώσεις αυτές είναι τοξικές, αθηρογόνες και μεταλλαξιογόνες. Η MDA και η HNE μπορούν να αντιδράσουν με τις ελεύθερες αμινομάδες της λυσίνης στην apoB με αποτέλεσμα τη δημιουργία αντιγονικών επιτόπων στο μόριο της πρωτεΐνης, μη αναγνωρίσιμων από τους LDL υποδοχείς αλλά από τους καθαριστές υποδοχείς μακροφάγων.

Στα κύτταρα των θηλαστικών έχουν αναπτυχθεί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί άμυνας για την προστασία τους από τις βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών. Διάφορα ενζυμικά συστήματα όπως η καταλάση (CAT), η δισμουτάση του υπεροξειδίου (superoxide dismutase SOD), η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (glutathione peroxidase GSH-Px), η παραοξογενάση 1 (paraoxonase 1 PON 1), αποτελούν τους πρωτογενείς ενδοκυτταρικούς μηχανισμούς άμυνας. Η SOD εξουδετερώνει το υπεροξειδικό ανιόν, η CAT και η GSH-Px το H_2O_2 , η PON1 έχει σχέση με την HDL και την προστατευτική δράση που αυτή εξασκεί. Σημαντικοί επίσης παράγοντες είναι οι αντιοξειδωτικές ουσίες τρανσφερρίνη, σερουλοπλασμίνη, τοκοφερόλες, β-καροτένιο, βιταμίνη C, γλουταθειόνη, ουβικινώνη 10 και συμβάλουν στην συνολική αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού. Οι εκτίμηση των ενζυμικών

δραστικότητων καθώς και των επιπέδων των αντιοξειδωτικών ουσιών, παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για την εκτίμηση του καρδιαγγειακού κινδύνου για καρδιαγγειακή νόσο. (47)

Εκτιμώντας ότι το οξειδωτικό στρες παίρνει μέρος στη διαδικασία της αθηροσκλήρωσης, σε πολλές μελέτες χρησιμοποιήθηκε ποικιλία αντιοξειδωτικών για την πρόληψη και αντιμετώπιση της αθηροσκλήρωσης. Κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι βιταμίνες C και E μπορεί να βελτιώνουν την ενδοθηλιακή λειτουργία σε ασθενείς με παράγοντες κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα. Εντούτοις, οι αρχικές ενδείξεις για στον ευεργετικό ρόλο των αντιοξειδωτικών βιταμινών ενάντια στην αθηροσκλήρωση, που προέρχονταν από περιορισμένες μελέτες παρατήρησης, δεν επαληθεύτηκαν από την πλειοψηφία των τυχαιοποιημένων μελετών που ακολούθησαν. Αυτές οι μελέτες προτείνουν ότι το οξειδωτικό στρες, μπορεί να είναι υπεύθυνο για την ανάπτυξη νοσημάτων φθοράς, όπως η αθηροσκλήρωση. (2)

Το ένζυμο MnSOD

Τα τελευταία χρόνια τα αντιοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα συγκεντρώνουν αυξανόμενο ερευνητικό ενδιαφέρον, συμπεριλαμβανομένων και των SODs. Τα SODs ένζυμα καταλύουν την αναγωγή των αντιδρώντων ριζών υπεροξειδίου σε υπεροξειδία υδρογόνου. Τρία SODs καταλύουν αυτή την αντίδραση στα θηλαστικά: το MnSOD στα μιτοχόνδρια, το copper-zincSOD στο κυτταρόπλασμα και το εξωκυτταρικό SOD. Οι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του Co-ZnSOD και του εξωκυτταρικού SOD, δεν σχετίζονται με μακροαγγειοπάθεια σε ασθενείς με διαβήτη τύπου 2. Πειραματικές μελέτες με knockouτ πειραματόζωα υποδεικνύουν ισχυρά ότι το MnSOD παίζει σημαντικό ρόλο προστασία από οξείδωση. (2)

Το MnSOD παίζει σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση από τα αντιδρώντα μόρια οξυγόνου. Η αναπνευστική αλυσίδα στο μιτοχόνδριο παράγει μεγάλα ποσά ανιόντων υπεροξειδίου, τα οποία ανάγονται από το

MnSOD σε υπεροξειδία υδρογόνου και μετά αποτοξινώνονται σε νερό από την μιτοχονδριακή υπεροξειδάση της γλουταθειώνης. (4)

Ο Fang και συνεργάτες σε μελέτη τους υποστηρίζουν ότι στα ενδοθηλιακά κύτταρα παράγονται ανιόντα υπεροξειδίου και οξειδώνουν την LDL in vitro. Για να διερευνηθεί αυτό, έγινε επώαση ανθρώπινης LDL με αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα βοός, για 18 ώρες και διαπιστώθηκε τετραπλάσια αύξηση στην οξείδωση της LDL σε σχέση με την επώαση χωρίς κύτταρα. Έπειτα προσθέσανε Cu/ZnSOD στο καλλιεργητικό μέσο, και η οξείδωση της LDL η οποία προκλήθηκε από τα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα μειώθηκε κατά 79%. Για να διαπιστωθεί αν και το ενδοκυτταρικό SOD έχει παρόμοια προστατευτική δράση, επιμολύνανε τα αορτικά ενδοθηλιακά κύτταρα με αδενοϊούς που έφεραν cDNA για τα ανθρώπινα Cu/ZnSOD και MnSOD (AdCu/ZnSOD και AdMnSOD). Η επίδραση με τον αδενοϊό αύξησε την ποσότητα και τη δραστικότητα του κάθε ενζύμου στα κύτταρα και περιόρισε την κυτταρική παραγωγή O_2^- κατά δύο τρίτα. (5)

Το αποτέλεσμα της μετάλλαξης Ala16Val στην έκφρασή και τη δράση του

Το MnSOD κωδικοποιείται από το πυρηνικό DNA και συντίθεται με μία μακριά αλληλουχία μιτοχονδριακού στόχου που αποτελείται από 24 αμινοξέα. Η είσοδος στο μιτοχόνδριο του πρόδρομου του MnSOD μπορεί να συμβεί είτε μετα-μεταφραστικά είτε κατά τη διάρκεια της μετάφρασης, καθοδηγούμενη από την αλληλουχία στόχου του μιτοχονδρίου (MTS) και δυνητικά από τη μιτοχονδριακή μεμβράνη. Έπειτα μέσα στο μιτοχόνδριο το MTS μετασχηματίζεται και η ώριμη πρωτεΐνη μετατρέπεται σε ενεργό τετραμερές. Ένας γενετικός πολυμορφισμός επηρεάζει την MTS του MnSOD. Η παρουσία κυτοσίνης ή θυμίνης στη θέση 1183 στο γονίδιο του MnSOD καταλήγει είτε σε κωδικόνιο γουανίνη-κιτοσίνη-θυμίνη είτε σε γουανίνη-θυμίνη-θυμίνη, που οδηγεί σε ενσωμάτωση είτε αλανίνης είτε θυμίνης στη θέση 9 του MnSOD. Η μετάλλαξη αναφέρεται είτε σαν Ala-9Val ή σαν Ala16Val. Το ala αλληλόμορφο και το val αλληλόμορφο εμφανίζουν παρόμοια συχνότητα εμφάνισης στους Καυκάσιους πληθυσμούς. Επίσης ο ρόλος της Ala16val μετάλλαξης ως

παράγοντα κινδύνου για την εμφάνιση καρκίνου, νευρογενετικών παθήσεων και άλλων ασθενειών παραμένει υπό διερεύνηση. (4)

Για να γίνει κατανοητή η λειτουργική συνέπεια της μετάλλαξης, αρχικά συντέθηκε ανθρώπινο MnSOD με ala και val μορφή και μελετήθηκε η είσοδος αυτών των δύο πρόδρομων πρωτεϊνών σε μιτοχόνδρια που είχαν απομονωθεί από ήπαρ αρουραίου *in vitro* (4). Η αντικατάσταση ενός μόνο αμινοξέος, της αλανίνης σε βαλίνη στο δέκατο έκτο αμινοξύ της αλληλουχίας του MnSOD (Ala16Val) προτείνεται ότι αλλάζει την δευτεροταγή δομή της ώριμης πρωτεΐνης και επομένως τον μιτοχονδριακό στόχο του ενζύμου (2). Βρέθηκε ότι ο πρόδρομος Ala-MnSOD, του οποίου η MTS μάλλον σχηματίζει δομή α-έλικας, εισάγεται γρήγορα και πλήρως στο μιτοχόνδριο ενώ ο πρόδρομος Val-MnSOD, του οποίου η MTS σχηματίζει πιθανόν δομή β-διαμόρφωσης, εγκλωβίζεται μέσα στη στενή περιοχή της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Η δραστηριότητα των τετραμερών του MnSOD στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου είναι περίπου 40% υψηλότερη μετά από την είσοδο του πρόδρομου Ala-MnSOD σε σχέση με την είσοδο του Val-MnSOD.(4)

Πρόσφατες έρευνες μελέτησαν την *in vitro* εισαγωγή πρωτεϊνών οι οποίες αποτελούνταν από κάθε μία από τις αλληλουχίες μιτοχονδριακού στόχου MnSOD (MnSOD/MTS) σε πρωτεΐνη δυϊδροφολικής αναγωγάσης ποντικίου και την εισαγωγή των δύο πρόδρομων των διάφορων ανθρώπινων MnSOD σε ηπατικά μιτοχόνδρια αρουραίου. Ο πρόδρομος του Ala-MnSOD μετατρεπόταν κατά 30-40% περισσότερο σε ενεργά εγγεγραμμένα, επεξεργασμένα MnSOD ομοτετραμερή από ότι ο Val-MnSOD πρόδρομος. Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αλληλουχία του Ala-MnSOD που στοχεύει στο μιτοχόνδριο, επιτρέπει επαρκή είσοδο MnSOD στο μιτοχόνδριο, ενώ η Val μορφή προκαλεί μερική δέσμευση του πρόδρομου στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου και περιορισμένο σχηματισμό ενεργού τετραμερούς MnSOD στο εσωτερικό του μιτοχονδρίου. (3)

Το γήρας

Το γήρας είναι μία φυσιολογική πολυπαραγοντική διαδικασία των κυττάρων, των οργάνων και ολόκληρου του οργανισμού, και επηρεάζει όλα ζωντανά όντα. Η πιο κοινά αποδεκτή άποψη είναι ότι το γήρας αναφέρεται σε μία διαδικασία η οποία αυξάνει την ευπάθεια ενός οργανισμού στις προκλήσεις κατά τη διάρκεια της ζωής και έτσι αυξάνεται νοσηρότητα και θνησιμότητα. Το γήρας πιστεύεται ότι είναι το αποτέλεσμα συσσωρευμένων φθορών στα κύτταρα και στους ιστούς του σώματος. Κάθε στιγμή συμβαίνουν μικρές φθορές οι οποίες ελαττώνουν τη φυσιολογική λειτουργία και μπορεί να οδηγήσουν σε ασθένεια. Αν καταφέρουμε να κατανοήσουμε το γήρας των κυττάρων και βρεθούν τρόποι να ελαττωθούν οι συσσωρευόμενες κυτταρικές φθορές, ή αυξηθεί η αποτελεσματικότητα των μηχανισμών επιδιόρθωσης, μπορεί να καταφέρουμε να καθυστερήσουμε το ξεκίνημα μίας ασθένειας και να βελτιώσουμε την ποιότητα ζωής των ηλικιωμένων.(12)

Ο ρυθμός με τον οποίο γίνεται η διαδικασία του γήρατος του κάθε ατόμου, επηρεάζεται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως το γενετικό υπόβαθρο, ο τρόπος ζωής και το περιβάλλον. Τα δεδομένα των μελετών υποδεικνύουν ότι η βελτίωση στον τρόπο ζωής μπορεί να επιτευχθεί με ρύθμιση των εξωγενών παραγόντων που επηρεάζουν τις διαδικασίες του γήρατος. Το γενετικό υπόβαθρο των ατόμων είναι προκαθορισμένο και οι διάφοροι παροντικοί χειρισμοί δεν μπορούν να επηρεάσουν αρκετά το ρυθμό με τον οποίο γερνά ένα άτομο. Εντούτοις, ο τρόπος ζωής και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να αλλάξουν την ροπή του ατόμου σε ασθένειες σχετιζόμενες με το γήρας.

Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες η διατροφή είναι ένας από τους ισχυρότερους, που επηρεάζει το ρυθμό της γήρανσης και την επίπτωση των ασθενειών που σχετίζονται με το γήρας (αθηροσκλήρωση και νευροεκφυλιστικές ασθένειες)(7)

Η θεωρία του οξειδωτικού στρες υποστηρίζει ότι το γήρας είναι η συνέπεια της οξειδωτικής καταστροφής των κυττάρων. Συγκεκριμένα η συσσώρευση μεταλλάξεων του mtDNA, καθορίζεται από την ανισορροπία του ρυθμού παραγωγής και ουδετεροποίησης των αντιδρώντων μορίων

οξυγόνου, από τα συστήματα αντιοξειδωτικής άμυνας είναι το οξειδωτικό στρες.

Ο Harman (1956) προτείνει ότι η θεωρία των ελευθέρων ριζών μπορεί να εξηγεί πολλές από τις φυσιολογικές αλλαγές που σχετίζονται με την γήρανση. Σύμφωνα με αυτή την υπόθεση, διάφοροι τύποι ελευθέρων ριζών σχηματίζονται στους αερόβιους οργανισμούς κυρίως μέσω της μεταβολικής τους δραστηριότητας.(33) Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες είναι τα αντιδρώντα μόρια οξυγόνου (ROS), που έχει δειχθεί ότι καταστρέφουν όλο το φάσμα των κύριων συστατικών του κυττάρου, κατά τη διαδικασία της γήρανσης (34). Οι ελεύθερες ρίζες και τα αντιδρώντα μόρια οξυγόνου και αζώτου (RNS) είναι μεταλλαξιογόνα, και προκαλούν καταστροφή στο DNA, ευνοούν την μεταλλαγή των κυττάρων και συμβάλουν στην ανάπτυξη ποικίλων κακοηθών ασθενειών. Επίσης τα αντιδρώντα μόρια οξυγόνου και το οξειδωτικό στρες συμβάλουν στην πορεία της αθηρογένεσης.

Σε μελέτη που έγινε για να διερευνηθεί το αν αυξάνεται το οξειδωτικό στρες με την ηλικία, παρατηρήθηκε αύξηση των λιποϋπεροξειδασών και παραδόξως το συνολικό αντιοξειδωτικό προφίλ παρουσιάζει μία ελάττωση σχετιζόμενη με την ηλικία. Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης φαίνεται να ελαττώνεται με την ηλικία, ενώ αντίθετα η δραστηριότητα του SOD δεν μεταβάλλεται σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Γενικά η μελέτη δείχνει ότι δεν υπάρχουν αλλαγές στους οξειδωτικούς δείκτες στις ηλικίες κάτω των 65 ετών. Στη μελέτη αυτή προτείνεται ότι σε ηλικίες άνω των 65 ετών πρέπει να υπάρχει μία αύξηση στο οξειδωτικό στρες.(6)

Ο Strehlow και συνεργάτες από μελέτη που έκαναν σε ανθρώπους και ποντίκια έδειξαν ότι η έλλειψη οιστρογόνων οδηγεί σε ελαττωμένη έκφραση και έκκριση του SOD, γεγονός το οποίο δεν συμβαίνει με άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα. Αν ισχύει κάτι τέτοιο θα μπορούσαμε να πούμε ότι οι μετεμμηνοπαυσιακές γυναίκες θα έχουν χαμηλότερα επίπεδα SOD από τις προεμμηνοπαυσιακές. (17)

Η αύξηση της ηλικίας συνοδεύεται από μείωση της γεύσης και της οσμής, αλλά και εμφάνιση ξηροστομίας που επηρεάζουν σημαντικά τη διατροφική πρόσληψη των ηλικιωμένων (36). Παράλληλα συχνά υπάρχουν

προβλήματα στοματικής υγιεινής, τεχνητές οδοντοστοιχίες που δυσκολεύουν την πρόσληψη τροφής και οδηγούν τους ηλικιωμένους σε περιορισμένες διαιτητικές επιλογές. Κοινωνικοοικονομικοί λόγοι επιδεινώνουν το πρόβλημα, όπως η έλλειψη επαρκούς μορφωτικού επιπέδου ή η οικονομική αδυναμία αγοράς ποιοτικών τροφίμων. Το πρόβλημα του υποσιτισμού στους ηλικιωμένους, που μπορεί να είναι ενεργειακός ή να αφορά μεμονωμένα θρεπτικά συστατικά, γίνεται πιο σύνθετο αν ληφθούν υπόψη οι αλλαγές στη γαστρεντερική λειτουργία και στο μεταβολισμό βιταμινών και ιχνοστοιχείων που παρατηρούνται στην τρίτη ηλικία (37), καθώς και την επίδραση της κατάθλιψης (που είναι συχνή στους ηλικιωμένους) στην όρεξη. Επιδημιολογικές μελέτες υποδεικνύουν πως η διατροφή αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην κατάσταση της υγείας και επιβίωσης στην τρίτη ηλικία (38).

Σε μελέτη που έγινε για να εκτιμηθούν οι διαφορές στις βιοχημικές παραμέτρους μεταξύ αιωνόβιων, ηλικιωμένων και νέων βρέθηκε ότι οι ηλικιωμένοι έχουν φτωχό διατροφικό επίπεδο, το οποίο μπορεί να οφείλεται στο μειωμένο τους μεταβολισμό και στην πιθανότητα ότι μόνο τα μικρόσωμα, αδύνατα άτομα με χαμηλά επίπεδα λιπιδίων, πρωτεϊνών και απαραίτητων αμινοξέων, είναι εκείνα που τείνουν να επιβιώνουν για να γίνουν αιωνόβιοι. (8)

Μεσογειακή διατροφή

Κατά την διάρκεια των τελευταίων ετών, πλήθος επιστημονικών ερευνών, συσχετίζει τις δίαιτες πλούσιες σε φρούτα, λαχανικά, όσπρια, ψάρια, χαμηλά σε λιπαρά γαλακτοκομικά προϊόντα, και μονοακόρεστα λιπαρά, με χαμηλότερο επιπολασμό της καρδιαγγειακής νόσου, ιδιαίτερα μέσω της επίδρασής τους στην αρτηριακή πίεση, στα επίπεδα λιπιδίων και λιποπρωτεϊνών. Η χαρακτηριστική διαίτα της περιοχής της Μεσογείου, της οποίας κύρια πηγή λίπους είναι το ελαιόλαδο, συγκεντρώνει αυτά τα χαρακτηριστικά. Τις προηγούμενες δεκαετίες διάφορες μελέτες, απέδειξαν τον ευεργετικό ρόλο αυτού του τύπου διαίτας στην συχνότητα εμφάνισης των

καρδιαγγειακών νοσημάτων, μεταβολικών διαταραχών και διάφορων τύπων καρκίνου. (1)

Αρκετές επιδημιολογικές μελέτες έχουν διερευνήσει τη συσχέτιση διατροφικών συνηθειών με τον κίνδυνο νοσηρότητας και θνησιμότητας στην τρίτη ηλικία. Στην ευρωπαϊκή μελέτη EPIC για ηλικιωμένους πληθυσμούς, η σύγκριση διάφορων διατροφικών σχημάτων μεταξύ των ευρωπαϊκών χωρών οδηγεί στο συμπέρασμα πως η μεσογειακή διατροφή και διατροφικά σχήματα που πλησιάζουν προς αυτή σχετίζονται με πιο υγιεινό τρόπο ζωής στην τρίτη ηλικία (39,40). Η μεσογειακή διατροφή αποτελείται από οχτώ βασικά χαρακτηριστικά: υψηλό λόγο μονοακόρεστων προς κορεσμένων λιπαρών οξέων, μέτρια κατανάλωση αλκοόλ, αυξημένη κατανάλωση οσπρίων, αυξημένη κατανάλωση μη κατεργασμένων δημητριακών, αυξημένη κατανάλωση φρούτων, αυξημένη κατανάλωση λαχανικών, χαμηλή κατανάλωση κρέατος και μέτρια κατανάλωση γαλακτοκομικών προϊόντων (41).

Διάφορες μελέτες δείχνουν ότι η μεσογειακή διατροφή οδηγεί σε χαμηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης και ox-LDL χοληστερόλης και επίσης προστατεύει από καρδιαγγειακά νοσήματα. Τα ευεργετικά οφέλη της μεσογειακής διατροφής οφείλονται στις αντιοξειδωτικές βιταμίνες και τα άλλα αντιοξειδωτικά καθώς επίσης και στις πολυφαινόλες και τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα που περιέχει. (9,10,11)

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η εκτίμηση βιοχημικών (ολική χοληστερόλη, HDL-C, LDL-C, τριγλυκερίδια, γλυκόζη ορού, οξειδωμένη LDL-C), ανθρωπομετρικών (βάρος, ύψος, δείκτης μάζας σώματος), κλινικών (αρτηριακή πίεση), γενετικών παραμέτρων (Ala16Val στο γονίδιο του SOD), ιατρικού ιστορικού και διατροφικών συνηθειών, σε δείγμα ηλικιωμένων Ελλήνων και ο έλεγχος πιθανών συσχετίσεων ανάμεσα σε αυτούς τους παράγοντες. Παράλληλα, σκοπός της έρευνας είναι η εκτίμηση της

συχνότητας εμφάνισης του μελετώμενου πολυμορφισμού σε ελληνικό πληθυσμό και ο έλεγχος συσχέτισης με τα επίπεδα της oxLDL στον ορό και/ή και τις διατροφικές συνήθειες των ηλικιωμένων.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Έρευνα GHRAS

Η μελέτη GHRAS (Greek Health Randomized Aging Study) στοχεύει 1). στην εκτίμηση του επιπολασμού των καρδιαγγειακών νοσημάτων, του διαβήτη, καθώς και άλλων παραγόντων κινδύνου για καρδιαγγειακά νοσήματα (υπερχοληστερολαιμία, υπέρταση, παχυσαρκία) σε ηλικιωμένους και υπέργηρους εθελοντές, 2). στην καταγραφή των διατροφικών συνηθειών στην τρίτη ηλικία, 3). στην διερεύνηση των πιθανών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα σε παράγοντες του τρόπου ζωής, διατροφικές συνήθειες, βιοχημικούς και γενετικούς δείκτες.

Κριτήρια Εθελοντικής συμμετοχής

Οι εθελοντές θα πρέπει να είναι 75 ετών και πάνω, να μην είναι τρόφιμοι ιδρύματος και να μη χρειάζονται καθημερινή νοσοκομειακή φροντίδα. Παράλληλα δεν θα πρέπει να λαμβάνουν στεροειδή, αντικαταθλιπτικά, αντιβίωση και αντιμεταβολίτες. Δεν συμπεριλαμβάνονται στην έρευνα ηλικιωμένοι που πάσχουν από: σακχαρώδη διαβήτη, αυτοάνοσα νοσήματα, νευρογενή νοσήματα, λοιμώξεις, νόσο chron, acrodermatitis enteropathica, νεφροπάθεια, ηπατοπάθεια, δρεπανοκυτταρική αναιμία, χρόνιες δερματικές παθήσεις, καρκίνο, καρδιακή ανεπάρκεια, καρωτιδική στένωση, στηθάγχη, καρδιακή αρρυθμία, έμφραγμα μυοκαρδίου, εγκεφαλικό αθηροσκλήρωση (αγγειοπλαστική, μπαλονάκι). Όσοι ασθενείς πληρούν τα παραπάνω κριτήρια χαρακτηρίζονται ως υγιείς.

Ανθρωπομετρικές και κλινικές παράμετροι

Ανθρωπομετρικές παράμετροι: Το βάρος μετράτε μία φορά για κάθε εθελοντή με ηλεκτρονική ζυγαριά seca. Η μέτρηση πραγματοποιείτε χωρίς παπούτσια και βαρύ ρουχισμό σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (63). Οι μετρήσεις στρογγυλοποιούνται στην πλησιέστερη εκατοντάδα γραμμαρίων.

Το ύψος μετράτε μία φορά σε κάθε εθελοντή με αναστημόμετρο seca. Η μέτρηση γίνεται σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (42): ο εθελοντής στέκετε χωρίς παπούτσια, ίσια με την πλάτη στην κάθετη κλίμακα του αναστημόμετρου, τα πόδια ενωμένα και το κεφάλι παράλληλο με το οριζόντιο επίπεδο. Το ύψος μετράτε αφού ζητηθεί από τον εθελοντή να παρει μια «βαθεία ανάσα». Οι μετρήσεις στρογγυλοποιούνται στο πλησιέστερο 0,5cm του μέτρου.

Ο δείκτης μάζας σώματος υπολογίζετε ως βάρος(kg) /ύψος² (m²).

Κλινικές παράμετροι: Η αρτηριακή πίεση μετράτε σύμφωνα με τις διεθνείς οδηγίες (43). Η μέτρηση γίνεται στο αριστερό χέρι έχοντας τα άτομα σε καθιστή θέση και σε ήρεμη κατάσταση. Η τιμή της συστολικής πίεσης αντιστοιχεί στην τιμή που δείχνει το πιεσόμετρο όταν ακουστεί ο πρώτος ήχος. Η τιμή της διαστολικής πίεσης καθορίζεται όταν ο ήχος σταματά να ακούγεται ρυθμικός και ακούγεται συνεχόμενος.

Ως υπέρτασικά χαρακτηρίζονται τα άτομα που έχουν συστολική αρτηριακή πίεση $\geq 140\text{mmHg}$, ή/και διαστολική αρτηριακή πίεση $\geq 90\text{mmHg}$ ή λαμβάνουν αντιυπερτασική φαρμακευτική αγωγή.

Ερωτηματολόγια

Η συλλογή στοιχείων που αφορούν δημογραφικά και κοινωνικά χαρακτηριστικά, ιατρικό ιστορικό, διατροφικές συνήθειες, κάπνισμα, κατανάλωση αλκοόλ, κατάσταση μνήμης και παρουσία κατάθλιψης, πραγματοποιείται σε ειδικά σχεδιασμένα ερωτηματολόγια για την έρευνα Zincage. Τα ερωτηματολόγια συμπληρώνονται από κλινικούς διαιτολόγους κατά τη διάρκεια της συνέντευξης με τους εθελοντές.

Καταγραφή δημογραφικών και κοινωνικών στοιχείων: Η καταγραφή δημογραφικών και κοινωνικών στοιχείων για κάθε εθελοντή πραγματοποιείται

σε ειδικά σχεδιασμένο ερωτηματολόγιο. Οι ερωτήσεις αφορούν: ηλικία, φύλο, τόπο διαμονής, οικογενειακή κατάσταση και μορφωτικό επίπεδο.

Καταγραφή ιατρικού ιστορικού: Η καταγραφή του ιατρικού ιστορικού πραγματοποιείται σε ειδικά σχεδιασμένο ερωτηματολόγιο. Οι ερωτήσεις αφορούν: την παρούσα φαρμακευτική αγωγή (είδος, δοσολογία, συχνότητα και αιτιολογία), την ύπαρξη διαγνωσμένων παθήσεων (υπέρταση, διαβήτης, στηθάγχη, καρδιακή ανεπάρκεια, καρδιακή αρρυθμία, οστεοπόρωση, καρκίνος κ.α.), την ύπαρξη περιστατικού εμφράγματος μυοκαρδίου, εγκεφαλικού, καρκίνου και ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων (είδος, αιτιολογία, χρονολογία).

Καταγραφή διατροφικών συνηθειών: Η καταγραφή των διατροφικών συνηθειών πραγματοποιείται με ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων.

Καπνιστικές συνήθειες και κατανάλωση αλκοόλ: Οι πληροφορίες σχετικά με τις καπνιστικές συνήθειες συλλέγονται σε ερωτηματολόγιο που διερευνά: την ηλικία έναρξης και λήξης καπνίσματος για τους πρώην καπνιστές. Στοιχεία για την κατανάλωση αλκοόλ καταγράφονται σε ερωτηματολόγιο που αφορά: την συχνότητα, την ποσότητα κατανάλωσης αλκοόλ και το είδος.

Αιμοληψία

Μετά από 12ωρη νηστεία πραγματοποιείται λήψη 10ml αίματος από κάθε εθελοντή. Τα 6 ml αίματος συλλέγονται σε συλλέκτες με πήγμα για απομόνωση ορού και 4 ml αίματος συλλέγονται σε συλλέκτες με αντιπηκτικό (EDTA) για απομόνωση DNA.

Απομόνωση ορού

Τα vacutainers φυγοκεντρούνται στις 3000rpm για 10 λεπτά. Μετά το τέλος της φυγοκέντρωσης παραλαμβάνετε ο ορός με πιπέτα και αποθηκεύεται σε eppendorf 1,5 ml στους 20 °C.

Απομόνωση DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (5-6ml) με τη μέθοδο NaCl. Τα Βήματα της μεθόδου περιγράφονται παρακάτω:

Ημέρα 1^η

1. Απομάκρυνση πλάσματος με πλαστική πιπέτα Pasteur μετά από φυγοκέντρωση (10min, 3000rpm).
2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος σε σωλήνα falcon 50ml.
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1×) μέχρι τελικό όγκο 50ml.
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση και κατά την διάρκεια των 20 min).
5. Φυγοκέντρωση (10min, 2500rpm).
6. Απομάκρυνση υπερκλειμένου (αναποδογύρισμα falcon σε απορροφητικό χαρτί).
7. Προσθήκη 25 ml Lysis II και ισχυρή ανακίνηση.
8. Προσθήκη 50μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml).
9. Προσθήκη 150μl SDS 20% και ήπια ανάδευση.
10. Επώαση στους 56° C σε υδατόλουτρο.

Ημέρα 2^η

1. Μεταφορά διαλύματος σε σωλήνα falcon 15ml.
2. Προσθήκη 1ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.

3. Φυγοκέντρωση (10min, 3000rpm). Με την φυγοκέντρωση παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
4. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντρωση (10min, 3000rpm).
5. Μεταφορά υπερκείμενου σε σωλήνα falcon 50ml.
6. Προσθήκη 2,5 φορές του όγκου σε αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα Pasteur, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με θέρμανση.
8. Πλύσιμο του DNA (εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη) και στέγνωμα (20 min). Το επιπλέον βήμα καθαρισμού με αιθανόλη χρειάζεται για την απομάκρυνση άλατος που έχει καταβυθιστεί με την αιθανόλη.
9. Μεταφορά DNA σε σωλήνα erpendorf που περιέχει 0,5ml διαλύματος TE.
10. Διαλυτοποίηση DNA σε roller bench και αποθήκευση (4°C).

Βιοχημικές παράμετροι

Στον ορό των δειγμάτων πραγματοποιείται βιοχημικός έλεγχος σε αυτόματο βιοχημικό αναλυτή που περιλαμβάνει: γλυκόζη νηστείας (Glu), ολική χοληστερόλη (TC), HDL-C και τριγλυκερίδια (TG). Τα επίπεδα LDL-C υπολογίζονται από την εξίσωση Friedewald (44).

Στον ορό των 175 ατόμων του δείγματος πραγματοποιείται μέτρηση της οξειδωμένης LDL-C (oxLDL-C) με την ανοσοενζυματική μέθοδο (ELISA).

Μέτρηση oxLDL-C με ανοσοενζυματική μέθοδο ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Η ανοσοενζυματική μέθοδος είναι μία βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενός αντιγόνου ή αντισώματος σε ένα δείγμα. Χρησιμοποιεί δύο αντισώματα, ένα ειδικό για το αντιγόνο και ένα αντίσωμα συζευγμένο σε ένζυμο. Η ανοσοενζυματική μέθοδος χρησιμοποιείται ευρέως στην ανοσολογία. Υπάρχουν διάφορες παραλλαγές της μεθόδου: άμεση, έμμεση, συζευγμένη, που μπορεί να είναι ανταγωνιστικές ή ανασταλτικές.

Στην παρούσα μελέτη το kit της ELISA για oxLDL της Mercodia είναι μία στερεής φάσης συζευγμένη ανοσοενζυμική μέθοδος. Βασίζεται στην τεχνική της άμεσης προσκόλλησης στην οποία δύο μονοκλωνικά αντισώματα κατευθύνονται κατά των ξεχωριστών αντιγονικών παραγόντων στο μόριο της οξειδωμένης απολιποπρωτεΐνης Β. Κατά τη διάρκεια της επώασης η oxLDL στο δείγμα αντιδρά με τα αντι-oxLDL αντισώματα που είναι δεσμευμένα μέσα στο «πηγάδι» προκαθορισμένης πυκνότητας. Μετά από το πλύσιμο, με το οποίο απομακρύνονται τα συστατικά του αίματος που δεν έχουν πάρει μέρος στην αντίδραση, μία υπεροξειδάση συζευγμένη με ανθρώπινο αντίσωμα αντι-απολιποπρωτεΐνης Β αναγνωρίζει την οξειδωμένη LDL που είναι δεσμευμένη πάνω στη στερεή φάση. Μετά τη δεύτερη επώαση και ένα βήμα απλού πλυσίματος που απομακρύνει τα μη δεσμευμένα αντισώματα που δεν είναι επισημασμένα με ένζυμο, ο συζευγμένος δεσμός ανιχνεύεται από την αντίδραση με 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). Η αντίδραση σταματάει με την προσθήκη οξέως που δίνει ένα χρωματομετρικό τελικό σημείο και έπειτα διαβάζεται με φασματοφωτομετρία στα 450nm.

Για την εφαρμογή της μεθόδου ELISA στην μέτρηση των επιπέδων oxLDL-C χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια (Mercodia oxLDL ELISA enzyme immunoassay kit):

- ✓ Πλάκα 96 «πηγαδιών» επικαλυμμένων με το αντίσωμα. Χρησιμοποιούνται 3 πλάκες. Τα «πηγάδια των πλακών έχουν σταθερά συνδεδεμένα στη βάση τους μονοκλωνικά αντισώματα αντι-oxLDL (ποντικίου). Οι πλάκες αποθηκεύονται στους 4°C.

- ✓ Διαλύματα αναφοράς oxLDL (calibrators). Χρησιμοποιούνται 6 διαλύματα oxLDL γνωστής συγκέντρωσης (0,000mU/l, 1.8mU/l, 3.6mU/l, 6.7mU/l, 14mU/l, 28mU/l). Προμηθεύονται σε λυοφιλιωμένη μορφή και αποθηκεύονται στους 4°C.
- ✓ Διαλύτης δειγμάτων oxLDL
- ✓ Αντιδραστήριο ενζυμικής σύνδεσης της oxLDL.
- ✓ Αντιδραστήριο TMB. Περιέχει το ένζυμο 3,3',5,5'-τετραμεθυλβενζιδίνη. Αποθηκεύεται στους 4°C.
- ✓ Το διάλυμα λήξης (stop solution). Περιέχει HCL 1N. Αποθηκεύεται στους 4°C.

Η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει:

1. Οι πλάκες και τα αντιδραστήρια θα πρέπει να βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν τη χρήση.

Γενετικές παράμετροι

Στην παρούσα μελέτη ερευνάτε ο πολυμορφισμός Ala16Val στο γονίδιο του MnSOD. Για την ανίχνευση του πολυμορφισμού στα δείγματα DNA των εθελοντών της έρευνας χρησιμοποιούνται οι μέθοδοι της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και της πέψης με περιοριστική ενδονουκλεάση.

Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολουθεί η εφαρμογή της μεθόδου PC (45), η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει τη γρήγορη ανάλυση περιοχών του DNA που περιέχονται σε ένα πολύ μικρό δείγμα. Πρόκειται για την αντίδραση πολυμερισμού, η οποία μιμείται in vitro

τον τρόπο με τον οποίο τα ένζυμα του πυρήνα (DNA πολυμεράσες) αντιγράφουν το DNA του κυττάρου.

Η εφαρμογή της μεθόδου προϋποθέτει να είναι γνωστή η νουκλεοτιδική αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία αυτή χρησιμοποιείται για το σχεδιασμό δύο συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, ενός συμπληρωματικού προς το 3' άκρο της μίας αλυσίδας του DNA και ενός συμπληρωματικού προς το 5' άκρο της άλλης αλυσίδας. Τα ολιγονουκλεοτίδια αυτά μήκους 20-30 βάσεων χρησιμοποιούνται ως πρωταρχικά τμήματα (εκκινητές-primers) για *in vitro* σύνθεση DNA και οριοθετούν τα άκρα του τελικού προϊόντος. Παρουσία περίσσιας τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), ιόντων μαγνησίου και της κατάλληλης DNA πολυμεράσης επιτυγχάνεται η αντίδραση πολυμερισμού. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για τον πολυμερισμό είναι η Taq πολυμεράση, η οποία απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στις υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 27° C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95° C.

Η τεχνική περιλαμβάνει την κυκλική επανάληψη τριών αντιδράσεων:

1. Αποδιάταξη (template denaturation). Το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται σε μονόκλωνες αλυσίδες σε υψηλή θερμοκρασία (94-96° C).
2. Σύνδεση εκκινητών (primer annealing). Οι δύο εκκινητές συνδέονται με τις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες που βρίσκονται στις δύο αλυσίδες του DNA. Η σύνδεση αυτή πραγματοποιείται σε θερμοκρασία που εξαρτάται αποκλειστικά από την αλληλουχία των εκκινητών.
3. Επιμήκυνση (primer extension). Στο στάδιο αυτό γίνεται σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών κατά την 5'-3' κατεύθυνση, χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτίδια που βρίσκονται στο διάλυμα έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η

αντίδραση πολυμερισμού καταλύετε από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72° C.

4. Οι νεοσυντηθέμενες αλυσίδες, επανυβριδίζονται με τους εκκινητές και ο κύκλος αυτός επαναλαμβάνεται 25-35 φορές.

Το κύριο προϊόν της εκθετικής αυτής αντίδρασης είναι ένα δίκλωνο τμήμα DNA του οποίου τα άκρα ορίζονται από τα 5' άκρα των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στη συνέχεια για τη μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε.

Για την εφαρμογή της μεθόδου PCR στον υποκινητή του γονιδίου της oxLDL χρησιμοποιούνται strips (PCR –Ready High Specificity, Syntezza). Κάθε kit περιέχει:

- ✓ DNA taq πολυμεράση
- ✓ μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs)
- ✓ PCR buffer που περιέχει Tris-HCL (pH 8,3) και KCL
- ✓ MgCL₂ 1,5mM
- ✓ Ζελέ φόρτωσης με χρωστική ουσία

Στα strips προσθήκετε επίσης διάλυμα (master mix) το οποίο περιέχει:

- ✓ **Εκκινητές:** Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) με αλληλουχία 5'-CCA GCA GGC AGC TGG CAC CG-3' προμηθεύεται σε ξηρή μορφή και προσθέτονται 783μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100pmol/μl. (stock solution). Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) έχει την αλληλουχία 5'-TCC AGG GCG CCG TAG TCG TAG G-3' προμηθεύεται σε ξηρή μορφή και προσθέτονται 670μl

απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100pmol/μl. (stock solution). Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάζονται νέα διαλύματα με αραίωση 1:8 (working solutions: 25μl stock + 175μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιούνται στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων είναι 12,5pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία -20 °C.

✓ **Απιονισμένο και αποστειρωμένο νερό.**

Η διαδικασία που ακολουθείτε περιλαμβάνει:

1. Παρασκευή του master mix. Σε αποστειρωμένο eppendorf 1,5ml προσθέτονται για κάθε δείγμα 0,2μl αριστερού εκκινητή, 0,2μl δεξιού εκκινητή, 13,4μl απεσταγμένου και αποστειρωμένου νερού. Αφού παρασκευαστεί το μείγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείτε σε πάγο.
2. Το μείγμα χωρίζεται στα strips στα οποία τοποθετούνται 13,8 μl από το μείγμα και 0,2μl DNA από το κάθε δείγμα. Αναδεύουμε ελαφρά τα strips ώστε να αναμιχθεί το μείγμα με το DNA και να μην υπάρχουν φυσαλίδες.
3. Τα strips μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείτε το πρόγραμμα:

SOD PROMOTOR:

Βήμα 1° : 94 °C για 10 min

Βήμα 2° : 94 °C για 1 min

Βήμα 3° : 63 °C για 1 min 37 cycles

Βήμα 4° : 72 °C για 1 min

Βήμα 5° : 72 °C για 1 min

Βήμα 6^ο : 4 °C αποθήκευση

Έλεγχος επιτυχίας PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Η ηλεκτροφοριστική κινητικότητα του DNA στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ουδέτερο pH το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο. Επομένως αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην κάθοδο (-), θα μετακινηθούν προς την άνοδο(+). Η ηλεκτροφοριστική ικανότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους των κλασμάτων DNA που ηλεκτροφορούνται και αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του πηκτώματος. Σημειώνεται τέλος ότι χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 2% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 Kb.

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 1% και ηλεκτροφόρηση.

1. Προσθήκη 1gr αγαρόζης και 50ml διαλύματος TBE 0,5× (Tris Borate Acid) σε κωνική φιάλη.
2. Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
3. Προσθήκη 2μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (EtBr) αφού κρυώσει το διάλυμα και ανάδευση. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο περιλαμβάνει ένα οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλεται μεταξύ βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-336 nm. Το αντιδραστήριο είναι καρκινογόνο.

4. Τοποθέτηση των ειδικών «χτενών» στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής (για τη δημιουργία «πηγαδιών» στο πήκτωμα της αγαρόζης και προσθήκη του διαλύματος αγαρόζης στο εκμαγείο.
5. Το διάλυμα αφήνεται να πήξει (10min) και αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι χτένες και προστίθεται στο δοχείο της ηλεκτροφόρησης ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0,5x μέχρι την ένδειξη της ηλεκτροφορητικής συσκευής (fill line), ώστε να καλύπτεται πλήρως το πήκτωμα.
6. Μεταφορά 4μl κάθε δείγματος σε ένα από τα «πηγάδια» του πηκτώματος.
7. Μεταφορά 5μl «μάρτυρα»(ladder) σε ένα «πηγάδι» του πηκτώματος.
8. Σύνδεση της ηλεκτροφορητικής συσκευής με το τροφοδοτικό και ηλεκτροφόρηση στα 120V για περίπου 10 λεπτά.
9. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μία ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το κομμάτι του DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Το μήκος του κομματιού ελέγχετε σε σύγκριση με τον «μάρτυρα», οπότε και ελέγχεται η επιτυχία της PCR.

Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, ενώ λέγονται περιοριστικές επειδή η δραστηριότητα τους περιορίζεται σε «ξένο» DNA. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές δίκλωνες αλληλουχίες DNA και κόβουν το μόριο μέσα ή κοντά στην αλληλουχία αναγνώρισης. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες (διαβάζονται το

ίδιο και από τις δύο κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του DNA). Τα τμήματα του DNA που παράγονται από την πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα (sticky ends), είτε όχι (blunt ends). Η συχνότητα και η θέση ανεύρεσης των αλληλουχιών αναγνώρισης οποιασδήποτε περιοριστικής ενδονουκλεάσης μέσα σε ένα μόριο DNA, εξαρτάται από την ακριβή αλληλουχία του δείγματος που εξετάζεται. Οι ιδιότητες των περιοριστικών ενδονουκλεασών μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την χαρτογράφηση ενός συγκεκριμένου μορίου DNA, με βάση τον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης, αλλά και τη διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμα και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα (46).

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στη θερμοκρασία επώασης και στη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στη σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπαράγοντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+} . Τα συστατικά διαλυμάτων επώασης πρέπει να είναι καθαρά και απαλλαγμένα από νουκλεάσες. Οι σουλφιδριλικοί παράγοντες (β-μερκαπτοαιθανόλη, DTT κ.α.) που προστίθενται αποσκοπούν στην αναστολή των νουκλεασών που ενδεχομένως συνυπάρχουν. Η προσθήκη BSA (αλβουμίνη ορού βοός) στην αντίδραση επώασης προφυλάσσει το ένζυμο πρωτεάσες και άλλους παράγοντες, ωστόσο η προσθήκη ή όχι BSA καθορίζεται από το ένζυμο. Το DNA που χρησιμοποιείται πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις (όπως EDTA, SDS, φαινόλη, βρωμιούχο αιθίδιο) που μπορεί να παρεμποδίζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους -20 °C μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (45).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται το ένζυμο Age 1. Για την πέψη καθενός από τα δείγματα με το ένζυμο χρησιμοποιούνται τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

✓ Buffer: 1μl

- ✓ Ένζυμο: 0,3μl
- ✓ Απεσταγμένο νερό: ως 10μl
- ✓ PCR product: 4μl

Η διαδικασία που ακολουθείτε περιλαμβάνει:

1. Παρασκευή του μείγματος του αντιδραστηρίου: Σε αποστειρωμένο errendorf 1,5ml προσθέτονται για κάθε δείγμα 0,3μl του ενζύμου Age 1, 1μl buffer και 4,7μl απεσταγμένου νερού.
2. Το μείγμα της πέψης χωρίζετε σε αποστειρωμένα errendorf των 0,5ml όσα και τα δείγματα και 4μl προϊόντος PCR. Τα errendorf τοποθετούνται στη φυγόκεντρο (έως 8000rpm για λίγα δευτερόλεπτα – short spin) ώστε να αναμιχθεί το διάλυμα επώασης του ενζύμου με το προϊόν της PCR.
3. Τα errendorf τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37 °C για 12 ώρες.

Έλεγχος προϊόντος πέψης

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3,5%.

Προετοιμασία πηκτώματος αγαρόζης 3,5% και ηλεκτροφόρηση.

Ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με τον έλεγχο επιτυχίας της PCR. Οι μόνες διαφοροποιήσεις είναι:

1. Προσθήκη 3,5% αγαρόζης και 100ml TBE 0,5× (Tris Borate Acid) σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 4 μl EtBr.
3. Το διάλυμα αφήνετε να πήξει για 20 λεπτά.
4. Ηλεκτροφόρηση στα 120V για περίπου 30 λεπτά.

5. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται παρατήρηση του πηκτώματος στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα δύο αλληλόμορφα. Τα κομμάτια του DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με το μάρτυρα και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό σε κάθε δείγμα.

Διαλύματα

✓ **Πρωτεϊνάση K**

60mg πρωτεϊνάση K

3,15ml proteinase buffer

Ανάδευση σε vortex

Αποθήκευση στους 4 °C

✓ **Διάλυμα BQ2**

20ml BQ2 buffer

80ml αιθανόλη

✓ **Tris Borate Acid 5× (TBE 5×)**

54gr tris Base

27,5gr Boric Acid

20ml EDTA 0,5M

Προσθήκη 800ml απεσταγμένου νερού

Ανάδευση

Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt

✓ **Tris Borate Acid 1× (TBE 1×)**

200ml TBE 5×

Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=1lt

Ανάδευση

✓ **Βρωμιούχο αιθίδιο (10mg/ml)**

10mg EtBr

1ml αποστειρωμένο νερό

Ανάδευση σε vortex

Φύλαξη στους 4 °C

Στατιστική Επεξεργασία

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 11.5. Οι συνεχείς μεταβλητές εκφράζονται ως μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση ($MS \pm SD$), ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές ως απόλυτη τιμή ή/και ποσοστό (%). Η κανονική κατανομή ελέγχθηκε για όλες τις συνεχείς μεταβλητές με το τεστ Kolmogorov-Smirnov. Οι τιμές της oxLDL μετατράπηκαν σε λογαριθμική μορφή για να εξασφαλιστεί η κανονικότητα. Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν με τον έλεγχο χ^2 . Οι συγκρίσεις ανάμεσα σε κατηγορικές και συνεχείς μεταβλητές πραγματοποιήθηκαν με t-test, ANOVA και ANCOVA όταν εξασφαλιζόταν η κανονικότητα και με Mann-Whitney και Kruskal-Wallis test όταν οι κατανομές δεν ήταν κανονικές. Για τον έλεγχο συσχετίσεων χρησιμοποιήθηκαν οι συντελεστές Pearson. Η κατανομή του πολυμορφισμού του SOD στον πληθυσμό συγκρίθηκε με την αναμενόμενη συχνότητα, από την εξίσωση Hardy-Weinberg (HWE). Οι αποκλίσεις από το HWE ελέγχεται με Pearson chi-squared test στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν οι συχνότητες των γονότυπων που βρέθηκαν από τα δεδομένα και οι αναμενόμενες συχνότητες των γονότυπων

που βρέθηκαν από το HWE. Η επίδραση του πολυμορφισμού και της διατροφής, στα επίπεδα της oxLDL εκτιμήθηκε με πολλαπλή παλινδρόμηση. Όλοι οι έλεγχοι πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

Μεσογειακό σκορ

Μία διαιτητική πυραμίδα έχει σχεδιαστεί για να περιγράψει το μεσογειακό διατροφικό μοντέλο. Σύμφωνα με αυτό το διατροφικό μοντέλο υπολογίσαμε για κάθε ασθενή ένα ειδικό διατροφικό σκορ (εύρος: 0-55), όπως περιγράφετε αλλού (35). Συνοπτικά, για την κατανάλωση προϊόντων που θεωρούνται ότι είναι κοντά σε αυτό το μοντέλο (μη ραφινάρισμα δημητριακά, φρούτα λαχανικά, πατάτες, όσπρια, ψάρι και ελαιόλαδο), υπολογίσαμε ένα σκορ 0 για καθόλου κατανάλωση και σκορ από 1 έως 5 για σπάνια έως ημερήσια κατανάλωση. Από την άλλη, για τρόφιμα τα οποία θεωρούνται ότι είναι μακριά από την μεσογειακή διατροφή (κόκκινο κρέας και προϊόντα κόκκινου κρέατος, πουλερικά, πλήρη γαλακτοκομικά προϊόντα), υπολογίσαμε τα αντίθετα σκορ (π.χ. 0 όταν ο εθελοντής αναφέρει ότι καταναλώνει καθημερινά και 5 για σπάνια ή καθόλου κατανάλωση). Για το αλκοόλ υπολογίσαμε σκορ από 5 κατανάλωση από < 300ml/ημέρα, σκορ από 0 για κατανάλωση για περισσότερο από 700ml/ ημέρα και σκορ από 4 έως 1 για κατανάλωση από 300, 400, 500 και 600 ml/ημέρα (το οποίο περιέχει 12γρ. αιθανόλης ανά 100ml).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού Ala16Val στο γονίδιο SOD και η επίδραση που έχει στα επίπεδα oxLDL-C, σε δείγμα 175 υπερήλικων ατόμων. Το 49,7% του δείγματος αποτελούνταν από άντρες και το 50,3% από γυναίκες. Η μέση ηλικία του δείγματος είναι τα 80,2 έτη. Οι μέσες τιμές του δείκτη μάζας σώματος, της αρτηριακής πίεσης, των βιοχημικών αναλύσεων του ορού και

του μεσογειακού σκορ φαίνονται στον πίνακα 1, σαν μέση τιμή $\pm$ τυπική απόκλιση. Η συχνότητα των αλληλομόρφων, όπως φαίνεται και στον πίνακα 2 είναι 0,53 για την ala και 0,47 για τη val. Η συχνότητα των αλληλομόρφων είναι αποδεκτή κατά την εξίσωση των Hardy-Wenberg (HWE) ($\chi^2=1,411$ $p=0,494$). Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται τα ανθρωπομετρικά, κλινικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά του δείγματος ανάλογα με το γονότυπο ala16val του SOD. Οι ηλικιωμένες με γονότυπο ala/ala ή ala/val φαίνετε να έχουν υψηλότερα επίπεδα oxLDL και μικρότερο λόγο ολικής προς οξειδωμένη LDL-C, αν τις συγκρίνουμε με τον val/val γονότυπο ($86,5\pm26,6$ vs $74,2\pm22,1$ mg/dl, $P=0,042$ για την oxLDL, $2,9\pm0,7$ vs $3,2\pm0,8$, $P=0,029$ για τον λόγο ολικής χοληστερόλης/ oxLDL). Επίσης τόσο οι άντρες όσο και οι γυναίκες με ala/ala ή ala/val γονότυπο φαίνεται να έχουν υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων σε σχέση με τα άτομα του val/val γονότυπου ($147,8\pm72,4$ vs $103,7\pm38$ mg/dl, $P=0,002$ και $145,2\pm68,7$ vs $114,3\pm34,3$ mg/dl, $P=0,027$, για άντρες και γυναίκες αντίστοιχα). Η γραμμική πολλαπλή παλινδρόμηση που φαίνεται στον πίνακα 4 και στρωματοποιείται ανάλογα με το φύλο και έχει συμμεταβλητές την ηλικία, το δείκτη μάζας σώματος, το μεσογειακό σκορ και τις καπνιστικές συνήθειες μας επιβεβαιώνει το αποτέλεσμα που έχει η ηλικία των ατόμων με Val/Val γονότυπο στα επίπεδα της ox-LDL-C (standardized β coefficient = -0,271, $P=0,010$ για τις ηλικιωμένες γυναίκες, standardized β coefficient = -0,210, $P=0,050$ για τους ηλικιωμένους άντρες).

Πίνακας 1: Γενικά χαρακτηριστικά του δείγματος.

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	
N	175
Δημογραφικά χαρακτηριστικά	
Φύλο (Άντρες/ γυναίκες)	87/88
Ηλικία (M $\pm$ SD) (έτη)	80,2 $\pm$ 4,4

Καπνιστές (%)	10,9
Κλινικά Χαρακτηριστικά	
Δείκτης μάζας σώματος (M±SD) (kg/m ²)	28,9±4,09
Συστολική αρτηριακή πίεση (M±SD) (mmHg)	146,9±19,7
Διαστολική αρτηριακή πίεση (M±SD) (mmHg)	78,0±11,1
Ολική χοληστερόλη (M±SD) (mg/dl)	227,9±38,1
Γλυκόζη νηστείας (M±SD) (mg/dl)	104,8±28,5
Τριγλυκερίδια (M±SD) (mg/dl)	136,3±64,9
HDL-C (M±SD) (mg/dl)	54,4±11,7
LDL-C (M±SD) (mg/dl)	146,2±34,3
Οξειδωμένη LDL-C (M±SD) (U/l)	81,1±23,7
Μεσογειακό σκορ (M±SD)	29,3±3,3

Πίνακας 2: Συχνότητα εμφάνισης γονότυπων και αλληλομόρφων.

	ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ				ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΑ	
	Ala/ala	Ala/val	Val/val	ΣΥΝΟΛΟ	Ala	val
N	57	70	48	175	184	166
(%)	(32,6)	(40,0)	(27,4)	(100)	(52,57)	(47,43)

Πίνακας 3: Χαρακτηριστικά των συμμετεχόντων ανά γονότυπο για την μετάλλαξη Ala16Val του γονιδίου SOD.

	Γυναίκες			Άντρες		
	Ala/ala, ala/val	Val/val	<i>P</i>	Ala/ala, ala/val	Val/val	<i>P</i>
N	62	26		65	22	
Ηλικία (έτη)	80,5±4,4	78,3±3,5	0,023	80,7±4,3	80,3±5,3	0,750
Δείκτης Μάζας Σώματος (M±SD) (kg/m²)	29,3±4,3	30,1±4,6	0,454	28,1±3,6	28,7±4,0	0,553
Συστολική αρτηριακή πίεση (M±SD) (mmHg)	147,0±21,4	139,2±20,9	0,147	150,6±17,1	143,6±18,0	0,128
Διαστολική αρτηριακή πίεση (M±SD) (mmHg)	76,7±10,8	79,1±12	0,384	79,1±10,7	77,5±12,5	0,585
Ολική χοληστερόλη (M±SD) (mg/dl)	235,1±34,5	226,5±40,8	0,321	227,4±36,4	210,8±45,8	0,087
HDL-C (M±SD) (mg/dl)	55,5±12,4	60,1±12,3	0,112	52,3±10,7	51,1±9,0	0,646
LDL-C (M±SD) (mg/dl)	150,6±32,5	143,5±39,2	0,389	145,5±32,4	138,9±38,9	0,434

Τριγλυκερίδια (M±SD) (mg/dl)	145,2±68,7	114,3±34,3	0,027	147,8±72,4	103,7±38,0	0,002
Οξειδωμένη LDL-C (M±SD) (U/l)	86,5±26,6	74,2±22,1	0,042	81,3±21,8	73,1±19,1	0,119
Ολική χοληστερόλη/ oxLDL-C	2,9±0,7	3,2±0,8	0,029	2,9±0,7	3,0±0,5	0,817
Γλυκόζη νηστείας (M±SD) (mg/dl)	104,2±29,0	95,0±12,9	0,127	110,2±33,6	102,0±20,7	0,288
Καπνιστές (%)	8,1	11,5	0,689	15,4	4,5	0,277
Μεσογειακό σκορ (M±SD)	29,5±3,0	29,6±3,0	0,841	30,1±3,5	31,3±3,2	0,128

Πίνακας 4: Αποτελέσματα του μοντέλου απλής γραμμικής παλινδρόμησης που επηρέασαν τη σχέση ανάμεσα στις συγκεντρώσεις oxLDL-C και το γονότυπο του SOD σταθμισμένα ανά φύλο.

	Γυναίκες		Άντρες	
Μεταβλητή	Standardized β coefficient	<i>P</i>	Standardized β coefficient	<i>P</i>
Val/val vs ala/ala, ala/val	-0,271	0,010	-0,210	0,050

Ηλικία (έτη)	-0,144	0,174	-0,362	0,001
ΔΜΣ (kg/m²)	0,066	0,521	-0,105	0,333
Μη καπνιστές vs καπνιστές	-0,040	0,692	0,103	0,341
Μεσογειακό σκορ	0,327	0,002	0,132	0,217
Adjusted R²	14,8%	0,003	14,7%	0,022

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτή τη μελέτη μελετήσαμε την επίδραση του πολυμορφισμού Ala16Val στο γονίδιο του SOD στα επίπεδα της oxLDL σε μια ομάδα υπερηλίκων. Η συχνότητα των αλληλομόρφων που βρέθηκε σε αυτό τον πληθυσμό είναι αντιστρόφως κατανομημένη, συγκρινόμενη με ασιατικούς πληθυσμούς (παρούσα μελέτη: ala 0,54 και val 0,46, υγιείς κινέζοι ala 0,13 και val 0,87, υγιείς κορεάτες ala 0,12 και val 0,88).(61,62) Από την άλλη η μελέτη είναι παρόμοια με τους άλλους καυκάσιους πληθυσμούς, όπως οι τούρκοι (48)και οι βραζιλιάνοι(49).

Καθώς το οξειδωτικό στρες θεωρείται ότι παίζει σημαντικό ρόλο στις αλλαγές που σχετίζονται με το γήρας, είναι πιθανό ότι τα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι σημαντικοί παράγοντες αντιγήρανσης. Παραδόξως ο πολυμορφισμός που ανιχνεύσαμε φαίνεται να έχει ένα αντίθετο αποτέλεσμα στα επίπεδα της oxLDL.

Στους ηλικιωμένους άντρες και γυναίκες, ο Val/Val γονότυπος σχετίζεται με ελαττωμένα επίπεδα oxLDL –C, καθώς επίσης και τριγλυκεριδίων. Η θετική σχέση των τριγλυκεριδίων με τα επίπεδα της oxLDL που παρατηρείτε στους ηλικιωμένους έχει ήδη δειχθεί σε άτομα μέσης ηλικίας

(50). Είναι καλά τεκμηριωμένο ότι τα υψηλότερα επίπεδα τριγλυκεριδίων στο πλάσμα, ενισχύουν την παραγωγή μικρών και πυκνών μορίων LDL, τα οποία όπως γνωρίζουμε είναι πιο εύκολο να οξειδωθούν (51). Τα δεδομένα από τη μελέτη MESA (Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis) προτείνουν ότι, η δυσλιπιδαιμία (διαταραχή επιπέδων χοληστερόλης, τριγλυκεριδίων, HDL-χοληστερόλης), οι δείκτες φλεγμονής (αυξημένο ινωδογόνο), το ανδρικό φύλο, η εθνικότητα (μαύρη φυλή) και το κάπνισμα, μπορούν να εξηγήσουν την μεγαλύτερη διακύμανση στο μοντέλο της πολυπαραγοντικής ανάλυσης (52). Οι ίδιοι ερευνητές προτείνουν ότι η oxLDL –C είναι ένα προφλεγμονώδες ερέθισμα, το οποίο παρεμποδίζει την παραγωγή του αντιοξειδωτικού ενζύμου SOD 1 (52). Τα αποτελέσματα από την μεγάλη ευρωπαϊκή μελέτη των ηλικιωμένων Zincage (53) προτείνουν ότι η δραστικότητα του SOD των ερυθροκυττάρων (eSOD) αυξάνεται σταδιακά και σημαντικά με την ηλικία, καθώς οι γυναίκες εκδηλώνουν υψηλότερη δραστικότητα του eSOD συγκρινόμενες με τους άντρες σε όλες τις ηλικίες. Προηγούμενα αποτελέσματα που αναφέρουν τη δραστικότητα του RBC SOD, του GPX στο πλάσμα και του σε μικρότερη έκταση SOD στο πλάσμα, είναι αντιφατικά. Μερικοί μελετητές ισχυρίζονται ότι υπάρχει μία αύξηση από τις μικρότερες ηλικίες στις μεγαλύτερες, η οποία σχετίζεται με παράλληλη αύξηση των ελευθέρων ριζών (54,55). Εντούτοις μία διασταυρούμενη μελέτη που έγινε σε 41 Δανούς αιωνόβιους και 52 άτομα που ήταν στην ομάδα ελέγχου, η δραστικότητα του Cu/Zn SOD ελαττώθηκε στην ομάδα των αιωνόβιων (56). Στο πλαίσιο της ενδογενούς αντιοξειδωτικής άμυνας, οι επιπλέον ποσότητες ελευθέρων ριζών οδηγούν σε εξάντληση των προστατευτικών GSH και SOD (57). Τα πολύ ηλικιωμένα άτομα, αντιπροσωπεύουν μία εκλεκτή ομάδα επιτυχώς γερασμένων ατόμων. Έχουν προφανώς γλιτώσει από τις κύριες, σχετιζόμενες με το γήρας, ασθένειες και παρουσιάζουν ιδιαίτερα ανοσολογικά και μεταβολικά χαρακτηριστικά (58). Σε διάφορες μελέτες που περιλαμβάνουν ηλικιωμένους και νέους, μερικοί ερευνητές, παρατήρησαν θετική σχέση μεταξύ της ηλικίας και της αυξημένης οξειδωσης της LDL-C και ελαττωμένα αντισώματα oxLDL-C (59), ενώ άλλες δεν έχουν δείξει αποτελέσματα (60). Αυτά τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορούν να αποδοθούν στα διαφορετικά μεγέθη των πληθυσμών.

Δεν έχουμε πολλά στοιχεία για τον κύριο μηχανισμό με τον οποίο μπορούμε να εξηγήσουμε το αντίθετο αποτέλεσμα του πολυμορφισμού του SOD στα επίπεδα της oxLDL-C στις ηλικιωμένες γυναίκες. Αν η μείωση στη δραστηριότητα του SOD όπως αναφέρθηκε, παρουσιάζεται περισσότερο σε φορείς του Ala αλληλομόρφου, αυτό μπορεί εν μέρη να εξηγεί τα υψηλότερα επίπεδα oxLDL-C σε αυτά τα άτομα. Σύμφωνα με αυτήν την υπόθεση είναι και τα αποτελέσματα μιας πρόσφατης μελέτης, που υποδεικνύει ότι στους ηλικιωμένους ο ala/ala γονότυπος σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο, εικόνα ανοσογήρανσης και καταστροφή του DNA (61). Η προτεινόμενη υπόθεση για αυτά τα αποτελέσματα από τους ερευνητές βασίζεται στη θεωρία των ελευθέρων ριζών για το γήρας. Συνοπτικά προτείνεται ότι οι φορείς του ala αλληλομόρφου μπορούν να παράγουν αποτελεσματικά SOD και έτσι παρουσιάζουν ισχυρή βασική ανοσία στην μέση ηλικία αλλά αυξημένη ανοσογήρανση αργότερα στη ζωή τους.

Πολλές μελέτες σε αυτόν τον πληθυσμό καθώς επίσης και μελέτες άλλων γονιδίων που μπορούν να επηρεάσουν τα επίπεδα της oxLDL-C, θα προσθέσουν νέα στοιχεία για τα ποικίλα επίπεδα oxLDL-C που σχετίζονται με την ηλικία και για τους πιθανούς προδιαθεσικούς παράγοντες.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

1. Christos Pitsavos, Demosthenis Panagiotakos, Antonia Trichopoulou, Christina Chrysohoou, George Dedoussis, Yannis Chlopsios, Despoina Choumerianou, Christodoulos Stefanidis. Interaction between Mediterranean diet and methylenetetrahydrofolate reductase C677T mut. 2008;40:27-34 lipoprotein concentrations: The ATTICA study. Nutrition metabolism and cardiovascular diseases 2006;16:91-99
2. Maria Gottlieb, Carla Schwanke, Andriana Sation on oxidized low destinyntos, Paulo Jobim, Denise Mussel, Ivana Cruz. Association among oxidized LDL levels, MnSOD,

- apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in south brazilian region population. *Genetics and molecular research* 2005;4:691-703.
3. Angela Sutton, Hania Khoury, Carina Prip-Buus, Claud Cepanec, Dominique Pessayre, Francoise Degoul. The ala16val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 2003; 13:145-157
 4. Angela Sutton, Audrey Imbert, Anissa Igoudjil, Veronique Descatoire, Sophie Cazanave, Dominique Pessayre, Francoise Degoul. The manganese superoxide dismutase ala16val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenetics and genomics* 2005; 15:311-319
 5. Xiang Fang Neal Weintrib, David Rios, David Chapell, Ralf Zwacka, John Engelhardt, Larry Oberley, Tao Yan, Donald Heistad, Arthur Spector. Overexpression of human Superoxide dismutase inhibits oxidation of low density lipoprotein by endothelial cells. *Circulation research* 1998; 82:1289-1297
 6. Victor Manuel, Mendoza-Nunez, Mirna Ruiz-Rumos, Martha Sanchez-Rodriguez, Raquel Retana-Ugalde, Jose Luis Munoz-Sanchez. Aging –related oxidative stress in healthy humans. *Tohoku University Medical Press* 2007; 213:261-268
 7. Maurizio Battino, Maria Soledad Ferreiro. Ageing and Mediterranean diet: a review of the role of the dietary fats. *Public health nutrition* 2004; 7:953-958
 8. Yin-Ching Chan, Makoto Suzuki, Shigeru Yamamoto. A comparison of anthropometry, biochemical variables and plasma amino acids among centenarians, elderly and young

- subjects. *Journal of the American College of Nutrition* 1999; 18:358-365
9. George Dedoussis, Stavroura Kanoni, Demosthenis Panagiotakos, Eirini Louizou, Efi Grigoriou, Christina Chrysohoou, Christos Pitsavos, Christodoulos Stefanidis. Age-dependent dichotomous effect of superoxide dismutase Ala16Val polymorphism on oxidized LDL levels. *Experimental and molecular medicine*. 2008;40:27-34
 10. Valeria Cizewski Culotta, Mei Yang, Thomas O'Halloran. Activation superoxide dismutases: Putting the metal to the pedal. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1763: 747-758
 11. Kinscherf, Hans-Peter Deigner, Claus Usinger, Johannes Pill, Martin Wagner, Huse Kamencic et al. induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *The FASEB journal* 1997; 11 1317-1327
 12. Stavroura Kanoni, George Dedoussis. Design and descriptive characteristics of the GHRAS: the Greek Health Randomized Aging Study. *Med Sci Monit* 2008; 14: 204-212
 13. Hooman Allayee, Bradley Aouizerat, Rita Cantor, Geesje Dallinga-Thie, Ronald Krauss, Christopher Lanning, Jerome Rotter et al. Families with familial combined Hyperlipidemia and Families enriched for coronary artery disease share genetic determinants for atherogenic lipoprotein phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 1998; 63:577-585
 14. V. Sigurdardottir, B. Fagerberg, J. Huthe. Circulating oxidized low-density lipoprotein (LDL) is associated with risk factors of the metabolic syndrome and LDL size in clinically health 58-year-old men (air study). V. Sigurdardottir, B.

- Fagerberg, J. Hulthe. *Jurnal of internal medicine* 2002; 252: 440-447
15. Kinscherf Ralf, Hans-Peter Deigner, Claus Usinger, Johannes Pill, Martin Wagner, Huse Kamencic et al. Induction of mitochondrial manganese superoxide dismutase in macrophages by oxidized LDL: its relevance in atherosclerosis of humans and heritable hyperlipidemic rabbits. *FASEB J* 1997; 11: 1317-1328
 16. Christine Green, Tosca Zern, Richard Wood, Sudeep Shrestha et al. Maintenance of the LDL cholesterol: HDL Cholesterol ratio in an elderly population given a dietary cholesterol challenge. *J nutrition* 2005; 135: 2793-2798
 17. Kerstin Strehlow, Simone Rotter, Sven Wassman, Oliver Adam, Christian Grohe et al. Modulation of antioxidant Enzyme expression and fuction by estrogen. *Circ Res* 2003; 93: 170-177
 18. Demosthenes Panagiotakos, Christos, Yannis Skoumas, Yannis Lentzas, Labros Papadimitriou et al. Abdominal obesity, blood glucose and apolipoprotein B levels are the best predictors of the incidence of hypercholesterolemia (2001-2006) among healthy adults: the ATTICA Study. *Lipids in health and disease* 2008; 7:11
 19. Masuo Ohashi, Marchall Runge, Frank Faraci, Donald Heistad. MnSOD Deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE- deficient mice. *J of the American Heart Association* 2006; 26:2331-2336
 20. J. Walston, Q. Xue, R.D. Semba, L.Ferrucci, A.R. Cappola, M. Ricks, J. Guralnik, L.P. Fried. Serum antioxidants, inflammation, and total mortality in older women. *American journal of Epidemiology* 2006; 163:18-26

21. K. Wallenfeldt, B. Fagerberg, J. Wikstrand, J. Hulthe. Oxidized low-density lipoprotein in plasma in prognostic marker of subclinical atherosclerosis development in clinically healthy men. *Journal of internal medicine* 2004; 256:413-420
22. Laila Guemouri, Yves Artur, Bernard Herberth, Claude Jeandel, Gerard Cuny, Gerard Siest. Biological Variability of superoxide dismutase, Glutathione Peroxidase, and Catalase in blood. *Clin Chem* 1991; 37:1932-1937
23. Jose M. Ordovas. The quest for cardiovascular health in the genomic era: nutrigenetics and plasma lipoproteins. *Proceedings in nutrition Society* 2004; 63: 145-152
24. Di Renzo, Di Pierro, Bigioni M, Sodi V., Galvano F., Ciaci R, La Fauci L, De Lorenzo A. Is antioxidant plasma status in humans a consequence of the antioxidant food content influence? *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2007; 11:185-92
25. Mancini M, Parfitt VJ, Rubba P. Antioxidants in the Mediterranean diet. *Can J Cardiol* 1995; 105-109
26. Barbaste M., BerkeB, Dumas M, Soulet S, Delaunay JC et al. Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. *J Nutr Health Aging* 2002; 6:209-23
27. Fito M, Guxens M, Corella D, Saez G, et al. Effect of traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med* 2007; 167: 1195-203
28. Perez-jimenez, Lopez-Miranda, Mata. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis* 2002; 163: 405-7
29. Bastaki M, Huen K, Manzanillo P, Chande N, Chen C, Balmes JR, Tager IB, Holland N. Genotype-activity relationship for Mn-superoxide dismutase, glutathione

- peroxidase 1 catalase in humans. *Pharmacogenet Genomics* 2006; 16:279-86
30. Bolzan AD, Bianchi MS, Bianchi NO. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood: influence of sex, age, and cigarette smoking. *Clin Biochem* 1997; 30:449-54
31. Ho SP, Chan-Yeung M, Chow KK, Ip MS, Mak JC, Antioxidant enzyme activities in healthy Chinese adults: influence of age, gender and smoking. *Respirology* 2005; 10:305-9
32. Kakko S, Paivansalo M, Koistinen P et al. The signal sequence polymorphism of the MnSOD gene is associated with the degree of carotid atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2003; 168:147-52
33. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11:298-300
34. Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899:136-147
35. Panagiotakos DB, Pitsavos C, Arvanity F, Trichopoulos D. Mediterranean food pattern predicts the prevalence of hypertension, hypercholesterolemia, diabetes and obesity, among healthy adults; the accuracy of MedDietScore. *Prev Med* 2007; 44:335-40
36. Gariballa S.E. , Sinclair A.J. Nutrition, Aging and ill-health. *Br J Nutr* 1998; 80: 7-21
37. Mahan L.K., Escott-Stump S, Krause's food, nutrition and diet therapy, 10th ed. Philadelphia WB Saunders: 2000; 32:365-366

38. Steen B.A. "Healthy" lifestyle in old age and its relation to health and disease. *Age Ageing* 2003; 32:365-366.
39. Bamia C., Orfanos P., Ferrari P., Overvad K., Handborg H.H., Tjonneland A., Olsen A., Kesse E., Boutron-Ruault M.C., Clavel-Chapelon F., Nagel G., Boffetta P., Boeing H., Hoffman K., Trichopoulos D., Baibas N., Psaltopoulou T., Norat T., Slimani N., Palli D., Krogh V., Panico S., Tumino R., Sacerdote C., Bueno-de-Mesquita H.B., Ocke M.C., Peeters P.H., van Rossum C.T., Quiros J.R., Sanchez M.J., Navarro, Tricopoulou A. Dietary patterns among older Europeans: EPIC-Elderly study. *Br J Nutr.* 2005; 94(1): 100-13.
40. Costacou T., Bamia C., Ferrari P., Riboli E., Trichopoulos D., Tricopoulou A., Tracing the Mediterranean diet through principal components and cluster analyses in the Greek population. *Eur J Clin Nut* 2003; 57:1378-1385.
41. Tricopoulou A. Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Publ Health Nutr.* 2004;7:943-947
42. World health organization. Physical status: the use and interpretation of anthropometry. Report of a WHO expert committee. *Tech Rep Ser.* 1995; 854:1-452.
43. Joint National Committee, 2003. The seventh report of the Joint National Committee on detection, evaluation, and treatment of high blood pressure (JNC V), NIH Publication No. 035233.
44. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.

45. Λεκανίδου Ρ., Τσιπήλου Σ., Ροδάκης Γ., Εισαγωγή στη μοριακή βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών Τμήμα βιολογίας. 1998.
46. Φουντουλάκης Κ., Τσολάκη Μ., Χατζή Ε., Κάξης Α., Mini mental state examination (MMSE): Σταθμηση του στον ελληνικό πληθυσμό για ηλικιωμένους ασθενείς με άνοια. Εγκέφαλος. 1994; 31: 93-102
47. Δ. Παναγιωτάκος, Α. Ζαμπέλας, Ν. Παπαγεωργάκης, Λ. Ραλλίδης. Σημειώσεις διαλέξεων Μετεκπαιδευτικό πρόγραμμα σπουδών στην «Αθηροσκλήρωση». Ελληνική Εταιρία Λιπιδιολογίας και Αθηροσκλήρωσης 2006; 184-185.
48. Akyol O., Canatan H., Yilmaz HR, Yuce H. et al PCR/RFLP-based cost effective identification of SOD2 Signal sequence polymorphism (ala-9val) using NgMIV: a detailed methodological approach. Clin Chim Acta 2004;345:151-9.
49. Gottlieb MG, Schwanke CH, Santos AF, Jobim PF, Mussel DP, da Cruz IB. Association among oxLDL levels, MnSOD, apolipoprotein E polymorphisms, and cardiovascular risk factors in south brazilian region population. Genet Mol Res 2005;4:691-703.
50. Lapointe A., Couillard C, Pche ME., WeisnagSJ, Bergeron J, Nadeau A, Lemieux S. Circulatin oxidized LDL is associated with parametrs of the metabolic syndrome in post menopausal women. Atherosclerosis 2007; 191: 362-8.
51. Young IS, Mc Farlane C, McEneny J, Oxidative modification of triacylglycerol-rich lipoproteins. Biochem Soc Trans 2003; 31:1062-5
52. Holvoe P, Davey PC, De Keyzer D, Doukoure M, Derridder E, Bochaton –Piallat ML, Gabbiani G, Beaufort E, Bishay K, Andrieux N, Benhabiles N, Marguerie G. Oxidized LDL

- correlates positively with toll like receptor 2 and interferon regulatory factor -1 and inversely with superoxide dismutase-1 expression: studies in hypercholesterolemic swine and THP-1 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006a,b; 26:1558-65.
53. Mocceghiani E. Zing and aging: third zincage conference. *Immun aging* 2007; Sep4-5.
54. Meccoci P, Polidori MC, Troiano L, Cherubini A, Cecchetti R, Pini G, Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Francesci C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: a study on healthy centenarians. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:1243-8.
55. Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr* 2005; 81:223S-9S.
56. Andersen HR, Jeune B, NyboH, Nielsen JB, Andersen-RAnberg K, Grandjean P. Low activity of superoxide dismutase and high activity of glutathione reductase in erythrocytes from centenarian. *Age Aging* 1998; 27:643-8.
57. Kaliora AC, Dedousis GV, Schmidt H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. *Atherosclerosis* 2006;187:1-17.
58. Martens A., Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *Faseb J* 2001;15:2073-84.
59. Nakamura YK, Read MH, Elias JW, Omaye ST. Oxidation of serum low-density lipoprotein (LDL) and antioxidant status in young and elderly humans. *Arch Gerontol Geriatr* 2006; 42:265-76.
60. Taufer M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sa G, do Canto ME, dos Santos AR, Bauer ME, da Cruz IB. Is the val16ala manganese superoxide dismutase polymorphism associated with aging processes? *J Gerontol A Biol Sci Med* 2001;7:13-9.

61. Lee SJ, Choi MG, Kim TW. Manganese superoxide dismutase gene polymorphism (V16A) is associated with stages of albuminuria in Korean type 2 diabetic patients. *Metabolism* 2006;55:1-7
62. Mac JC, Leung HC, Ho SP, Ko FW, Cheung AH, Ip MS, Chan Yeung MM. Polymorphism in manganese superoxide dismutase and catalase genes: functional study in Hong Kong Chinese asthma patients. *Clinic experiment Allergy* 2006; 36:440-7
63. World Health Organization. Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. Report of WHO Expert Committee. *Tech Rep Ser.* 1995;854:1-452