

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ TNF α -308 G/A ΚΑΙ ΓΕΥΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ ΣΤΗΝ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΠΑΙΔΙΚΗΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ



ΚΟΝΤΕΛΕ ΙΩΑΝΝΑ

Επιβλέπων Καθηγητής: Δεδούσης Γεώργιος

Τριμελής Επιτροπή:
Δεδούσης Γεώργιος
Γιαννακούλια Μαίρη
Παναγιωτάκος Δημοσθένης

ΑΘΗΝΑ 2006

Ευχαριστώ ιδιαίτερα τους καθηγητές μου κο Δεδούση και κα Γιαννακούλια για την ανάθεση του τόσο ενδιαφέροντος θέματος της εργασίας μου καθώς και για την βοήθειά τους και τις γνώσεις που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια εκπόνησης της.

Ευχαριστώ την Εύα και την Γαρυφαλλιά για την θερμή υποστήριξη τους και την εξάισια συνεργασία μας και τις Ειρήνη, Δέσποινα, Βάσια, Μαρία και Τζοβάννα για την πολύτιμη βοήθεια τους κατά την διάρκεια όλης της έρευνας.

Τέλος, ευχαριστώ ιδιαίτερα θερμά την Νικολέτα χωρίς την υποστήριξη και τον κόπο της οποίας δεν θα είχα ολοκληρώσει την πτυχιακή μου μελέτη.

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Παιδική Παχυσαρκία

1.2. TNF α

1.3. Γευματικές συνήθειες

1.1. ΠΑΙΔΙΚΗ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑ

- 1.1.1. Εισαγωγή
- 1.1.2. Διαγνωστικά κριτήρια
- 1.1.3. Επιπολασμός
- 1.1.4. Επιπτώσεις
- 1.1.5. Αιτιολογικοί Παράγοντες

1.1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας η παχυσαρκία ορίζεται ως η νόσος κατά την οποία υπάρχει συσσώρευση υπερβολικού σωματικού λίπους σε τέτοιο βαθμό ώστε η υγεία του ατόμου να επηρεάζεται αρνητικά. Η παχυσαρκία έχει λάβει επιδημικές διαστάσεις παγκοσμίως, καθώς περισσότεροι από 1 δισεκατομμύριο ενήλικες έχουν βάρος υψηλότερο του φυσιολογικού. Το υπερβάλλον βάρος και η παχυσαρκία αποτελούν ισχυρούς παράγοντες κινδύνου για ανάπτυξη χρόνιων ασθενειών όπως σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, καρδιαγγειακές παθήσεις, υπέρταση και κάποιοι τύποι καρκίνου. Αυτές οι επιπτώσεις μπορεί να οδηγήσουν σε πρόωρη θνησιμότητα ή σοβαρές χρόνιες καταστάσεις οι οποίες μειώνουν σημαντικά την ποιότητα ζωής. Οι κυριότερες αιτίες εμφάνισης της παχυσαρκίας είναι η αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη και η μειωμένη φυσική δραστηριότητα ενώ τα τελευταία χρόνια οι έρευνες στρέφονται και σε γονίδια τα οποία φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στην γενετική προδιάθεση για ανάπτυξη παχυσαρκίας κάτω από συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (1).

Δυστυχώς η παχυσαρκία είναι μία ασθένεια η οποία προσβάλλει και τον παιδικό πληθυσμό. Παγκοσμίως, περίπου 155 εκατομμύρια παιδιά σχολικής ηλικίας υπολογίζεται ότι είναι υπέρβαρα ενώ ο επιπολασμός ολοένα και μεγαλώνει στις περισσότερες χώρες του κόσμου. Οι επιπτώσεις της παιδικής παχυσαρκίας είναι περίπου οι ίδιες με αυτές στον ενήλικο πληθυσμό καθώς τα παχύσαρκα παιδιά φαίνεται να έχουν μεγάλες πιθανότητες ανάπτυξης σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, υπέρτασης και καρδιαγγειακών προβλημάτων ακόμα και από την παιδική ή εφηβική τους ηλικία. Μάλιστα, τα παχύσαρκα παιδιά έχουν έναν ακόμα σοβαρό κίνδυνο που είναι η διατήρηση του υπερβάλλοντος βάρους κατά την ενήλικη ζωή και επομένως ακόμα μεγαλύτερη πιθανότητα ανάπτυξης χρόνιων ασθενειών. Η μελέτη των αιτιολογικών παραγόντων και η ανάπτυξη μεθόδων πρόληψης της παιδικής παχυσαρκίας είναι απαραίτητες ώστε να μειωθεί ο επιπολασμός της και επομένως η εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων τόσο στην παιδική όσο και στην ενήλικη ζωή (1).

1.1.2 ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΑ ΚΡΙΤΗΡΙΑ

Ο καλύτερος τρόπος για την εκτίμηση της παιδικής παχυσαρκίας είναι η χρήση του Δείκτη Μάζας Σώματος ($\Delta\text{Μ}\Sigma = \text{βάρος σε κιλά} / (\text{ύψος σε μέτρα})^2$). Ο $\Delta\text{Μ}\Sigma$ των παιδιών αλλάζει με την ηλικία και διαφέρει σε κάθε φύλο, γι' αυτό εκτιμάται ανάλογα με την ηλικία και το φύλο του παιδιού (2).

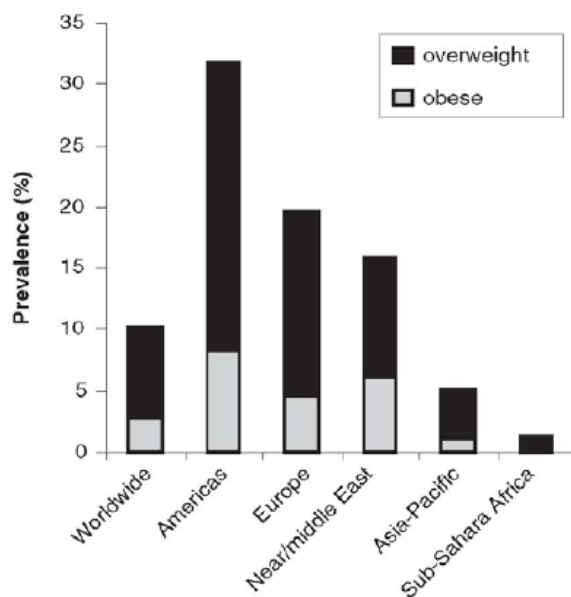
Υπάρχουν 2 διεθνώς αναγνωρισμένοι μέθοδοι εκτίμησης της παχυσαρκίας βάση του $\Delta\text{Μ}\Sigma$. Η πρώτη μέθοδος βασίζεται στην χρήση των ποσοστημορίων του $\Delta\text{Μ}\Sigma$ στις καμπύλες ανάπτυξης που έχει ορίσει το CDC (Center for Disease Control) των ΗΠΑ. Οι καμπύλες ανάπτυξης του CDC έχουν σχεδιαστεί βασιζόμενες σε στοιχεία που έχουν συλλεχτεί από αμερικάνικο πληθυσμό. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο τα παιδιά με $\Delta\text{Μ}\Sigma$ μεγαλύτερο του 85^{ου} ποσοστημορίου χαρακτηρίζονται ως υπέρβαρα και τα παιδιά με

ΔΜΣ μεγαλύτερο του 95^{ου} ποσοστημορίου χαρακτηρίζονται ως παχύσαρκα (2). Μέχρι στιγμής υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός στοιχείων που δείχνουν ότι για ένα πλήθος επιπτώσεων στην υγεία, τόσο βραχυπρόθεσμα όσο και μακροπρόθεσμα, τα παιδιά με ΔΜΣ μεγαλύτερο του 85^{ου} και του 95^{ου} ποσοστημορίου βρίσκονται σε υψηλότερο κίνδυνο νοσηρότητας σε σχέση με τους συνομηλίκους τους με χαμηλότερο ΔΜΣ. Οι συγκεκριμένες οριακές τιμές ποσοστημορίων ΔΜΣ διαγιγνώσκουν την παχυσαρκία σε ικανοποιητικό βαθμό και χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται εθνικά δεδομένα τιμών ΔΜΣ (3). Η δεύτερη μέθοδος βασίζεται στην χρήση των οριακών τιμών του ΔΜΣ που έχουν προταθεί από τους Cole et al και έχουν υιοθετηθεί από τον IOTF (International Obesity Task Force). Οι συγκεκριμένες οριακές τιμές προέκυψαν από μετανάλυση 6 εθνικών ερευνών με μεγάλο (>10000 παιδιά σε κάθε έρευνα) και αντιπροσωπευτικό δείγμα ανά χώρα, και εκφράζουν την τιμή ΔΜΣ ανά φύλο και ηλικία που αντιστοιχεί σε τιμή 25kg/m² του ΔΜΣ των ενηλίκων για το υπέρβαρο και στο 30kg/m² του ΔΜΣ των ενηλίκων για την παχυσαρκία (2).

Μερικοί ερευνητές χρησιμοποιούν επίσης το ποσοστό σωματικού λίπους που εκτιμάται από δερματικές πτυχές για την διάγνωση της παιδικής παχυσαρκίας (παχύσαρκα >25% στα κορίτσια και >30% στα αγόρια) (4). Δεν υπάρχουν όμως αρκετά δεδομένα ώστε να δημιουργηθούν οριακές τιμές καθορισμού της παχυσαρκίας με άλλα μέτρα εκτός του ΔΜΣ όπως οι δερματικές πτυχές και η περίμετρος μέσης (3).

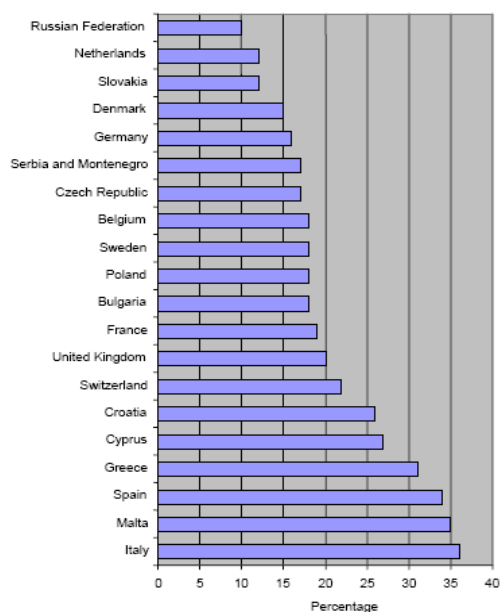
1.1.3 ΕΠΙΠΟΛΑΣΜΟΣ

Σύμφωνα με τον IOTF (Childhood Obesity Report May 2004) το 10% των παιδιών παγκοσμίως είναι υπέρβαρο και το 3% παχύσαρκα. Όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα η Αμερική και η Ευρώπη έχουν τα υψηλότερα ποσοστά που αγγίζουν το 30% και 20% αντίστοιχα για το υπερβάλλον βάρος και το 8% και 5% για την παχυσαρκία (5).



Εικόνα 1.1 : Επιπολασμός υπέρβαρου και παχυσαρκίας σε παιδιά ηλικίας 5-17 ετών παγκοσμίως βάση των κριτηρίων του IOTF. Βασίζεται σε έρευνες μετά το 1990. Πηγή: IOTF.

Στην Ευρώπη ο αριθμός των υπέρβαρων παιδιών φτάνει τα 14 εκατομμύρια, τα 3 εκατομμύρια εκ των οποίων είναι παχύσαρκα. Αυτό σημαίνει ότι 1 στα 4 παιδιά στην Ευρώπη έχει βάρος υψηλότερο του φυσιολογικού (5). Σε κάποιες χώρες όπως οι Σκανδιναβικές, το ποσοστό των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών είναι χαμηλότερο (10-20%) σε σύγκριση με τις Μεσογειακές χώρες (20-35%), τα ποσοστά όμως αυξάνονται και στις 2 περιπτώσεις (4). Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται ο επιπολασμός του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας σε διάφορες χώρες της Ευρώπης.



Εικόνα 1.2: Επιπολασμός υπέρβαρου και παχυσαρκίας σε παιδιά ηλικίας 7-11 ετών σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης.
Πηγή: Lobstein T. and Frelut M.-L. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obesity Reviews* 2003 4: 195–200

Στην Ελλάδα 3 μεγάλες έρευνες έχουν εκτιμήσει τον επιπολασμό της παιδικής παχυσαρκίας (6).

Οι Μαμαλάκης και συν το 1992 σε δείγμα 1000 παιδιών ηλικίας 6 ετών στην Κρήτη, κατέγραψαν το 23,2% των αγοριών και το 28,8% των κοριτσιών ως υπέρβαρα και το 10,9% των αγοριών και 9,2% των κοριτσιών ως παχύσαρκα. Τα παιδιά αυτά επανεξετάστηκαν σε ηλικία 9 ετών όπου ο επιπολασμός του υπέρβαρου ήταν 18,9% για τα αγόρια και 18,1% για τα κορίτσια και ο επιπολασμός της παχυσαρκίας 4,9% για τα αγόρια και 4,5% για τα κορίτσια. Μία τρίτη μέτρηση έγινε στην ηλικία των 12 ετών όπου υπέρβαρα ήταν το 24% των αγοριών και το 19,2% των κοριτσιών και παχύσαρκα το 8,2% των αγοριών και το 5% των κοριτσιών. Στην έρευνα αυτή χρησιμοποιήθηκαν οι οριακές τιμές ΔΜΣ του CDC για την εκτίμηση της παχυσαρκίας (7).

Οι Κρασσάς και συν το 2000-2001 μέτρησαν τον ΔΜΣ ~2500 παιδιών ηλικίας 6-17 ετών από την πόλη της Θεσσαλονίκης. Βάση των οριακών τιμών ΔΜΣ του IOTF τα υπέρβαρα παιδιά αποτελούσαν το 22,2% του δείγματος και το παχύσαρκα το 4,1%. Όσον αφορά τις ξεχωριστές ηλικιακές ομάδες, ο επιπολασμός του υπέρβαρου και της παχυσαρκίας στα παιδιά δημοτικού (6-10 ετών) ήταν 25,3% και 5,6% αντίστοιχα, ενώ στους έφηβους (11-17 ετών) τα ποσοστά ήταν 19% και 2,6% αντίστοιχα. Έπειτα από

διαχωρισμό του δείγματος ανάλογα με το φύλο βρέθηκε ότι το 25,9% των αγοριών και το 19,1% των κοριτσιών ήταν υπέρβαρα και το 5,1% των αγοριών και 3,2% των κοριτσιών ήταν παχύσαρκα (8).

Τέλος, οι Καραγιάννης και συν εκτίμησαν τον επιπολασμό της παχυσαρκίας και του υπέρβαρου σε αντιπροσωπευτικό δείγμα 4299 παιδιών ηλικίας 11-16 ετών βασιζόμενοι σε αυτοδηλουμένα στοιχεία ύψους και βάρους. Βάση των οριακών τιμών ΔΜΣ του ΙΟΤΦ το 9,1% των κοριτσιών και το 21,7% των αγοριών που συμμετείχαν στην έρευνα ήταν υπέρβαρα, ενώ το 1,2% των κοριτσιών και το 2,5% των αγοριών ήταν παχύσαρκα. Βάση των οριακών τιμών ΔΜΣ του CDC τα ποσοστά ήταν 8,1% και 18,8% τα υπέρβαρα κορίτσια και αγόρια αντίστοιχα και 1,7% και 5,8% τα παχύσαρκα κορίτσια και αγόρια αντίστοιχα (9).

Συγκριτικά με τα στοιχεία άλλων χωρών, φαίνεται ότι τα ελληνόπουλα, έχουν έναν από τους μεγαλύτερους επιπολασμούς υπέρβαρου στις δυτικές χώρες, ενώ ο επιπολασμός της παχυσαρκίας είναι αντίστοιχος ή και χαμηλότερος σε σχέση με άλλες Ευρωπαϊκές χώρες (8).

Διαχρονικές τάσεις

Ο επιπολασμός του υπερβάλλοντος βάρους και της παχυσαρκίας στα παιδιά αυξάνεται ραγδαία σε πολλές χώρες του κόσμου (10). Σύμφωνα με τον ΙΟΤΦ η ετήσια αύξηση του επιπολασμού της παχυσαρκίας ήταν 0,2% κατά την δεκαετία του 70, 0,6% την δεκαετία του 80, 0,8% την δεκαετία του 90 και φτάνει στο 2% τις αρχές του 21^{ου} αιώνα (11).

Στις ΗΠΑ ο αριθμός των υπέρβαρων παιδιών διπλασιάστηκε και των υπέρβαρων εφήβων τριπλασιάστηκε από το 1980 μέχρι το 2003. Ο επιπολασμός των παχύσαρκων παιδιών ηλικίας 6-11 διπλασιάστηκε από το 1960 μέχρι το 2003. Στις ηλικίες 12-17 ο επιπολασμός της παχυσαρκίας έχει αυξηθεί δραματικά από 5% σε 13% στα αγόρια και από 5% σε 9% στα κορίτσια από το 1966-70 μέχρι το 1988-91 (12).

Στην Ευρώπη, από τα στοιχεία του ΙΟΤΦ και της Ευρωπαϊκής Ομάδας για την Παιδική Παχυσαρκία, προκύπτει ότι η παιδική παχυσαρκία αυξάνεται σταθερά τις τελευταίες τρεις δεκαετίες (6) και σε απόλυτους αριθμούς φτάνει τα 400.000 παιδιά ετησίως (5).

Στο Ηνωμένο Βασίλειο το ποσοστό των υπέρβαρων παιδιών ηλικίας 7-11 ετών αυξήθηκε από 8% στο 20% την περίοδο 1984-1998. Στην Ισπανία, ο επιπολασμός του υπερβάλλοντος βάρους σε παιδιά ηλικίας 6-7 ετών αυξήθηκε από 23% σε 35% την περίοδο 1985/6-1995/6. Στην Γαλλία, οι έρευνες δείχνουν αύξηση των υπέρβαρων παιδιών από 10% σε 16% την περίοδο 1992-2000 (10). Στην Πολωνία, ο επιπολασμός αυξήθηκε από 8% σε 18% μεταξύ του 1994 και του 2000 (11).

Στην Ελλάδα, η διαχρονική τάση της παχυσαρκίας μελετήθηκε από τους Κρασσά και συν, καθώς τα στοιχεία που συλλέχτηκαν από μαθητές της Θεσσαλονίκης το 2000

συγκρίθηκαν με 3 μελέτες που είχαν διεξαχθεί σε παιδιά σχολικής ηλικίας το 1942, το 1982 και το 1984-5. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι από το 1942 μέχρι το 2000 ο ΔΜΣ των αγοριών αυξήθηκε κατά 11,1% και των κοριτσιών κατά 4%. Η μεγαλύτερη αύξηση παρατηρήθηκε μεταξύ 1984-5 και 2000 όπου ο ΔΜΣ αυξήθηκε κατά 6,5% στα αγόρια και 2,9% στα κορίτσια (8).

1.1.4 ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ

Σύμφωνα με την έκθεση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας οι πιο σοβαρές συνέπειες της παχυσαρκίας είναι η υπέρταση, η υπερλιπιδαιμία, η στεφανιαία νόσος, τα ισχαιμικά επεισόδια, ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, κάποιοι τύποι καρκίνου, η οστεοπόρωση και τα ψυχολογικά προβλήματα (11).

Είναι γεγονός ότι παθήσεις όπως ο σακχαρώδης διαβήτης τύπου 2, η υπέρταση και η υπερχοληστερολαιμία, οι οποίες εμφανίζονταν μόνο σε ενήλικα άτομα, είναι πλέον πολύ συχνές και στα παιδιά όσο ο επιπολασμός της παχυσαρκίας αυξάνεται (13). Το υπερβάλλον βάρος κατά την διάρκεια της εφηβείας σχετίζεται με αύξηση κατά 8,5 φορές της υπέρτασης, κατά 2,4 φορές της εμφάνισης υψηλών τιμών ολικής χοληστερόλης ορού, κατά 3 φορές της εμφάνισης υψηλών τιμών LDL χοληστερόλης ορού και κατά 8 φορές της εμφάνισης χαμηλών τιμών HDL χοληστερόλης, ενώ πλήθος μελετών που έχουν διεξαχθεί κυρίως στις ΗΠΑ καταδεικνύουν ότι όσο αυξάνεται ο επιπολασμός της παχυσαρκίας, αναμένεται να αυξηθεί και ο επιπολασμός του διαβήτη τύπου 2 (6).

Ιδιαίτερα συχνή είναι και η εμφάνιση του μεταβολικού συνδρόμου στα παχύσαρκα παιδιά. Στην μελέτη NHANES III (1988-1994) στις ΗΠΑ αποκαλύφθηκε η σημαντική συσχέτιση του μεταβολικού συνδρόμου με το βάρος, εφόσον ο επιπολασμός του ήταν σχεδόν μηδενικός για τους εφήβους με φυσιολογικό βάρος, αυξανόταν σε ποσοστό 6,8% των υπέρβαρων εφήβων και έφτανε έως το 28,7% των παχύσαρκων συνομηλίκων τους. Σε έρευνες που έχουν γίνει σε ευρωπαϊκό πληθυσμό έχει επίσης φανεί ότι το μεταβολικό σύνδρομο είναι ιδιαίτερα συχνό σε παχύσαρκους ενήλικες, που ήταν παχύσαρκοι ως παιδιά (6).

Επιπλέον είναι γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό παχύσαρκων παιδιών και εφήβων παραμένει παχύσαρκο καθώς μεγαλώνει. Στην διαχρονική μελέτη των Κρασά και συν φάνηκε ότι μόνο το 2,1% των μη παχύσαρκων παιδιών ηλικίας 6 ετών ήταν παχύσαρκα στην ηλικία των 12 ετών ενώ το 50% των παχύσαρκων παιδιών στην ηλικία των 6 ετών παρέμεινε παχύσαρκο και στην ηλικία των 12 ετών (8). Επειδή η παιδική παχυσαρκία συχνά παραμένει και στην ενήλικη ζωή, ένας ολοένα αυξανόμενος αριθμός ενηλίκων θα βρίσκεται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης παθήσεων όπως καρδιαγγειακά νοσήματα, οστεοαρθρίτιδα και διάφοροι τύποι καρκίνου (13).

Άλλες βιολογικές επιπτώσεις της παιδικής και εφηβικής παχυσαρκίας είναι οι αναπνευστικές (άσθμα, άπνοια ύπνου), οι γαστρεντερικές (λιπώδες ήπαρ) και οι

ενδοκρινικές (διαταραχές εμμηνορρυσίας, καθυστέρηση σεξουαλικής ωρίμανσης αγοριών) (6).

Συχνές είναι και οι ψυχολογικές επιπτώσεις της παιδικής παχυσαρκίας, η οποία φαίνεται να επηρεάζει την αυτοεκτίμηση και να έχει αρνητικές συνέπειες στην γνωσιακή και κοινωνική ανάπτυξη (13). Ο στιγματισμός των υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών έχει καταγραφεί πολλές φορές στις δυτικές κοινωνίες και είναι ιδιαίτερα έκδηλος στις μικροκοινότητες των ανηλίκων. Παιδιά που έχουν ενοχληθεί από τον εμπαιγμό των συνομηλίκων τους σχετικά με το σχήμα του σώματός τους είναι πιθανότερο να είναι δυσανεσθημένα με την εμφάνισή τους ως ενήλικες, μέχρι του βαθμού ανάπτυξης διαταραχών λήψης τροφής (6).

Τέλος, δεν πρέπει να παραβλέπονται και οι οικονομικές επιπτώσεις που σχετίζονται με την παχυσαρκία. Εφόσον η παιδική παχυσαρκία δείχνει να προδιαθέτει σε διαιώνιση του προβλήματος και στην ενήλικη ζωή, ο αυξημένος επιπολασμός της θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε συντομότερη και άρα ακριβότερη έναρξη χρήσης του Εθνικού Συστήματος Υγείας από τους νεαρούς ενήλικες για τη θεραπεία ασθενειών που συνδέονται με αυτήν. Η αύξηση λοιπόν του οικονομικού βάρους, το οποίο ασκεί η παχυσαρκία στο Εθνικό Σύστημα Υγείας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και μάλιστα να χρησιμοποιείται ως κίνητρο για τον σχεδιασμό μέτρων πρόληψης της (6).

1.1.5 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Παρόλο που οι μηχανισμοί ανάπτυξης της παχυσαρκίας δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, έχει επιβεβαιωθεί ότι η παχυσαρκία υπάρχει όταν η πρόσληψη ενέργειας είναι μεγαλύτερη από την κατανάλωση. Υπάρχουν πολλές αιτίες για αυτήν την ανισορροπία και ο αυξανόμενος επιπολασμός της παχυσαρκίας δεν μπορεί να αποδοθεί σε μία και μόνη αιτία (4). Η παχυσαρκία φαίνεται να είναι αποτέλεσμα πολλαπλών αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος (14).

Με εξαίρεση κάποιες ανωμαλίες γονιδίων που άμεσα οδηγούν στην παχυσαρκία όπως η συγγενής έλλειψη λεπτίνης και η συγγενής έλλειψη υποδοχέα λεπτίνης, στις περισσότερες περιπτώσεις, τα γονίδια που σχετίζονται με την αύξηση βάρους δεν προκαλούν παχυσαρκία από μόνα τους αλλά αυξάνουν την επιδεκτικότητα για αύξηση βάρους σε άτομα που εκτίθενται σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον υψηλού κινδύνου (14).

Πολλές έρευνες έχουν αναγνωρίσει γονίδια που εμπλέκονται στην εμφάνιση της παχυσαρκίας. Ένα από αυτά είναι το γονίδιο του CART, ενός πεπτιδίου που ρυθμίζεται από την λεπτίνη και σηματοδοτεί τον κορεσμό στον υποθάλαμο αλληλεπιδρώντας με το νευροπεπτιδίο Υ και άλλους υποθαλαμικούς ρυθμιστές της όρεξης. Επίσης έχει μελετηθεί το γονίδιο του PPAR γ 2, που είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης των πρόδρομων μορφών των λιποκυττάρων σε λιποκύτταρα (14). Τέλος διάφοροι πολυμορφισμοί στο γονίδιο του TNF α φαίνεται να μεταβάλλουν την

έκφραση του στα λιποκύτταρα και να εμπλέκονται στην εμφάνιση της παχυσαρκίας (15).

Η ύπαρξη γενετικής προδιάθεσης για ανάπτυξη παχυσαρκίας φαίνεται και από το γεγονός ότι τα παιδιά των παχύσαρκων γονέων έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να γίνουν παχύσαρκα σε σχέση με τα παιδιά των μη παχύσαρκων γονέων (14).

Βέβαια ένα περιβάλλον που είναι ευνοϊκό για την ανάπτυξη της παχυσαρκίας είναι απαραίτητο για την φαινοτυπική έκφραση των γονιδίων (16). Ο ρόλος του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη της παχυσαρκίας φαίνεται από το γεγονός της ραγδαίας αύξησης της παχυσαρκίας το δεύτερο μισό του 20^{ου} αιώνα, η οποία δεν θα μπορούσε να εξηγηθεί με αλλαγές στο ανθρώπινο γονιδίωμα που είναι αδύνατο να συνέβησαν σε τόσο σύντομο χρονικό διάστημα (14). Οι διαιτητικές συνήθειες και οι συνήθειες της φυσικής δραστηριότητας αποτελούν σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες που διαμορφώνουν την έκφραση των γονιδίων κατά την διάρκεια της ζωής (16).

Όσον αφορά την διατροφή δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να επιβεβαιώνουν ότι η παχυσαρκία στα παιδιά οφείλεται στην αυξημένη πρόσληψη ενέργειας καθώς η ολική ενεργειακή πρόσληψη είναι δύσκολο να μετρηθεί ακριβώς σε πληθυσμιακό επίπεδο (4). Έρευνες στις ΗΠΑ δείχνουν ότι η ενεργειακή πρόσληψη παιδιών και εφήβων έχει αυξηθεί από ~1800 kcal την δεκαετία του 1970 σε ~1960 kcal τα μέσα του 1990 (17). Απ' την άλλη όμως αρκετές έρευνες έχουν αποτύχει να δείξουν κάποια σταδιακά αυξανόμενη ενεργειακή πρόσληψη στα παιδιά. Δύο σημαντικοί παράγοντες είναι πιθανό να μπορούν να εξηγήσουν την φαινομενική ασυμφωνία μεταξύ αύξησης της παχυσαρκίας και μη αύξησης της ενεργειακής πρόσληψης. Ο ένας παράγοντας είναι η ανακρίβεια στην εκτίμηση της κατανάλωσης φαγητού από τα υπέρβαρα παιδιά που μπορεί να οδηγήσει σε υποεκτίμηση της ενεργειακής τους πρόσληψης και ο δεύτερος παράγοντας είναι η μείωση των ενεργειακών απαιτήσεων και της οξειδωσης λίπους στην σύγχρονη βιομηχανοποιημένη κοινωνία (14).

Εξάλλου όπως αναφέρθηκε η παχυσαρκία είναι αποτέλεσμα θετικού ενεργειακού ισοζυγίου, το οποίο εκτός από την πρόσληψη ενέργειας επηρεάζεται και από την κατανάλωσή της μέσω του βασικού μεταβολικού ρυθμού, της θερμογένεσης μέσω φυσικής δραστηριότητας και της θερμογένεσης μέσω τροφής. Όσον αφορά την φυσική δραστηριότητα έχει γίνει η υπόθεση ότι μία σταθερή μείωση της σχετίζεται με την παχυσαρκία παγκοσμίως και σε όλες τις ηλικιακές ομάδες. Πολλές έρευνες έχουν δείξει ότι καθιστικές δραστηριότητες όπως η ασχολία με την τηλεόραση και τον ηλεκτρονικό υπολογιστή σχετίζονται με την παχυσαρκία ενώ ολοένα και αυξάνεται ο αριθμός των παιδιών που πηγαίνουν στο σχολείο με το αυτοκίνητο και δεν συμμετέχουν σε σχολικές και εξωσχολικές αθλητικές δραστηριότητες, γεγονός που μειώνει περαιτέρω την ενεργειακή κατανάλωση (4).

Τα μακροθρεπτικά συστατικά είναι επίσης πιθανό να έχουν κάποιο ρόλο. Διάφορες έρευνες σχετικά με την κατανάλωση τροφής σε Ευρωπαϊκό πληθυσμό παιδιών έδειξαν

γενικότερα μία υπερκατανάλωση λίπους και πρωτεΐνης ζωικής προέλευσης και υποκατανάλωση φυτικών ινών σε σχέση με τις διεθνείς συστάσεις (14). Όσον αφορά την υπόθεση ότι η αύξηση της παχυσαρκίας οφείλεται σε αυξημένη κατανάλωση διαιτητικού λίπους, υπάρχουν διφορούμενα αποτελέσματα. Τα αποτελέσματα της έρευνας NHANES έχουν δείξει ότι η κατανάλωση λίπους από παιδιά στις ΗΠΑ έχει μειωθεί τις τελευταίες 3 δεκαετίες ενώ από την άλλη κάποιες συγχρονικές έρευνες έχουν βρει θετική συσχέτιση μεταξύ πρόσληψης λίπους και παχυσαρκίας στα παιδιά (4). Όσον αφορά την πρόσληψη πρωτεΐνης έχει προταθεί ότι μέσω της διέγερσης έκκρισης ινσουλίνης προωθεί την αποθήκευση λίπους και τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων (14).

Οι επιστήμονες έχουν επίσης μελετήσει τις διαιτητικές συμπεριφορές σε μια προσπάθεια να εξηγήσουν την ραγδαία αύξηση της παιδικής και εφηβικής παχυσαρκίας. Για παράδειγμα έχει δείχθει ότι η αποφυγή κάποιων γευμάτων, η μη κατανάλωση πρωινού και η κατανάλωση πολλών σνακ μεταξύ των κυρίων γευμάτων είναι πιθανό να σχετίζονται με τον κίνδυνο παχυσαρκίας κατά την διάρκεια της παιδικής και εφηβικής ηλικίας (18). Παράλληλα ο τρόπος ζωής και οι διατροφικές συνήθειες της οικογένειας παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των διατροφικών συνηθειών του παιδιού κάτι που μπορεί να έχει άμεση επιρροή και στο βάρος του (14).

Τέλος ακόμη και κοινωνικοί παράγοντες μπορούν να θεωρηθούν αιτιολογικοί για την ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Για παράδειγμα η αστικοποίηση και οι αντίστοιχες αλλαγές στην διατροφή και την φυσική δραστηριότητα (π.χ. κατανάλωση τροφίμων υψηλής ενεργειακής πυκνότητας και αναψυκτικών αντί για φρούτα και λαχανικά, καθιστικές δραστηριότητες αντί για φυσική δραστηριότητα στην ύπαιθρο, έλλειψη ασφαλών δρόμων, πάρκων κλπ) αλλά και η κοινωνικοοικονομική κατάσταση της οικογένειας (υπερβολική αύξηση βάρους είναι πιο συχνή μεταξύ των οικογενειών με υψηλό εισόδημα στις λιγότερο βιομηχανοποιημένες περιοχές και μεταξύ των οικογενειών με χαμηλό εισόδημα στις βιομηχανοποιημένες κοινωνίες) (10).

Η παχυσαρκία λοιπόν είναι μια πολύπαραγοντική ασθένεια και η εμφάνιση της οφείλεται σε πολλαπλές αλληλεπιδράσεις μεταξύ γονιδίων και περιβάλλοντος (14).

Στην συγκεκριμένη μελέτη θα αναλυθούν διεξοδικότερα η επίδραση των γονιδίων και συγκεκριμένα του πολυμορφισμού -308 TNFα G/A, καθώς και των γευματικών συνηθειών στην ανάπτυξη της παιδικής παχυσαρκίας.

1.2. TNF α

1.2.1. Εισαγωγή

1.2.2. Δομή και Σύνθεση

1.2.3. Υπεροικογένεια TNF

1.2.4. Υποδοχείς

1.2.5. Λειτουργίες

1.2.5.1. TNF α και καχεξία

1.2.5.2. TNF α και παχυσαρκία

1.2.6. Γονίδιο

1.2.7. Πολυμορφισμοί

1.2.8. Ο πολυμορφισμός -308 G/A

1.2.9. Αποτελέσματα ερευνών

1.2.9.1. Έρευνες σε παιδιά και έφηβους

1.2.9.2. Έρευνες σε ενήλικους

1.2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

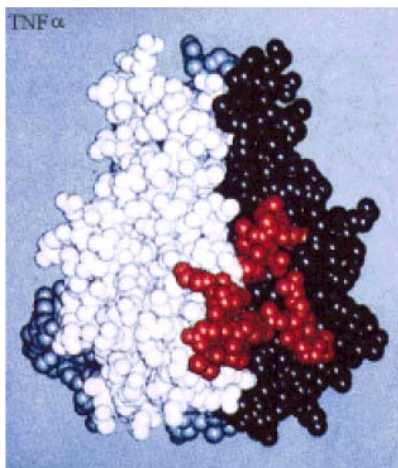
Ο Παράγοντας Νέκρωσης Όγκων - άλφα (Tumor Necrosis Factor-alpha – TNFα) είναι μία πολυλειτουργική φλεγμονώδης κυτοκίνη που παράγεται αρχικά από μονοκύτταρα και μακροφάγα σε καταστάσεις οξείας φλεγμονής αλλά εκφράζεται επίσης στα λιποκύτταρα (19).

Αρχικά ανακαλύφθηκε σε ορούς ποντικών και κουνελιών στα οποία είχε εγχυθεί ενδοτοξίνη. Ο ορός των ζώων παρήγαγε αιμορραγική νέκρωση και σε μερικές περιπτώσεις και πλήρη αναστροφή κάποιων μεταμοσχευμένων όγκων (20). Παράλληλα, οι Kawasaki και Cerami ανακάλυψαν ένα μόριο υπεύθυνο για το σύνδρομο απίσχνανσης, το οποίο εμφανίζεται σε πολλές χρόνιες φλεγμονώδεις καταστάσεις όπως ο καρκίνος. Το μόριο αυτό ονομάστηκε καχεκτίνη, καθώς θεωρήθηκε υπεύθυνο για την επαγωγή της καχεξίας. Αργότερα, βρέθηκε ότι η καχεκτίνη και ο TNFα είναι το ίδιο ακριβώς μόριο (21).

Διαταραχές στον μεταβολισμό του TNFα και πολυμορφισμοί στο γονίδιο του φαίνεται να σχετίζονται με πολλές ασθένειες όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα, ο συστηματικός ερυθηματώδης λύκος, η νόσος του Crohn, η λισμανίαση, η πνευμονική ίνωση, το σηπτικό σοκ, η ψωρίαση, το άσθμα καθώς και η παχυσαρκία, η ινσουλινοαντίσταση και ο σακχαρώδης διαβήτης (22).

1.2.2 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΣΥΝΘΕΣΗ

Η ανθρώπινη πρωτεΐνη TNFα αποτελείται από 233 αμινοξέα. Αρχικά συντίθεται ως πρόδρομη διαμεμβρανική πρωτεΐνη μοριακού βάρους 26kDa (22). Η πρωτεΐνη αυτή είναι τύπου 2 διαμεμβρανική πρωτεΐνη, δηλαδή το αμινοτελικό άκρο βρίσκεται εντός του κυττάρου και το καρβοξυτελικό άκρο στο εξωτερικό μέρος της μεμβράνης (23). Ο TNFα μπορεί να παραμείνει στην επιφάνεια του κυττάρου ως διαμεμβρανική πρωτεΐνη ή να απελευθερωθεί από αυτή μέσω ενζυμικής αποκοπής του αμινοτελικού της άκρου από το ένζυμο TACE ώστε να παραχθεί η διαλυτή μορφή μοριακού βάρους 17kDa που κυκλοφορεί στο αίμα και στα βιολογικά υγρά (22). Η διαλυτή μορφή αποτελεί τριμερές, το κάθε μονομερές της οποίας έχει μήκος 60 Å και πλάτος 30 Å και φέρει χαρακτηριστικές δομές β πτυχωτής επιφάνειας (22).



Εικόνα 2.1: Τριμερές TNFα.
Πηγή: Idriss TH and Naismith HJ. TNFα and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). Microscopy Research and Technique 50:184–195 (2000).

1.2.3 ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ TNF

Ο TNFα είναι το πρώτο μέλος της υπερ-οικογένειας TNF που αναγνωρίστηκε (22). Τα μέλη της οικογένειας των κυτοκινών TNF ενεργοποιούν οδούς παραγωγής σημάτων που σχετίζονται με την επιβίωση, τον θάνατο και την διαφοροποίηση των κυττάρων (23). Η υπερ-οικογένεια έχει μέχρι τώρα 19 επαρκώς αναγνωρισμένα μέλη. Τα πιο γνωστά είναι ο TNFα ή καχεκτίνη, ο TNFβ ή λεμφοτοξίνη α και ο TNFC ή λεμφοτοξίνη β. Όλα τα μέλη επιδεικνύουν μια εξελικτική διατήρηση στις ακολουθίες των αμινοξέων τους, πολλές από τις οποίες έχουν χαρακτηριστικά των μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου 2. Αυτό τα χαρακτηριστικό προτείνει ότι τα μέλη της οικογένειας αυτής μπορεί να προέρχονται από το ίδιο προγονικό γονίδιο. Εκτός από τον TNFβ (λεμφοτοξίνη α) και τον TNFC (λεμφοτοξίνη β) που μπορεί να σχηματίσουν είτε ομοτριμερή είτε ετεροτριμερή, η ενεργή μορφή όλων των υπόλοιπων μελών είναι ομοτριμερής (22).

1.2.4 ΥΠΟΔΟΧΕΙΣ

Ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί ο TNFα είναι μέσω σύνδεσης του σε υποδοχείς κυττάρων με μεγάλη συγγένεια και επομένως μεγάλη ειδικότητα. Οι 2 υποδοχείς του TNFα οι οποίοι είναι ευρέως κατανεμημένοι στα περισσότερα κύτταρα μέσα στο σώμα είναι ο TNFR1 που είναι ένα πεπτιδίο μοριακού βάρους 60kDa και του TNFR2 που είναι ένα πεπτιδίο μοριακού βάρους 80kDa. Και οι 2 υποδοχείς προσδένουν τον TNFα με μεγάλη συγγένεια, με διαφορετικές όμως βιολογικές συνέπειες. Ο TNFα προσδένεται στους υποδοχείς στη κυτταρική επιφάνεια, παράγοντας σήματα που ενεργοποιούν τις φλεγμονώδεις λειτουργίες του κυττάρου. Οι υποδοχείς έχουν ένα εξωκυτταρικό τμήμα, το οποίο προσδένει τον TNFα με μεγάλη συγγένεια και ένα ενδοκυτταρικό τμήμα το οποίο είναι σημαντικό για την δημιουργία των σημάτων (25). Τα εξωκυτταρικά τμήματα και των 2 υποδοχέων έχουν ομόλογη αλληλουχία, ενώ τα ενδοκυτταρικά τμήματα φαίνεται να είναι αρκετά διαφορετικά (26).

Ο TNFR1 και ο TNFR2 ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των υποδοχέων TNF που είναι μία ομάδα μεμβρανικών πρωτεϊνών τύπου 1, οι οποίες περιέχουν χαρακτηριστικά επαναλαμβανόμενα τμήματα πλούσια σε κυστεΐνη στο εξωκυτταρικό τμήμα τους (27). Αυτή η πλούσια σε κυστεΐνη περιοχή που σχηματίζεται από 3 δισουλφιδικούς δεσμούς αποτελεί το κλειδί των υποδοχέων (23). Άλλα μέλη της υπερ-οικογένειας είναι τα TNFRSF5, αντιγόνο FA, NGFR και άλλα. Αυτά τα μόρια εμπλέκονται στην ρύθμιση της ωρίμανσης, της επιβίωσης και του θανάτου των κυττάρων (27).

Και οι 2 υποδοχείς του TNFα μπορούν να απελευθερωθούν μέσω πρωτεόλυσης από την κυτταρική επιφάνεια και να σχηματίσουν διαλυτά μόρια. Τα κυκλοφορούντα επίπεδα των υποδοχέων είναι αυξημένα σε πολλές παθολογικές καταστάσεις όπως σήψη, καρκίνος, αυτοάνοσες νόσοι, πυρετός, χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία και παχυσαρκία (26).

1.2.5 ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ

Ο TNFα έχει μία ποικιλία προ-φλεγμονωδών δράσεων και γι' αυτό εκφράζεται σχεδόν σε όλους τους τύπους κυττάρων ως απάντηση σε φλεγμονώδη σήματα. Μια δράση του είναι η πρόκληση πυρετού άμεσα με την δράση του ή μέσω ενεργοποίησης της έκκρισης της ιντερλευκίνης 1 (22). Σε απάντηση στην φλεγμονώδη διέγερση, τα μακροφάγα και τα μονοκύτταρα εκκρίνουν TNFα που μπορεί να προκαλέσει απόπτωση ή θάνατο κυττάρων διαφόρων τύπων (π.χ. καρκινικών) ή να ρυθμίσει την ενεργοποίηση, διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό των κυττάρων που παίζουν σημαντικό ρόλο στην φλεγμονώδεις παθήσεις (22,25). Η διαρκής αναπαραγωγή του TNFα σε ένα πλήθος ασθενειών, και κυρίως στον καρκίνο και σε σοβαρές λοιμώξεις, μπορεί να προκαλέσει σύνδρομο καχεξίας (22).

Ο TNFα είναι πλειοτροπικός, δηλαδή μπορεί να έχει πολλές διαφορετικές επιδράσεις σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα κατά την διάρκεια εξέλιξης μιας φλεγμονής. Έτσι εκτός από την φλεγμονώδη δράση του έχει και κατασταλτική δράση στην αυτοανοσοποίηση (25).

Τέλος όπως όλες οι κυτοκίνες μεσολαβεί στην επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (25) ενώ προκαλεί άμεσα ή έμμεσα και οξειδωτικό στρες ή οξείδωση λιπιδίων, φαινόμενα τα οποία σχετίζονται με την αθηροσκλήρωση (28).

1.2.5.1 TNFα και καχεξία

Αυξημένα επίπεδα TNFα έχουν βρεθεί στον ορό περίπου του 70% των ασθενών που πάσχουν από παρασιτικές λοιμώξεις και σηψαιμία, καταστάσεις που χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό καχεξίας. Στην καχεξία παρατηρείται μία δραματική απώλεια λευκών λιποκυττάρων η οποία οφείλεται κυρίως στην μειωμένη δραστηριότητα της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης και την αυξημένη δραστηριότητα της ορμονοευαίσθητης λιπάσης. Ο TNFα φαίνεται να μειώνει την δράση της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ενώ συνεργιστικά με την ιντερλευκίνη 1 έχει φανεί ότι αναστέλλουν την μεταφορά γλυκόζης στα λιποκύτταρα και επομένως μειώνουν τα διαθέσιμα υποστρώματα για λιπογένεση. Επιπλέον υπάρχουν στοιχεία που προτείνουν την συμμετοχή του TNFα στην απώλεια αζώτου και επομένως μυϊκής πρωτεΐνης. Τέλος, ο TNFα μαζί με άλλες κυτοκίνες όπως η ιντερλευκίνη 1 φαίνεται να έχει σημαντικό ρόλο στην θερμογένεση και επομένως την αύξηση του μεταβολικού ρυθμού (21).

1.2.5.2 TNFα και παχυσαρκία

Ο ακριβής ρόλος του TNFα στην παχυσαρκία δεν είναι σαφώς καθορισμένος (29). Παρόλο που ο ρόλος του TNFα στην καχεξία προτάθηκε περί το 1970, μόλις το 1993 ξεκίνησαν οι θεωρίες συσχέτισης της κυτοκίνης αυτής με την παχυσαρκία. Ο TNFα είναι πιθανό να σχετίζεται είτε με την πρόσληψη, είτε με την κατανάλωση, είτε με την αποθήκευση ενέργειας (21).

Ο TNFα ανήκει σε μία πολύπλοκη οικογένεια κυτοκινών που φαίνεται να έχει δραματικές επιδράσεις στην πρόσληψη τροφής. Η δράση του TNFα μπορεί να διαμεσολαβείται από την ιντερλευκίνη 1, η οποία δρα στον υποθάλαμο μειώνοντας την πρόσληψη τροφής. Επιπλέον, ο TNFα έχει φανεί να επηρεάζει τα επίπεδα ορμονών, όπως είναι η γλυκαγόνη, η ινσουλίνη και τα γλυκοκορτικοειδή, οι οποίες επηρεάζουν επίσης την πρόσληψη τροφής (21).

Ο λιπώδης ιστός είναι μία σημαντική πηγή ενδογενούς παραγωγής του TNFα (30). In vitro μελέτες σε παχύσαρκα τρωκτικά καθώς και σε παχύσαρκους ανθρώπους δείχνουν αυξημένη έκφραση του TNFα στον λιπώδη ιστό γι' αυτό και το γονίδιο του έχει θεωρηθεί ως υποψήφιο γονίδιο για την παχυσαρκία (15). Οι δράσεις του στον λιπώδη ιστό είναι πολλές και περιλαμβάνουν την μείωση της δραστηριότητας της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης, την μείωση της έκφρασης των μεταφορέων γλυκόζης GLUT4, και την αύξηση της ορμονο-ευαίσθητης λιπάσης. Η ρύθμιση της έκφρασης αυτών και άλλων γονιδίων μπορεί να επηρεάσει την ινσουλινοευαισθησία των λιποκυττάρων και την κατανομή των λιπιδίων με μηχανισμούς που δεν είναι ακόμα ξεκάθαροι (31).

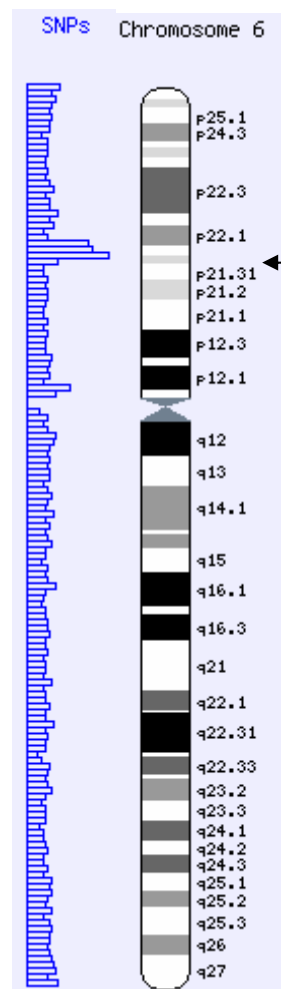
Ο TNFα ρυθμίζει επίσης την δράση της ινσουλίνης στα λιποκύτταρα με αποτέλεσμα μία πιθανή διαφορά της ικανότητας αποθήκευσης λίπους κατά την διάρκεια της υπερινσουλιναϊμίας. Κάποιοι πολυμορφισμοί του γονιδίου του TNFα έχουν σχετιστεί με υψηλό αναπνευστικό πηλίκο, που δηλώνει υψηλό επίπεδο οξειδωσης γλυκόζης και σύνθεσης λιπιδίων κατά την υπερινσουλιναϊμία. Επομένως ο TNFα μπορεί να σχετίζεται με αποθήκευση λίπους κατά την υπερινσουλιναϊμία και μακροπρόθεσμη αύξηση βάρους (32). Η αυξημένη έκφραση του TNFα στον λιπώδη ιστό στην παχυσαρκία φαίνεται να σχετίζεται ισχυρά με το επίπεδο της υπερινσουλιναϊμίας (33).

Είναι βέβαια παράδοξο το γεγονός ότι μία κυτοκίνη η οποία προάγει την καχεξία βρίσκεται σε αυξημένα επίπεδα σε παχύσαρκα άτομα. Βέβαια, πρέπει να λάβουμε υπόψη ότι οι έρευνες που εξετάζουν την επίδραση του TNFα στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού μελετούν κυρίως πολύ υψηλά επίπεδα της κυτοκίνης. Είναι λοιπόν πιθανό ο πραγματικός ρόλος του TNFα στην ανάπτυξη του λιπώδους ιστού να έχει επικαλυφθεί σε αυτές τις έρευνες λόγω της χρήσης επιπέδων κυτοκίνης πολύ μεγαλύτερων από το φυσιολογικό. Επιπλέον, οι μελέτες in vitro εξετάζουν συγκεκριμένους μεμονωμένους παράγοντες ενώ στην πραγματικότητα πολλαπλοί ενδοκρινείς παράγοντες αλληλεπιδρούν για το τελική ανταπόκριση του κυττάρου. Για

παράδειγμα ο IGF-1 (insulin-like growth factor 1), μία κυτοκίνη που παράγεται στα λιποκύτταρα μπορεί να δρα ως παρακρινής παράγοντας για την ανάπτυξη του λιπώδους ιστού. Το εάν ο IGF-1 θα διεγείρει την διαφοροποίηση ή τον πολλαπλασιασμό των λιποκυττάρων εξαρτάται από την παρουσία ή την απουσία άλλων παραγόντων όπως ο TNFα (34).

1.2.6 ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΟΥ TNFα

Το ανθρώπινο γονίδιο του TNFα βρίσκεται στο ανθρώπινο χρωμόσωμα 6p21.3, είναι στενά συνδεδεμένο με την περιοχή στην οποία εντοπίζονται τα γονίδια του Μείζονος Συμπλόκου Ιστοσυμβατότητας (MHC) και εξαπλώνεται στην περιοχή τάξης III ανάμεσα στα γονίδια που κωδικοποιούν το MHC τάξης II και το ανθρώπινο αντιγόνο των λευκοκυττάρων (HLA) (35). Το γονίδιο του TNFα έχει 4 εξόνια που καταλαμβάνουν 2,762bp στην θέση του χρωμοσώματος 6p21.3 και η έκφραση του δημιουργεί mRNA μεγέθους 1,669nt (22).



Εικόνα 2.2: Ανθρώπινο χρωμόσωμα 6 και θέση γονιδίου TNF.
Πηγή: Human Chromosome 6 Project Overview. Sanger Institute.
www.sanger.ac.uk/HGP/Chr6/

1.2.7 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Πολλοί πολυμορφισμοί που οφείλονται σε αλλαγή ενός νουκλεοτιδίου (single nucleotide polymorphisms-SNPs) έχουν βρεθεί μέσα ή γύρω από το γονίδιο του TNF. Εξάλλου όπως φαίνεται και στην εικόνα 2.2 η περιοχή γύρω από το γονίδιο του TNF εμφανίζει τους περισσότερους πολυμορφισμούς σε όλο το χρωμόσωμα 6.

Οι περισσότεροι πολυμορφισμοί που έχουν βρεθεί βρίσκονται στις αναρροϊκές, πλευρές του γονιδίου και συγκεκριμένα στις παρακάτω θέσεις:

1. -1031
2. -863
3. -857
4. -851
5. -419
6. -376
7. -308
8. -238
9. -163
10. -49

Από αυτούς του πολυμορφισμούς, αυτοί στις θέσεις -419, -163 και -49 είναι σπάνιοι. Οι περισσότεροι από τους πολυμορφισμούς είναι αντικαταστάσεις της γουανίνης (G) από αδερίνη (A). υπάρχουν εξαιρέσεις που αφορούν τον πολυμορφισμό -419 όπου γίνεται αντικατάσταση γουανίνης από κυτοσίνη, τον -851 όπου γίνεται αντικατάσταση κυτοσίνης από θυμίνη, τον -857 και τον -863 όπου γίνεται αντικατάσταση κυτοσίνης από αδερίνη και τον -1031 όπου γίνεται αντικατάσταση θυμίνης από κυτοσίνη. Τέλος, έχει βρεθεί ένας πολυμορφισμός σε μη μεταγραφόμενη περιοχή στην θέση +691, όπου υπάρχει απώλεια γουανίνης (20).

Πολλοί από τους πολυμορφισμούς στον γενετικό τόπο του TNF φαίνεται να σχετίζονται με διαφορές στην κυτταρική έκκριση του TNFα. Για παράδειγμα η έρευνα των Skoog et al έδειξε ότι ο λιπώδης ιστός μη παχύσαρκων ατόμων με το αλληλίο -863A εκκρίνει σημαντικά λιγότερο TNFα σε σχέση με τον λιπώδη ιστό μη παχύσαρκων ατόμων με το αλληλίο -863C, ενώ οι μη παχύσαρκοι φορείς του A αλληλίου του πολυμορφισμού -857 εκκρίνουν 3 φορές περισσότερο TNFα σε σχέση με τους φορείς του C αλληλίου (36).

1.2.8 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ -308 G/A

Ο πολυμορφισμός -308 G/A οφείλεται σε αντικατάσταση της γουανίνης με αδενίνη στη περιοχή του υποκινητή του γονιδίου του TNFα. Τα άτομα που εμφανίζουν τον πολυμορφισμό και στα δύο αλληλόμορφα γονίδια χαρακτηρίζονται ομοζυγώτες στον πολυμορφισμό (AA) ενώ αν η αντικατάσταση της γουανίνης από αδενίνη έχει γίνει μόνο στο ένα αλληλόμορφο ονομάζονται ετεροζυγώτες (GA). Τα άτομα χωρίς τον πολυμορφισμό είναι ομοζυγώτες φυσιολογικοί (GG). Οι ομοζυγώτες AA και οι ετεροζυγώτες αποτελούν τους φορείς του A αλληλίου. Οι ετερόζυγοι είναι επίσης φορείς του G αλληλίου όπως άλλωστε και οι ομόζυγοι φυσιολογικοί (29).

Ο πολυμορφισμός αυτός φαίνεται να σχετίζεται με παχυσαρκία, υπερλεπτιναιμία, ινσουλινοαντίσταση και αυξημένη μεταγραφική δραστηριότητα του TNFα (37). Η ύπαρξη του A αλληλίου έχει επίσης σχετιστεί με αυξημένη παραγωγή TNFα σε καλλιέργειες κυττάρων ολικού αίματος με λιποπολυσακχαρίτες (29).

Μελέτες έχουν δείξει ότι η αυξημένη μεταγραφή πιθανότατα να οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα γλυκόζης και ινσουλίνης και αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους (19). Για παράδειγμα, έρευνα των Fernandez – Real et al έχει δείξει ότι άτομα που έχουν τον πολυμορφισμό -308 G/A του γονιδίου που οδηγεί σε αυξημένο ρυθμό μεταγραφής του TNFα έχουν υψηλότερα επίπεδα ινσουλίνης πλάσματος, μειωμένη ινσουλινοευαισθησία, αυξημένο ποσοστό σωματικού λίπους και αυξημένη συγκέντρωση λεπτίνης ορού (38).

Ο πολυμορφισμός έχει επίσης συνδεθεί με την παχυσαρκία και το ποσοστό σωματικού λίπους σε αρκετές μελέτες, αν και ταυτόχρονα υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός ερευνών που δεν δείχνουν κάποια συσχέτιση του πολυμορφισμού με την παχυσαρκία. Τα αποτελέσματα των ερευνών θα αναλυθούν στην επόμενη ενότητα.

Η συχνότητα του πολυμορφισμού ποικίλλει ιδιαίτερα ανάλογα με τον πληθυσμό που μελετάται. Ενδεικτικά έχουν αναφερθεί οι παρακάτω συχνότητες A αλληλίου:

- ο 0,20 στην Σουηδία σε δείγμα 254 ατόμων (36)
- ο 0,24 στην Βόρεια Ιρλανδία σε δείγμα 372 ατόμων (39)
- ο 0,24 στην Αυστραλία σε δείγμα 180 παχύσαρκων ατόμων (29)
- ο 0,16 στην Γαλλία σε μεγάλο δείγμα καρδιοπαθών και υγιών ατόμων (39)
- ο 0,08 σε διαβητικά και 7,4% σε μη διαβητικά άτομα Κινέζικης καταγωγής σε δείγμα 604 ατόμων (37)
- ο 0,014 σε διαβητικά άτομα Ιαπωνικής καταγωγής σε δείγμα 71 ατόμων (37)
- ο 0,015 σε 299 μη-διαβητικά άτομα Ιαπωνικής καταγωγής (37)
- ο 0,09 στην Κορέα σε δείγμα 153 γυναικών (40)
- ο 0,18 σε δείγμα υπέρτασικών εφήβων στην Αμερική (41)
- ο 0,07 σε δείγμα 237 καρδιοπαθών και 0,02 σε δείγμα 237 υγιών Ελλήνων (42)
- ο 0,15 σε δείγμα 79 Ιταλών φυσιολογικού βάρους και 0,13 σε δείγμα 115 παχύσαρκων Ιταλών (51)

1.2.9 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

1.2.9.1 Έρευνες σε παιδιά και εφήβους

Ελάχιστες έρευνες έχουν μελετήσει τον TNFα ορού σε παιδιά και εφήβους ενώ μόνο μία έρευνα έχει αξιολογήσει τον επιπολασμό και τις επιπτώσεις του πολυμορφισμού -308G/A του γονιδίου του TNFα σε εφήβους.

Σε έρευνα που διεξήχθη στην Τουρκία μελετήθηκε η σχέση μεταξύ των επιπέδων TNFα ορού, του σχετικού ΔΜΣ (πραγματικός ΔΜΣ / αναμενόμενος ΔΜΣ x 100) και της υπερινσουλιναιμίας σε 14 παχύσαρκα, 10 υποσιτισμένα και 10 παιδιά φυσιολογικού βάρους. Τα παχύσαρκα παιδιά είχαν σαφώς υψηλότερα επίπεδα TNFα ορού σε σχέση με τα παιδιά φυσιολογικού βάρους ($20,94 \pm 0,38$ pg/ml έναντι 2.97 ± 0.05 pg/ml). Τα επίπεδα στα υποσιτισμένα παιδιά δεν διέφεραν σημαντικά από τα επίπεδα των παιδιών φυσιολογικού βάρους. Τα επίπεδα TNFα ορού δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ των υπερινσουλιναιμικών και νορμοϊνσουλιναιμικών παχύσαρκων παιδιών (43).

Στην Κορέα σε δείγμα 71 εφήβων βρέθηκε ότι τα επίπεδα TNFα καθώς και υποδοχέων TNFα στον ορό ήταν σημαντικά υψηλότερα στην ομάδα των παχύσαρκων εφήβων. Μάλιστα οι παχύσαρκοι έφηβοι είχαν σχεδόν τετραπλάσια επίπεδα TNFα ορού και διπλάσια επίπεδα υποδοχέα TNFR2 ορού από τους έφηβους φυσιολογικού σωματικού βάρους. Θετική συσχέτιση υπήρξε και μεταξύ επιπέδων TNFα ορού και ΔΜΣ καθώς και με την περιφέρεια μέσης. Επίσης είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι τα αγόρια είχαν υψηλότερα επίπεδα TNFα ορού και υποδοχέων σε σχέση με τα κορίτσια (44).

Τέλος σε δείγμα 175 εφήβων στην Αργεντινή μελετήθηκε η σχέση του πολυμορφισμού -308G/A του γονιδίου του TNFα με χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου. Η συχνότητα των γονότυπων στο συνολικό δείγμα ήταν 78,8% για τον GG γονότυπο (φυσιολογικά άτομα), 18,8% για τον GA γονότυπο (ετεροζυγώτες στον πολυμορφισμό) και 2,4% για τον AA γονότυπο (ομοζυγώτες στον πολυμορφισμό). Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα του A αλληλίου στους εφήβους με υπέρταση (17,74% σε σχέση με 8,41% στους εφήβους με φυσιολογική αρτηριακή πίεση) ανεξάρτητα από τον ΔΜΣ και το WHR, όμως δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φορέων και μη φορέων του A αλληλίου όσον αφορά τον ΔΜΣ, το WHR και άλλα χαρακτηριστικά του μεταβολικού συνδρόμου (HDL, τριγλυκερίδια, γλυκόζη νηστείας κλπ) (41).

1.2.9.2 Έρευνες σε ενήλικους

Αρκετές έρευνες έχουν μελετήσει την συσχέτιση του TNFα ορού και του πολυμορφισμού -308G/A με τον ΔΜΣ και άλλους δείκτες παχυσαρκίας, τον βαθμό παχυσαρκίας και τις αλλαγές του σωματικού βάρους. Τα αποτελέσματα των ερευνών είναι αντικρουόμενα και γι' αυτό ο πραγματικός ρόλος του TNFα στην εμφάνιση της παχυσαρκίας δεν είναι σαφώς καθορισμένος (29).

Μελέτη της συσχέτισης των επιπέδων TNFα ορού και σωματικού βάρους διεξήχθη σε 38 παχύσαρκες και 30 φυσιολογικού βάρους γυναίκες (ομάδα ελέγχου) στις ΗΠΑ. Τα επίπεδα TNFα ορού των παχύσαρκων γυναικών ήταν σημαντικά υψηλότερα σε σχέση με την ομάδα ελέγχου. Οι παχύσαρκες γυναίκες ακολούθησαν υποθερμιδική δίαιτα και συμπεριφοριστική θεραπεία για 1 έως 2 χρόνια. Στο τέλος της παρέμβασης τα επίπεδα TNFα ορού των παχύσαρκων γυναικών είχαν μειωθεί σε ποσοστό ~25% παράλληλα με την απώλεια βάρους (45).

Σημαντική συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων TNFα ορού και του σπλαχνικού λίπους βρέθηκε και σε 132 Ιάπωνες με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 (46).

Επίσης στην Ιαπωνία οι Katsuki et al σχεδίασαν μία έρευνα παρέμβασης στην οποία συμμετείχαν δώδεκα παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, δώδεκα μη παχύσαρκα άτομα με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2, οκτώ παχύσαρκα άτομα χωρίς σακχαρώδη διαβήτη και δώδεκα υγιή άτομα με φυσιολογικό σωματικό βάρος. Στην αρχή της μελέτης τα παχύσαρκα άτομα με ή χωρίς σακχαρώδη διαβήτη είχαν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα TNFα ορού σε σχέση με τα μη παχύσαρκα άτομα, είτε αυτά ήταν διαβητικά είτε όχι. Εν συνεχεία όλα τα διαβητικά άτομα ακολούθησαν για 4 εβδομάδες υποθερμιδική δίαιτα 1400-1700 kcal και πρόγραμμα φυσικής δραστηριότητας (15.000 βήματα καθημερινά). Στο τέλος της παρέμβασης τα επίπεδα TNFα ορού είχαν μειωθεί σημαντικά στην ομάδα των παχύσαρκων διαβητικών, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή των επιπέδων TNFα ορού στους μη παχύσαρκους διαβητικούς. Τα επίπεδα TNFα ορού σχετίστηκαν θετικά με το σπλαχνικό λίπος σε όλα τα διαβητικά άτομα, αλλά δεν σχετίστηκαν ούτε με το υποδόριο ούτε με το συνολικό λίπος στο σύνολο των συμμετεχόντων (47).

Η μελέτη των Xu et al σε καλλιεργημένα ανθρώπινα λιποκύτταρα έδειξε ότι τα επίπεδα της διαμεμβρανικής πρωτεΐνης TNFα ήταν σημαντικά υψηλότερα στα παχύσαρκα άτομα σε σχέση με τα φυσιολογικά (48).

Οι Hotamisligil et al το 1995 βρήκαν ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης του TNFα στον λιπώδη ιστό και της έκτασης της υπερινσουλιναϊμίας, όμως δεν βρέθηκε καμία συσχέτιση με το WHR, γεγονός που οδήγησε τους ερευνητές στο συμπέρασμα ότι η έκφραση του TNFα δεν συνδέεται στενά με διαφορές στην κατανομή του σωματικού λίπους (33).

Οι Kern et al μελέτησαν την έκφραση του TNFα σε βιοψίες λιπώδους ιστού 39 υγιών ατόμων. Στο σύνολο των ατόμων δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ παχυσαρκίας και TNFα. Όμως όταν αποκλείστηκαν από το δείγμα τα άτομα με

$\Delta\text{ΜΣ} >45\text{kg/m}^2$, το TNF mRNA σχετίστηκε σημαντικά με το $\Delta\text{ΜΣ}$. Εξάλλου, τα άτομα με ήπια ή μέτρια παχυσαρκία ($\Delta\text{ΜΣ} 27\text{--}45\text{ kg/m}^2$) είχαν υψηλότερα επίπεδα TNF mRNA. Η συσχέτιση μεταξύ TNF mRNA και σωματικού λίπους μετρημένου με την μέθοδο της βιοηλεκτρικής εμπέδησης ήταν δυνατότερη από την συσχέτιση με το $\Delta\text{ΜΣ}$. Συγκεκριμένα, το TNF mRNA αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση του ποσοστού σωματικού λίπους αλλά και με το σωματικό λίπος εκφρασμένο σε κιλά. Μετά από απώλεια βάρους μέσω υποθερμιδικής διαίτας τα επίπεδα TNF mRNA μειώθηκαν στο $58 \pm 7\%$ των αρχικών επιπέδων. Η μείωση αυτή όμως δεν σχετίστηκε με το ποσό της απώλειας βάρους ή τον βαθμό της αρχικής παχυσαρκίας (31).

Μία από τις πρώτες μελέτες που προσπάθησαν να διερευνήσουν την σχέση μεταξύ του γονιδίου του TNFα και της παχυσαρκίας διενεργήθηκε το 1994 από τους Norman et al με δείγμα 764 ατόμων καταγωγής Ινδιάνων Pima. Σε αυτή την μελέτη ένα τμήμα 10kb από το γονίδιο του TNFα συνδέθηκε με το ποσοστό σωματικού λίπους αν και δεν αναφέρθηκε συσχέτιση μεταξύ κάποιου πολυμορφισμού του TNFα με την παχυσαρκία (15).

Έρευνα σε 50 Καναδούς γαλλικής καταγωγής με υπέρταση έδειξε σημαντική θετική συσχέτιση του γονιδίου του TNFα με διάφορους δείκτες παχυσαρκίας. Η περιοχή του γονιδίου του TNFα συσχετίστηκε σημαντικά με τον $\Delta\text{ΜΣ}$ καθώς και με το ολικό σωματικό λίπους εκτιμώμενο τόσο από δερματικές πτυχές όσο και με βιοηλεκτρική εμπέδηση. Το γονίδιο συσχετίστηκε επίσης σημαντικά με την περιφέρεια του μηρού, ενώ υπήρξαν συσχετίσεις και με τις περιφέρειες βραχίονα, μέσης και ισχίων, οι οποίες όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Μετά από διαχωρισμό ανάλογα με το φύλο βρέθηκε σημαντική συσχέτιση με την περιφέρεια μέσης, το WHR και την δερματική πτυχή υπερλαγόνιου για τους άντρες και με τις περιφέρειες άνω και μέσου μηρού και την δερματική πτυχή του μηρού στις γυναίκες. Επομένως αυτή η έρευνα έδειξε ότι ο TNFα επηρεάζει την κατανομή του λίπους κυρίως στην κοιλιακή χώρα για τους άντρες και την περιοχή των μηρών για τις γυναίκες. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί ότι τα αποτελέσματα είχαν υψηλότερη στατιστική σημαντικότητα σε άτομα που ήταν παχύσαρκα αλλά όχι με νοσογόνο παχυσαρκία (49).

Προοπτική έρευνα σε 335 υγιείς γυναίκες από την Αυστραλία δεν βρήκε καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση οποιουδήποτε πολυμορφισμού στον υποκινητή του TNFα με αλλαγές στο σωματικό βάρος, την λιπώδη μάζα ή το ποσοστό λίπους. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά μετρήθηκαν στην αρχή της έρευνας καθώς και μετά από 2 χρόνια (follow-up), όπου οι αλλαγές στην μάζα σώματος ή λίπους δεν σχετίστηκαν με τους διάφορους πολυμορφισμούς του TNFα και έπειτα από διόρθωση για την ηλικία και τα ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά (50).

Όσον αφορά τον πολυμορφισμό TNFα -308G/A η έρευνα των Skoog et al σε δείγμα 254 ενήλικων ατόμων Σουηδικής καταγωγής δεν έδειξε καμία συσχέτιση με τα επίπεδα TNFα ορού (36).

Η μελέτη των Wang et al σε 1281 Κινέζους με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 δεν έδειξε καμία συσχέτιση μεταξύ του TNFα -308G/A πολυμορφισμού και της παχυσαρκίας, αν και στην συγκεκριμένη έρευνα το ποσοστό των φορέων του AA γονότυπου ήταν ιδιαίτερα χαμηλό (0,8%) (37).

Η συχνότητα των γονότυπων και των αλληλίων του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A επίσης δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ παχύσαρκων και φυσιολογικών ατόμων σε δείγμα 194 Ιταλών. Καμία συσχέτιση του πολυμορφισμού δεν βρέθηκε και μεταξύ των βαθμίδων παχυσαρκίας αλλά και με το ολικό σωματικό λίπος και την άλιπη μάζα σώματος (51).

Καμία σημαντική διαφορά μεταξύ παχύσαρκων και μη στις συχνότητες εμφάνισης του πολυμορφισμού δεν βρέθηκε και σε έρευνα σε παχύσαρκους Κορεάτες (30).

Επίσης οι Walston et al δεν βρήκαν καμία σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A και του ΔΜΣ ή του WHR σε δείγμα 424 ατόμων (52).

Στην Κορέα σε δείγμα 153 γυναικών δεν φάνηκε στατιστικά σημαντική διαφορά όσον αφορά την συχνότητα εμφάνισης του πολυμορφισμού μεταξύ των παχύσαρκων και μη γυναικών, όπως επίσης δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του ΔΜΣ. Είναι όμως αξιοσημείωτο ότι η συχνότητα του A αλληλίου ήταν χαμηλότερη στις ομάδες με ΔΜΣ 27-40kg/m² σε σχέση με την ομάδα που είχε ΔΜΣ 25-26kg/m², παρόλο που η διαφορά αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική (40).

Σε μελέτη 464 ατόμων στη Σουηδία η κατανομή των 3 γονότυπων του πολυμορφισμού -308G/A δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ παχύσαρκων και μη παχύσαρκων ατόμων. Όμως, ανάμεσα στις γυναίκες, όσες είχαν γονότυπο AA, ήταν δηλαδή ομόζυγες ως προς τον πολυμορφισμό, ήταν στατιστικά σημαντικά πιο παχύσαρκες σε σχέση με τον γονότυπο AG (ετερόζυγοι) και τον γονότυπο GG (φυσιολογικοί). Ο μέσος ΔΜΣ των γυναικών με γονότυπο AA ήταν περίπου 10 kg/m² πιο υψηλός και το σωματικό λίπος 1/3 περισσότερο από τις γυναίκες με γονότυπους AG και GG. Το 75% των γυναικών με γονότυπο AA είχε ΔΜΣ > 40 kg/m² σε αντίθεση με το 25% των AG και 22% των GG. Ο πολυμορφισμός δεν είχε στατιστικά σημαντική επιρροή στο ΔΜΣ ή το σωματικό λίπος των αντρών που συμμετείχαν στην έρευνα. Στο συνολικό δείγμα (άντρες και γυναίκες) οι φορείς AA είχαν σχεδόν 7 kg/m² υψηλότερο ΔΜΣ από τα υπόλοιπα άτομα. Επίσης το ποσοστό λίπους ήταν περίπου 25% υψηλότερο στους AA φορείς. Καμία διαφορά δεν βρέθηκε μεταξύ των 3 γονότυπων όσον αφορά το WHR (53).

Έρευνα των Herrmann et al σε πληθυσμούς της Γαλλίας και της Βόρειας Ιρλανδίας έδειξε αυξημένη συχνότητα του A αλληλίου του πολυμορφισμού -308 G/A σε υπέρβαρα άτομα. Ο μέσος ΔΜΣ των φορέων του A αλληλίου ήταν υψηλότερος σε σχέση με τους μη φορείς τόσο σε υγιή άτομα (26,7 kg/m² vs 26,1 kg/m²) όσο και σε άτομα με καρδιοπάθειες (26,7 kg/m² vs 26,3 kg/m²) (39).

Σε έρευνα που διεξήχθη στην Αυστραλία σε 180 παχύσαρκους Αυστραλούς, άντρες και γυναίκες, ο πολυμορφισμός TNFα -308G/A συνδέθηκε με αυξημένη ινσουλινοαντίσταση και υψηλή περιφέρεια μέσης στα άτομα με τον AA πολυμορφισμό, που αποτελούσαν το 7% του εξεταζόμενου δείγματος (29).

Οι Pihlajamaki et al σε δείγμα 129 υγιών Φιλανδών ερεύνησαν την σχέση του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A με την δράση της ινσουλίνης στον μεταβολισμό της γλυκόζης, στην σύνθεση των λιπιδίων και στα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων σε άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους και υπέρβαρα. Όσον αφορά την συσχέτιση με την παχυσαρκία δεν βρέθηκε διαφορά στην συχνότητα εμφάνισης των γονότυπων μεταξύ των ομάδων διαφορετικού ΔΜΣ, όμως ο ΔΜΣ έτεινε να είναι υψηλότερος στα άτομα με τον πολυμορφισμό ($28.8 \pm 5.4 \text{ kg/m}^2$ έναντι $26.3 \pm 3.9 \text{ kg/m}^2$). Ο πολυμορφισμός σχετίστηκε επίσης με υψηλά επίπεδα οξείδωσης της γλυκόζης, με υψηλότερο RQ και με μεγαλύτερο ρυθμό σύνθεσης λιπιδίων. Η επίδραση του πολυμορφισμού στην οξείδωση της γλυκόζης και την σύνθεση λιπιδίων κατά την υπερινσουλιναμία φάνηκε να εξαρτάται και από το ΔΜΣ. Σε άτομα φυσιολογικού σωματικού βάρους, η ύπαρξη του πολυμορφισμού βελτίωσε την οξείδωση της γλυκόζης και στα υπέρβαρα άτομα συνέβαλλε στην σύνθεση λιπιδίων. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδήγησαν στην διατύπωση της υπόθεσης ότι ο TNFα ρυθμίζει την δράση της ινσουλίνης στα λιποκύτταρα με αποτέλεσμα μία πιθανή διαφορά της ικανότητας αποθήκευσης λίπους κατά την διάρκεια της υπερινσουλιναμίας μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων του γονιδίου του TNFα. Επομένως αυτός ο πολυμορφισμός είναι πιθανό να σχετίζεται με αποθήκευση λίπους κατά την υπερινσουλιναμία και μακροπρόθεσμα αύξηση βάρους (32).

Στην Αυστραλία αξιολογήθηκε η συσχέτιση του πολυμορφισμού TNFα -308G/A με το αρχικό βάρος και το ποσό απώλεια βάρους σε δείγμα 256 παχύσαρκων ατόμων που ακολούθησαν υποθερμιδική δίαιτα για 12 εβδομάδες. Στην αρχική αξιολόγηση δεν εμφανίστηκε διαφορά μεταξύ των γονότυπων όσον αφορά την πρόσληψη ενέργειας, λίπους, υδατανθράκων και πρωτεΐνης, και η παρουσία του πολυμορφισμού δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τον ΔΜΣ. Επιπλέον ο πολυμορφισμός δεν επηρέασε το ποσό απώλειας βάρους και την μείωση της περιφέρειας μέσης μετά από την υποθερμιδική δίαιτα. Συγκεκριμένα τα άτομα με γονότυπο GG έχασαν $8.1 \pm 0.65 \text{ kg}$, με γονότυπο AG $6.9 \pm 0.77 \text{ kg}$ και με γονότυπο AA $7.6 \pm 0.12 \text{ kg}$ (19).

Στην μελέτη The Finnish Diabetes Prevention Study έλαβαν μέρος 522 υπέρβαρα άτομα που χωρίστηκαν στην ομάδα ελέγχου και στην ομάδα παρέμβασης, τα άτομα της οποίας ακολούθησαν εξατομικευμένο πρόγραμμα διαίτας και άσκησης. Δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά στην απώλεια βάρους μεταξύ των ατόμων με τον γονότυπο GG και των ατόμων με τον γονότυπο AG και AA του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A, τόσο στην ομάδα παρέμβασης όσο και στην ομάδα ελέγχου (54).

Τέλος, έρευνα των Mantzoros et al σε 82 Έλληνες άντρες και γυναίκες απέτυχε να δείξει συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων του υποδοχέα TNFR1 στον ορό και του ΔΜΣ (55).

1.3. ΓΕΥΜΑΤΙΚΕΣ ΣΥΝΗΘΕΙΕΣ

1.3.1. Εισαγωγή

1.3.2. Συχνότητα και αριθμός κύριων και ενδιάμεσων γευμάτων

1.3.3. Κατανάλωση πρωινού

1.3.4. Κατανάλωση μεσημεριανού και βραδινού

1.3.5. Κατανάλωση φαγητού από εστιατόρια και fast-food

1.3.6. Συμπεριφορές κατά την διάρκεια του φαγητού

1.3.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μη υγιεινές γευματικές συνήθειες έχουν σχετιστεί με παχυσαρκία, αυξημένα επίπεδα λιποπρωτεϊνών, μη φυσιολογικό μεταβολισμό γλυκόζης, αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη και μειωμένη πρόσληψη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών (56). Λίγες έρευνες όμως έχουν προσπαθήσει να αναγνωρίσουν την σχέση των γευματικών συνηθειών με την ανάπτυξη της παχυσαρκίας. Μάλιστα οι περισσότερες από αυτές τις έρευνες αφορούν ενήλικο πληθυσμό, και λίγες είναι αυτές που αναφέρονται στην σχέση παχυσαρκίας – γευματικών συνηθειών στα παιδιά (57).

Με τον όρο γευματικές συνήθειες (meal patterns) εννοούνται η συχνότητα των γευμάτων, ο τύπος (πρωινό, μεσημεριανό, βραδινό, σνακ), η πηγή των γευμάτων (σπιτικό, από εστιατόριο, fast-food, κλπ), και ο συνολικός αριθμός των κύριων και ενδιάμεσων γευμάτων που καταναλώνονται μέσα στην ημέρα (56). Άλλες γευματικές συνήθειες είναι η κατανάλωση του γεύματος μπροστά στην τηλεόραση ή κάνοντας ταυτόχρονα κάποια άλλη δραστηριότητα, η κατανάλωση φαγητού χωρίς να υπάρχει το αίσθημα της πείνας, η κατανάλωση του γεύματος σε άλλο χώρο εκτός της τραπεζαρίας, και η κατανάλωση γεύματος σε μη κατάλληλα σκεύη ή σε μη κατάλληλη θέση (π.χ. ξαπλωμένος) (58).

Πολλές από τις παραπάνω συνήθειες έχει θεωρηθεί ότι επηρεάζουν την αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης και επομένως την εμφάνιση της παχυσαρκίας (17). Για παράδειγμα αρκετές έρευνες έχουν δείξει θετική συσχέτιση μεταξύ ΔΜΣ και κατανάλωσης φαγητού σε εστιατόρια (57). Επίσης η παράλειψη κάποιων γευμάτων είναι πιθανό να σχετίζεται με τον κίνδυνο παχυσαρκίας (18) ενώ η κατανάλωση πρωινού φαίνεται να σχετίζεται με πρόληψη της αύξησης βάρους (59).

1.3.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΥΡΙΩΝ ΚΑΙ ΕΝΔΙΑΜΕΣΩΝ ΓΕΥΜΑΤΩΝ

Πολλές φορές είναι δύσκολος ο ορισμός του «κύριου γεύματος» και του «ενδιάμεσου γεύματος» ειδικότερα στα παιδιά και τους εφήβους. Πολλοί ερευνητές ορίζουν ως «κύριο γεύμα» ένα επεισόδιο κατανάλωσης τροφής το οποίο συμβαίνει σε μία συνήθη ώρα γεύματος και ως «ενδιάμεσο γεύμα» τα επεισόδια κατανάλωσης τροφής τα οποία συμβαίνουν εκτός των συνήθων ωρών κατανάλωσης γευμάτων. Άλλοι ερευνητές, έχουν ζητήσει από τους συμμετέχοντες να καθορίσουν οι ίδιοι εάν καταναλώνουν «κύριο γεύμα» ή «ενδιάμεσο γεύμα». Τέλος, κάποιοι ερευνητές ορίζουν το «κύριο γεύμα» και το «ενδιάμεσο γεύμα» ανάλογα με την ποσότητα της τροφής που καταναλώθηκε (18).

Η μετανάλυση ερευνών σχετικά με τις συνήθειες διατροφής παιδιών και εφήβων από τους Nicklas et al δείχνει αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας κατανάλωσης γευμάτων και του σωματικού βάρους. Μάλιστα φαίνεται ότι τα παιδιά και οι έφηβοι με τακτικές και σταθερές γευματικές συνήθειες (π.χ. 3 γεύματα την ημέρα) είναι πιο αδύνατα από αυτά που δεν έχουν σταθερές γευματικές συνήθειες (58).

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και έρευνα στις ΗΠΑ, όπου συμμετείχαν 106 κορίτσια ηλικίας 9 ετών κατά την έναρξη και 15 ετών κατά την επαναξιολόγηση. Στην ηλικία των 9 ετών τα κορίτσια κατανάλωναν κατά μέσο όρο 5 γεύματα και σνακ τις καθημερινές και 4 ½ τα σαββατοκύριακα. Στην επαναξιολόγηση ο αριθμός γευμάτων και σνακ είχε μειωθεί σε 4 τόσο τις καθημερινές όσο και τα σαββατοκύριακα. Ο μέσος συνολικός αριθμός καθημερινών γευμάτων και σνακ σχετίστηκε σημαντικά με αλλαγές στο z-score* του ΔΜΣ κατά τον επανέλεγχο. Συγκεκριμένα, τα κορίτσια που κατανάλωναν 4 - 5,9 γεύματα και σνακ την ημέρα είχαν μικρότερη αύξηση του z-score του ΔΜΣ σε σχέση με τα κορίτσια που κατανάλωναν λιγότερα από 4 ή περισσότερα από 6 γεύματα και σνακ. Όσον αφορά την κατανομή των επεισοδίων κατανάλωσης τροφής μέσα στην ημέρα, παρατηρήθηκε κατά μέσο όρο κατανάλωση 1,1 γευμάτων και σνακ τις πρωινές ώρες (6:00-11:00), 2 τις μεσημεριανές (11:00-17:00) και 1,6 τις απογευματινές / βραδινές (17:00-6:00). Ο αριθμός των απογευματινών / βραδινών γευμάτων και σνακ σχετίστηκε σημαντικά με αλλαγές στο z-score του ΔΜΣ κατά τον επανέλεγχο. Συγκεκριμένα, τα κορίτσια που έτρωγαν έως 1,9 φορές το απόγευμα και το βράδυ εμφάνισαν μικρότερη αύξηση του z-score σε σχέση με τα κορίτσια που κατανάλωναν 3 ή περισσότερα γεύματα και σνακ το απόγευμα και το βράδυ (18).

Στοιχεία πολλών ερευνών δείχνουν ότι ο μέσος ημερήσιος αριθμός συνολικών γευμάτων και σνακ έχει μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες. Σύμφωνα με στοιχεία της έρευνας The Bogalusa Heart Study στις ΗΠΑ ο μέσος αριθμός των συνολικών επεισοδίων κατανάλωσης τροφής μειώθηκε από 6,6 το 1973-4 σε 5,2 το 1993-4 (56).

1.3.3 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΠΡΩΙΝΟΥ

Οι Rampersaud et al το 2005 δημοσίευσαν μία μετανάλυση 47 ερευνών σχετικά με την κατανάλωση πρωινού από παιδιά και εφήβους ηλικίας 5-18 ετών που έχουν διεξαχθεί τόσο στις ΗΠΑ όσο και σε Ευρωπαϊκές χώρες. Η μετανάλυση αυτή δείχνει ότι η μέση ενεργειακή πρόσληψη από το πρωινό γεύμα κυμαίνεται μεταξύ 275 και 669 kcal, και η μέση περιεκτικότητα μακροθρεπτικών είναι 49-72% υδατάνθρακες, 11-16% πρωτεΐνη και 14-40% λίπος. Τα παιδιά που καταναλώνουν πρωινό τείνουν να έχουν υψηλότερη ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη σε σχέση με τα παιδιά που δεν καταναλώνουν πρωινό. Αντίστοιχα, τα παιδιά που καταναλώνουν πρωινό τείνουν να έχουν υψηλότερη πρόσληψη υδατανθράκων, πρωτεΐνης και λίπους, όμως κάποιες έρευνες δείχνουν ότι η ποσοστιαία ημερήσια πρόσληψη λίπους είναι χαμηλότερη σε

* BMI z-score = $\frac{(\text{μετρούμενος } \Delta\text{ΜΣ}) - (\text{διάμεση τιμή πληθυσμού αναφοράς})}{\text{τυπική απόκλιση του πληθυσμού αναφοράς}}$

τυπική απόκλιση του πληθυσμού αναφοράς

σχέση με τα παιδιά που δεν καταναλώνουν πρωινό. Επίσης τα παιδιά που καταναλώνουν πρωινό έχουν υψηλότερη ημερήσια πρόσληψη μικροθρεπτικών συστατικών (ιδιαίτερα βιταμινών A, B₆, B₁₂ και ασβεστίου) και είναι πιθανότερο να καλύπτουν τις συστάσεις σε σχέση τα παιδιά που αποφεύγουν την λήψη πρωινού. Επιπλέον η λήψη πρωινού σχετίζεται γενικότερα με πιο υγιεινές επιλογές τροφίμων και καλύτερες διατροφικές συνήθειες στα παιδιά και τους εφήβους. Τα παιδιά που καταναλώνουν πρωινό τείνουν να καταναλώνουν περισσότερα λαχανικά και γαλακτοκομικά προϊόντα και λιγότερα αναψυκτικά και τηγανητές πατάτες, ενώ τα παιδιά που δεν καταναλώνουν πρωινό συνηθίζουν να καταναλώνουν περισσότερα πρόχειρα τρόφιμα και μεγαλύτερες ποσότητες σνακ υψηλής περιεκτικότητας σε λίπος (60). Η μετανάλυση των Nicklas et al δείχνει ότι τα παιδιά που καταναλώνουν πρωινό έχουν σημαντικά καλύτερο σκορ στο Health Eating Index όσον αφορά τα δημητριακά, τα φρούτα, τα γαλακτοκομικά και την ποικιλία τροφίμων (58).

Παρόλο που οι έρευνες έχουν αποδείξει την συσχέτιση κατανάλωσης πρωινού και καλής ποιότητας διατροφής, η σχέση μεταξύ κατανάλωσης πρωινού και σωματικού βάρους δεν έχει καθοριστεί επαρκώς. Σύμφωνα με την μετανάλυση των Rampersaud et al πολλές συγχρονικές έρευνες έχουν δείξει ότι ο ΔΜΣ και το βάρος των παιδιών και των εφήβων που αποφεύγουν το πρωινό είναι υψηλότερο σε σχέση με αυτών που καταναλώνουν πρωινό (60).

Οι Siega-Riz et al μελέτησαν την κατανάλωση πρωινού σε μία μεγάλη διαχρονική έρευνα με δείγμα 24000 παιδιών και εφήβων. Αύξηση μίας μονάδας στον ΔΜΣ σχετίστηκε με μειωμένη πιθανότητα κατανάλωσης πρωινού. Η 25ετής αυτή έρευνα έδειξε επίσης ότι έχει μειωθεί η κατανάλωση πλήρων γαλακτοκομικών, αυγών και μπέικον στο πρωινό, όμως η βελτίωση στην ποιότητα του αντισταθμίζεται από το μεγάλο ποσοστό παιδιών που παραλείπει το πρωινό, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ανάπτυξη παχυσαρκίας (59).

Συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης πρωινού και ΔΜΣ έδειξαν και τα στοιχεία της διαχρονικής έρευνας NHLBI Growth and Health Study που διεξήχθη στις ΗΠΑ. Στην έρευνα συμμετείχαν 2379 κορίτσια 9-10 ετών κατά την έναρξη του προγράμματος. Η έρευνα διήρκεσε 10 χρόνια και κάθε χρόνο, λαμβάνονταν μετρήσεις ύψους και βάρους, γινόταν συμπλήρωση 3ημερου ημερολογίου καταγραφής τροφίμων καθώς και αξιολόγηση της φυσικής κατάστασης των κοριτσιών. Ο αριθμός των ημερών που τα κορίτσια κατανάλωναν πρωινό έτεινε να μειώνεται με την πάροδο της ηλικίας. Στην ηλικία των 9 ετών, το 77% κατανάλωνε πρωινό και τις 3 ημέρες που καταγράφονταν στο ημερολόγιο, ενώ μόνο 0,9% δεν κατανάλωνε πρωινό καμία από τις 3 ημέρες. Όμως στην ηλικία των 19 ετών μόνο το 32% κατανάλωνε πρωινό και τις 3 ημέρες, ενώ το ποσοστό που δεν κατανάλωνε πρωινό καμία μέρα αυξήθηκε στο 19,1%. Ο αριθμός των ημερών κατανάλωσης πρωινού αποτέλεσε έναν ισχυρό παράγοντα ρύθμισης του ΔΜΣ. Όσα κορίτσια κατανάλωναν πρωινό συχνότερα είχαν χαμηλότερο ΔΜΣ, ενώ είναι

αξιοσημείωτο ότι τα κορίτσια που κατανάλωναν και δημητριακά πρωινού (επομένως πλήρες πρωινό) και τις 3 ημέρες είχαν 0,1 kg/m² χαμηλότερο ΔΜΣ σε σχέση με όσα έτρωγαν 0,1 ή 2 ημέρες. Επιπλέον η τακτική κατανάλωση πρωινού σχετίστηκε με υψηλότερη πρόσληψη φυτικών ινών και ασβεστίου (61).

Σε μελέτη που έγινε το 2003 στον Καναδά με δείγμα 4300 παιδιών ηλικίας 11 ετών βρέθηκε ότι τα παιδιά που δεν κατανάλωναν πρωινό ήταν 1,5 φορές πιθανότερο να είναι υπέρβαρα σε σχέση με τα παιδιά τα οποία κατανάλωναν συχνά πρωινό (13).

Αντίστοιχα πολλές έρευνες δείχνουν ότι τα υπέρβαρα και παχύσαρκα παιδιά και έφηβοι είναι περισσότερο πιθανό να αποφεύγουν την κατανάλωση πρωινού σε σχέση με τους φυσιολογικού βάρους συμμαθητές τους, ιδιαίτερα όσον αφορά τα κορίτσια (60).

Απ' την άλλη μία διαχρονική μελέτη από τους Berkey et al έδειξε ότι τα υπέρβαρα παιδιά που απέφευγαν το πρωινό μείωσαν τον ΔΜΣ τους σε σχέση με τα υπέρβαρα παιδιά που κατανάλωναν τακτικά πρωινό. Όμως στα παιδιά φυσιολογικού σωματικού βάρους, ο ΔΜΣ των παιδιών που δεν κατανάλωναν πρωινό έτεινε να αυξάνεται σε σχέση με των αντίστοιχων παιδιών που κατανάλωναν πρωινό (62).

Η πιθανή αρνητική συσχέτιση μεταξύ κατανάλωσης πρωινού και παχυσαρκίας δεν μπορεί να εξηγηθεί μέσω της αύξησης της ενεργειακής πρόσληψης γιατί, όπως αναφέρθηκε, η λήψη πρωινού σχετίζεται με μεγαλύτερη πρόσληψη θερμίδων. Όμως η κατανάλωση πρωινού φαίνεται να σχετίζεται με υγιεινότερες διατροφικές επιλογές και υψηλότερη φυσική δραστηριότητα, η οποία επηρεάζει σημαντικά το ενεργειακό ισοζύγιο (60). Οι Affenito et al εξάλλου αναφέρουν ότι η συχνή κατανάλωση πρωινού μπορεί να οδηγήσει σε κατανάλωση τακτικών γευμάτων και σταθερή ενεργειακή πρόσληψη τα οποία επίσης συμβάλλουν σε μειωμένο ΔΜΣ (61). Επίσης, δεν θα πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός της υποκαταγραφής της διαιτητικής πρόσληψης κατά την διάρκεια των ερευνών η οποία εμφανίζεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα υπέρβαρα παιδιά και εφήβους σε σχέση με τα φυσιολογικού βάρους παιδιά (60).

Η μη κατανάλωση πρωινού είναι ιδιαίτερα συχνή τόσο στις ΗΠΑ όσο και την Ευρώπη, σε ποσοστά μεταξύ 10-30% ανάλογα με την ηλικία και τον πληθυσμό. Στις ΗΠΑ, μεταξύ του 1965 και του 1991, η κατανάλωση πρωινού σε παιδιά προσχολικής ηλικίας, σε παιδιά 8-10 ετών και σε εφήβους έχει μειωθεί κατά 5%, 9% και 13-20% αντίστοιχα. Τα παιδιά και οι έφηβοι αποφεύγουν την λήψη πρωινού σε μεγαλύτερη συχνότητα από οποιοδήποτε άλλο γεύμα. 21% των παιδιών ηλικίας 8-9 ετών και 42% των παιδιών ηλικίας 12-13 ετών δεν τρώνε καθημερινά πρωινό. Η αποφυγή του πρωινού είναι συχνότερη στα κορίτσια, στα παιδιά χαμηλού κοινωνικοοικονομικού επιπέδου, και στους εφήβους (60). Η 20ετής έρευνα The Bogalusa Heart Study έδειξε ότι το ποσοστό των παιδιών που κατανάλωνε πρωινό στο σπίτι μειώθηκε σημαντικά από 86% το 1973 σε 68% το 1979, ενώ παράλληλα φάνηκε μια δραματική αύξηση από 8% σε 30% στον αριθμό των παιδιών που παρέλειπαν το πρωινό (56).

Οι συχνότεροι λόγοι για τους οποίους τα παιδιά δεν καταναλώνουν πρωινό είναι η έλλειψη χρόνου και η προσπάθεια απώλειας βάρους (60). Επίσης πολλά παιδιά σχολικής ηλικίας δεν καταναλώνουν πρωινό καθώς συνήθως διαβάζουν μέχρι αργά το βράδυ, όποτε και καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες φαγητού και επομένως αποφεύγουν το πρωινό λόγω πρωινής ανορεξίας (61). Επίσης η κατανάλωση πρωινού φαίνεται να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η εθνικότητα, το φύλο, και η επαγγελματική κατάσταση της οικογενείας. Λιγότερο συχνά καταναλώνουν πρωινό τα παιδιά μονογονεϊκών οικογενειών, τα παιδιά των οποίων η μητέρα εργάζεται, τα παιδιά φτωχών οικογενειών καθώς και τα παιδιά από οικογένειες με λιγότερο από 3 μέλη (59).

1.3.4 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΜΕΣΗΜΕΡΙΑΝΟΥ ΚΑΙ ΒΡΑΔΙΝΟΥ

Η συσχέτιση κατανάλωσης μεσημεριανού γεύματος και σωματικού βάρους δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Εξάλλου σε πολλές χώρες τα παιδιά καταναλώνουν το κύριο γεύμα τους το βράδυ, καθώς την ώρα του μεσημεριανού γεύματος βρίσκονται στο σχολείο. Η αποφυγή κατανάλωσης του μεσημεριανού γεύματος έχει σχετιστεί με αυξημένο κίνδυνο υπερβολικής αύξησης του βάρους σε έρευνα με δείγμα 4300 παιδιών στον Καναδά. Η συσχέτιση όμως αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Στην ίδια έρευνα φάνηκε επίσης ότι τα παιδιά που αγόραζαν το γεύμα τους από το σχολείο ήταν 47% πιθανότερο να είναι υπέρβαρα σε σχέση με τα παιδιά που έφερναν γεύμα από το σπίτι στο σχολείο (13). Σύμφωνα με τα στοιχεία της Bogalusa Heart Study από το 1973-4 έως το 1993-4, το ποσοστό των παιδιών που κατανάλωναν μεσημεριανό στο σχολείο μειώθηκε από 90% σε 78% (56).

Η κατανάλωση του βραδινού γεύματος έχει μελετηθεί περισσότερο. Στην ίδια έρευνα στον Καναδά, η αυξημένη συχνότητα κατανάλωσης βραδινού γεύματος στο σπίτι με την συντροφιά της οικογένειας και η μειωμένη συχνότητα κατανάλωσης του βραδινού μπροστά από την τηλεόραση σχετίστηκε με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας (13).

Στις ΗΠΑ, σε έρευνα με δείγμα 16000 παιδιών ηλικίας 9-14 ετών βρέθηκε ότι τα παιδιά που έτρωγαν βραδινό στο σπίτι με την οικογένεια τους είχαν $\frac{1}{2}$ μονάδα χαμηλότερο ΔΜΣ από τα παιδιά που δεν κατανάλωναν ποτέ βραδινό. Επίσης τα παιδιά που έτρωγαν βραδινό με την οικογένεια τους καθημερινά κατανάλωναν κατά μέσο όρο 0,8 περισσότερες μερίδες φρούτων και λαχανικών ενώ η κατανάλωση τηγανητών και αναψυκτικών ήταν πολύ σπανιότερη σε σχέση με τα παιδιά που έτρωγαν βραδινό με την οικογένεια τους κάποιες μέρες ή ποτέ. Τέλος, τα παιδιά που έτρωγαν βραδινό με την οικογένεια τους κατανάλωναν λιγότερο κορεσμένο λίπος ως ποσοστό της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης (64).

Η έρευνα των Haaralathi et al στην Φινλανδία σε δείγμα 400 παιδιών ηλικίας 10-11 ετών έδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Τα παιδιά που κατανάλωναν τακτικά βραδινό με την οικογένεια τους έτρωγαν γλυκά και φαγητά τύπου fast-food σπανιότερα και χυμούς

φρούτων συχνότερα από τα παιδιά που δεν κατανάλωναν τακτικά βραδινό στο σπίτι. Επίσης τα παιδιά που δεν κατανάλωναν οικογενειακώς γεύμα τα σαββατοκύριακα είχαν 3 φορές υψηλότερο κίνδυνο να αναπτύξουν ανθυγιεινές διατροφικές συνήθειες (65).

Γενικότερα, η κατανάλωση βραδινού σχετίζεται με πιο υγιεινές διατροφικές επιλογές, όπως μεγαλύτερη κατανάλωση φρούτων και λαχανικών και με μεγαλύτερη πρόσληψη φυτικών ινών, ασβεστίου, σιδήρου και βιταμινών B₆, B₁₂, C, E καθώς και με μικρότερη πρόσληψη κορεσμένων λιπαρών, αναψυκτικών και τηγανητών (58). Φαίνεται ότι το διατροφικό προφίλ των παιδιών που δεν καταναλώνουν τακτικά δείπνο με τις οικογένειες τους είναι όμοιο με το προφίλ των παιδιών που καταναλώνουν συχνά fast-food. Τα παιδιά αυτά καταναλώνουν λιγότερα φρούτα και λαχανικά, περισσότερα τηγανητά και αναψυκτικά, περισσότερο κορεσμένο λίπος και λιγότερες φυτικές ίνες και μικροθρεπτικά συστατικά (66).

1.3.5 ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗ ΦΑΓΗΤΟΥ ΑΠΟ ΕΣΤΙΑΤΟΡΙΑ ΚΑΙ FAST-FOOD

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, η παραδοσιακή συνήθεια της κατανάλωσης γεύματος στο οικογενειακό τραπέζι μαζί με όλη την οικογένεια έχει αλλάξει σημαντικά, καθώς λίγες είναι πλέον οι οικογένειες οι οποίες συνηθίζουν να γευματίζουν μαζί στο σπίτι. Περίπου το 46% των οικογενειακών εξόδων για φαγητό, σπαταλάται στην αγορά φαγητών και ποτών εκτός σπιτιού. Το 18% των παιδιών προσχολικής ηλικίας καταναλώνουν το ¼ των καθημερινών τους γευμάτων εκτός σπιτιού, ενώ το ποσοστό αυξάνεται σε 26% στα παιδιά σχολικής ηλικίας και 27-30% στους έφηβους. Τα φαγητά τύπου fast-food αποτελούν τουλάχιστον το 50% της συνολικής ποσότητας τροφίμων που καταναλώνονται εκτός σπιτιού. Η συχνότητα κατανάλωσης φαγητών τύπου fast-food έχει σχετιστεί θετικά με την αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη σε ενήλικες γυναίκες (58), λίγες όμως είναι οι έρευνες που έχουν εξετάσει τις επιπτώσεις της κατανάλωσης fast-food στα παιδιά (66).

Μελέτη 6212 παιδιών από το 1994 έως το 1998 στις ΗΠΑ έδειξε ότι σε μία τυπική μέρα το 30,3% των παιδιών κατανάλωνε fast-food. Η κατανάλωση ήταν συχνή σε όλες τις ηλικιακές ομάδες, και στα 2 φύλα, σε όλα τα κοινωνικά, φυλετικά και οικονομικά στρώματα, καθώς και σε όλες τις περιοχές που μελετήθηκαν στις ΗΠΑ. Τα παιδιά ηλικίας 9-13 ετών που κατανάλωναν fast-food προσλάμβαναν επιπλέον 132 kcal ή 6,4% περισσότερη ενέργεια σε μία τυπική ημέρα σε σχέση με τα παιδιά που δεν κατανάλωναν fast-food. Επίσης, τα παιδιά που κατανάλωναν fast-food είχαν υψηλότερη πρόσληψη ολικού λίπους, κορεσμένου λίπους, υδατανθράκων, απλών σακχάρων, και αναψυκτικών και χαμηλότερη πρόσληψη γάλακτος, φρούτων και λαχανικών. Συγκρίνοντας τα παιδιά μεταξύ τους, βρέθηκε επίσης ότι τις ημέρες που καταναλώνουν fast-food προσλαμβάνουν επιπλέον 126 kcal σε σχέση με τις ημέρες που δεν το καταναλώνουν. Αυτή η αύξηση της ενεργειακής πρόσληψης θεωρητικά θα

μπορούσε να επιφέρει αύξηση ~3 κιλών σε ένα χρόνο αν ταυτόχρονα δεν άλλαζε και η κατανάλωση της ενέργειας μέσω της φυσικής δραστηριότητας (66). Μάλιστα, αποτελέσματα προοπτικής έρευνας των Pereira et al σε 5114 παιδιά υποστηρίζουν αυτή την πιθανότητα. Ο σχετικός κίνδυνος ανάπτυξης παχυσαρκίας μέσα σε μία περίοδο 15 χρόνων αυξήθηκε κατά 86% μεταξύ των ατόμων που έτρωγαν σε εστιατόρια fast-food περισσότερο από 2 φορές την εβδομάδα σε σχέση με τα άτομα που έτρωγαν σε εστιατόρια fast-food λιγότερο από 1 φορά την εβδομάδα (67).

Μελέτη των Huang et al σε 2000 παιδιά 3-19 ετών στις ΗΠΑ έδειξε θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού της ενέργειας που προέρχεται από φαγητό που καταναλώνεται εκτός σπιτιού και του ΔΜΣ σε αγόρια ηλικίας 12-19 ετών αλλά όχι στα κορίτσια και στα αγόρια όλων των υπόλοιπων ηλικιών (17).

Πολλά είναι τα χαρακτηριστικά των τροφίμων fast-food που μπορεί να οδηγήσουν σε υψηλή ενεργειακή πρόσληψη και επομένως αύξηση της πιθανότητας ανάπτυξης παχυσαρκίας. Τα παιδιά που τρώνε fast-food καταναλώνουν περισσότερο συνολικό λίπος, περισσότερο κορεσμένο λίπος, περισσότερους υδατάνθρακες, περισσότερα απλά σάκχαρα, περισσότερα αναψυκτικά με προσθήκη ζάχαρης, λιγότερο γάλα, και λιγότερα φρούτα και λαχανικά. Τα παραπάνω χαρακτηριστικά άλλωστε αντικατοπτρίζουν την σύσταση των τυπικών τροφίμων fast-food (χάμπουργκερ, τηγανητές πατάτες, αναψυκτικά). Επίσης, τα τρόφιμα αυτά σερβίρονται σε πολύ μεγάλες μερίδες, γεγονός που σχετίζεται με υψηλή ενεργειακή πρόσληψη. Επιπλέον, τα τρόφιμα αυτά περιέχουν πολύ μικρή ποσότητα ή και καθόλου φυτικές ίνες, οι οποίες προάγουν το αίσθημα του κορεσμού και επομένως προστατεύουν από την κατανάλωση μεγάλης ποσότητας τροφής. Τέλος, τα fast-food μειώνουν την ποιότητα της διατροφής και έχει φανεί ότι τα παιδιά που καταναλώνουν fast-food καταναλώνουν περισσότερα αναψυκτικά σε σχέση με τα παιδιά που δεν τρώνε fast-food, καθώς και λιγότερο γάλα, φρούτα και λαχανικά, τα οποία προστατεύουν από την υπερβολική αύξηση βάρους λόγω της χαμηλής ενεργειακής πυκνότητας και της υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικές ίνες (66).

Τις τελευταίες δεκαετίες η κατανάλωση φαγητού εκτός σπιτιού έχει αυξηθεί ιδιαίτερα στα παιδιά και τους εφήβους. Από το 1973-4 έως το 1993-4, το ποσοστό των παιδιών που κατανάλωνε γεύματα σε εστιατόριο αυξήθηκε από 0,3% σε 5,4% σύμφωνα με τα στοιχεία της Bogalusa Heart Study (56), ενώ σύμφωνα και με την έρευνα Nationwide Food Consumption Survey του 1977-78 το 74% της ενεργειακής πρόσληψης των εφήβων προερχόταν από φαγητά που καταναλώνονταν στο σπίτι, ποσοστό το οποίο μειώθηκε στο 68% την περίοδο 1989-1991 και στο 60% μέχρι το 1994-1996 (68). Μεγάλο ποσοστό οικογενειών τρώει εκτός σπιτιού, ειδικά το βραδινό της γεύμα. Σε έρευνα στην Ιαπωνία, το ποσοστό των οικογενειών με παιδιά 7-14 ετών που κατανάλωνε βραδινό εκτός σπιτιού τουλάχιστον 1 ημέρα την εβδομάδα το 1994 ήταν 25% και με παιδιά 15-19 ετών 45% (63).

Εξάλλου δεν είναι λίγοι και οι περιβαλλοντικοί παράγοντες οι οποίοι σχετίζονται με την αυξημένη συχνότητα κατανάλωσης φαγητού έξω από το σπίτι, όπως οι κοινωνικές συναναστροφές, η διαφήμιση και προώθηση του φαγητού, και οι προσιτή του τιμή. Επιπλέον, σε όλο και περισσότερες οικογένειες εργάζονται και οι 2 γονείς, και ο περιορισμένος χρόνος έχει γίνει ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τον τύπο της τροφής που καταναλώνεται (68).

1.3.6 ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΕΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΓΕΥΜΑΤΟΣ

Στις γευματικές συνήθειες συμπεριλαμβάνονται και κάποιες συνήθειες που αφορούν την συμπεριφορά του ατόμου κατά την διάρκεια της κατανάλωσης φαγητού, οι οποίες δεν έχουν μελετηθεί ακόμα σε μεγάλο βαθμό. Αυτές αφορούν την κατανάλωση φαγητού κάνοντας κάποια άλλη ασχολία, όπως βλέποντας τηλεόραση, τον τόπο και τα σκεύη κατανάλωσης φαγητού, και την κατανάλωση φαγητού χωρίς να υπάρχει το αίσθημα της πείνας.

Αυτές τις συνήθειες μελέτησαν οι McNutt et al σε ένα μεγάλο δείγμα κοριτσιών ηλικίας 9-10 ετών που είχε λάβει μέρος στην NHLBI Growth and Health Study στις ΗΠΑ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο συχνότερα τα κορίτσια ασκούσαν κάποιες συγκεκριμένες διαιτητικές συμπεριφορές, τόσο περισσότερο αυξημένη ήταν η διαιτητική τους πρόσληψη. Οι διαιτητικές συμπεριφορές που σχετίστηκαν με αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη ήταν οι παρακάτω:

- τρώω και διαβάζω τα μαθήματα μου συγχρόνως,
- τρώω ενώ δεν πεινάω,
- τρώω στα κρυφά,
- τρώω βλέποντας τηλεόραση,
- τρώω στο υπνοδωμάτιο (69).

Άλλη μία έρευνα που μελέτησε αυτές τις συνήθειες διεξήχθη στο Ισραήλ και έλαβαν μέρος 60 παχύσαρκα παιδιά 6-11 ετών μαζί με τους γονείς τους. Οι οικογένειες χωρίστηκαν και στην ομάδα παρέμβασης συμμετείχαν μόνο οι γονείς, οι οποίοι διδάχθηκαν τρόπους αλλαγής συμπεριφορών και τρόπου ζωής ώστε να επιτευχθεί απώλεια βάρους στα παιδιά. Στην ομάδα ελέγχου συμμετείχαν μόνο τα παιδιά στα οποία δόθηκε υποθερμιδική δίαιτα. Θετική συσχέτιση φάνηκε μεταξύ της μείωσης του βάρους του παιδιού και αλλαγών όσον αφορά την παρουσία ανθυγιεινών τροφίμων στο σπίτι, την μη κατανάλωση φαγητού στο τραπέζι, την κατανάλωση φαγητού σε κατάσταση άγχους ή ενώ το παιδί έκανε άλλες δραστηριότητες, την κατανάλωση φαγητού μεταξύ των γευμάτων, το μέρος κατανάλωσης του φαγητού και το επίπεδο φυσικής δραστηριότητας (70).

Τα αποτελέσματα των παραπάνω ερευνών δείχνουν ότι αν υιοθετηθούν κάποιες συμπεριφορές κατά την διάρκεια των γευμάτων είναι πιθανός ο περιορισμός της παχυσαρκίας. Αυτές οι συνήθειες είναι η κατανάλωση γεύματος μόνο στο τραπέζι, σε

καθιστή θέση και μέσα στο κατάλληλο πιάτο, η κατανάλωση φαγητού χωρίς το παιδί να κάνει κάποια άλλη δραστηριότητα και η κατανάλωση φαγητού μόνο όταν το παιδί πεινάει. Ειδικά για την τελευταία συνήθεια σε έρευνες ενηλίκων έχει αποδειχθεί ότι η κατανάλωση φαγητού σε καταστάσεις μη πείνας συνήθως οφείλεται σε βαρεμάρα, άγχος, κοινωνικές πιέσεις κλπ και οδηγεί σε υπερκατανάλωση τροφής (69, 70).

Όσον αφορά την παρακολούθηση τηλεόρασης κατά την διάρκεια του γεύματος υπάρχουν περισσότερες έρευνες που έχουν μελετήσει την επίδρασή της στο βάρος του παιδιού. Η τηλεόραση εξάλλου είναι το πιο διαδεδομένο μέσο μαζικής ενημέρωσης και κύρια πηγή μηνυμάτων που σχετίζονται με την διατροφή. Τα προϊόντα που διαφημίζονται εντονότερα στην τηλεόραση είναι και αυτά τα οποία υπερκαταναλώνονται, ενώ τα φρούτα και λαχανικά, τα οποία δεν διαφημίζονται σχεδόν ποτέ, υποκαταναλώνονται (71).

Έρευνα που διεξήχθη στην Αμερική σε 91 ζευγάρια γονέα-παιδιού, έδειξε ότι τα παιδιά που καταναλώνουν 2 ή περισσότερα γεύματα την ημέρα μπροστά στην τηλεόραση, καταναλώνουν δημητριακά, φρούτα, λαχανικά, πατάτες, όσπρια, ξηρούς καρπούς, κοτόπουλο, αυγό και ψάρι λιγότερο συχνά και κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας περισσότερο συχνά σε σχέση με τα παιδιά που δεν βλέπουν τηλεόραση κατά την διάρκεια των γευμάτων τους ή που βλέπουν τηλεόραση μόνο σε 1 γεύμα. Τα παιδιά που καταναλώνουν 2 ή περισσότερα γεύματα την ημέρα μπροστά στην τηλεόραση έχουν επίσης υψηλότερη κατανάλωση πίτσας, αλμυρών σνακ και αναψυκτικών. Η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη από κρεατικά είναι 6% υψηλότερη από τα παιδιά που δεν βλέπουν τηλεόραση κατά τα γεύματά τους, η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη από πίτσα, αλμυρά σνακ και αναψυκτικά 5% υψηλότερη και η ημερήσια ενεργειακή πρόσληψη από φρούτα, λαχανικά και χυμούς 5% χαμηλότερη. Στην ίδια έρευνα επίσης φάνηκε ότι τα παιδιά που καταναλώνουν 2 ή περισσότερα γεύματα την ημέρα βλέποντας τηλεόραση προσλαμβάνουν λιγότερη ενέργεια από υδατάνθρακες και περισσότερη από ολικό και κορεσμένο λίπος σε σχέση με τα υπόλοιπα παιδιά. Όλα τα παραπάνω αποτελούν χαρακτηριστικά που αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης της παιδικής παχυσαρκίας (71).

Στην έρευνα των Tanasescu et al σε 53 παιδιά στις ΗΠΑ φάνηκε επίσης ότι τα παχύσαρκα παιδιά καταναλώναν περισσότερο χρόνο παρακολουθώντας τηλεόραση σε σχέση με τα παιδιά φυσιολογικού βάρους. Τα επίπεδα παρακολούθησης τηλεόρασης σχετίστηκαν θετικά με την κατανάλωση γλυκών και σνακ και αρνητικά με τα επίπεδα φυσικής δραστηριότητας (72).

Η παρακολούθηση τηλεόρασης μπορεί να επηρεάζει την εμφάνιση της παχυσαρκίας μέσω της συνακόλουθης μείωσης της φυσικής δραστηριότητας, της αυξημένης δυνατότητας κατανάλωσης σνακ μπροστά από την τηλεόραση και της διαφήμισης τροφίμων υψηλών σε ενέργεια και λίπος (72).

2. ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1. Σκοπός

2.2. Μεθοδολογία

2.2.1. Πληθυσμός και Δείγμα Μελέτης

2.2.2 Ανθρωπομετρία

2.2.3 Εργαστηριακές Αναλύσεις

2.2.4 Απομόνωση DNA

2.2.5 Έλεγχος Πολυμορφισμού

2.2.5.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

2.2.5.2 Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση

2.2.5.3 Διαλύματα

2.2.5.4 Μηχανήματα

2.2.6 Διατροφική Αξιολόγηση

2.2.6.1 Αξιολόγηση Διαιτητικής Συμπεριφοράς

2.2.6.2 Κατηγοριοποίηση Επεισοδίων Κατανάλωσης Τροφής

2.2.7 Αξιολόγηση Φυσικής Δραστηριότητας

2.2.8 Δημογραφικά Στοιχεία

2.2.9 Οικογενειακό Ιστορικό

2.2.10 Στατιστική Επεξεργασία

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Χαρακτηριστικά Πληθυσμού Μελέτης

2.3.2 Αποτελέσματα PCR

2.3.3 Αποτελέσματα Πέψης

2.3.4 Κατανομή Πολυμορφισμού

2.3.5 Συσχέτιση Πολυμορφισμού με Δείκτες Παχυσαρκίας

2.3.6 Συχνότητα Γευματικών Συνηθειών

2.3.7 Συσχέτιση Γευματικών Συνηθειών με τον ΔΜΣ

2.3.8 Αλληλεπιδράσεις Πολυμορφισμού-Γευματικών Συνηθειών

2.4 Συζήτηση

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση του ρόλου του πολυμορφισμού - 308G/A του γονιδίου του TNFα και των γευματικών συνηθειών στην αιτιολογία της παιδικής παχυσαρκίας. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε εάν ο πολυμορφισμός επηρεάζει διάφορους ανθρωπομετρικούς παράγοντες, εάν η υιοθέτηση ή μη διαφόρων διαιτητικών συνηθειών επηρεάζει τον ΔΜΣ καθώς και εάν υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού και των γευματικών συνηθειών που να επηρεάζει τον ΔΜΣ ή άλλους ανθρωπομετρικούς δείκτες. Επιμέρους σκοποί είναι επίσης ο έλεγχος της κατανομής του πολυμορφισμού στο δείγμα, τόσο στο σύνολο, όσο και κατά κατηγορίες φύλου και ΔΜΣ, και η περιγραφή των συχνοτήτων υιοθέτησης διαφόρων διαιτητικών συμπεριφορών και εν συνεχεία η σύγκριση αυτών με άλλους πληθυσμούς που αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.2.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΑΙ ΔΕΙΓΜΑ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην μελέτη συμμετείχαν 243 παιδιά, μαθητές πέμπτης και έκτης τάξης Δημοτικού (ηλικία 10-12), από σχολεία των δήμων Καλλιθέας και Μοσχάτου, για τα οποία είχε ληφθεί σχετική έγκριση από το Παιδαγωγικό Ινστιτούτο.

Η συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα επιλέχτηκε καθώς σε αυτή την ηλικία είναι εφικτή η συνεργασία και καλή επικοινωνία των παιδιών με τους ερευνητές (κάτι που δεν θα ήταν εφικτό αν τα παιδιά ήταν μικρότερης ηλικίας), ενώ ταυτόχρονα το μεγαλύτερο ποσοστό των παιδιών δεν έχει περάσει στο βιολογικό στάδιο της εφηβείας ώστε να επηρεάζονται διάφοροι ορμονικοί και βιοχημικοί παράγοντες από τις φυσιολογικές βιολογικές αλλαγές της εφηβείας.

Η διαδικασία επιλογής του δείγματος είχε ως εξής: Αρχικά οι διευθυντές των σχολείων που είχαν επιλεγεί ενημερώνονταν για τους σκοπούς και την μεθοδολογία της έρευνας μέσω ενημερωτικού εντύπου, ενώ ταυτόχρονα λάμβαναν και ένα αντίγραφο της έγκρισης του Παιδαγωγικού Ινστιτούτου. Μία συνάντηση του επιστημονικού υπεύθυνου της έρευνας με τον διευθυντή του σχολείου κατοχύρωνε την συμμετοχή του σχολείου στην μελέτη. Στην συνέχεια όλα τα παιδιά της πέμπτης και έκτης τάξης του σχολείου ενημερώνονταν για την μελέτη μέσω παρουσίασης από την ερευνητική ομάδα στο σχολείο τους. Στο τέλος της παρουσίασης σε κάθε παιδί δινόταν ένα ενημερωτικό έντυπο καθώς και ένα συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής για τους γονείς. Τα παιδιά που τελικά συμμετείχαν στην έρευνα ήταν αυτά τα οποία είχαν επιστρέψει εντός του προβλεπόμενου χρόνου το συμφωνητικό εθελοντικής συμμετοχής υπογεγραμμένο από τον γονέα ή κηδεμόνα.

2.2.2 ΑΝΘΡΩΠΟΜΕΤΡΙΑ

Το σωματικό βάρος των παιδιών μετρήθηκε με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας στο πλησιέστερο 0,5 kg. Το ύψος μετρήθηκε στο πλησιέστερο 0,5 cm με φορητό αναστημόμετρο προσαρμοσμένο σε κατακόρυφο τοίχο. Ο Δείκτης Μάζας Σώματος υπολογίστηκε με τον τύπο $ΔΜΣ = ΒΑΡΟΣ (kg) / ΥΨΟΣ^2 (m^2)$.

Οι περιφέρειες μέσης, ισχίων και βραχίονα μετρήθηκαν στο πλησιέστερο 0,1 cm με πλαστική μεζούρα και ο δείκτης λόγου περιφέρειας μέσης προς περιφέρεια ισχίων (WHR) υπολογίστηκε με τον τύπο $WHR = \text{περιφέρεια μέσης (cm)} / \text{περιφέρεια ισχίων (cm)}$. Η περιφέρεια μέσου βραχίονα (mid-upper arm circumference) μετρήθηκε σε γυμνό βραχίονα στη μισή απόσταση μεταξύ ακρώμιου οστού της ωμοπλάτης και την εσωτερική κορυφή του αγκώνα. Η περιφέρειας μέσης, μετρήθηκε απουσία ρουχισμού, στο μέσο της απόστασης μεταξύ του τελευταίου πλευρού και του άκρου του λαγονίου οστού, περίπου στο ύψος του αφαλού. Η περιφέρεια ισχίων μετρήθηκε στο σημείο που παρουσίαζε την μεγαλύτερη περίμετρο.

Για την εκτίμηση του σωματικού λίπους μετρήθηκαν οι δερματικές πτυχές τρικεφάλου και υποωμοπλατιαίου μυός στο πλησιέστερο 0,2 mm με δερματοπτυχόμετρο Lange (Cambridge Scientific Instruments, Cambridge, MA, USA). Οι μετρήσεις έγιναν στην δεξιά πλευρά του σώματος (δεξιός βραχίονας). Πραγματοποιήθηκαν δύο μετρήσεις και υπολογίστηκε ο μέσος όρος. Οι δερματοπτυχές τρικεφάλου προσδιορίστηκαν ως εξής: με μεζούρα μετρήθηκε κάθετα στο πίσω μέρος του βραχίονα η απόσταση μεταξύ του κατώτερου ορίου του ακρώμιου οστού και του ωλέκranου (εσωτερικής κορυφής του αγκώνα), ενώ το χέρι σχηματίζει ορθή γωνία. Με ένα στυλό σημειώθηκε το σημείο αυτό και στη συνέχεια ο εξεταστής ανασήκωσε το δέρμα κατά 1 εκ. άνω του μέσου και κρατώντας με το ένα χέρι του την δερματοπτυχή και με το άλλο χέρι το δερματοπτυχόμετρο, πραγματοποίησε την μέτρηση προσέχοντας να περιλαμβάνεται όλη η δερματοπτυχή αφήνοντας απέξω τον μυϊκό ιστό. Η υποωμοπλατιαία δερματοπτυχή μετρήθηκε δύο εκατοστά κάτω από την έσω γωνία του οστού της ωμοπλάτης σε μία νοητή διαγώνια γραμμή (45° με το οριζόντιο ή/και κάθετο επίπεδο),

Τα παιδιά κατηγοριοποιήθηκαν ως φυσιολογικού σωματικού βάρους, υπέρβαρα ή παχύσαρκα σύμφωνα με τις οριακές τιμές του ΔΜΣ που έχουν αναπτύξει οι Cole et al και έχει υιοθετήσει η Διεθνής Ομάδα Δράσης για την Παχυσαρκία (IOTF). Οι συγκεκριμένες τιμές προτιμήθηκαν από τα οριακά ποσοστημόρια των καμπυλών ανάπτυξης του CDC γιατί οι καμπύλες έχουν σχεδιαστεί βάση στοιχείων του αμερικάνικου πληθυσμού ενώ οι οριακές τιμές του Cole προέρχονται από στοιχεία 6 μεγάλων ερευνών από διάφορα κράτη, μεταξύ των οποίων και 2 ευρωπαϊκά (Ολλανδία, Μεγάλη Βρετανία), οι πληθυσμοί των οποίων αντιπροσωπεύουν καλύτερα τον ελληνικό πληθυσμό. Επιπλέον οι οριακές τιμές του Cole αντιστοιχούν στις διεθνώς

αναγνωρισμένες και ευρέως χρησιμοποιούμενες οριακές τιμές του ΔΜΣ για το υπερβάλλον βάρος (25 kg/m^2) και την παχυσαρκία (30 kg/m^2) (2).

2.2.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ

Από κάθε παιδί λήφθηκαν ~3ml αίματος για:

- ο γενική εξέταση αίματος (αιματοκρίτης, αιμοσφαρίνη, λευκά και ερυθρά αιμοσφαίρια, αιμοπετάλια, MCV, MCH, MCHC),
- ο απομόνωση πλάσματος για ορμονικές εξετάσεις,
- ο απομόνωση του DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.

Επίσης λήφθηκαν ~8ml αίματος για:

- ο βιοχημικές εξετάσεις (γλυκόζη ορού, ολική χοληστερόλη ορού, HDL-χοληστερόλη, LDL-χοληστερόλη, τριγλυκερίδια ορού)

2.2.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Το πρωτόκολλο της απομόνωσης του DNA από λευκά αιμοσφαίρια είναι το εξής:

Ημέρα 1^η

1. Απομάκρυνση πλάσματος μετά από φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm)
2. Μεταφορά στοιβάδας λευκών αιμοσφαιρίων σε σωλήνα Falcon 15ml
3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (1X) μέχρι τελικό όγκο ~15ml
4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20 min (ανακίνηση και κατά την διάρκεια των 20min)
5. Φυγοκέντρηση (10min, 2500rpm)
6. Απομάκρυνση υπερκείμενου
7. Προσθήκη 10ml Lysis I (1X) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος
8. Φυγοκέντρηση (10min, 2500rpm)
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου
10. Προσθήκη 1,5ml διαλύματος Lysis II και ισχυρή ανακίνηση
11. Προσθήκη 25μl πρωτεΐνάσης K (20mg/dl)
12. Προσθήκη 75μl SDS 20% και ήπια ανάδευση
13. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο

Ημέρα 2^η

1. Προσθήκη 0,5ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec
2. Φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm)
3. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και ξανά φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm)
4. Μεταφορά υπερκείμενου με πλαστική Pasteur σε σωλήνα Falcon 50ml που περιέχει 12-15ml αιθανόλη 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή την φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε rollerbench.
5. Απομάκρυνση κουβαριού DNA από το διάλυμα με πιπέτα και τοποθέτηση για πλύσιμο σε erpendorf 1,5ml που έχουμε προηγουμένως τοποθετήσει 70% αιθανόλη.
6. Προσθήκη 3-4 σταγόνες οξικό αμμώνιο
7. Φυγοκέντρηση 14.000g, 15min
8. Άδειασμα υπερκείμενου και στέγνωμα για 20-30 min έως ότου δεν υπάρχουν υπολείμματα αιθανόλης
9. Προσθήκη 0,2-0,5ml TE και επώαση 10min, 60° C.

Μετά την απομόνωση το DNA ελέγχεται για την παρουσία του πολυμορφισμού μέσω αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και πέψης.

2.2.5 ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

2.2.5.1 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Μετά την απομόνωση ακολούθησε εφαρμογή της μεθόδου PCR, η οποία χρησιμεύει στην εκλεκτική αντιγραφή κατά εκατομμύρια φορές ειδικών τμημάτων DNA. Η μέθοδος είναι εξαιρετικά ευαίσθητη και επιτρέπει την 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 3' 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 περίσσειας των 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 θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες. Η πολυμεράση αυτή παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργότητα πολυμερισμού στους 72° C, ενώ παραμένει ενεργή σε θερμοκρασία μέχρι 95° C.

Η τεχνική της PCR 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 και έχοντας ως καλούπι τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA. Η αντίδραση πολυμερισμού καταλύεται από την Taq DNA πολυμεράση και πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72° C.

Οι νεοσυντιθέμενες αλυσίδες αποδιατάσσονται ξανά και οι μονόκλωνες 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 και έχει μήκος ίσο με την απόσταση των εκκινητών. Για παράδειγμα 30 κύκλοι PCR δίνουν πολλαπλασιασμό της τάξης του εκατομμυρίου. Το προϊόν της PCR χρησιμοποιείται στην συνέχεια για την μελέτη του τμήματος DNA που πολλαπλασιάστηκε.

Αντιδραστήρια

❖ Εκκινητές:

- Ο αριστερός εκκινητής (forward primer) είχε την ακολουθία 5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' και ήταν σε ξηρή μορφή. Προστέθηκαν 390μl διαλύματος TE, έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100pmol/μl (stock solution)
- Ο δεξιός εκκινητής (reverse primer) είχε την αλληλουχία 5'-TCC TCC CTG CTC CGA TTC CG-3' και ήταν σε μορφή σκόνης. Προστέθηκαν 548 μl διαλύματος TE έτσι ώστε η συγκέντρωση να είναι 100pmol/μl (stock solution)
- Από τα διαλύματα των εκκινητών που σχηματίστηκαν (stock solutions), παρασκευάστηκαν νέα διαλύματα με αραίωση 1:8 (working solutions: 3μl stock + 21μl απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην PCR. Η τελική συγκέντρωση των διαλυμάτων ήταν 12,5 pmol/μl. Τα διαλύματα των εκκινητών (stock και working solutions) διατηρούνται σε θερμοκρασία -20° C.

- ❖ Taq πολυμεράση: Χρησιμοποιήθηκε η Taq πολυμεράση που είχε συγκέντρωση 5U/μl. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C.
- ❖ PCR buffer: Η συγκέντρωση του ήταν 10X και περιείχε: 200mM Tris-HCL (pH 8,4) και 500 mM KCL. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20° C.
- ❖ Διάλυμα MgCl₂: Η συγκέντρωση του ήταν 50mM. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία-20° C.
- ❖ Μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων (dNTPs): Τα τέσσερα ολιγονουκλεοτίδια είχαν συγκέντρωση 100mM το καθένα. Αναμίχθηκαν και μεταφέρθηκαν σε erppendorf. Το αντιδραστήριο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.
- ❖ Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό

Διαδικασία

1. Παρασκευή μίγματος αντιδραστηρίων της PCR. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.1. Τα αντιδραστήρια διατηρούνται σε πάγο σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει PCR, συν 1 δείγμα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα, αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 2.1: ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ PCR ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ TNFα -308 G/A		
Αντιδραστήρια	Όγκος	Συγκέντρωση
Taq Πολυμεράση	0,3μl	1,5 Units
PCR Buffer	1,25μl	1 X
MgCl ₂	1,0μl	1,5mM
dNTPs	0,2μl	20mM
Δεξιός Εκκινητής	0,3μl	3,75pmol
Αριστερός Εκκινητής	0,3μl	3,75pmol
Enhancer	1,25μl	
Νερό απεσταγμένο και αποστειρωμένο	7,6μl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε αποστειρωμένο erppendorf των 0,2ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erppendorf τοποθετούνται 12,5μl από το μίγμα με πιπέτα και με το ίδιο αποστειρωμένο tip για να μειωθούν οι απώλειες. Τα erppendorfs με το μίγμα διατηρούνται στον πάγο.

3. Σε κάθε erppendorf προστίθενται 0,3μl DNA από τα δείγματα. Ο συνολικός όγκος του μίγματος για την PCR είναι 12,8μl.

4. Τα eppendorfs τοποθετούνται στην φυγόκεντρο (έως 8000rpm) για λίγα δευτερόλεπτα (short spin) ώστε να αναμιχθεί το μίγμα με το DNA και να μην υπάρχουν φυσαλίδες.

5. Τα eppendorfs μεταφέρονται σε θερμικό κυκλοποιητή (μηχάνημα PCR) και ακολουθείται το παρακάτω πρόγραμμα:

Βήμα 1° : 95°C για 3 min

Βήμα 2° : 94°C για 30 sec

Βήμα 3° : 57°C για 30 sec

Βήμα 4° : 72°C για 45 sec

} Επανάληψη βημάτων 2,3,4 επί 33 φορές

Βήμα 5° : 72°C για 5 min

Βήμα 6° : Αποθήκευση στους 4° C

Έλεγχος Επιτυχίας PCR

Ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γίνεται με ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η ηλεκτροφορητική 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 ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA κατά μήκος των πηκτωμάτων εξαρτάται κυρίως από το μοριακό μέγεθος του DNA και την 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. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA. Με συγκέντρωση 1% γίνεται διαχωρισμός γραμμικών τμημάτων DNA μήκους 0,1-3 kb.

Το πήκτωμα της αγαρόζης 1% παρασκευάζεται ως ακολούθως:

1. Ζυγίζονται 0,5 gr αγαρόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 50 ml διαλύματος TBE 0,5 X (Tris Borate Acid)
3. Ταχεία θέρμανση μερικών λεπτών σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη.
4. Αφού κρυώσει το διάλυμα προστίθενται 3μl διαλύματος βρωμιούχου αιθιδίου 10mg/ml (EtBr) και αναδεύεται το διάλυμα. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μία φθορίζουσα χρωστική. Το μόριο του περιλαμβάνει έναν οριζόντιο δακτύλιο που έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων του DNA, με αποτέλεσμα το DNA να φθορίζει όταν εκτεθεί σε υπεριώδη ακτινοβολία μήκους κύματος 302-366 nm. Το αντιδραστήριο αυτό είναι καρκινογόνο.
5. Το διάλυμα χύνεται στο εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής, αφού πρώτα έχουν τοποθετηθεί σε αυτό «χτένες» ώστε να δημιουργηθούν «πηγάδια» καθώς πηάζει το πήκτωμα της αγαρόζης.
6. Το διάλυμα αφήνεται να πηξει για ~10 min

7. Αφού δημιουργηθεί το πήκτωμα αγαρόζης, αφαιρούνται οι «χτένες» από αυτό 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.

Μετά την παρασκευή του πηκτώματος γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση ως ακολούθως:

1. Σε parafilm τοποθετούνται 2μl χρωστικής κυτανούν της ξυλόλης και φυγοκεντρούνται (short spin) για να αναμιχθεί η χρωστική με το προϊόν της PCR και το μάρτυρα.
2. Μεταφέρονται 5μl του προϊόντος PCR από κάθε δείγμα και τοποθετείται 5μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp). Το υπόλοιπο προϊόν της PCR διατηρείται στους 4° C, ενώ ο μάρτυρας διατηρείται στους -20° C.
3. Στην συνέχεια μεταφέρεται κάθε δείγμα με την χρωστική σε ένα από τα «πηγάδια» του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται και ο μάρτυρας.

Η ηλεκτροφόρηση γίνεται στα 100V για περίπου 20 λεπτά. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνεται μια ζώνη DNA, η οποία αντιπροσωπεύει το κομμάτι του DNA που πολλαπλασιάστηκε από την PCR. Το μήκος του κομματιού ελέγχεται σε σύγκριση με τον μάρτυρα, οπότε και ελέγχεται η επιτυχία της PCR.

2.2.5.2 ΠΕΨΗ ΜΕ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ένζυμα που παράγονται από βακτήρια. Λέγονται ενδονουκλεάσες γιατί κόβουν το DNA στο εσωτερικό του μορίου και όχι στα άκρα, και περιοριστικές επειδή η δραστηρότητα 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 ίδιες κατευθύνσεις 5'-3' και 3'-5' του DNA).

Τα τμήματα DNA που παράγονται από την πέψη με μία 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 στην διαδικασία σύνδεσης τμημάτων DNA που περιέχουν τα ίδια προεξέχοντα άκρα ακόμη και αν αυτά προέρχονται από διαφορετικά δείγματα (73).

Τα περιοριστικά ένζυμα ποικίλλουν ως προς τις συνθήκες άριστης δράσης τους. Οι παραλλαγές αυτές αναφέρονται στην θερμοκρασία επώασης και στην σύσταση του διαλύματος επώασης. Η επιλογή της κατάλληλης θερμοκρασίας είναι αυστηρή, ενώ οι διαφορές στην σύσταση των διαλυμάτων επώασης είναι μικρές. Τα ρυθμιστικά διαλύματα μέσα στα οποία γίνεται η αντίδραση της επώασης περιέχουν συνήθως Mg^{+2} που λειτουργεί ως συμπράγοντας του ενζύμου, καθώς και Na^{+} . Τα συστατικά των 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 από 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 την δραστικότητα του ενζύμου. Τα ένζυμα διατηρούνται στους $-20^{\circ} C$ μέσα σε διάλυμα που περιέχει 50% v/v γλυκερόλη (73).

Για τον πολυμορφισμό TNFα -308G/A χρησιμοποιήθηκε το περιοριστικό ένζυμο Nco I (26). Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου είναι



Αντιδραστήρια

- ο Ένζυμο Nco I σε συγκέντρωση 2500 U/ml το οποίο διατηρείται σε θερμοκρασία $-20^{\circ} C$
- ο Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer 2) σε συγκέντρωση 1X, το οποίο περιείχε 50mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 10mM $MgCl_2$, 1mM dithiothreitol και είχε pH 7,5 στους $25^{\circ}C$.
- ο Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.
- ο BSA

Διαδικασία

1. Παρασκευή μίγματος αντιδραστηρίων της πέψης. Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον πίνακα 2.2. Τα αντιδραστήρια διατηρούντα σε πάγο σε όλη την διάρκεια της διαδικασίας. Η ποσότητα από το κάθε αντιδραστήριο πολλαπλασιάζεται με τον αριθμό των δειγμάτων στα οποία θα γίνει η πέψη, συν 2 δείγματα για τυχόν απώλειες. Αφού παρασκευαστεί το μίγμα αναδεύεται σε vortex και διατηρείται σε πάγο.

Πίνακας 2.2: ΜΙΓΜΑ ΓΙΑ ΠΕΨΗ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟ TNFα -308 G/A		
Αντιδραστήριο	Όγκος	Συγκέντρωση
Ένζυμο NcoI	0,3 μl	1,25 U
Buffer 2	1,0 μl	1 x
BSA	1,0 μl	
Απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό	3,7 μl	

2. Το μίγμα χωρίζεται σε μη αποστειρωμένα erpendorfs του 1,5ml όσα και τα δείγματα. Σε κάθε erpendorf μεταφέρονται 6μl από το μίγμα με πιπέτα και το ίδιο tip. Τα erpendorfs με το μίγμα της πέψης διατηρούνται σε πάγο.
3. Στα erpendorfs προστίθενται 4μl από το προϊόν της PCR κάθε δείγματος. Ο συνολικός όγκος μίγματος για την πέψη είναι 10μl.
4. Τα erpendorfs τοποθετούνται σε εκκολαπτικό θάλαμο στους 37° C για 12 ώρες.

Έλεγχος του προϊόντος της πέψης

Ο έλεγχος του προϊόντος της πέψης γίνεται με ηλεκτροφόρηση του σε πήκτωμα αгарόζης 4%. Για την προετοιμασία του πηκτώματος ακολουθείται ακριβώς η ίδια διαδικασία με την προετοιμασία πηκτώματος αгарόζης 2% για τον έλεγχο επιτυχίας PCR. Οι μόνες διαφοροποιήσεις είναι:

- ο Ζυγίζονται 4γραμ αгарόζης και τοποθετούνται σε κωνική φιάλη.
- ο Το διάλυμα αφήνεται να πήξει για ~20min

Μετά την παρασκευή του πηκτώματος γίνεται η προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση ως ακολούθως:

1. Αφού αποσυρθούν τα erpendorfs με το προϊόν της πέψης από τους 37° C μετά το πέρας των 12 ωρών, προστίθενται στο καθένα 5μl χρωστικής κυανού της ξυλόλης. Σε καθαρό erpendorf τοποθετείται 1μl μάρτυρα (DNA ladder 100bp) και 5μl χρωστικής.
2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (short spin) για την ανάμιξη του προϊόντος της πέψης με την χρωστική και του μάρτυρα με την χρωστική.
3. Στην συνέχεια μεταφέρεται κάθε δείγμα με την χρωστική σε ένα από τα «πηγάδια» του πηκτώματος, ενώ σε ένα από τα πηγάδια μεταφέρεται και ο «μάρτυρας».

Η ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος γίνεται στα 150V για περίπου 40 min. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα παρατηρείται στο υπεριώδες. Σε κάθε δείγμα φαίνονται ζώνες ανάλογα με την ύπαρξη ή όχι του πολυμορφισμού στο ένα ή και στα 2 αλληλόμορφα. Τα κομμάτια DNA που αντιστοιχούν στις ζώνες συγκρίνονται με τον «μάρτυρα» και γίνεται διάγνωση του γονότυπου για τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό σε κάθε δείγμα.

2.2.5.3 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Tris Borate Acid 5X (TBE 5X)

- o 54 gr Tris Base
- o 27,5 gr Boric Acid
- o 20ml EDTA 0,5 M
- o ~800ml απεσταγμένο νερό
- o ανάδευση
- o έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,3
- o Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ = 1lt

Tris Borate Acid 1X (TBE 1X)

- o 200ml TBE 5X
- o προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ = 1lt
- o ανάδευση

EDTA 0,5M

- o 186,1 gr EDTA $2H_2O$
- o ~700ml απεσταγμένο νερό
- o ρύθμιση pH με προσθήκη NaOH υπό ανάδευση στο 8
- o προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ = 1lt

Βρωμιούχο Αιθίδιο (10mg/ml)

- o 10mg EtBr
- o 10ml αποστειρωμένο νερό
- o ανάδευση σε vortex
- o φύλαξη στους 4° C

Tris-EDTA (TE)

- o 0,61 gr Tris Base 10Mm
- o 1ml EDTA 0,05M
- o Προσθήκη ~400ml απεσταγμένο νερό
- o Ανάδευση
- o Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι Vτελ=500ml
- o Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4
- o Αποστείρωση

2.2.5.4 ΜΗΧΑΝΗΜΑΤΑ

Τα μηχανήματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι: φυγόκεντρος Eppendorf centrifuge 5810R, υδατόλουτρο Mement, roller (Stuart Scientific Rollers SRTI), μηχανήμα PCR Primus 96 plus-NWGAGBIOTECH, αναδευτήρας Nuava-stir plate, συσκευή ηλεκτροφόρησης, αυτόματες πιπέτες Gilson 2μl, 20 μl, 100 μl, 200 μl, 1000 μl, τροφοδοτικό ηλεκτροφόρησης, θάλαμος UV.

2.2.6 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ

Η διαιτητική πρόσληψη των παιδιών αξιολογήθηκε μέσω ανάκλησης 24ώρου με τυποποιημένη μέθοδο. Η ανάκληση έγινε από εκπαιδευμένους διαιτολόγους και φοιτητές διαιτολογίας την ημέρα που έγινε και η αιμοληψία. Τα παιδιά καλούνταν να αναφέρουν τα τρόφιμα και ποτά που κατανάλωσαν το προηγούμενο 24ωρο, την ποσότητα, την μάρκα του τροφίμου καθώς και την ώρα και τον τόπο κατανάλωσης. Μία δεύτερη ανάκληση για κάθε παιδί λήφθηκε τηλεφωνικά μετά από ένα διάστημα κάποιων εβδομάδων. Οι ανακλήσεις αναλύθηκαν ως προς τα θρεπτικά συστατικά με το πρόγραμμα Nutritionist Pro.

2.2.6.1 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΔΙΑΙΤΗΤΙΚΗΣ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑΣ

Οι διαιτητικές συμπεριφορές των παιδιών αξιολογήθηκαν περαιτέρω με ένα ερωτηματολόγιο που σχεδίασε η ερευνητική ομάδα και περιέχει ερωτήσεις σχετικά με την υιοθέτηση συμπεριφορών που έχει υποτεθεί ή αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την παχυσαρκία. Συγκεκριμένα το ερωτηματολόγιο περιείχε 18 ερωτήσεις που κατηγοριοποιούνται σε 4 ομάδες:

1. Γευματικές συνήθειες (κατανάλωση πρωινού, πλήρους πρωινού, μεσημεριανού, βραδινού, κατανάλωση πρόχειρου φαγητού (πρόχειρα σνακ και fast-food)).
2. Προσπάθειες απώλειας βάρους (τον τελευταίο χρόνο, αυτή την εποχή, μέθοδος)
3. Συνθήκες κατά την διάρκεια του φαγητού (κατανάλωση φαγητού μόνο όταν υπάρχει το αίσθημα της πείνας, κατανάλωση φαγητού χωρίς άλλη ταυτόχρονη δραστηριότητα, κατανάλωση γεύματος μόνο σε συγκεκριμένα σκεύη, μόνο καθιστός και μόνο στην τραπεζαρία)
4. Εμφάνιση βουλιμικών επεισοδίων (εμφάνιση και συχνότητα)

Στις ερωτήσεις των ομάδων 1 και 3 και στην τελευταία ερώτηση της ομάδας 4, τα παιδιά καλούνταν να σημειώσουν πόσο συχνά ακολουθούσαν αυτές τις συνήθειες από μία λίστα απαντήσεων. Στις 2 πρώτες ερωτήσεις της ομάδας 2 και τις 2 πρώτες της ομάδας 4, τα παιδιά καλούνταν να απαντήσουν με ένα ΝΑΙ ή ΟΧΙ, και στην τελευταία ερώτηση της ομάδας 2 να σημειώσουν τις μεθόδους που χρησιμοποιούν για να χάσουν βάρος από μία λίστα απαντήσεων.

Επιπλέον, στις ερωτήσεις της ομάδας 3 προστέθηκαν οι «βαθμοί» των 5 απαντήσεων και προέκυψε ένα σκορ από τις συγκεκριμένες ερωτήσεις. Και στις 5 ερωτήσεις ο μικρότερος βαθμός (1-πάντα) αντιστοιχούσε σε συχνή υιοθέτηση της συγκεκριμένης συνήθειας ενώ ο μεγαλύτερος βαθμός (5-ποτέ) αντιστοιχούσε σε μη υιοθέτηση της συγκεκριμένης συνήθειας. Επομένως όσο μικρότερο ήταν το συνολικό σκορ τόσο πιθανότερο ήταν τα παιδιά να ακολουθούν συχνά τις συγκεκριμένες συνήθειες στο σύνολό τους. Το συγκεκριμένο σκορ ονομάστηκε 5onlys score.

2.2.6.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΟΠΟΙΗΣΗ ΕΠΕΙΣΟΔΙΩΝ ΚΑΤΑΝΑΛΩΣΗΣ ΤΡΟΦΗΣ

Η κατηγοριοποίηση των επεισοδίων κατανάλωσης τροφής (Food Based Classification of Eating Episodes - FBCE) είναι μία μέθοδος που αξιολογεί ποιοτικά τα κύρια και ενδιάμεσα γεύματα ανάλογα με τους τύπους των τροφίμων που αυτά περιέχουν. Η χρήση αυτής της μεθόδου παρέχει επίσης στοιχεία σχετικά με την συχνότητα και την κατανομή των επεισοδίων κατανάλωσης τροφής.

Η μέθοδος στηρίζεται στην κατηγοριοποίηση των τροφίμων σε 7 ομάδες ανάλογα με την θρεπτική τους σύνθεση, και εν συνεχεία την ταυτοποίηση των κύριων και ενδιάμεσων γευμάτων ανάλογα με τις κατηγορίες τροφίμων που περιέχουν.

Οι 7 κατηγορίες τροφίμων είναι:

1. Πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης (κρέας, ψάρι, θαλασσινά, πουλερικά, αυγό, γαλακτοκομικά) με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή θρεπτική τους αξία, και την παροχή πρωτεϊνών, σιδήρου, ψευδαργύρου και ασβεστίου.
2. Άμυλο (ρύζι, ζυμαρικά, ψωμί, όσπρια, πατάτες) με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή θρεπτική τους αξία, και την παροχή αμύλου, φυτικών πρωτεϊνών, και φυτικών ινών.
3. Λαχανικά και φρούτα με κύρια χαρακτηριστικά την υψηλή θρεπτική τους αξία, την χαμηλή ενεργειακή πυκνότητα και την παροχή αμύλου, καροτενοειδών και ασκορβικού οξέος.
4. Ξηροί καρποί και ελιές με κύρια χαρακτηριστικά την παροχή λίπους και φυτικών πρωτεϊνών.
5. Λίπη και έλαια με κύριο χαρακτηριστικό την παροχή λίπους.
6. Τρόφιμα τα οποία περιέχουν ζάχαρη (αναψυκτικά, αλκοόλ, παγωτό, γλυκά, σοκολάτα, μπισκότα κλπ) με κύρια χαρακτηριστικά την χαμηλή θρεπτική αξία και την παροχή ζάχαρης, λίπους και αιθανόλης.
7. Μη θερμιδογόνα τρόφιμα (νερό, καφές, τσάι, light αναψυκτικά κλπ) τα οποία δεν περιέχουν ενέργεια και θρεπτικά συστατικά.

Τα επεισόδια κατανάλωσης τροφής ταυτοποιούνται ως κύρια ή ενδιάμεσα γεύματα ανάλογα με το ποιες από τις παραπάνω ομάδες τροφίμων περιέχουν. Τα κύρια γεύματα κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ως εξής:

Πλήρες γεύμα: περιέχει πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης, άμυλο και λαχανικά/φρούτα

Μη πλήρες γεύμα: περιέχει πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης και άμυλο

Λιγότερο ισορροπημένο γεύμα: περιέχει πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης και λαχανικά/φρούτα

Χορτοφαγικό γεύμα: περιέχει άμυλο και λαχανικά/φρούτα

Τα ενδιάμεσα γεύματα κατηγοριοποιούνται περαιτέρω ως εξής:

Υψηλής θρεπτικής αξίας: πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης ή άμυλο ή λαχανικά/φρούτα

Μέτριας θρεπτικής αξίας: πρωτεΐνες ζωικής προέλευσης ή άμυλο ή λαχανικά/φρούτα σε συνδυασμό με λίπη/έλαια ή τρόφιμα με ζάχαρη ή ξηρούς καρπούς/ελιές

Χαμηλής θρεπτικής αξίας: λίπη/έλαια ή τρόφιμα με ζάχαρη

Η μέθοδος FBCE στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε στις ανακλήσεις 24ώρου. Τα επεισόδια κατανάλωσης τροφής κατηγοριοποιήθηκαν ως κύρια (πλήρη, μη πλήρη κλπ) ή ενδιάμεσα (υψηλής, μέτριας, χαμηλής θρεπτικής αξίας) γεύματα σε κάθε ανάκληση και στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των 2 ανακλήσεων για κάθε παιδί (74).

2.2.7 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΦΥΣΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑΣ

Η φυσική δραστηριότητα των παιδιών αξιολογήθηκε με ερωτηματολόγιο φυσικής δραστηριότητας. Στο ερωτηματολόγιο τα παιδιά καλούνταν να σημειώσουν όλες τις δραστηριότητες που είχαν κάνει το προηγούμενο 24ωρο από μία λίστα που περιείχε αθλήματα αλλά και άλλες δραστηριότητες όπως δουλειές στο σπίτι, περπάτημα κλπ. Επίσης τα παιδιά σημείωναν την χρονική διάρκεια της δραστηριότητας καθώς και το αν ξεκουράστηκαν λίγο, πολύ ή καθόλου. Τέλος, τα παιδιά κατέγραφαν και τις ώρες που παρακολούθησαν τηλεόραση ή βίντεο ή ασχολήθηκαν με παιχνίδια σε ηλεκτρονική υπολογιστή, βίντεο κλπ την προηγούμενη μέρα (75)

Τα στοιχεία επεξεργάστηκαν σε ειδικό πρόγραμμα του Microsoft Excel όπου εισάγονταν τα METs της φυσικής δραστηριότητας, η χρονική διάρκεια, ένας συντελεστής ανάλογα με το πόσο κουράστηκε το παιδί, και η χρονική διάρκεια ενασχόλησης με καθιστικές δραστηριότητες. Το πρόγραμμα υπολόγιζε την συνολική χρονική διάρκεια των δραστηριοτήτων και την ενεργειακή κατανάλωση του παιδιού, στοιχεία τα οποία τελικά εισάγονταν στην βάση δεδομένων.

2.2.8 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Οι γονείς των παιδιών κλήθηκαν να συμπληρώσουν ένα ερωτηματολόγιο σχετικά με τα δημογραφικά στοιχεία της οικογένειας, δηλαδή την καταγωγή και ηλικία των γονέων, την περιοχή διαμονής, την επαγγελματική τους κατάσταση, το μορφωτικό επίπεδο, την οικογενειακή κατάσταση και την οικονομική κατάσταση. Επίσης το ερωτηματολόγιο περιείχε ένα σκέλος όπου οι γονείς έπρεπε να συμπληρώσουν το βάρος τους, το ύψος τους και την ομάδα αίματος και τέλος ένα σκέλος όπου έπρεπε να δώσουν πληροφορίες σχετικά με το βάρος γέννησης και τον θηλασμό του συμμετέχοντος παιδιού.

2.2.9 ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑΚΟ ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Οι γονείς των παιδιών κλήθηκαν να συμπληρώσουν ένα ερωτηματολόγιο σχετικά με ασθένειες που πιθανόν να εμφανίζουν οι πρώτου βαθμού συγγενείς του παιδιού (γονείς, αδέρφια, παππούδες, γιαγιάδες), όπως παχυσαρκία, διαβήτης, καρδιαγγειακές παθήσεις και καρκίνο.

2.2.10 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 10.0 for Windows.

Οι συνεχείς μεταβλητές παρουσιάζονται στους πίνακες αποτελεσμάτων ως μέσες τιμές $\pm$ μία τυπική απόκλιση, ενώ οι κατηγορικές μεταβλητές παρουσιάζονται σαν απόλυτες συχνότητες.

Οι στατιστικές μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

Περιγραφική στατιστική - Συχνότητες για την περιγραφή των χαρακτηριστικών του δείγματος (ηλικία, ανθρωπομετρικά χαρακτηριστικά, συχνότητες γευματικών συνηθειών στο σύνολο του δείγματος).

Έλεγχος χ^2 για: α) την σύγκριση της κατανομής των κατηγοριών ΔΜΣ (φυσιολογικά, υπέρβαρα, παχύσαρκα) με την αναμενόμενη κατανομή στον πληθυσμό, β) την σύγκριση της κατανομής των γονότυπων του πολυμορφισμού κατά φύλο και κατά κατηγορία ΔΜΣ με την αναμενόμενη κατανομή στον πληθυσμό, γ) την σύγκριση των συχνοτήτων υιοθέτησης διαφόρων γευματικών συνηθειών με τις αναμενόμενες στον πληθυσμό.

Σύγκριση μέσω t -test για: α) σύγκριση ανθρωπομετρικών δεικτών που είναι συνεχείς μεταβλητές μεταξύ των γονότυπων, β) σύγκριση μεταξύ της συχνότητας υιοθέτησης γευματικών συνηθειών και του ΔΜΣ.

Συσχέτιση (Pearson correlation) για την διερεύνηση της σχέσης μεταξύ διαφόρων γευματικών συνηθειών και του ΔΜΣ ξεχωριστά για τον κάθε γονότυπο.

Γραμμική Παλινδρόμηση για την διερεύνηση του συνόλου των μεταβλητών οι οποίες επηρεάζουν τον ΔΜΣ.

Σε όλες τις μεθόδους επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το 5%.

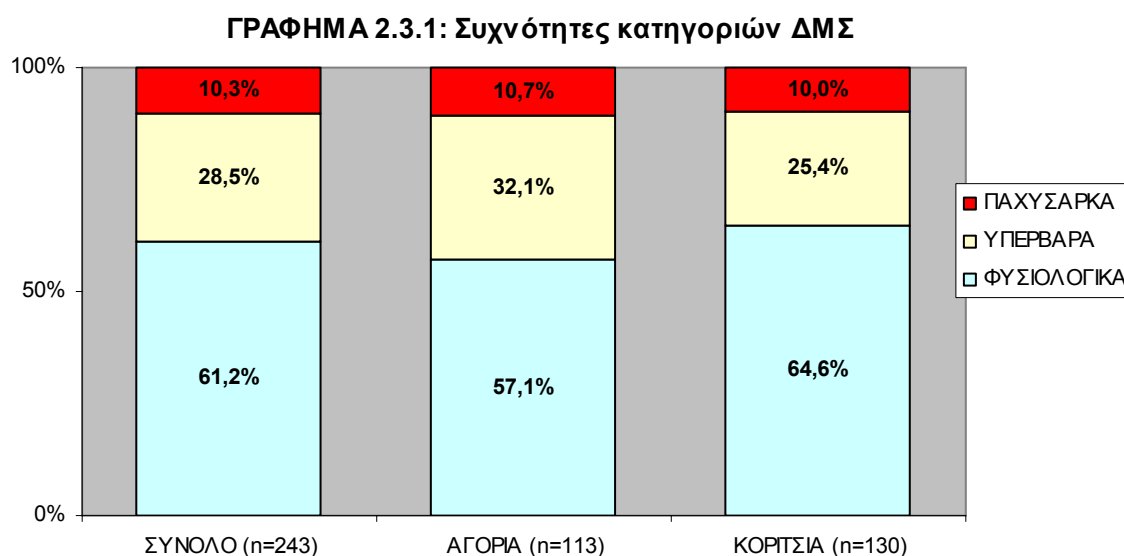
2.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

2.3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στον πίνακα 2.3.1 περιγράφονται τα χαρακτηριστικά του δείγματος της μελέτης. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων παρατηρήθηκαν στο WHR και την δερματοπτυχή υποωμοπλατταίου μυός. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε υψηλότερο WHR στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια ($0,81 \pm 0,91$ vs $0,79 \pm 0,6$ με $p = 0.009$), και χαμηλότερη τιμή δερματοπτυχής υποωμοπλατταίου στα αγόρια σε σχέση με τα κορίτσια ($10,94 \pm 5,46$ vs $12,50 \pm 5,5$ με $p = 0.03$).

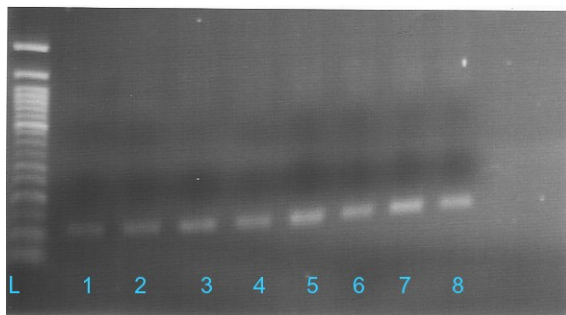
ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.1: Γενικά Χαρακτηριστικά Δείγματος			
	Αγόρια (n=113)	Κορίτσια (n=130)	p
Ηλικία (έτη)	$10,9 \pm 0,65$	$11,01 \pm 0,59$	0.16
Βάρος (kg)	$44,20 \pm 10,36$	$44,14 \pm 9,9$	0.96
Ύψος (cm)	$146,31 \pm 6,65$	$148,01 \pm 8,17$	0.081
BMI (kg/m^2)	$20,5 \pm 3,76$	$20,02 \pm 3,55$	0.31
Περιφέρεια μέσης (cm)	$69,73 \pm 12,24$	$67,75 \pm 9,9$	0.16
Περιφέρεια ισχίων (cm)	$85,10 \pm 8,64$	$85,52 \pm 8,5$	0.69
WHR	$0,81 \pm 0,09$	$0,79 \pm 0,06$	0.009
Δερματοπτυχή τρικεφάλου (mm)	$19,31 \pm 8,77$	$20,51 \pm 8,01$	0.27
Δερματοπτυχή υποωμοπλατταίου (mm)	$10,94 \pm 5,46$	$12,50 \pm 5,5$	0.03

Όσον αφορά τον επιπολασμό του υπερβάλλοντος βάρους και της παχυσαρκίας στο συγκεκριμένο δείγμα βρέθηκαν 69 παιδιά (28,5%) υπέρβαρα και 25 (10,3%) παχύσαρκα. Έπειτα από διαχωρισμό για τα δύο φύλα βρέθηκαν 36 υπέρβαρα και 12 παχύσαρκα αγόρια (32,1% και 10,7% αντίστοιχα στο σύνολο των αγοριών) και 33 υπέρβαρα και 13 παχύσαρκα κορίτσια (25,4% και 10% αντίστοιχα στο σύνολο των κοριτσιών). Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων ($p = 0.46$). Τα παραπάνω αποτελέσματα παρουσιάζονται στο γράφημα 2.3.1.



2.3.2 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ PCR

Από τα 243 άτομα του δείγματος η PCR ήταν επιτυχής για τα 136 άτομα. Ο έλεγχος για την επιτυχία της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της σε πήκτωμα αγαρόζης όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.2.5.1. Ένα τέτοιο πήκτωμα φαίνεται στην εικόνα 2.3.1. Η ζώνη που φαίνεται σε κάθε δείγμα αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 107bp, όπως προκύπτει από τον μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους (100bp ladder).



Εικόνα 2.3.1: Έλεγχος επιτυχίας PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

L : ladder 100bp

1-8 : προϊόντα PCR 107 bp

2.3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΠΕΨΗΣ

Η αλληλουχία αναγνώρισης για το ένζυμο NcoI, υπάρχει στο γονίδιο του TNFα μόνο απουσία του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A. Μετά την ηλεκτροφόρηση του πηκτώματος αγαρόζης έγινε παρατήρηση του στο υπεριώδες. Για κάθε δείγμα υπήρχαν ζώνες που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια DNA, ανάλογα με το αν το ένζυμο είχε βρει την αλληλουχία αναγνώρισης ή όχι.

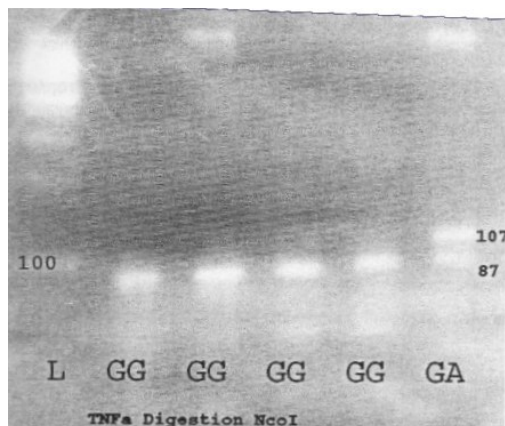
Στα δείγματα DNA που δεν έφεραν τον πολυμορφισμό, το ένζυμο εντόπισε την αλληλουχία αναγνώρισης και στα 2 αλληλόμορφα και προκύπτουν 2 ζώνες, που αντιστοιχούν σε κομμάτια DNA ίσα με 87bp και 20bp. Επειδή η ζώνη που αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 20bp είναι χαμηλή, στο πήκτωμα παρατηρούμε μία ζώνη που αντιστοιχεί σε κομμάτι DNA ίσο με 87bp. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν GG, δηλαδή ομόζυγα φυσιολογικά.

Στα δείγματα DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό μόνο στο ένα αλληλόμορφο, το ένζυμο εντόπισε μία αλληλουχία αναγνώρισης (στο φυσιολογικό αλληλόμορφο) και στο πήκτωμα παρατηρήθηκαν 2 ζώνες, που αντιστοιχούσαν σε κομμάτια 107bp και 87bp. Την ζώνη που αντιστοιχεί στο κομμάτι DNA ίσο με 20bp η οποία φυσιολογικά προκύπτει, εξακολουθούμε να μην την βλέπουμε. Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν GA, δηλαδή ετερόζυγα για τον πολυμορφισμό.

Στα δείγματα DNA που έφεραν τον πολυμορφισμό και στα δύο αλληλόμορφα, το ένζυμο δεν εντόπισε την αλληλουχία αναγνώρισης και στο πήκτωμα παρατηρήθηκε μόνο μία ζώνη, που αντιστοιχούσε σε κομμάτι DNA ίσο με 107bp (άκοπο κομμάτι). Τα άτομα αυτά χαρακτηρίστηκαν AA, δηλαδή ομόζυγα για τον πολυμορφισμό.

Από τα 136 δείγματα με επιτυχή PCR, επιτυχή πέψη είχαν τα 136 δείγματα. Από αυτά 106 ήταν GG, 29 ήταν GA και 1 ήταν AA.

Πήκτωμα ελέγχου της πέψης φαίνεται στην εικόνα 2.3.2, όπου ο μάρτυρας γνωστού μοριακού βάρους που χρησιμοποιήθηκε αντιστοιχούσε σε κομμάτι DNA ίσο με 100bp.



Εικόνα 2.3.2: Έλεγχος πέψης σε πήκτωμα αгарόζης.

L : ladder 100bp

GG: 87bp

GA: 107bp + 87bp

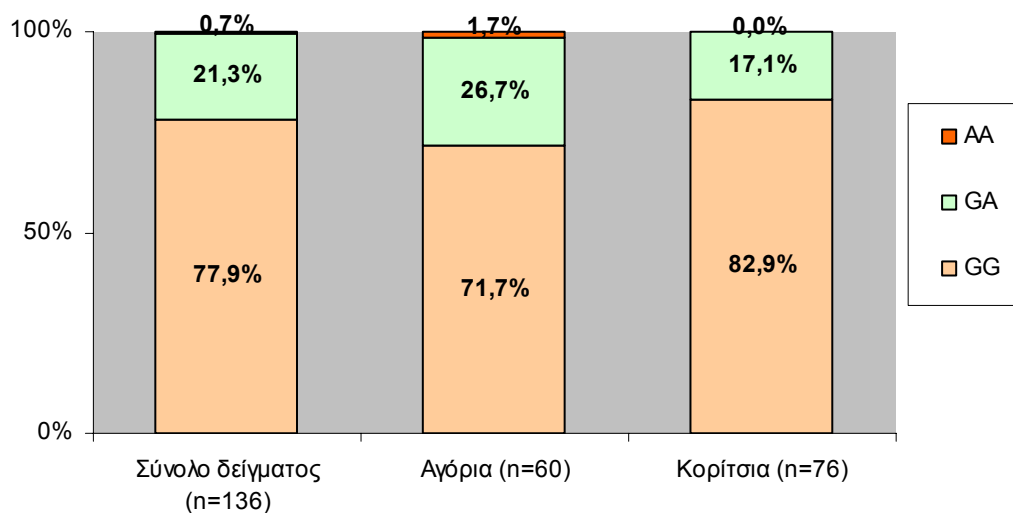
2.3.4 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ

Η κατανομή του πολυμορφισμού ανά φύλο παρουσιάζεται στον πίνακα 2.3.2 και στο γράφημα 2.3.2 και ανά κατηγορία ΔΜΣ στον πίνακα 2.3.3 και στο γράφημα 2.3.3. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην κατανομή τόσο μεταξύ των δύο φύλων ($p = 0.11$) όσο και μεταξύ των κατηγοριών ΔΜΣ ($p = 0.60$). Επιπλέον υπολογίστηκαν οι συχνότητες του A και του G αλληλίου, οι οποίες ήταν 0.11 για το A αλληλίο και 0.89 για το G και βρέθηκε ότι ο πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.2: Κατανομή του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A ανά φύλο			
	Σύνολο δείγματος	Αγόρια	Κορίτσια
	N	60	76
GG	106 (77,9%)	43 (71,7%)	63 (82,9%)
GA	29 (21,3%)	16 (26,7%)	13 (17,1%)
AA	1 (0,7%)	1 (1,7%)	0 (0%)

p-value: 0.11

ΓΡΑΦΗΜΑ 2.3.2: Κατανομή γονότυπων ανά φύλο

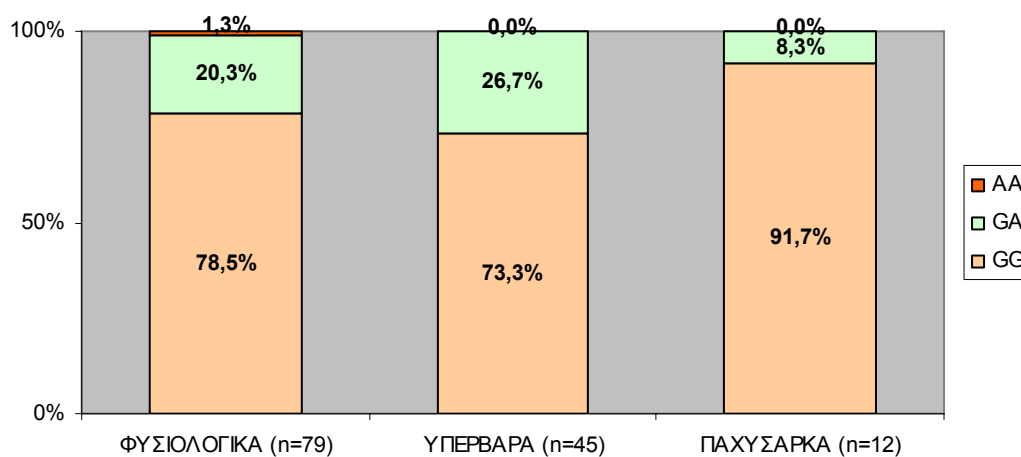


ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.3: Κατανομή του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A, ανά κατηγορία ΔΜΣ

N	Σύνολο δείγματος 136	Φυσιολογικά 79	Υπέρβαρα 45	Παχύσαρκα 12
GG	106 (77,9%)	62 (78,5%)	33 (73,3%)	11 (91,7%)
GA	29 (21,3%)	16 (20,3%)	12 (26,7%)	1 (8,3%)
AA	1 (0,7%)	1 (1,3%)	0 (0%)	0 (0%)

p-value: 0.60

ΓΡΑΦΗΜΑ 2.3.3: Κατανομή γονότυπων ανά κατηγορία ΔΜΣ



2.3.5 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΜΕ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΑΧΥΣΑΡΚΙΑΣ

Οι μέσες τιμές των ανθρωπομετρικών χαρακτηριστικών συγκρίθηκαν μεταξύ των γονότυπων του πολυμορφισμού στο σύνολο του δείγματος και έπειτα από διαχωρισμό ανάλογα με το φύλο και ανάλογα με την κατηγορία ΔΜΣ. Επειδή η συχνότητα του γονότυπου AA είναι πολύ χαμηλή δημιουργήθηκε μία ομάδα που περιλαμβάνει τον γονότυπο AG και τον γονότυπο AA, η οποία και συγκρίθηκε με την ομάδα του GG γονότυπου.

Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 ομάδων σε κανέναν από τους δείκτες παχυσαρκίας, τόσο στο σύνολο όσο και μετά από διαχωρισμό ανάλογα με το φύλο και ανάλογα με την κατηγορία ΔΜΣ.

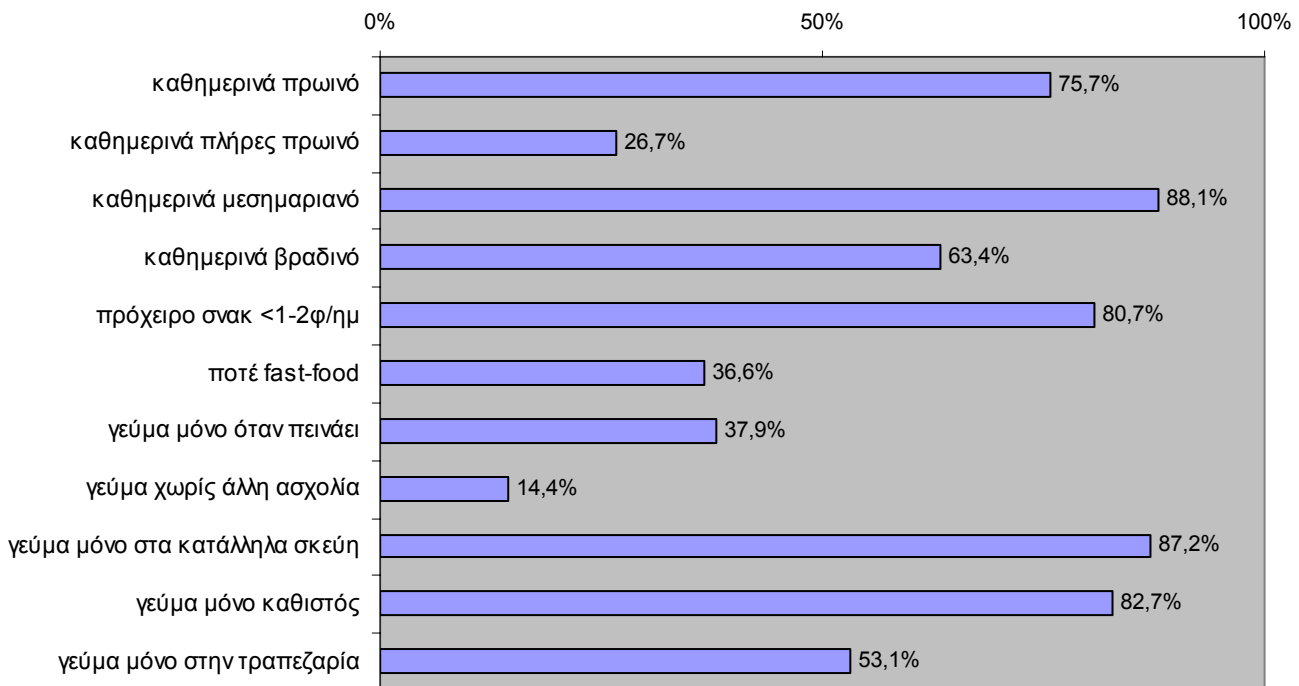
ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.4: Σύγκριση ανθρωπομετρικών δεικτών μεταξύ των γονότυπων στο σύνολο του δείγματος

	GG (n = 106)	GA / AA (n = 30)	p
Δείκτης Μάζας Σώματος (kg/m ²)	20,33 ± 3,86	20,60 ± 3,01	0.73
Βάρος (kg)	44,29 ± 10,92	43,64 ± 8,73	0.76
Περιφέρεια μέσης (cm)	69,16 ± 12,47	68,45 ± 9,21	0.76
Περιφέρεια ισχίων (cm)	85,32 ± 8,89	85,76 ± 7,33	0.80
WHR	0,80 ± 0,09	0,79 ± 0,05	0.53
Δερματοπτυχή τρικεφάλου (mm)	21,82 ± 9,46	21,36 ± 8,25	0.83
Δερματοπτυχή υποωμοπλατταίου (mm)	13,29 ± 6,32	12,17 ± 5,10	0.42

2.3.6 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΓΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΗΘΕΙΩΝ

Στο γράφημα 2.3.4 παρουσιάζονται τα ποσοστά των παιδιών στο σύνολο του δείγματος που ακολουθούν τις συγκεκριμένες γευματικές συνήθειες. Επίσης βρέθηκε ότι ο μέσος όρος των επεισοδίων κατανάλωσης τροφής (κύρια και ενδιάμεσα γεύματα) είναι $4,93 \pm 1,0$, των κύριων γευμάτων $2,39 \pm 0,77$ και των ενδιάμεσων γευμάτων $2,54 \pm 1,16$. Έπειτα από διαχωρισμό του δείγματος ανάλογα με το φύλο δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αγοριών και κοριτσιών

ΓΡΑΦΗΜΑ 2.3.4: Συχνότητες γευματικών συνηθειών (n=243)



Η συχνότητες των γευματικών συνηθειών συγκρίθηκαν μεταξύ των κατηγοριών του ΔΜΣ, αφού τα παιδιά χωρίστηκαν σε φυσιολογικά και υπέρβαρα/παχύσαρκα. Τα υπέρβαρα και παχύσαρκα παιδιά κατηγοριοποιήθηκαν σε μία κοινή ομάδα για διευκόλυνση της στατιστικής επεξεργασίας. Επίσης κάθε γευματική συνήθεια διχοτομήθηκε ώστε να αντιστοιχεί στην υιοθέτηση ή μη των συνηθειών βάση της βιβλιογραφίας. Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και υπέρβαρων/παχύσαρκων παιδιών βρέθηκαν στην καθημερινή κατανάλωση βραδινού και στην κατανάλωση του γεύματος πάντα μόνο στην τραπεζαρία. Συγκεκριμένα το 70,3% των παιδιών φυσιολογικού βάρους κατανάλωνε καθημερινά βραδινό ενώ μόνο το 56,5% των υπέρβαρων / παχύσαρκων ανέφερε καθημερινή κατανάλωση βραδινού ($p=0.03$). Αντίστοιχα, μόνο το 44,6% των υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών καταναλώνει πάντα το γεύμα του στην τραπεζαρία ενώ το αντίστοιχο ποσοστό είναι 60,7% στα παιδιά φυσιολογικού βάρους ($p=0.01$). Αξίζει να αναφερθούν επίσης κάποιες συχνότητες που ενώ δεν είναι στατιστικά σημαντικές παρουσιάζουν την τάση των ομάδων προς περισσότερο ή λιγότερο υγιεινές διατροφικές συνήθειες. Μεγαλύτερο

ποσοστό υπέρβαρων/παχύσαρκων παιδιών σε σχέση με τα φυσιολογικά έχει λιγότερα από 5 επεισόδια κατανάλωσης τροφής την ημέρα και καταναλώνει λιγότερο από 2,5 ενδιάμεσα γεύματα. Το 26,1% των υπέρβαρων/παχύσαρκων παιδιών δεν καταναλώνει καθημερινά πρωινό και το 76,1% δεν καταναλώνει πλήρες πρωινό ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά για τα παιδιά φυσιολογικού βάρους είναι 20% και 70,3%. Επίσης, το 69,9% των υπέρβαρων/παχύσαρκων παιδιών καταναλώνει fast-food 1-2 φορές την εβδομάδα ή και περισσότερο ενώ το αντίστοιχο ποσοστό για τα παιδιά φυσιολογικού βάρους είναι 57,9%. Τέλος, το 56,6% των παιδιών φυσιολογικού βάρους αναφέρει ότι δεν καταναλώνει πάντα το γεύμα του επειδή πεινάει ενώ το ποσοστό αυξάνεται σε 68,5% για τα υπέρβαρα/παχύσαρκα παιδιά. Τα παραπάνω φαίνονται στον πίνακα 2.3.5.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.5: Συχνότητες γευματικών συνηθειών κατά κατηγορία Δείκτη Μάζας Σώματος				
		Φυσιολογικά (n=145)	Υπέρβαρα / Παχύσαρκα (n=92)	p
Αριθμός επεισοδίων κατανάλωσης τροφής	< 5 / ημέρα	64,3%	73,9%	0.12
	≥ 5 / ημέρα	35,7%	26,1%	
Αριθμός κύριων γευμάτων	< 2,5 / ημέρα	67,8%	70,7%	0.64
	≥ 2,5 / ημέρα	32,2%	29,3%	
Αριθμός ενδιάμεσων γευμάτων	< 2,5 / ημέρα	57,3%	65,2%	0.22
	≥ 2,5 / ημέρα	42,7%	34,8%	
Κατανάλωση πρωινού	Καθημερινά	80,0%	73,9%	0.27
	Όχι καθημερινά	20,0%	26,1%	
Κατανάλωση πλήρους πρωινού	Καθημερινά	29,7%	23,9%	0.33
	Όχι καθημερινά	70,3%	76,1%	
Κατανάλωση μεσημεριανού	Καθημερινά	92,4%	85,9%	0.10
	Όχι καθημερινά	7,6%	14,1%	
Κατανάλωση βραδινού	Καθημερινά	70,3%	56,5%	0.03
	Όχι καθημερινά	29,7%	43,5%	
Κατανάλωση πρόχειρων ενδιάμεσων γευμάτων	< 1-2 φορές / ημέρα	82,1%	82,6%	0,91
	≥ 1-2 φορές / ημέρα	17,9%	17,4%	
Κατανάλωση fast-food	Ποτέ	42,1%	30,1%	0.07
	≥ 1-2 φορές / εβδ.	57,9%	69,9%	
Κατανάλωση γεύματος μόνο όταν υπάρχει το αίσθημα της πείνας	Πάντα	43,4%	31,5%	0.06
	Όχι πάντα	56,6%	68,5%	
Κατανάλωση γεύματος χωρίς άλλη ασχολία	Πάντα	16,0%	13,0%	0.53
	Όχι πάντα	84,0%	87,0%	
Κατανάλωση γεύματος μόνο σε συγκεκριμένα σκεύη	Πάντα	88,3%	90,2%	0.64
	Όχι πάντα	11,7%	9,8%	
Κατανάλωση γεύματος μόνο σε καθιστή θέση	Πάντα	86,1%	83,7%	0.61
	Όχι πάντα	13,9%	16,3%	
Κατανάλωση γεύματος μόνο στην τραπεζαρία	Πάντα	60,7%	44,6%	0.01
	Όχι πάντα	39,3%	55,4%	

2.3.7 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΓΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΗΘΕΙΩΝ ΜΕ ΤΟΝ ΔΕΙΚΤΗ ΜΑΖΑΣ ΣΩΜΑΤΟΣ

Οι μέσες τιμές του ΔΜΣ συγκρίθηκαν μεταξύ των συχνοτήτων των γευματικών συνηθειών οι οποίες έχουν διχοτομηθεί για διευκόλυνση της στατιστικής επεξεργασίας. Όπως φαίνεται και στον πίνακα 2.3.6 βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές του ΔΜΣ μεταξύ των συχνοτήτων κατανάλωσης ενδιάμεσων γευμάτων, μεταξύ των συχνοτήτων κατανάλωσης βραδινού, μεταξύ των συχνοτήτων κατανάλωσης fast-food και μεταξύ των συχνοτήτων κατανάλωσης γεύματος μόνο στην τραπεζαρία. Συγκεκριμένα, τα παιδιά που καταναλώνουν λιγότερα από 2,5 ενδιάμεσα γεύματα την ημέρα έχουν υψηλότερο ΔΜΣ από τα παιδιά που καταναλώνουν 2,5 ή περισσότερα ενδιάμεσα γεύματα ($20,86 \pm 3,98 \text{ kg/m}^2$ vs $19,78 \pm 3,31 \text{ kg/m}^2$ με $p=0.02$). Τα παιδιά που καταναλώνουν καθημερινά βραδινό έχουν χαμηλότερο ΔΜΣ από αυτά που παραλείπουν το βραδινό ακόμα και κάποιες μέρες της εβδομάδας ($19,86 \pm 3,45 \text{ kg/m}^2$ vs $20,95 \pm 3,96 \text{ kg/m}^2$ με $p=0.03$). Τα παιδιά που δεν καταναλώνουν ποτέ fast-food έχουν χαμηλότερο ΔΜΣ από αυτά που καταναλώνουν 1-2 φορές την εβδομάδα ή και περισσότερο ($19,53 \pm 3,32 \text{ kg/m}^2$ vs $20,67 \pm 3,81 \text{ kg/m}^2$ με $p=0.02$). Τέλος, τα παιδιά που καταναλώνουν πάντα το γεύμα τους στην τραπεζαρία έχουν χαμηλότερο ΔΜΣ από αυτά που δεν το καταναλώνουν πάντα στην τραπεζαρία ($19,82 \pm 3,47 \text{ kg/m}^2$ vs $20,72 \pm 3,80 \text{ kg/m}^2$ με $p=0.02$). Επίσης, υψηλότερο ΔΜΣ εμφανίζουν τα παιδιά που έχουν λιγότερα από 5 επεισόδια κατανάλωσης τροφής και περισσότερα από 2,5 κύρια γεύματα την ημέρα, τα αποτελέσματα όμως αυτά δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Ακόμα, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την καθημερινή κατανάλωση πρωινού (πλήρες ή μη) και μεσημεριανού αν και τα παιδιά που παραλείπουν αυτά τα γεύματα έχουν υψηλότερο ΔΜΣ. Τέλος, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την κατανάλωση των γευμάτων μόνο όταν υπάρχει το αίσθημα της πείνας, χωρίς να υπάρχουν άλλες ταυτόχρονες ασχολίες, μόνο μέσα σε συγκεκριμένα σκεύη και μόνο σε καθιστή θέση.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2.3.6: Συσχέτιση γευματικών συνηθειών με τον Δείκτη Μάζας Σώματος (kg/m²)

(n=243)		ΔΜΣ (kg/m ²)	p
Αριθμός επεισοδίων κατανάλωσης τροφής	≥ 5 / ημέρα < 5 / ημέρα	20,12 ± 3,62 21,39 ± 3,78	0.12
Αριθμός κύριων γευμάτων	≥ 2,5 / ημέρα < 2,5 / ημέρα	20,43 ± 3,85 20,01 ± 3,39	0.37
Αριθμός ενδιάμεσων γευμάτων	≥ 2,5 / ημέρα < 2,5 / ημέρα	19,78 ± 3,31 20,86 ± 3,98	0.02
Κατανάλωση πρωινού	Καθημερινά Όχι καθημερινά	20,04 ± 3,77 20,96 ± 3,23	0.10
Κατανάλωση πλήρους πρωινού	Καθημερινά Όχι καθημερινά	19,56 ± 3,44 20,50 ± 3,73	0.07
Κατανάλωση μεσημεριανού	Καθημερινά Όχι καθημερινά	20,12 ± 3,58 21,40 ± 4,29	0.10
Κατανάλωση βραδινού	Καθημερινά Όχι καθημερινά	19,86 ± 3,45 20,95 ± 3,96	0.03
Κατανάλωση πρόχειρων ενδιάμεσων γευμάτων	< 1-2 φορές / ημέρα ≥ 1-2 φορές / ημέρα	19,74 ± 3,46 20,30 ± 3,69	0,49
Κατανάλωση fast-food	Ποτέ ≥ 1-2 φορές / εβδ.	19,53 ± 3,32 20,67 ± 3,81	0.02
Κατανάλωση γεύματος μόνο όταν υπάρχει το αίσθημα της πείνας	Πάντα Όχι πάντα	19,69 ± 3,81 20,58 ± 3,52	0.06
Κατανάλωση γεύματος χωρίς άλλη ασχολία	Πάντα Όχι πάντα	19,70 ± 2,85 20,33 ± 3,76	0.33
Κατανάλωση γεύματος μόνο σε συγκεκριμένα σκεύη	Πάντα Όχι πάντα	20,30 ± 3,66 19,83 ± 3,59	0.50
Κατανάλωση γεύματος μόνο σε καθιστή θέση	Πάντα Όχι πάντα	20,13 ± 3,59 20,77 ± 3,90	0.30
Κατανάλωση γεύματος μόνο στην τραπεζαρία	Πάντα Όχι πάντα	19,82 ± 3,47 20,72 ± 3,80	0.05

2.3.8 ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ ΚΑΙ ΓΕΥΜΑΤΙΚΩΝ ΣΥΝΗΘΕΙΩΝ

Για να μελετηθούν οι πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του πολυμορφισμού TNFα - 308 G/A και των γευματικών συνηθειών στην παιδική παχυσαρκία διενεργήθηκε έλεγχος συσχέτισης (Pearson correlation) και γραμμική παλινδρόμηση (Linear Regression)

Στον έλεγχο συσχέτισης τα παιδιά χωρίστηκαν σε δύο ομάδες ανάλογα με την παρουσία ή όχι του πολυμορφισμού (ομάδα GG και ομάδα GA/AA) και ερευνήθηκε η σχέση μεταξύ των γευματικών συνηθειών και του ΔΜΣ ξεχωριστά στην κάθε ομάδα. Στις συσχετίσεις χρησιμοποιήθηκαν επίσης η ηλικία και το φύλο ως ελεγχόμενες μεταβλητές, έτσι ώστε να αποφευχθεί η εμφάνιση πλασματικών συσχετίσεων που οφείλονται σε αυτούς τους παράγοντες.

Στα GG παιδιά, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και της συχνότητας κατανάλωσης ενδιάμεσων γευμάτων ($r = -0.213$, $p=0.036$). Επίσης, εμφανίστηκε αρνητική συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και του συνολικού αριθμού επεισοδίων κατανάλωσης τροφής, η οποία όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική ($r = -0.182$, $p=0.075$).

Στα GA/AA παιδιά, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και του συνολικού αριθμού επεισοδίων κατανάλωσης τροφής ($r = 0.471$, $p=0.023$). Επίσης, εμφανίστηκε στατιστικά σημαντική θετική συσχέτιση μεταξύ του ΔΜΣ και της συχνότητας κατανάλωσης ενδιάμεσων γευμάτων ($r = 0.416$, $p=0.048$).

Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν την διαφορετική ανταπόκριση των παιδιών με διαφορετικό γονότυπο στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος τους. Δηλαδή, στα παιδιά χωρίς τον πολυμορφισμό η αυξημένη συχνότητα συνολικών γευμάτων και ενδιάμεσων γευμάτων σχετίζεται με χαμηλότερο ΔΜΣ, ενώ στα παιδιά με τον πολυμορφισμό σχετίζεται με υψηλότερο ΔΜΣ, υπάρχει δηλαδή αντίθετο αποτέλεσμα.

Για την τελική διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ γονότυπων, γευματικών συνηθειών και ΔΜΣ εφαρμόστηκε γραμμική παλινδρόμηση, με εξαρτημένη μεταβλητή τον ΔΜΣ και ανεξάρτητες τον γονότυπο και τις γευματικές συνήθειες που βρέθηκε να σχετίζονται σημαντικά με τον ΔΜΣ (καθημερινή κατανάλωση βραδινού, κατανάλωση fast-food, συχνότητα συνολικών και ενδιάμεσων γευμάτων την ημέρα).

Η συχνότητα των συνολικών επεισοδίων κατανάλωσης τροφής σχετίστηκε αρνητικά με τον ΔΜΣ ($B = -0.198$, $p=0.023$), μόνο όμως στο μοντέλο το οποίο περιελάμβανε και τον γονότυπο, γεγονός το οποίο δείχνει την αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού με την συχνότητα των γευμάτων στην πρόβλεψη του ΔΜΣ. Η συσχέτιση παρέμεινε στατιστικά σημαντική και μετά από την εισαγωγή της ηλικίας και του φύλου στο μοντέλο, γεγονός που δείχνει ότι η συσχέτιση που εμφανίστηκε δεν επηρεάζεται από την ηλικία και το φύλο.

2.4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη συμμετείχαν 243 παιδιά ηλικίας 10-12 ετών, τα οποία υποβλήθηκαν σε ανθρωπομετρικές μετρήσεις, αξιολόγηση των γευματικών τους συνθηθειών και έλεγχο του γονότυπου για τον πολυμορφισμό TNFα -308 G/A. Τα στοιχεία αυτά χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η σχέση του συγκεκριμένου πολυμορφισμού με την παχυσαρκία, η σχέση των γευματικών συνθηθειών με την παχυσαρκία και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πολυμορφισμού και γευματικών συνθηθειών.

Από τα χαρακτηριστικά του δείγματος στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των 2 φύλων παρουσίαζαν το WHR, το οποίο ήταν υψηλότερο στα αγόρια και η δερματοπτυχή υποωμοπλατταίου που ήταν υψηλότερη στα κορίτσια. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Μαμαλάκης και συν σε έρευνα παιδιών στην Κρήτη, όπου το WHR ήταν υψηλότερο στα αγόρια όλων των ηλικιακών ομάδων και οι μετρήσεις των δερματοπτυχών υψηλότερες στα κορίτσια (7).

Ο επιπολασμός του υπερβάλλοντος βάρους ήταν 28,5% και της παχυσαρκίας 10,3% και δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων. Τα ποσοστά αυτά είναι υψηλότερα από τα ποσοστά άλλων ερευνών που έχουν γίνει σε ελληνικό πληθυσμό παιδιών σχολικής ηλικίας (7,8,9).

Η συχνότητα του TNFα -308 A αλληλίου στα 136 παιδιά στα οποία έγινε έλεγχος για τον πολυμορφισμό ήταν 0.11 και δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των 2 φύλων. Μέχρι στιγμής δεν αναφέρονται στην βιβλιογραφία άλλες έρευνες που να έχουν μελετήσει τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό σε παιδιά σχολικής ηλικίας, γι' αυτό η σύγκριση της συχνότητας έγινε με πληθυσμούς έφηβων ή ενήλικων ατόμων. Η συχνότητα που βρέθηκε είναι μικρότερη από την αντίστοιχη σε έφηβους στην Αργεντινή (0.18) (41) και σε υγιείς ενήλικες στην Σουηδία (0.20) (36), την Β.Ιρλανδία (0.24) (39) και την Ιταλία (0.15) (51). Είναι όμως υψηλότερη από την συχνότητα που έχει βρεθεί σε υγιείς ενήλικους πληθυσμούς στην Ιαπωνία (0.015) (37), την Κίνα (0.074) (37), την Κορέα (0.09) (40) και την Ελλάδα (0.02) (42).

Όσον αφορά την κατανομή μεταξύ των κατηγοριών ΔΜΣ δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυσιολογικών, υπέρβαρων και παχύσαρκων παιδιών. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις μελέτες των Romeo et al (51), Hoffstedt et al (53) και Uma et al (30) όπου η συχνότητα των γονότυπων και των αλληλίων του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ παχύσαρκων και φυσιολογικών ενήλικων ατόμων σε Ιταλούς, Σουηδούς και Κορεάτες αντίστοιχα. Αντίθετα, έρευνα των Herrmann et al (39) σε πληθυσμούς της Γαλλίας και της Βόρειας Ιρλανδίας έδειξε αυξημένη συχνότητα του A αλληλίου σε υπέρβαρα άτομα.

Η σύγκριση των ανθρωπομετρικών δεικτών μεταξύ των διαφορετικών γονότυπων δεν έδειξε σημαντική διαφορά, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι στον

συγκεκριμένο πληθυσμό η ύπαρξη του πολυμορφισμού δεν επηρεάζει τους δείκτες παχυσαρκίας. Όπως προαναφέρθηκε δεν έχουν γίνει αντίστοιχες μελέτες σε παιδικό πληθυσμό και γι' αυτό δεν μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων, αξίζει όμως να αναφερθεί ότι έρευνα σε έφηβους έχει δείξει παρόμοια αποτελέσματα, καθώς δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των φορέων και μη του A αλληλίου όσον αφορά τον ΔΜΣ και το WHR (41). Οι έρευνες σε ενήλικο πληθυσμό δείχνουν διφορούμενα αποτελέσματα. Καμία συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και του ΔΜΣ ή του WHR έδειξαν οι έρευνες των Wang et al (37), Romeo et al (51), Walston et al (52) και Um et al (40). Αντίθετα, η έρευνα των Hoffstedt et al (53) έδειξε 7kg/m² υψηλότερο ΔΜΣ και 25% υψηλότερο ποσοστό λίπους στους ομόζυγους AA. Υψηλότερο ΔΜΣ στους φορείς του A αλληλίου έδειξε και η έρευνα των Herrmann et al (39).

Όσον αφορά τις γευματικές συνήθειες, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στις συχνότητες τους μεταξύ παιδιών φυσιολογικού βάρους και υπέρβαρων / παχύσαρκων. Το 70,3% των παιδιών φυσιολογικού βάρους και μόνο το 56,5% των υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών καταναλώνουν καθημερινά βραδινό. Η σύγκριση των μέσων του ΔΜΣ εξάλλου έδειξε ότι τα παιδιά που καταναλώνουν καθημερινά βραδινό έχουν σημαντικά χαμηλότερο ΔΜΣ από τα παιδιά που το παραλείπουν έστω και κάποιες μέρες της εβδομάδας. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν βρει διάφορες έρευνες. Η έρευνα των Veugeliers et al (13) στον Καναδά έδειξε ότι η αυξημένη συχνότητα κατανάλωσης βραδινού γεύματος στο σπίτι με την συντροφιά της οικογένειας σχετίζεται με μειωμένο κίνδυνο εμφάνισης παχυσαρκίας, ενώ και στις ΗΠΑ οι Gillman et al (64) σε δείγμα 16000 παιδιών ηλικίας 9-14 βρήκαν ότι τα παιδιά που έτρωγαν βραδινό είχαν ½ μονάδα χαμηλότερο ΔΜΣ από τα παιδιά που δεν κατανάλωναν ποτέ βραδινό με την οικογένεια τους.

Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές όσον αφορά την καθημερινή κατανάλωση πρωινού (πλήρες ή μη) και μεσημεριανού αν και τα παιδιά που παραλείπουν αυτά τα γεύματα έχουν υψηλότερο ΔΜΣ και αντίστροφα μεγαλύτερο ποσοστό υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών σε σχέση με τα παιδιά φυσιολογικού βάρους παραλείπει αυτά τα γεύματα. Στατιστικά σημαντική αρνητική συσχέτιση μεταξύ καθημερινής κατανάλωσης πρωινού και ΔΜΣ έχουν βρει πλήθος ερευνών όπως η NHLBI Health and Growth Study (61) καθώς και η μετανάλυση 47 ερευνών από τους Rampersaud et al (60). Επιπλέον, στην NHLBI Health and Growth Study (61) βρέθηκε ότι τα κορίτσια που κατανάλωναν πλήρες πρωινό καθημερινά είχαν 0,1 kg/m² χαμηλότερο ΔΜΣ σε σχέση με όσα δεν κατανάλωναν πλήρες πρωινό καθημερινά.

Όσον αφορά την κατανάλωση fast-food μεγαλύτερο ποσοστό υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών κατανάλωνε 1-2 φορές την εβδομάδα ή και περισσότερο σε σχέση με τα παιδιά φυσιολογικού βάρους, η διαφορά όμως αυτή δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Όμως, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ των ΔΜΣ των

παιδιών που δεν κατανάλωναν ποτέ fast-food σε σχέση με αυτά που κατανάλωναν 1-2 φορές την εβδομάδα ή και περισσότερο. Συγκεκριμένα τα παιδιά που δεν κατανάλωναν ποτέ fast-food είχαν σημαντικά χαμηλότερο ΔΜΣ, αποτέλεσμα που συμφωνεί με την θετική συσχέτιση που βρήκαν οι Huang et al (17) μεταξύ ποσοστού ενέργειας από προέρχεται από φαγητά που καταναλώνονται εκτός σπιτιού και ΔΜΣ. Εξάλλου, και οι Pereira et al (67) έχουν δείξει αύξηση του σχετικού κινδύνου ανάπτυξης παχυσαρκίας στα άτομα που κατανάλωναν fast-food 2 ή περισσότερες φορές την εβδομάδα. Τα αποτελέσματα αυτά άλλωστε είναι αναμενόμενα αν λάβουμε υπόψη ότι τα τρόφιμα αυτά είναι πλούσια σε ενέργεια, ολικό και κορεσμένο λίπος και απλούς υδατάνθρακες. Εξάλλου σερβίρονται σε μεγάλες μερίδες, γεγονός που αυξάνει την ενεργειακή πρόσληψη και προκαλούν ελάχιστο κορεσμό λόγω της πολύ μικρής περιεκτικότητας τους σε φυτικές ίνες, γεγονός που οδηγεί σε υπερκατανάλωση (66).

Οι συχνότητες των συνολικών, κύριων και ενδιάμεσων γευμάτων ήταν 4,93, 2,39 και 2,54 γεύματα αντίστοιχα, και παρόλο που δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των κατηγοριών του ΔΜΣ, μεγαλύτερο ποσοστό των υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών σε σχέση με τα φυσιολογικά κατανάωνε λιγότερα από 5 συνολικά γεύματα και λιγότερα από 2,5 κύρια και 2,5 ενδιάμεσα. Εξάλλου, η κατανάλωση λιγότερων από 2,5 ενδιάμεσων γευμάτων την ημέρα σχετίστηκε στατιστικά σημαντικά με υψηλότερο ΔΜΣ. Στην αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ συχνότητας κατανάλωσης γευμάτων και σωματικού βάρους έχει καταλήξει και η μετανάλυση ερευνών από τους Nicklas et al (58). Επίσης, στην έρευνα των Thompson et al (18) φάνηκε ότι η κατανάλωση 4-5,9 συνολικών γευμάτων την ημέρα σχετίζεται με μικρότερη αύξηση του ΔΜΣ σε σχέση με την κατανάλωση λιγότερων από 4 ή περισσότερων από 6 γευμάτων, αποτέλεσμα που δεν φάνηκε στην παρούσα μελέτη. Η αυξημένη συχνότητα επεισοδίων κατανάλωσης τροφής είναι πιθανό να σχετίζεται με μειωμένο ΔΜΣ, λόγω της σχέσης του με υγιεινότερες διατροφικές συνήθειες (τα παιδιά που τρώνε τακτικά γεύματα καταναλώνουν περισσότερα φρούτα, λαχανικά και γαλακτοκομικά) και με την συνακόλουθη αύξηση της θερμογένεσης λόγω τροφής αλλά και της θερμογένεσης λόγω άσκησης, καθώς τα παιδιά που τρώνε τακτικά γεύματα είναι περισσότερο δραστήρια (58).

Όσον αφορά τις συμπεριφορές κατά την διάρκεια του γεύματος, στατιστικά σημαντική διαφορά βρέθηκε μεταξύ των κατηγοριών ΔΜΣ σε σχέση με την κατανάλωση του γεύματος μόνο στην τραπεζαρία, αφού μόλις το 44,6% των υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών καταναλώνει πάντα το γεύμα του στην τραπεζαρία σε αντίθεση με το 60,7% των φυσιολογικών. Οριακά σημαντική ήταν και η συσχέτιση της συγκεκριμένης συνήθειας με τον ΔΜΣ, καθώς τα παιδιά που καταναλώνουν τα γεύματα τους πάντα στην τραπεζαρία έχουν χαμηλότερο ΔΜΣ. Δεν υπάρχουν αρκετές έρευνες που να έχουν ερευνήσει την επίδραση της συγκεκριμένης συνήθειας στην παχυσαρκία, όμως η κατανάλωση γεύματος στο υπνοδωμάτιο σχετίστηκε με αυξημένη

ενεργειακή πρόσληψη στην έρευνα των McNutt et al (69) και η έναρξη κατανάλωσης γεύματος στην τραπεζαρία σχετίστηκε θετικά με μείωση του σωματικού βάρους σε μία έρευνα παρέμβασης των Golan et al (70).

Οι υπόλοιπες συμπεριφορές κατά την διάρκεια του γεύματος δεν σχετίστηκαν σημαντικά με τον ΔΜΣ, αν και φάνηκε μία υψηλή τάση των υπέρβαρων / παχύσαρκων παιδιών ως προς την κατανάλωση φαγητού χωρίς να υπάρχει το αίσθημα της πείνας, καθώς ένα υψηλό ποσοστό αυτών (68,5%) δήλωσε ότι καταναλώνει το γεύμα χωρίς να πεινάει πάντα. Τα παιδιά που καταναλώνουν το γεύμα τους πάντα ενώ πεινάνε είχαν $\sim 1\text{kg/m}^2$ χαμηλότερο ΔΜΣ σε σχέση με αυτά που δεν το καταναλώνουν πάντα λόγω πείνας, η διαφορά αυτή όμως δεν ήταν στατιστικά σημαντική. Η κατανάλωση φαγητού χωρίς να υπάρχει το αίσθημα της πείνας σχετίστηκε με αυξημένη ενεργειακή πρόσληψη στην έρευνα των McNutt et al (69), και δεν έχει διερευνηθεί περισσότερο σε παιδιά.

Η διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του πολυμορφισμού και των γευματικών συνθηκών στην παχυσαρκία έδειξε ιδιαίτερα ενδιαφέροντα αποτελέσματα. Η γραμμική παλινδρόμηση έδειξε αρνητική συσχέτιση μεταξύ συχνότητας επεισοδίων κατανάλωσης τροφής και ΔΜΣ, μόνο όμως όταν στο συγκεκριμένο μοντέλο εισαγόταν και ο γονότυπος. Το αποτέλεσμα αυτό οδήγησε στην εφαρμογή συσχέτισης Pearson, όπου φάνηκε πλήρως αντίθετη συσχέτιση της συχνότητας συνολικών και ενδιάμεσων γευμάτων και του ΔΜΣ σε κάθε γονότυπο. Έτσι, η συχνότητα συνολικών γευμάτων και ενδιάμεσων γευμάτων σχετίστηκε αρνητικά με τον ΔΜΣ στους ομοζυγώτες φυσιολογικούς και θετικά με τον ΔΜΣ στους ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες στον πολυμορφισμό. Δεν έχουν βρεθεί στην βιβλιογραφία άλλες έρευνες που να έχουν αξιολογήσει την αλληλεπίδραση του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A με τις γευματικές συνθήκες ώστε να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα όμως της παρούσας έρευνας δείχνουν ότι είναι πιθανό τα άτομα με διαφορετικούς γονότυπους να ανταποκρίνονται διαφορετικά στα ερεθίσματα του περιβάλλοντος τους και επομένως να έχουν διαφορετική επιδεκτικότητα στην εμφάνιση της παχυσαρκίας.

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη φάνηκαν τα εξής:

- Η κατανομή του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ υπέρβαρων και φυσιολογικών και δεν επηρέαζε σημαντικά τους δείκτες παχυσαρκίας.
- Η καθημερινή κατανάλωση βραδινού γεύματος, η κατανάλωση του γεύματος μόνο στην τραπεζαρία, η κατανάλωση fast-food λιγότερο από 1-2 φορές την εβδομάδα και η κατανάλωση 2,5 ή περισσότερων ενδιάμεσων γευμάτων σχετίστηκε με χαμηλότερο ΔΜΣ.
- Υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A και της συχνότητας των γευμάτων στον καθορισμό του ΔΜΣ.

- Η συχνότητα συνολικών γευμάτων και ενδιάμεσων γευμάτων σχετίστηκε αρνητικά με τον ΔΜΣ στους ομοζυγώτες φυσιολογικούς και θετικά με τον ΔΜΣ στους ετεροζυγώτες και ομοζυγώτες στον πολυμορφισμό

Η επίδραση του πολυμορφισμού TNFα -308 G/A στην παχυσαρκία καθώς και οι αλληλεπιδράσεις του με διατροφικούς παράγοντες δεν έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα στον ελληνικό πληθυσμό ενώ ελάχιστες είναι παγκοσμίως οι έρευνες που αφορούν παιδικό πληθυσμό. Είναι λοιπόν αναγκαίο οι επιδράσεις αυτές να αποτελέσουν θέμα ερευνητικού ενδιαφέροντος και στο μέλλον, ώστε να εξαχθούν περισσότερο έγκυρα συμπεράσματα, που είναι πιθανό να ωφελήσουν στην πρόληψη και αντιμετώπιση της παιδικής παχυσαρκίας.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας. WHO Technical Report Series 894. www.who.int
2. Cole TJ, Bellizzi MG, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320:1240-3
3. Reilly J. John. Descriptive epidemiology and health consequences of childhood obesity. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005, Vol. 19, No. 3, 327–341.
4. Dehghan Mahshid, Akhtar-Daneshand Noori, T Merchant Anwar. Childhood obesity, prevalence and prevention. *Nutrition Journal* 2005; 4:24.
5. EU childhood obesity “out of control”. IOTF Childhood Obesity Report May 2004.
6. Φαρατζιάν Π, Γιαννακούλια Μ, Ρίσβας Γ, Μελίστας Λ, Κωνσταντινίδου Μ. Παιδική και εφηβική παχυσαρκία. Ένα κρίσιμο πρόβλημα για την δημόσια υγεία. *Διατροφή – Διαιτολογία* 2004, Περίοδος Β, 8(3-4): 65-110.
7. Mamalakis G, Kafatos A, Manios Y, Anagostopoulou T, Apostolaki I. Obesity indices in a cohort of primary school children in Crete: a six year prospective study. *International Journal of Obesity* 2000; 24: 765-771.
8. Krassas G.E., Tzotzas Th., Tsamets Ch., Konstantinidis T.. Prevalence and trends in overweight and obesity among children and adolescents in Thessaloniki (Greece). *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 2001; 14: 1319-1326.
9. Karayiannis D, Yannakoulia M, Terzidou M, Sidossis LS and Kokkevi A. Prevalence of overweight and obesity in Greek school-aged children and adolescents. *European Journal of Clinical Nutrition* 2003; 57: 1189–1192.
10. Lobstein T. and Frelut M.-L. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obesity Reviews* 2003; 4: 195–200.
11. The challenge of obesity in the WHO European Region. Fact sheet EURO/13/05 Copenhagen, Bucharest, 12 September 2005.
12. Obesity and overweight. Global strategy on diet, physical activity and health. World Health Organization. 2003.
13. Veugelers J. Paul, Fitzgerald L. Angela. Prevalence of and risk factors for childhood overweight and obesity. *CMAJ* 2005; 173(6): 607-13.
14. Maffei Claudio. Aetiology of overweight and obesity in children and adolescents. Review. *European Journal of Pediatrics* 2000; 159: [Suppl 1] S35-S44.
15. Norman R.A., Bogardus C., and Ravussin E. Linkage between obesity and a marker near the tumor necrosis factor- α locus in Pima Indians. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995; 96: 158-162.
16. Loos F. Ruth, Rankinen Tuomo. Gene-Diet Interactions on Body Weight Changes. Review. *J Am Diet Assoc.* 2005; 105: S29-S34.
17. Huang T-K Terry, Howarth C. Nancy, Lin Biing-Hwan, Roberts B. Susan, and McCrory A. Megan. Energy intake and meal portions: Associations with BMI percentile in U.S. children. *Obesity Research* 2004 Vol. 12 No. 11: 1875-1885.
18. Thompson OM, Ballew C, Resnicow K, Gillespie C, Must A, Bandini LG, Cyr H and Dietz WH. Dietary pattern as a predictor of change in BMI z-score among girls. *International Journal of Obesity* 2006; 30: 176–182.
19. Morris M. Alison, Heilbronn K. Leonie , Noakes Manny, Kind L. Karen, Clifton M. Peter. -308 Nco I polymorphism of tumour necrosis factor alpha in overweight Caucasians. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2003; 62: 197-201.
20. Tumor Necrosis Factor. Online Mendelian Inheritance in Man. www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim.
21. Argiles M. Josep, Lopez-Soriano Joaquin, Busqueth Silvia, and Lopez-Soriano J. Francisco. Journey from cachexia to obesity by TNF. *FASEBJ.* 1997; 11: 743-751.
22. Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes/TNFaIS319.html
23. The TNF Superfamily. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2003; 14: 181-194.
24. Idriss TH and Naismith HJ. TNFa and the TNF Receptor Superfamily: Structure-Function Relationship(s). *Microscopy Research and Technique* 2000; 50:184–195.
25. Ivashkiv B. Lionel. The history, basic science and biology of TNF. Hospital for Special Surgery (www.hss.edu) 2003.

26. Sethi K. Jaswinder and Hotamisligil S. Gokhan. The role of TNF α in adipocyte metabolism. *Cell & Developmental Biology*, 1999; 10: 19-29.
27. Tumor Necrosis Factor Superfamily Members: Nomenclature update and models. [JAX Mice Literature](http://jaxmice.jax.org/library/notes/477c.html). <http://jaxmice.jax.org/library/notes/477c.html>.
28. Wang Xing Li and Oosterhof Janine. Tumour necrosis factor α G-308A polymorphism and risk for coronary artery disease. *Clinical Science* 2000; 98: 435-7.
29. Dalziel Bronwen, Gosby K. Alison, Richman M. Rosemary, Bryson M. Janet, and Caterson D. Ian. Association of the TNF- α -308 G/A promoter polymorphism with insulin resistance in obesity. *Obesity Research* 2002 Vol. 10 No. 5 : 401-407.
30. Uma Jae-Young, Parkb Jae-Hwang, Kima Hyung-Min. Gene polymorphisms in tumor necrosis factor locus and waist-hip ratio in obese Koreans.. *Clinica Chimica Acta* 2003; 338:117-122.
31. Kern A. Philip, Seghizadeh Mehrnoosh, Ong M. John, Bosch J. Ricardo, Deem Richard, and Simsolo B. Rosa. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *Journal of Clinical Investigation*. 1995; 95: 2111-2119.
32. Pihlajamaki Jussi, Ylinen Mari, Karhapaa Pauli, Vauhkonen Ilkka, and Laakso Markku. The effect of the -308a allele of the TNF- α gene on insulin action is dependent on obesity. *Obesity Research* 2003; Vol. 11 No. 7: 912-917.
33. Hotamisligil S. Gokhan, Arner Peter, Caro F. Jose, Atkinson L. Richard and Spiegelman M. Bruce. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95: 2409-2415.
34. Kras M. Krystyna, Hausman B. Dorothy, and Martin J. Roy. Tumor Necrosis Factor- α stimulates cell proliferation in adipose tissue-derived stromal-vascular cell culture: promotion of adipose tissue expansion by paracrine growth factors. *Obesity Research* 2000; Vol. 8 No. 2: 186-193.
35. Wilson AG, di Giovine FS, Blakemore AI, Duff GW. Single base polymorphism in the tumour necrosis factor α (TNF α) gene detectable by NcoI restriction of PCR product. *Human Molecular Genetics* 1992; 1: 353.
36. Skoog T, Ferdinand M, Kallin B, Jovinge S, Boquist S, Nilsson J, Eriksson P, Hamsten A. A common functional polymorphism (C $\rightarrow$ A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor- α gene associated with reduced circulating levels of TNF α . *Human Molecular Genetics*, 1999; 8:1443-1449.
37. Wang Ying, Ng C.Y. Maggie, So Wing-Yee, Ma Ronald, Ko T.C. Gary, Tong C.Y. Peter and Chan C.N. Juliana. Association between tumour necrosis factor- α G-308A polymorphism and risk of nephropathy in obese Chinese type 2 diabetic patients. *Nephrology Dialysis Transplantation* 2005; 20: 2733-2738.
38. [Fernandez-Real JM](#), [Gutierrez C](#), [Ricart W](#), [Casamitjana R](#), [Fernandez-Castaner M](#), [Vendrell J](#), [Richart C](#), [Soler J](#). The TNF- α gene Nco I polymorphism influences the relationship among insulin resistance, percent body fat, and increased serum leptin levels. [Diabetes](#). 1997; 46(9):1468-72.
39. Herrmann SM, Ricard S, Nicaud V, Mallet C, Arveiler D, Evans A, Ruidavets JB, Luc G, Bara L, Parra HJ, Poirier O, Cambien F. Polymorphisms of the tumour necrosis factor- α gene, coronary heart disease and obesity. *European Journal of Clinical Investigation* 1998; 28: 59-66.
40. Um Jae-Young, Kang Byung-Ku, Lee Si-Hyeong, Shin Jo-Young, Hong Seung-Heon, and Kim Hyung-Min. Polymorphism of the tumor necrosis factor α gene and waist-hip ratio in obese Korean women. *Molecules and Cells*, 2004; Vol. 18, No. 3: 340-345.
41. Sookoian Silvia, Garcia Silvia I., Fernandez Gianotti Tomas, Dieuzeide Guillermo, Gonzalez D. Claudio, and Pirola J. Carlos. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor- α gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. *American Journal of Hypertension*, 2005; 18: 1271-1275.
42. [Dedoussis GV](#), [Panagiotakos DB](#), [Vidra NV](#), [Louizou E](#), [Chrysohooou C](#), [Germanos A](#), [Mantas Y](#), [Tokmakidis S](#), [Pitsavos C](#), [Stefanadis C](#). Association between TNF- α -308G>A polymorphism and the development of acute coronary syndromes in Greek subjects: the CARDIO2000-GENE Study. [Genet Med](#) 2005; 7(6): 411-416.

43. Berberoglu M. Evaluation of the correlation between serum tumor necrosis factor- α and relative body mass index (RBMI) in childhood. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2001; 14(5):543-7.
44. Moon Yoo-Sun, Kim Do-Hoon, and Song Dong-Keun. Serum Tumor Necrosis Factor- α levels and components of the metabolic syndrome in obese adolescents. *Metabolism*, 2004; 53(7):863-867.
45. Dandona Paresh, Weinstock Ruth, Thusu Kuldip, Abdel-Rahman Ehad, Aljada Ahmad, and Wadden Thomas. Tumor Necrosis Factor- α in sera of obese patients: fall with weight loss. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 2907–2910.
46. Furuta Masahiko, Yano Yutaka, Ito Kuninobu, Gabazza E.C., Katsuki Akira, Tanaka Takashi, Ohtake Kouhei, Hirata Naoki, Hori Yasuko, Araki-Sasaki Rika, Sumida Yasuhiro, Adachi Yukihiko. Relationship of the tumor necrosis factor- α -308 A/G promoter polymorphism with insulin sensitivity and abdominal fat distribution in Japanese patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2002; 56: 141–145.
47. Katsuki Akira, Sumida Yasuhiro, Murashima Shuichi, Murata Kazuya, Takarada Yoshihiro, Ito Kuninobu, Fujii Masashi, Tsuchihashi Ken, Goto Hiroyuki, Nakatani Kaname, and Yano Yutaka. Serum levels of tumor necrosis factor- α are increased in obese patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1998; 83: 859–862.
48. Xu Haiyan, Uysal K. Teoman, Becherer J. David, Arner Peter, and Hotamisligil S. Gokhan. Altered Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) processing in adipocytes and increased expression of transmembrane TNF- α in obesity. *Diabetes* 2002; 51: 1876-1883.
49. Pausova Zdenka, Deslauriers Benoit, Gaudet Daniel, Tremblay Johanne, Kotchen A. Theodore, Larochelle Pierre, Cowley W. Allen, Hamet Pavel. Role of Tumor Necrosis Factor- α gene locus in obesity and obesity-associated hypertension in French Canadians. *Hypertension* 2000; 36: 14-19.
50. de Silva M. Andrea, Walder R. Ken, Boyko J. Edward, Whitecross F. Kate, Nicholson Geoff, Kotowicz Mark, Pasco Julie, and Collier R. Greg. Genetic variation and obesity in Australian women: A prospective study. *Obesity Research* 2001; 12: 733-740.
51. Romeo Stefano, Sentinelli Federica, Capici Francesca, Arca Marcello, Berni Andrea, Vecci Elio, Di Mario Umberto and Baroni Marco Giorgio. The G-308A variant of the Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) gene is not associated with obesity, insulin resistance and body fat distribution. *BMC Medical Genetics* 2001; 2: 10.
52. Walston Jeremy, Seibert Michael, Yen Chung-Jen, Cheskin J. Lawrence, and Andersen E. Ross. Tumor Necrosis Factor- α -238 and -308 polymorphisms do not associate with traits related to obesity and insulin resistance. *Diabetes* 1999; 48:2096–2098.
53. Hoffstedt J., Eriksson P., Hellström L., Rössner S., Rydén M., Arner P. Excessive fat accumulation is associated with the TNF α -308 G/A promoter polymorphism in women but not in men. *Diabetologia* 2000; 43: 117-120.
54. Kubaszek Agata, Pihlajamäki Jussi, Komarovski Vladislav, Lindi Virpi, Lindström Jaana, Eriksson Johan, Valle T. Timo, Hamalainen Helena, Ilanne-Parikka Pirjo, Keinänen-Kiukkaanniemi Sirkka, Tuomilehto Jaakko, Uusitupa Matti, and Laakso Markku. Promoter polymorphisms of the TNF- α (G-308A) and IL-6 (C-174G) genes predict the conversion from impaired glucose tolerance to type 2 Diabetes. The Finnish Diabetes Prevention Study. *Diabetes* 2003; 52: 1872-1876.
55. Mantzoros S. Christos, Moschos Stergios, Avramopoulos Iraklis, Kaklamani Virginia, Liolios Antonios, Doulgerakis E. Dimitrios, Griveas Ioannis, Katsilambros Nicholas, and Flier S. Jeffrey. Leptin concentrations in relation to body mass index and the tumor necrosis factor- α system in humans. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1997; 82: 3408–3413.
56. Nicklas A. Theresa, Morales Miriam, Linares A., Yang Su-Jau, Baranowski Tom, De Moor Carl, Berenson Gerald. Children's meal patterns have changed over a 21-year period: The Bogalusa Heart Study. *J Am Diet Assoc.* 2004;104:753-761.

57. Nicklas A. Theresa, Yang Su-Jau, Baranowski Tom, Zakeri Issa, Berenson Gerald. Eating Patterns and Obesity in Children. The Bogalusa Heart Study. *Am J Prev Med* 2003; 25(1):9–16.
58. Nicklas A. Theresa, Baranowski Tom, Cullen W. Karen, Berenson Gerald. Eating patterns, dietary quality and obesity. *Journal of the American College of Nutrition*, 2001; 20(6): 599–608.
59. Siega-Riz Anna Maria, Popkin M Barry, and Carson Terri. Trends in breakfast consumption for children in the United States from 1965 to 1991. *Am J Clin Nutr* 1998;67(suppl):748S–756S.
60. Rampersaud C. Gail, Pereira A. Mark, Girard L. Beverly, Adams Judi, Metz D. Jordan. Breakfast habits, nutritional status, body weight, and academic performance in children and adolescents. *J Am Diet Assoc.* 2005;105:743-760.
61. Affenito S.G, Thompson D.R, Barton B.A, Franko D.L, Daniels S.R, Obarzanek E, Schreiber G.B, Striegel-Moore R.H. Breakfast consumption by African-American and white adolescent girls correlates positively with calcium and fiber intake and negatively with body mass index. *Journal of the American Dietetic Association* 2005;105:938-945.
62. Berkey CS, Rockett HR, Gillman MW, Field AE, Colditz GA. Longitudinal study of skipping breakfast and weight change in adolescents. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27: 1258-1266.
63. Murata Mitsunori. Secular trends in growth and changes in eating patterns of Japanese children. *Am J Clin Nutr* 2000;72(suppl):1379S–83S.
64. Gillman M.W., Rifas-Shiman S.L., Frazier L, Rockett H.R., Camargo C.A., Field A.E., Berkey C.S., Colditz G.A. Family dinner and diet quality among older children and adolescents. *Arch Fam Med* 2000;9:235-240.
65. Haapalahti Mila, Mykkanen Hannu, Tikkanen Sami and Kokkonen Jorma. Meal patterns and food use in 10- to 11-year-old Finnish children. *Public Health Nutrition* 2002; 6(4): 365–370.
66. Bowman A. Shanthi, Gortmaker L. Steven, Ebbeling B. Cara, Pereira A. Mark and Ludwig S. David. Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey. *Pediatrics* 2004;113:112-118.
67. Pereira MA, Kartashov AI, Ebbeling CB, et al. Fast food meal frequency and the incidence of obesity and abnormal glucose homeostasis in young black and white adults: the CARDIA study [abstract]. *Circulation* 2003;107:35.
68. St-Onge Marie-Pierre, Keller L Kathleen, and Heymsfield B Steven. Changes in childhood food consumption patterns: a cause for concern in light of increasing body weights. *Am J Clin Nutr* 2003;78:1068 – 1073.
69. McNutt W. Suzanne, Hu Yuanreng, Schreiber B. George, Crawford B. Patricia, Obarzanek Eva, and Mellin Laurel. A Longitudinal Study of the dietary practices of black and white girls 9 and 10 years old at enrollment: The NHLBI Growth and Health Study. *Journal Of Adolescent Health* 1997;20:27-37.
70. Golan M, Fainaru M, Weizman A. Role of behavior modification in the treatment of childhood obesity with the parents as the exclusive agents of change. *International Journal of Obesity* 1998;22:1217-1224.
71. Coon A. Katharine, Goldberg Jeanne, Rogers L. Beatrice, Tucker L. Katherine. Relationships between use of television during meals and children's food consumption patterns. *Pediatrics* 2001;107(1).
72. Tanasescu Mihaela, Ferris Ann, Himmelgreen David, Rodriguez Nancy and Perez-Escamilla Rafael. Biobehavioral factors are associated with obesity in puerto rican children. *J. Nutr.* 130:1734–1742, 2000.
73. Λεκανίδου P, Τσιπήλου Σ, Ροδάκης Γ. Εισαγωγή στην μοριακή βιολογία. Πανεπιστήμιο Αθηνών – Τμήμα Βιολογίας 1998.
74. Lennernas M, Andersson I.. Food Based Classification of Eating Episodes. *Appetite*, 1999; 32: 53-65
75. Ainsworth E, Haskell L, Whitt C, Irwin L, Swartz M, Strath J, O'Brien L, Bassett R, Schmitz H, Emplainscourt O, Jacobs R, Leon S. Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 2000; S498-S516.