



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΔΙΑΙΤΟΛΟΓΙΑΣ-ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

**ΠΡΟΟΠΤΙΚΗ ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΩΝ
ΔΕΙΚΤΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΣΕ ΓΗΡΙΑΤΡΙΚΟ ΠΛΗΘΥΣΜΟ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs780094 ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ GCKR ΚΑΙ ΠΩΣ
ΕΠΙΔΡΑ ΣΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΩΝ ΑΤΟΜΩΝ**



Υπεύθυνη Πτυχιακής Εργασίας: Στρογγυλού Ευαγγελία ΑΜ:20635

Επιβλέπων καθηγητής: Δεδούσης Γ.- Αναπληρωτής Καθηγητής

Τριμελής Επιτροπή:

Δεδούσης Γ.-Αναπληρωτής Καθηγητής

Πολυχρονόπουλος Ε.- Επίκουρος Καθηγητής

Συντώσης Α.- Καθηγητής

Αθήνα 2010

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ πολύ τον υπεύθυνο της πτυχιακής μου, κύριο Δεδούση Γιώργο, ο οποίος μου εμπιστεύθηκε την πραγματοποίηση αυτής της μελέτης και μου ενέπνευσε την αγάπη και την όρεξη για την έρευνα. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τη Σταυρούλα Κανόνη τόσο για την πραγματοποίηση της στατιστικής ανάλυσης όσο και για τη συνεχή βοήθειά της σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, ευχαριστώ όλα τα άτομα του εργαστηρίου που βοήθησαν με το δικό τους τρόπο σε ότι πρόβλημα προέκυπτε. Ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για τη συμπαράσταση και την κατανόηση που μου έδειξαν αυτούς τους μήνες. Τέλος, ευχαριστώ προκαταβολικά τους επιβλέποντες καθηγητές μου, για το χρόνο τους που θα αφιερώσουν στην παρουσίαση των ευρημάτων της μελέτης αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΕΛΛΑΔΑ, ΕΥΡΩΠΗ ΚΑΙ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ	6
1.2 ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ	7
1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ	8
1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΓΗΡΑΤΟΣ	9
1.5 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ- ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ	11
1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ	13
1.6.1 ΦΥΛΟ	13
1.6.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	14
1.6.2.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ	14
1.6.2.2 ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ	15
1.6.2.3 ΚΑΠΝΙΣΜΑ	15
1.6.2.4 ΣΤΡΕΣ	16
1.6.2.5 ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	16
1.6.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	17
1.7. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	21
1.8. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΚΙΝΑΣΗΣ (GCKR)	24
1.8.1 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΚΙΝΑΣΗΣ (GK)	24
1.8.2 Η ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΚΙΝΑΣΗΣ	25
1.9 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ GCKR	27
1.9.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	27
1.9.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	28
1.9.3 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	29
1.9.4 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ	30
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	31
2.1 ΣΚΟΠΟΣ	32
2.2 Η ΜΕΛΕΤΗ GHRAS	32
2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ	32
2.4 ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ	33
2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA	33
2.6 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	34
2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ ΤΑQMAN	35
2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ	36
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	37
3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	38
3.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs780094 ΤΟΥ <i>GCKR</i>	39
3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs780094 ΤΟΥ <i>GCKR</i> ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ	40
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	42
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	45

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι ηλικιωμένοι αντιπροσωπεύουν ένα αυξανόμενο τμήμα του Ευρωπαϊκού πληθυσμού, κυρίως λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης και της μείωσης της νεογενικής θνησιμότητας. Προσπάθειες για την πιστοποίηση δεικτών θνησιμότητας ή μακροβιότητας περιλαμβάνουν την εκτίμηση δημογραφικών στοιχείων, παραγόντων του τρόπου ζωής, διατροφικών συνήθειών, βιοχημικών δεικτών, παραγόντων φλεγμονής και γενετικού υπόβαθρου.

Ο πολυμορφισμός rs780094 (γονότυπος CC) του γονιδίου της *GCKR* έχει συσχετιστεί με την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2, χωρίς να υπάρχει αντίστοιχη συσχέτιση με την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων, για τα οποία ο Σακχαρώδης Διαβήτης αποτελεί παράγοντα κινδύνου. Δεδομένου ότι τα ηλικιωμένα άτομα είναι αυτά που εμφανίζουν συχνότερα αυτές τις διαταραχές πολλές έρευνες που γίνονται επικεντρώνονται στη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να εξεταστεί η συσχέτιση που μπορεί να έχει ο πολυμορφισμός rs780094 του γονιδίου της *GCKR* με τη θνησιμότητα των ηλικιωμένων ατόμων της μελέτης GHRAS σύμφωνα με τα στοιχεία που συγκεντρώθηκαν κατά τον επανέλεγχο των πέντε χρόνων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου C στα άτομα του δείγματος ήταν 54,3 % και του γονοτύπου CC 28,1%. Δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση του πολυμορφισμού με τη θνησιμότητα των ατόμων ($p=0,114$) ούτε όταν λάβαμε υπόψη ως συγχυτικό παράγοντα το Σακχαρώδη Διαβήτη ($p=0,116$). Επίσης το φύλο δεν φάνηκε να επηρεάζει τα αποτελέσματά μας ($p= 0,278$).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δεν επιβεβαιώνουν τη συσχέτιση του πολυμορφισμού rs780094 με τη θνησιμότητα των ατόμων. Η πιθανή συσχέτιση του πολυμορφισμού θα πρέπει να επαληθευτεί και από άλλες έρευνες και να διευκρινιστεί ο μηχανισμός συμμετοχής του στη θνησιμότητα των ατόμων.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι ηλικιωμένοι αποτελούν ένα αξιόλογο τμήμα του ελληνικού, του ευρωπαϊκού αλλά και του παγκόσμιου πληθυσμού και ενώ τα γηρατεία συνήθως συνοδεύονται από πληθώρα νοσημάτων, όπως σακχαρώδη διαβήτη, καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνο, αποτελεί συχνό φαινόμενο πολλά ηλικιωμένα άτομα να διατηρούν καλή κατάσταση της υγείας τους και να παραμένουν υγιείς μέχρι τα βαθειά γεράματα. Η διατροφή, ο τρόπος ζωής και το γενετικό υπόβαθρο, πιθανόν συνδυαστικά συμβάλλουν ώστε ορισμένοι ηλικιωμένοι να απολαμβάνουν πολλά και υγιή χρόνια ζωής. Παρακάτω θα δούμε κάποια δημογραφικά στοιχεία για τους ηλικιωμένους, θα αναφερθούμε στις διάφορες θεωρίες του γήρατος και θα εξετάσουμε την πιθανότητα ο πολυμορφισμός rs780094 του γονιδίου *GCKR* να επηρεάζει τη θνησιμότητα σε άτομα τρίτης ηλικίας.

1.1 ΔΗΜΟΓΡΑΦΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΩΝ ΗΛΙΚΙΩΜΕΝΩΝ ΣΕ ΕΛΛΑΔΑ, ΕΥΡΩΠΗ ΚΑΙ ΣΕ ΠΑΓΚΟΣΜΙΟ ΕΠΙΠΕΔΟ

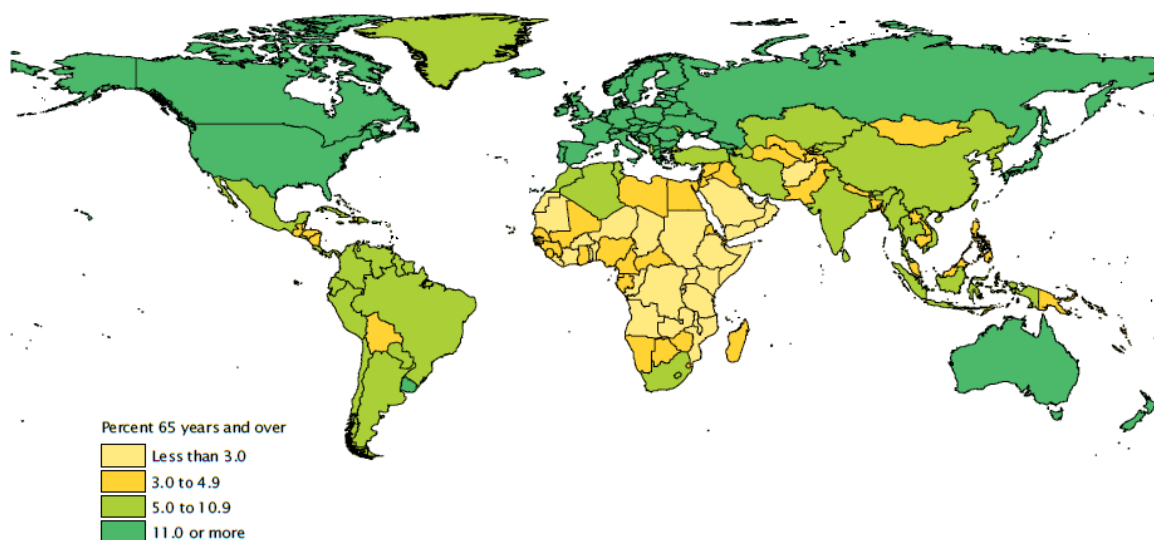
Οι ηλικιωμένοι αποτελούν ένα αυξανόμενο τμήμα του ελληνικού, του ευρωπαϊκού αλλά και του παγκόσμιου πληθυσμού κυρίως λόγω της αύξησης του προσδόκιμου επιβίωσης, της μείωσης της νεογνικής θνησιμότητας και της μείωσης των γεννήσεων, όπως συμβαίνει στην Ελλάδα. Στην Ελλάδα προβλέπεται το 2050 το 32,1 % του πληθυσμού να αποτελείται από άτομα ηλικίας άνω των 65 ετών ενώ στην απογραφή του 2001 το ποσοστό αυτό ήταν 16,7% και το 1971 ήταν 10,92% (1). Όπως φαίνεται και στον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 1) οι γυναίκες εμφανίζουν αριθμητική υπεροχή έναντι των αντρών (αποτελούν το 55,2% των ατόμων άνω των 65 ετών). Μέχρι το 2025 περισσότερο από το 20% των Ευρωπαίων θα είναι 65 ετών και άνω, με μια ιδιαίτερα ταχεία αύξηση του αριθμού των ατόμων άνω των 80 ετών (2). Σε παγκόσμιο επίπεδο το 2005 τα άτομα άνω των 65 ετών αποτελούσαν το 7,3 % του παγκόσμιου πληθυσμού ενώ προβλέπεται το 2050 να αποτελούν το 16,2% του παγκόσμιου πληθυσμού (2).

Πίνακας 1: Κατανομή των ατόμων ηλικίας 65 ετών και άνω κατά ομάδες ηλικιών και φύλο
(Απογραφή 2001: Εθνική Στατιστική Υπηρεσία της Ελλάδας)

Ομάδες ηλικιών	Άνδρες		Γυναίκες		Σύνολο	
	N	%	N	%	N	%
65-79	685.534	6,25	815.440	7,43	1.500.974	13,68
80+	134.201	1,22	196.365	1,79	330.566	3,01
ΣΥΝΟΛΟ	819.735	7,47	1.011.805	9,22	1.831.540	16,7

Τα ποσοστά υπολογίζονται με βάση των πραγματικό πληθυσμό που στην απογραφή του 2001 βρέθηκε ίσος με 10.964.020 άτομα (Εθνική Στατιστική Υπηρεσία)

Figure 1-1.
Percent Population Aged 65 and Over: 2008



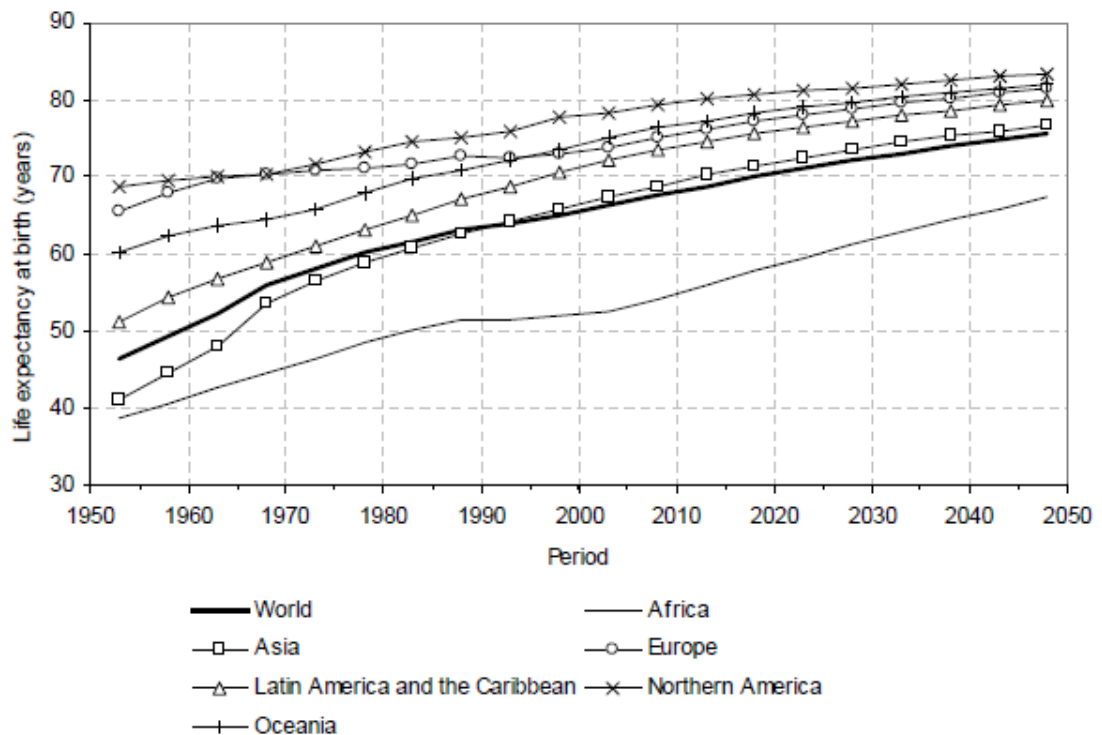
Source: U.S. Census Bureau, International Data Base, accessed on May 27, 2008.

Εικόνα 1 : % πληθυσμός άνω των 65 ετών σε παγκόσμιο επίπεδο για το 2008

1.2 ΠΡΟΣΔΟΚΙΜΟ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ

Εκτός της αύξησης του πληθυσμού άνω των 65 ετών παρατηρείται και αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης, με το γυναικείο πληθυσμό να εμφανίζει το μεγαλύτερο προσδόκιμο επιβίωσης σε σύγκριση με τον αντίστοιχο αντρικό. Η Ιαπωνία είναι η χώρα που κρατάει τα σκήπτρα με τη μέγιστη ηλικία επιβίωσης στις γυναίκες (86 έτη) και ακολουθούν Ανδόρρα, Γαλλία, Μονακό (85 έτη). Στους άντρες την πρώτη θέση κατέχει το Σαν Μαρίνο (81 έτη) και ακολουθούν Ελβετία και

Ισλανδία (80 έτη). Για την Ελλάδα το 2008 το προσδόκιμο επιβίωσης για τους άντρες ήταν τα 78 έτη και για τις γυναίκες 83 έτη ενώ το 1990 ήταν 75 και 79 έτη αντίστοιχα. Υπάρχει η πρόβλεψη ότι το 2050 το προσδόκιμο επιβίωσης για τους άντρες θα είναι τα 86,9 και για τις γυναίκες τα 88 ,6 έτη. Αυτό δίνει βάση ώστε να μελετηθούν ποιοί παράγοντες (περιβαλλοντικοί, γενετικοί) οδηγούν σ' αυτή την αυξανόμενη τάση (1,3). Παρακάτω φαίνεται η αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης διαχρονικά ανάλογα με τη γεωγραφική ήπειρο.



Source: Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat (2009). World Population Prospects: The 2008 Revision. New York: United Nations.

Εικόνα 2: Προσδόκιμο επιβίωσης κατά τη γέννηση σε παγκόσμιο επίπεδο και ανά ήπειρο

1.3 ΟΡΙΣΜΟΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ

Η γήρανση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία στην οποία εμπλέκεται κάθε μόριο, κύτταρο και όργανο του σώματος. Με την ευρύτερη έννοια του όρου ο ορισμός αυτός αναφέρεται στις μεταβολές που σημειώνονται κατά τη διάρκεια της ζωής. Αυτές οι μεταβολές δεν είναι πάντοτε προβληματικές και δεν επηρεάζουν τη βιωσιμότητα του ατόμου. Ένας άλλος ορισμός αναφέρει ότι γήρανση είναι η προοδευτική επιδείνωση πολλών σωματικών λειτουργιών κατά τη διάρκεια του χρόνου και χρησιμοποιείται για να γίνει διαχωρισμός των επιφανειακών αλλαγών από

εκείνες που αυξάνουν τον κίνδυνο ασθένειας, αναπηρίας ή θανάτου. Αυτή η απώλεια της λειτουργίας συνοδεύεται από μειωμένη γονιμότητα και αυξημένο κίνδυνο της θνησιμότητας καθώς το άτομο γερνά (4).

Ο ρυθμός και η εξέλιξη αυτής της διαδικασίας μπορεί να διαφέρουν σημαντικά από άτομο σε άτομο, αλλά γενικά επηρεάζονται σημαντικά όργανα του σώματος. Η εκδήλωση του γήρατος έχει να κάνει τόσο με τη μείωση του συνολικού αριθμού των κυττάρων του σώματος, όσο και με τη δυσλειτουργία όσων κυττάρων απομένουν (5).

1.4 ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΜΕΤΑΒΟΛΕΣ ΚΑΙ ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ ΓΗΡΑΤΟΣ

Τα ηλικιωμένα άτομα παρουσιάζουν χαμηλότερο μεταβολικό ρυθμό ηρεμίας (RMR) ενώ παρατηρείται και αλλαγή στη σύσταση του σώματος με αύξηση της λιπώδους και μείωση της άλιπης μάζας σώματος, κυρίως μέσω της μείωσης μυϊκού ιστού αλλά και μείωσης της μάζας διαφόρων οργάνων του σώματος (6).

Κάποιες αλλαγές που μπορούν να αναφερθούν είναι η μείωση της ελαστικότητας του πνευμονικού ιστού και η συρρίκνωση των μυών των πλευρών. Ως εκ τούτου, η μέγιστη ζωτική ικανότητα αναπνοής μειώνεται προοδευτικά σε κάθε δεκαετία της ζωής και αυτό αρχίζει περίπου από την ηλικία των 20.

Με αύξηση της ηλικίας αλλάζει η δομή των νεφρών και υπάρχει σταδιακή έκπτωση της λειτουργίας τους. Πιο συγκεκριμένα εμφανίζεται μείωση της σπειραματικής διήθησης, απώλεια νεφρικού φλοιού, σκλήρυνση των νεφρικών σπειραμάτων, αγγειακή και σωληναριακή διάμεση ίνωση και σωληναριακή ατροφία (7).

Επίσης με την ηλικία μειώνεται η ελαστικότητα του καρδιακού μυός, υπάρχει απώλεια σε μυοκύτταρα και όσα επιβιώνουν υπερτρέφονται, οι αρτηρίες χάνουν μέρος της λειτουργικότητάς τους και έτσι υπερτρέφεται και η αριστερή κοιλία προκαλώντας συστολική υπέρταση (8).

Στο γαστρεντερικό σύστημα, η παραγωγή των πεπτικών ενζύμων μειώνεται και ως εκ τούτου οι ιστοί χάνουν την ικανότητά τους να διασπούν και να απορροφούν κατάλληλα τα τρόφιμα. Μειώνεται η κινητικότητα του οισοφάγου δημιουργώντας επεισόδια γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης καθώς και η κινητικότητα του εντέρου αυξάνοντας το χρόνο γαστρικής κένωσης (9,10).

Στα αιμοφόρα αγγεία τα υψηλά επίπεδα LDL χοληστερόλης οδηγούν σε συσσώρευση των λιπιδίων αυτών στα τοιχώματα των αγγείων, μεταβάλλοντας τη λειτουργικότητά τους με αποτέλεσμα την αθηροσκλήρωση (11).

Στις γυναίκες μειώνεται η παραγωγή κολπικών υγρών και ατροφούν οι ιστοί με αύξηση της ηλικίας. Στους άνδρες μειώνεται η παραγωγή σπέρματος και διευρύνεται ο προστάτης. Με αυτό τον τρόπο και τα δύο φύλα οδηγούνται σε απώλεια της αναπαραγωγικής τους ικανότητας (9).

Παρατηρείται ακόμα μείωση της ανοχή στη γλυκόζη, αλλοίωση της γεύσης και της όσφρησης και εμφανίζεται πρεσβυωπία, καταρράκτης και βαρηκοΐα (9) ενώ εμφανίζεται με μεγάλη συχνότητα σακχαρώδης διαβήτης (23,6% των ατόμων άνω των 60 ετών πάσχουν από διαβήτη) (12) και γίνονται πιο συχνά τα αυτοάνοσα νοσήματα όπως η αρθρίτιδα (13). Αξίζει να σημειωθεί ότι αλλάζει ο μηχανισμός θερμορύθμισης στα άτομα τρίτης ηλικίας κάνοντας αναγκαίο τον επαρκή κλιματισμό όλο τον καιρό, και μεταβάλλεται η διάρκεια και η ποιότητα του ύπνου οδηγώντας σε διαταραχές των κιρκάδιων ρυθμών επηρεάζοντας και την ψυχολογική κατάσταση των ηλικιωμένων (14).

Όλα δείχνουν ότι οι μεταβολές αυτές οδηγούν σε χρόνιες ασθένειες που αποτελούν τις κύριες αιτίες θανάτου σε άτομα ηλικίας άνω των 70 ετών στις αναπτυγμένες κοινωνίες. Οι περισσότεροι θάνατοι οφείλονται σε καρδιαγγειακές νόσους και ακολουθούν στη λίστα με τις κυριότερες αιτίες θανάτου, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), ο καρκίνος και ο σακχαρώδης διαβήτης (15).

Ένα άλλο ερώτημα που προκύπτει είναι πότε ξεκινάει η διαδικασία της γήρανσης, μερικοί υποστηρίζουν ότι αρχίζει κατά τη γέννηση και άλλοι υποστηρίζουν ότι ξεκινάει μετά την κορυφή της αναπαραγωγικής ηλικίας. Σε κάθε περίπτωση είτε το γήρας ξεκινάει κατά τη γέννηση είτε στην ηλικία των 20, 30, ή 40, οδηγεί σε συσσωρευμένη απώλεια σωματικών λειτουργιών, που αυξάνει την πιθανότητα του θανάτου, καθώς γερνάμε (4).

1.5 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΓΗΡΑΝΣΗΣ- ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Οι κυριότερες βιολογικές θεωρίες της γήρανσης του πληθυσμού μπορούν να καταταχθούν στις εξελικτικές, μοριακές, κυτταρικές και συστηματικές θεωρίες (16).

Εξελικτική θεωρία: Διατυπώθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του '40 και υποστηρίζει ότι η γήρανση προκύπτει από τη μείωση της δύναμης της φυσικής επιλογής με το πέρασμα των χρόνων. Η συσσώρευση μεταλλάξεων στον πληθυσμό, που δεν μπορούν να αποκατασταθούν γιατί υπόκεινται στην αρνητική πίεση της φυσικής επιλογής, τελικά οδηγούν τους οργανισμούς στην παθογένεση και τη γήρανση (17). Σ' αυτή τη θεωρία διατυπώνεται επίσης ότι ορισμένα γονίδια που μπορεί να είναι ωφέλιμα στις νέες ηλικίες μετά το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου μπορεί να έχουν αρνητική δράση για την υγεία. Από μελέτες που έγιναν στη μύγα *Drosophila melanogaster* και στο νηματώδη σκώληκα *Caenorhabditis elegans* φάνηκε επίσης ότι υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ της αναπαραγωγικής ικανότητας και της γήρανσης, καθώς με αφαίρεση των γεννητικών κυττάρων τους παρατάθηκε η διάρκεια ζωής τους (18).

Μοριακή θεωρία: Σύμφωνα με τη μοριακή θεωρία η γήρανση επέρχεται λόγω των αλλαγών που συμβαίνουν στη γονιδιακή έκφραση (19). Σ' αυτή την περίπτωση μειώνεται η ακρίβεια της μετάφρασης του mRNA καθώς υπάρχει αδυναμία αποκωδικοποίησης των κωδικονίων του mRNA. Έτσι αυξάνεται η ποσότητα των μη φυσιολογικών πρωτεϊνών που συντελούν με τη σειρά τους σε αύξηση των μοριακών βλαβών κυρίως στο γενετικό υλικό (DNA) που επιδεινώνουν περαιτέρω τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης (16).

Κυτταρική θεωρία: Η θεωρία αυτή υποστηρίζει ότι η γήρανση επέρχεται λόγω της αύξησης των γηρασμένων κυττάρων. Η γήρανση των κυττάρων μπορεί να προκληθεί είτε μέσω του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, είτε μέσω διαφόρων στρεσογόνων παραγόντων. Η γήρανση μέσω κυτταρικού πολλαπλασιασμού οφείλεται στην απώλεια των τελομερών (ειδικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών που βρίσκονται στα άκρα των χρωμοσωμάτων) σε κάθε πολλαπλασιασμό, πιθανόν για να μετριάσουν

τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό (προστασία από καρκίνο) (20). Αυτό προκαλείται με μείωση της έκφρασης της τελομεράσης, του ενζύμου που αναγεννά τα τελομερή. Με συσσώρευση των απωλειών των τελομερών αλλάζει η δομή και η λειτουργία τους και οδηγούμαστε σε γήρανση του πολλαπλασιασμού (replicate senescence) (21). Έχει βρεθεί ακόμη ότι το στρες, και ιδιαίτερα το οξειδωτικό, αυξάνει την απώλεια των τελομερών επιταχύνοντας τη γήρανση (22). Μια άλλη υπόθεση αυτής της θεωρίας υποστηρίζει ότι ο οξειδωτικός μεταβολισμός παράγει ελεύθερες ρίζες που προκαλούν ζημιές στο DNA, στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες (23). Ιδιαίτερα επηρεάζεται το μιτοχονδριακό DNA μειώνοντας έτσι την παραγωγή ATP και επακόλουθα την ενεργότητα των ιστών (4). Όλα αυτά μαζί με τη συσσώρευση φυσιολογικών κυτταρικών βλαβών οδηγούν στην έναρξη του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση) (24).

Συστηματική θεωρία: Οι επιμέρους υποθέσεις αυτής της θεωρίας συσχετίζουν τη γήρανση με α) μείωση της ικανότητας των συστημάτων του σώματος που είναι υπεύθυνα να ελέγχουν και να συντηρούν τα άλλα συστήματα του οργανισμού β) μείωση της ικανότητας των οργανισμών να επικοινωνούν και να προσαρμόζονται στο περιβάλλον στο οποίο ζουν. Στους ανθρώπους όλα τα συστήματα μπορεί να θεωρηθούν απαραίτητα για την επιβίωση, ωστόσο, το νευρικό, το ενδοκρινικό και το ανοσοποιητικό σύστημα φαίνεται να έχουν ιδιαίτερο ρόλο τόσο για το συντονισμό των υπολοίπων συστημάτων, όσο και για την απόκριση σε εσωτερικά και εξωτερικά ερεθίσματα. Αλλαγές στο νευροενδοκρινικό έλεγχο της ομοιόστασης και η σταδιακή απώλεια της λειτουργίας του ανοσοποιητικού συστήματος οδηγούν σε γήρανση του οργανισμού. Με την έλλειψη ισορροπίας στον οργανισμό, μείωση της αντίστασης σε μολυσματικές ασθένειες και μειωμένη προστασία κατά του καρκίνου εμφανίζεται έκπτωση της λειτουργίας του οργανισμού (16). Σύμφωνα με τη θεωρία της ανοσογήρανσης (immunosenescence) η συνεχής ενεργότητα του ανοσοποιητικού συστήματος με το πέρασ των χρόνων οδηγεί σε εξασθένηση αυτού και σε αύξηση των προ-φλεγμονωδών αντιδράσεων (25). Η χρόνια ύπαρξη στον οργανισμό των κυτταροκινών (IL-1, IL-6 και TNF-α), αποτέλεσμα της φλεγμονώδους κατάστασης, φαίνεται ότι σηματοδοτεί την εμφάνιση χρόνιων νοσημάτων όπως Alzheimer, αθηροσκλήρωση, διαβήτης, καρκίνος κ. ά στα ηλικιωμένα άτομα (26). Βλέπουμε δηλαδή ότι όσο πιο δραστήριο είναι το ανοσοποιητικό σύστημα κατά τη διάρκεια της

ζωής τόσο πιο επιρρεπής είναι ο οργανισμός σε φλεγμονώδεις καταστάσεις και νοσήματα (27).

Ωστόσο η γήρανση του πληθυσμού αποτελεί ένα πολύπλοκο φαινόμενο και είναι μια σημαντική πρόκληση που καλούμαστε να αντιμετωπίσουμε ώστε να κατανοήσουμε πλήρως το πώς αυτή προκαλείται. Για να το επιτύχουμε αυτό χρειάζονται να πραγματοποιηθούν περαιτέρω μελέτες ώστε να απαντηθούν όλα τα ερωτήματα που προκύπτουν γύρω από αυτό (28).

1.6 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΜΑΚΡΟΒΙΟΤΗΤΑΣ

Τα τελευταία χρόνια στο επίκεντρο του επιστημονικού ενδιαφέροντος βρίσκεται η αναζήτηση των παραγόντων που επηρεάζουν τη μακροζωία. Μελέτες έχουν δείξει ότι γενετικοί και περιβαλλοντικοί παράγοντες εμπλέκονται στην αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης στους ηλικιωμένους (GEHA, EPIC) (4, 29, 30). Τα άτομα που καταφέρνουν να αποφύγουν χρόνια νοσήματα, ακολουθώντας έναν υγιή τρόπο ζωής, ή και όχι, φαίνεται να απολαμβάνουν και περισσότερα χρόνια ζωής (31). Ποιοι είναι αυτοί οι παράγοντες που σχετίζονται περισσότερο με αύξηση του προσδόκιμου επιβίωσης;

1.6.1 ΦΥΛΟ

Το φύλο φαίνεται να επηρεάζει τη μακροζωία με τις γυναίκες να εμφανίζουν πλεονέκτημα σε σχέση με τους άντρες. Η μεγαλύτερη ηλικία που έχει καταγραφεί ποτέ είναι 122 χρόνια και το ρεκόρ το κατέχει γυναίκα, μάλιστα υπολογίζεται ότι το 75% των ατόμων που ζουν περισσότερο από 100 χρόνια είναι γυναίκες. Το γεγονός αυτό αποδίδεται όχι στο ότι οι άντρες γερνούν γρηγορότερα αλλά διότι οι γυναίκες είναι «ισχυρότερες» στις ασθένειες σε όλες τις ηλικίες (32,33). Οι άντρες γενικά έχουν υψηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε κάθε ηλικία αλλά οι γυναίκες εμφανίζονται να έχουν υψηλότερα ποσοστά ασθένειας και χρόνου νοσηλείας. Αυτό εξηγείται λόγω του ότι προσβάλλονται ευκολότερα από ασθένειες που δεν είναι τόσο απειλητικές για τη ζωή αλλά χρήζουν σοβαρής ιατρικής φροντίδας (π. χ. αρθρίτιδα). Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στα φυλετικά χρωμοσώματα καθώς οι άντρες έχουν έλλειψη σε ένα X χρωμόσωμα και υπολείπονται σε πάνω από χίλια γονίδια που δεν έχουν το αντίστοιχο αλληλόμορφο στο Y χρωμόσωμα (32). Μια άλλη υπόθεση,

που προσπαθεί να εξηγήσει τη μακροβιότητα των γυναικών, αναφέρει ότι η σωματική διάπλαση των ανδρών υπερέχει των γυναικών ώστε να μπορούν να ανταγωνιστούν τα άλλα αρσενικά, για να γίνει αυτό ενεργοποιείται το ενδοκυτταρικό μονοπάτι mTOR που οδηγεί σε αύξηση της μυϊκής μάζας αλλά ταυτόχρονα οδηγεί σε γήρανση των κυττάρων. Το μονοπάτι mTOR οδηγεί και σε διάφορες ασθένειες του γήρατος όπως αθηροσκλήρωση και καρκίνος. Το συγκεκριμένο μονοπάτι φαίνεται να επηρεάζει και τις γυναίκες ως προς την εμμηνόπαυση, μια περίοδο που αρχίζουν να εμφανίζονται τα πρώτα σημάδια χρόνιων ασθενειών στις γυναίκες. Η αύξηση της δραστηριότητας του mTOR οδηγεί σε έναρξη της αναπαραγωγής, με δραστηριοποίηση των ωοθηκών, αλλά τελικά οδηγεί στην εμμηνόπαυση και τη γήρανση (32).

1.6.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

1.6.2.1 ΔΙΑΤΡΟΦΗ

Η προοπτική μελέτη EPIC, από τις μεγαλύτερες μελέτες που έχουν γίνει στον ευρωπαϊκό χώρο σχετικά με την τρίτη ηλικία και τη διατροφή, έδειξε ότι όσοι ακολουθούν το μεσογειακό τύπο διατροφής (πλούσια σε ακόρεστα λιπαρά οξέα και φυτικές ίνες, μέτριας περιεκτικότητας σε αιθανόλη, κυρίως μέσω του κόκκινου κρασιού και χαμηλής περιεκτικότητας σε κορεσμένα λιπαρά οξέα) ζουν περισσότερο και διατηρούν καλή κατάσταση της υγείας τους (29).

Η Ιαπωνία και συγκεκριμένα η Οκινάβα είναι γνωστή για το μεγάλο ποσοστό αιωνόβιων του πληθυσμού της (35 αιωνόβιοι για 100.000 κατοίκους) και έχει προκαλέσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ώστε να βρεθεί το μυστικό της μακροζωίας τους. Ως κύριος παράγοντας θεωρείται η παραδοσιακή διατροφή που είναι χαμηλών θερμίδων αλλά ταυτόχρονα πλούσια σε θρεπτικά συστατικά. Η διαίτα της Οκινάβα, όπως χαρακτηριστικά ονομάζεται, έχει κοινά στοιχεία με τη μεσογειακή διατροφή καθώς είναι χαμηλή σε λιπαρά, ιδιαίτερα σε κορεσμένα, και υψηλή σε υδατάνθρακες κυρίως μέσω της πρόσληψης φρούτων και λαχανικών με μεγάλη περιεκτικότητα και σε αντιοξειδωτικά. Παραδοσιακά τρόφιμα που καταναλώνονται σε καθημερινή βάση, μπαχαρικά ή και βότανα σκόπιμο είναι να μελετηθούν λεπτομερέστερα ώστε να βρεθεί αν έχουν ιδιότητες που επιδρούν στην καλή κατάσταση της υγείας (34).

Το μοντέλο της διαίτας χαμηλών θερμίδων, που ακολουθούν οι κάτοικοι της Οκινάβα, έχει επιβεβαιωθεί σε πειραματόζωα ότι επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής τους

(34) και γίνονται επιπλέον μελέτες (CALERIE) για να διαπιστωθεί ότι το ίδιο συμβαίνει και στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα πρώτα ευρήματα έδειξαν ότι με τη διαίτα χαμηλή σε θερμιδικό περιεχόμενο, σύμφωνα με το πρότυπο της Οκινάβα, μειώνονται οι δείκτες για αθηροσκλήρωση, σακχαρώδη διαβήτη και φλεγμονή (σύμφωνα με τους δείκτες C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και TNFα), παράγοντες που οδηγούν στη γήρανση (35). Νεώτερα ευρήματα αναμένεται να μας δώσουν περισσότερες απαντήσεις για το ρόλο της διατροφής στη μακροβιότητα.

1.6.2.2 ΦΥΣΙΚΗ ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΑ

Τα οφέλη της συστηματικής φυσικής δραστηριότητας είναι σχεδόν σε όλους γνωστά, καθώς από μελέτες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι η ενασχόληση με κάποιο είδος φυσικής άσκησης βοηθά στην πρόληψη αλλά και τη θεραπεία πολλών χρόνιων ασθενειών όπως τα καρδιαγγειακά νοσήματα, ο καρκίνος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η αρθρίτιδα, η οστεοπόρωση κ.ά. (36), ενώ οι Lee και Paffenbarger εκτίμησαν ότι ένα σωματικά δραστήριο άτομο μπορεί να κερδίσει μέχρι και δύο χρόνια ζωής και να μειώσει τη θνησιμότητά του σχεδόν κατά το ήμισυ σε σχέση με ένα λιγότερο δραστήριο άτομο (36). Έχει προταθεί ότι οι βιολογικοί μηχανισμοί που μπορεί να ευθύνονται για τη μείωση του κινδύνου εμφάνισης χρόνιων νοσημάτων και θνησιμότητας σε άτομα με συστηματική σωματική δραστηριότητα, είναι η μείωση της σύστασης σώματος (μείωση κοιλιακής παχυσαρκίας, έλεγχος σωματικού βάρους), ενίσχυση του λιπιδαιμικού προφίλ (μείωση επιπέδων τριγλυκεριδίων, μείωση αναλογίας LDL προς HDL χοληστερόλης), βελτίωση ευαισθησίας στην ινσουλίνη, μείωση της αρτηριακής πίεσης, μείωση της πήξης του αίματος, βελτίωση της καρδιακής λειτουργίας και μείωση της φλεγμονής κυρίως μέσω της μείωσης της C-αντιδρώσας πρωτεΐνης. Η καθημερινή φυσική άσκηση σχετίζεται άμεσα και με βελτίωση της ψυχικής ευεξίας (μείωση άγχους, στρες και περιστατικών κατάθλιψης) που έχει σημαντικό ρόλο στην πρόληψη αλλά και κατά τη θεραπεία πολλών χρόνιων ασθενειών (37). Επομένως η ένταξη της καθημερινής δραστηριότητας στη ζωή μας μπορεί να μας χαρίσει περισσότερα, και με καλύτερη ποιότητα, χρόνια ζωής προστατεύοντάς μας από νοσήματα που πλήττουν άτομα μεγαλύτερων, και όχι μόνο, ηλικιών.

1.6.2.3 ΚΑΠΝΙΣΜΑ

Το κάπνισμα, που κατά καιρούς έχει βρεθεί να σχετίζεται με την εμφάνιση διαφόρων ασθενειών [καρδιαγγειακά νοσήματα, καρκίνος, ΧΑΠ κ. ά. (9)] φαίνεται ότι σχετίζεται και με το προσδόκιμο επιβίωσης. Από σχετικές έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στο χώρο της υγείας βρέθηκε ότι άτομα που δεν έχουν καπνίσει ποτέ «κερδίζουν» 4,3 και 4,1 χρόνια ζωής, αντίστοιχα για άντρες και γυναίκες, σε σύγκριση με χρόνιους καπνιστές (38). Η σχέση του καπνίσματος με τη μείωση του προσδόκιμου επιβίωσης σχετίζεται με τη θεωρία ότι μέσω του καπνίσματος παράγονται ελεύθερες ρίζες που όπως προαναφέρθηκε αποτελούν μέρος της κυτταρικής θεωρίας του γήρατος (23).

1.6.2.4 ΣΤΡΕΣ

Από μελέτες που έχουν γίνει βρέθηκε ότι άτομα που υποφέρουν από χρόνια στρες εμφανίζουν αύξηση κατά 10 χρόνια της βιολογικής τους ηλικίας σε σύγκριση με την πραγματική τους ηλικία, οδηγώντας σε εκδήλωση χρόνιων νοσημάτων και ως επακόλουθο σε πρόωρο θάνατο. Ο μηχανισμός που το στρες στη ζωή μας μπορεί να επιταχύνει τη διαδικασία του γήρατος δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί ωστόσο φαίνεται ότι πιθανόν επηρεάζει το μήκος των τελομερών και τη δράση της τελομεράσης που έχουν άμεση σχέση με τη γήρανση. Το ψυχολογικό στρες στη ζωή μας μπορεί ακόμη να οδηγήσει και σε οξειδωτικό στρες με επακόλουθο τη δημιουργία βλαβών σε μακρομόρια του ανθρώπινου οργανισμού (DNA, λίπη, πρωτεΐνες) μειώνοντας ακόμη περισσότερο το προσδόκιμο επιβίωσης (39).

1.6.2.5 ΑΛΛΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Οι μελετητές που ασχολούνται με το γήρας προσπαθούν να κατανοήσουν τους μηχανισμούς που εμπλέκονται στη διαδικασία της γήρανσης του οργανισμού και να ανακαλύψουν τρόπους για να επιβραδύνουν την εμφάνισή της. Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί και συχνά εφαρμόζεται η ορμονική θεραπεία ως μέσω για την καθυστέρηση του γήρατος. Δεδομένου ότι με το πέρασμα των χρόνων παρατηρείται μείωση των ορμονών [οιστρογόνων, προγεστερόνης, τεστοστερόνης, θεικής δεϋδροεπιανδροστερόνης (DHEA), μελατονίνης, θυρεοειδούς ορμόνης και ανθρώπινης αυξητικής ορμόνης (hGH)] η συμπληρωματική χορήγηση των ορμονών,

όταν διαπιστωθεί το χαμηλό επίπεδό τους, μπορεί να βοηθήσει στην καθυστέρηση του γήρατος (4,40). Μια υπόθεση που ακόμα δεν είναι πλήρως επιβεβαιωμένη αναφέρει ότι φάρμακα που αυξάνουν την έκφραση των PPARs (μόρια που επηρεάζουν: την έκφραση των γονιδίων-στόχων που συμμετέχουν στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση των κυττάρων, το ανοσοποιητικό σύστημα και τις φλεγμονώδεις απαντήσεις), ιδιαίτερα των PPARα, όπως οι φιμπράτες, μπορεί να σχετίζονται άμεσα και με τη μακροζωία (41). Ακόμη έχει βρεθεί σε πειράματα που έγιναν στο νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* ότι η χορήγηση τριών φαρμακολογικών ενώσεων, εθουσουλμιδής (ethosuximide), τριμεθαδιόνης (trimethadione) και 3,3- διαίθυλο- 2- πυρρολιδινόνη (3,3-diethyl-2-pyrrolidinone) αυξάνει τη μακροζωία (42). Και οι τρεις ενώσεις χορηγούνται στον άνθρωπο για τη θεραπεία των επιληπτικών κρίσεων (42), για να επιβεβαιωθεί ότι το ίδιο ισχύει και στον άνθρωπο όπως και στο *Caenorhabditis elegans* χρειάζεται να γίνουν περισσότερες και λεπτομερέστερες έρευνες.

1.6.3 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Το γενετικό υπόβαθρο έχει εξίσου σημαντικό ρόλο στη μακροζωία του ανθρώπου όμως ο προσδιορισμός των γονιδίων που επιμηκύνουν τη διάρκεια ζωής του ανθρώπου είναι κάτι αρκετά δύσκολο λόγω της μεγάλης διάρκειας του κύκλου ζωής του. Ωστόσο γίνονται προσπάθειες και ιδιαίτερα μέσω της μελέτης πειραματόζωων (μαγιά, νηματώδη και μύγες των φρούτων) που έχουν μικρό κύκλο ζωής και τα ευρήματα προσπαθούν να γενικευτούν και σε άλλα πιο πολύπλοκα είδη (4). Παρακάτω θα παρουσιάσουμε τα γονίδια που έχουν μέχρι τώρα βρεθεί ότι επηρεάζουν το προσδόκιμο επιβίωσης τόσο σε μελέτες σε ανθρώπους όσο και σε πειραματόζωα.

Σύμφωνα με τους ερευνητές από το πρόγραμμα υπεραιωνόβιων New England στη Βοστώνη, αδέρφια αιωνόβιων έχουν τέσσερις φορές μεγαλύτερες πιθανότητες να ζήσουν και να ξεπεράσουν τα ενενήντα χρόνια και αυτό εξηγείται από το κοινό γενετικό υπόβαθρο που διαθέτουν (4). Μελετώντας το γονιδίωμά τους βρέθηκε ένα σημαντικό στοιχείο για μια περιοχή στο χρωμόσωμα 4 (D4S1564) που επηρεάζει τη μακροζωία, ωστόσο χρειάζονται περαιτέρω μελέτες σε ένα ανεξάρτητο σύνολο οικογενειών και να γίνει προσδιορισμός συγκεκριμένων γονιδίων (43).

Σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε στην Οκινάβα της Ιαπωνίας σε αιωνόβιους βρέθηκε χαμηλή συχνότητα του γονότυπου HLA-DRw9 ενώ αντίθετα ήταν αυξημένος ο γονότυπος του HLA-DR1. Δεδομένου ότι η υψηλή συχνότητα του DRw9 και η χαμηλή συχνότητα του DR1 σχετίζεται με τα αυτοάνοσα νοσήματα, η γενετική προστασία έναντι των διαταραχών αυτών (με την ύπαρξη του DR1 γονότυπου) μπορεί να συμβάλει στη μακροζωία (44).

Δύο μελέτες σε Φιλανδία και Γαλλία έδειξαν ότι οι υπερήλικες εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα του αλληλόμορφου e4 ενώ είναι πιο συχνό το αλληλόμορφο e2 της απολιποπρωτεΐνης E. Το συγκεκριμένο γονίδιο APOE είναι το μόνο που έχει επανειλημμένως αποδειχτεί σε διάφορους πληθυσμούς ότι σχετίζεται με τα καρδιαγγειακά νοσήματα αλλά και τη νόσο Alzheimer και φαίνεται να επηρεάζει τη διάρκεια και τη ποιότητα ζωής (45).

Γενικότερα οι έρευνες στους ανθρώπους επικεντρώνονται στη μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονται στο βιοχημικό μονοπάτι «ινσουλίνης/ IGF- 1» καθώς έχει βρεθεί ότι έχει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της γήρανσης. Συγκεκριμένα ο γονότυπος FOXO3A της πρωτεΐνης FOXO, που λειτουργεί σαν μεταγραφικός παράγοντας, βρέθηκε να αυξάνει τη μακροβιότητα και να σχετίζεται με μείωση καρδιαγγειακών νοσημάτων, καρκίνου και σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2. Τα άτομα που μελετήθηκαν εμφάνισαν και μεγαλύτερη ινσουλινοευαισθησία που αποδόθηκε στην ομοζυγωτία του γονότυπου FOXO3A GG. Επειδή η μελέτη αυτή αφορούσε μόνο άντρες ιαπωνικής καταγωγής και ηλικίας 71-93 χρόνων για να υπάρξει γενικότερη αποδοχή θα πρέπει τα αποτελέσματα να επιβεβαιωθούν και σε άλλους πληθυσμούς (46). Από διάφορες μελέτες που έγιναν μετέπειτα το ίδιο βρέθηκε και σε πληθυσμούς σε Γερμανία, Αμερική, Ιταλία και Κίνα (47).

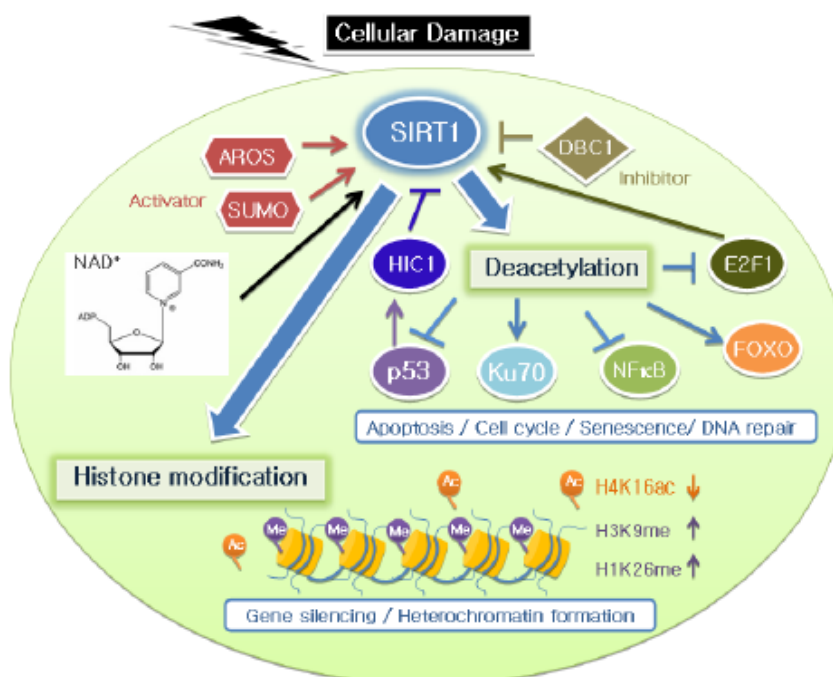
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως το βιοχημικό μονοπάτι «ινσουλίνης/ IGF- 1» έχει συσχετιστεί με τη μακροβιότητα και συγκεκριμένα η μείωση της δραστηριότητας στο μονοπάτι αυξάνει τα χρόνια επιβίωσης, πιθανή συνέπεια της μείωσης του ρυθμού αύξησης των κυττάρων και της μείωσης του οξειδωτικού μεταβολισμού. Σε μια μελέτη στην Ιταλία βρέθηκε να υπάρχει θετική συσχέτιση του υπολειπόμενου αλληλόμορφου A του πολυμορφισμού rs2229765 με τη μακροζωία στους άντρες, χωρίς να μπορούν να γίνουν γενικεύσεις και αναφορές ως προς το μηχανισμό που οδηγεί στη μεταβολή της έκφρασης του γονιδίου και της τιμής του IGF-1 στο πλάσμα (48).

Ο p21 αποτελεί έναν αναστολέα κινάσης που κωδικοποιείται από τα γονίδια CDKN1A (στο χρωμόσωμα 6) και το HRAS1 (στο χρωμόσωμα 11) και έχει αποδειχτεί ότι συμμετέχει στη διαδικασία του στρες και στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την εμφάνιση ασθενειών. Η συσχέτιση του p21 με την εμφάνιση Alzheimer, καρκίνου, αθηροσκλήρωσης και αρθρίτιδας αποτελεί τη βάση ώστε να βρεθούν ποιοι πολυμορφισμοί του συγκεκριμένου γονιδίου αυξάνουν την εμφάνιση αυτών των ασθενειών και μειώνουν τη μακροζωία. Βρέθηκε ότι οι πολυμορφισμοί rs1801270 και rs1059234 είναι σπάνιοι σε αιωνόβιους και επομένως είναι επιζήμιοι για τη μακροζωία (49). Οι φορείς του πολυμορφισμού a3 στο γονίδιο HRAS1 φαίνεται να έχουν αρνητική πρόβλεψη για μακροζωία χωρίς να μπορεί να διευκρινιστεί ο ακριβής βιολογικός μηχανισμός πίσω από αυτό (50).

Ένας γνωστός μονός νουκλεοτιδικός πολυμορφισμός (SNP) στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο TP53 οδηγεί στην αύξηση της μακροζωίας. Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Δανία ομοζυγώτες στο υπολειπόμενο αλληλόμορφο (Pro/Pro) σε σύγκριση με τους ομοζυγώτες στο επικρατές αλληλόμορφο (Arg/ Arg) είχαν αύξηση της μέσης ηλικίας επιβίωσης κατά 3 χρόνια. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί εν μέρει από την αύξηση επιβίωσης μετά από καρκίνο ή άλλη ασθένεια με την παρατήρηση ότι η υποκατάσταση Arg72Pro στην πρωτεΐνη p53 έχει σημαντική επίδραση στο θάνατο των κυττάρων μέσω της αυξημένης απόπτωσης. Έτσι η αύξηση της μακροζωίας μπορεί να οφείλεται σε γενικά αυξημένη ανθεκτικότητα μετά την προσβολή από κάποια ασθένεια. Σε αντίθεση με τον ευρύτατο σκεπτικισμό σχετικά με τη σημασία των SNPs στον άνθρωπο, ο SNP στο p53 έχει ιδιαίτερη σημασία και επηρεάζει σε βάθος τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης των κυττάρων και τη μακροζωία (51).

Η πρωτεΐνη SIRT1 που βρίσκεται στους μύκητες, στα βακτήρια και στους ανθρώπους κωδικοποιείται από το ανάλογο γονίδιο (υπάρχουν 7 ομόλογα SIRT1-7) και εμφανίζει πληθώρα λειτουργιών, στο μεταβολισμό, στη γήρανση και στον καρκίνο. Συγκεκριμένα βρέθηκε ότι τροποποιεί τη χρωματίνη και σταματά τη μεταγραφή με μετατροπή της σε ετεροχρωματίνη. Εφαρμόζοντας θερμιδικό περιορισμό εξετάστηκε η δράση της SIRT1 και ορισμένα στοιχεία δείχνουν ότι μειώνει το στρες που προκύπτει από την απόπτωση, ρυθμίζει την ομοιόσταση της γλυκόζης, μειώνει τη λιπογένεση, προστατεύει τα καρδιακά μυοκύτταρα από την ισχαιμία και προστατεύει τα νευρικά κύτταρα από εκφυλισμό (άμεσα συνδεδεμένος

με τη νόσο Alzheimer). Επομένως η αυξημένη δραστηριότητα του συγκεκριμένου γονιδίου επάγει τη μακροζωία και την προστασία από χρόνια νοσήματα (52).



Εικόνα 3:

Απεικονίζεται η αλληλεπίδραση των διαφόρων παραγόντων (p53, FOXO, SIRT1) στην κυτταρική γήρανση

Υποθέσεις έχουν διατυπωθεί και για τη γονιδιακή περιοχή 1q32 και την ύπαρξη του γονοτύπου -1082G στον υποκινητή του γονιδίου και τη θετική συσχέτιση με τη μακροζωία. Ο συγκεκριμένος γονότυπος συναντάται συχνά σε υπερήλικες και συνδέεται με αύξηση της παραγωγής IL-10, μια κυτοκίνη που αναστέλλει την προφλεγμονώδη λειτουργία (διαδικασία που σχετίζεται με τη γήρανση). Περαιτέρω μελέτες χρειάζονται για να επιβεβαιώσουν τα ευρήματα και να βρεθούν συγκεκριμένοι πολυμορφισμοί των γονιδίων των κυτοκινών που δραστηριοποιούνται στην εξέλιξη της γήρανσης (53).

Η πρωτεΐνη klotho (MIM 604824) φαίνεται να έχει σχέση με την εμφάνιση καρδιαγγειακής νόσου και τη μακροζωία. Αρχικά παρατηρήθηκε σε ποντίκια, που είχαν έλλειψη του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη, να εμφανίζουν σημάδια πρόωρης γήρανσης και αθηροσκλήρωσης. Μια παραλλαγή του γονιδίου (KL-VS) είναι αρκετά συχνή στο γενικό πληθυσμό (συχνότητα 16%) και μεταλλάξεις στην κωδικοποιούσα περιοχή μπορούν να επηρεάσουν το μεταβολισμό της πρωτεΐνης.

Συγκεκριμένα οι ετεροζυγώτες του συγκεκριμένου αλληλόμορφου είχαν πλεονέκτημα για να ζήσουν περισσότερο σε σχέση με τους ομοζυγώτες (54).

Στην έρευνα για τη μακροζωία αξίζει να αναφερθεί το γενετικό σύνδρομο Werner όπου παρουσιάζεται μια διαταραχή στο γονίδιο WRN και παρατηρείται πρόωγη γήρανση στα άτομα που εμφανίζουν το σύνδρομο (47). Υπάρχει μια υπόθεση ότι ορισμένοι πολυμορφισμοί στο συγκεκριμένο γονίδιο μπορεί να έχουν θετική επίδραση κατά τη διαδικασία της γήρανσης χωρίς όμως να έχει εξακριβωθεί το ποιοι είναι αυτοί (55).

Σε μελέτες που έγιναν στο νηματοειδή σκώληκα *Caenorhabditis elegans* βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της αδρανοποίησης της έκφρασης των γονιδίων Daf-2 και Age-1 και της αύξησης του προσδόκιμου ζωής του σκώληκα με κόστος τη διαταραχή της ανάπτυξης και της γονιμότητας (56). Το γονίδιο Daf-2 κωδικοποιεί ορμονικούς υποδοχείς ανάλογους με αυτούς της ινσουλίνης στον άνθρωπο και το γονίδιο Age-1 κωδικοποιεί μια ανάλογη με τα θηλαστικά υπομονάδα της PI3K (φωσφατιδυλοϊνοσιτιδικής-3-κινάσης), που μεταδίδει το σήμα για την akt-1/akt-2 (πρωτεϊνική κινάση B). Το σήμα αυτό διαμορφώνεται από το γονίδιο Daf-18. Στο συγκεκριμένο μονοπάτι εμπλέκεται και ένας μεταγραφικός παράγοντας που κωδικοποιείται από το γονίδιο Daf-16. Αν συνυπάρχουν οι μεταλλάξεις στο γονίδιο Age-1 και στο Daf-16 μπορεί να αυξηθεί τέσσερις φορές η ζωή του *Caenorhabditis elegans* (56,57).

Στη μύγα *Drosophila melanogaster* διάφορες μελέτες έδειξαν ότι μεταλλάξεις στο γονίδιο INDY, που κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που μεταφέρει διάφορα ενδιάμεσα του κύκλου του krebs, παρατείνουν τη διάρκεια ζωής. Οι μεταλλάξεις αυτές φαίνεται να μειώνουν την έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου και να επηρεάζουν το διάμεσο μεταβολισμό (58). Ένα άλλο γονίδιο που έχει μελετηθεί είναι το mth και βρέθηκε ότι οι ομοζυγώτες ως προς το μεταλλαγμένο γονίδιο εμφανίζουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής (59).

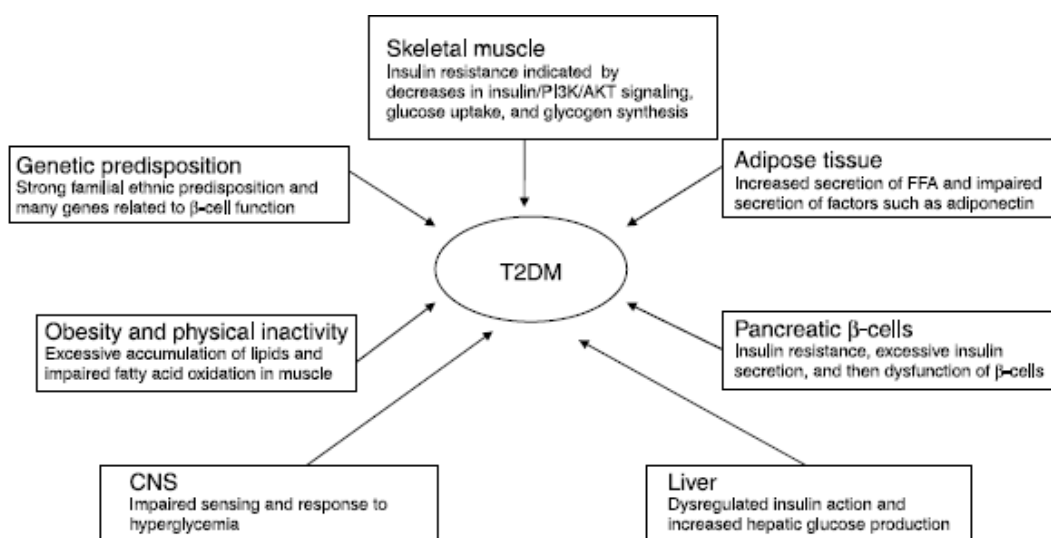
1.7. ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Στη συνέχεια θα αναφέρουμε στο σακχαρώδη διαβήτη, που αποτελεί μια από τις κυριότερες αιτίες θανάτου παγκοσμίως κυρίως λόγω των επιπλοκών που τον συνοδεύουν. Ο Σακχαρώδης Διαβήτης τύπου 2 έχει συσχετιστεί με τον πολυμορφισμό που θα μελετηθεί στη συνέχεια (rs780094).

Υπολογίζεται ότι ο διαβήτης επηρεάζει περίπου 150 εκατομμύρια ανθρώπους σε όλο τον κόσμο, και αυτός ο αριθμός αναμένεται να διπλασιαστεί τα επόμενα 20 χρόνια. Περίπου 90-95% των περιπτώσεων στη Βόρεια Αμερική είναι διαβήτη τύπου 2, και περίπου το 20% του πληθυσμού άνω των 65 ετών έχει σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2.

Σακχαρώδης Διαβήτης ονομάζεται μια ετερογενής ομάδα μεταβολικών παθήσεων που χαρακτηρίζονται από χρόνια υπεργλυκαιμία και διαταραχές του μεταβολισμού των υδατανθράκων, των λιπιδίων και των πρωτεϊνών και οφείλονται σε διαταραχή της έκκρισης ινσουλίνης, της δράσης της ή και των δύο. Οι επιπλοκές της νόσου μπορεί να επηρεάσουν όλα τα συστήματα του σώματος και γι' αυτό ευθύνεται κυρίως η χρόνια υπεργλυκαιμία.

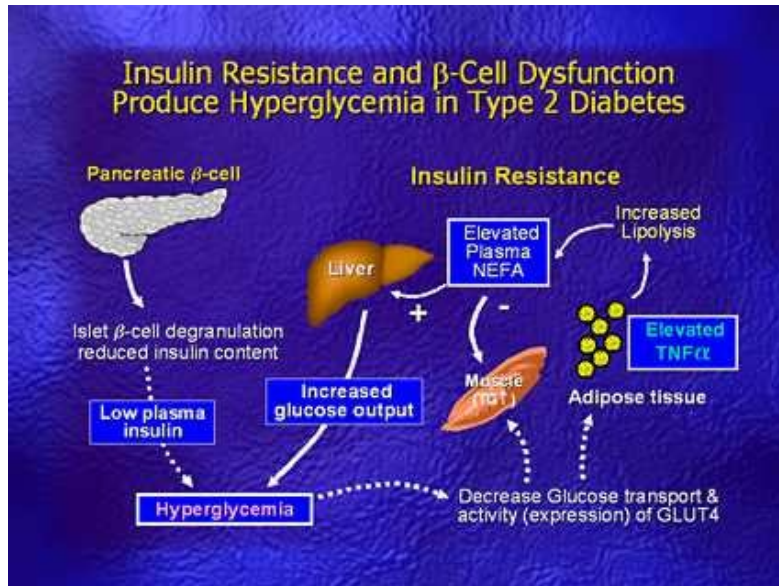
Υπάρχουν διάφοροι τύποι σακχαρώδη διαβήτη με κυριότερους τους τύπους 1 και 2. Σε άτομα μεγαλύτερης ηλικίας εμφανίζεται συχνά ο διαβήτης τύπου 2. Παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση διαβήτη τύπου 2 είναι: το οικογενειακό ιστορικό, η ηλικία, η παχυσαρκία και η καθιστική ζωή.



Εικόνα 4: Απεικονίζονται οι παράγοντες που οδηγούν σε ΣΔ2 : διαταραχή στην πρόσληψη γλυκόζης από τα κύτταρα, διαταραχή στη λειτουργία των λιποκυττάρων, δυσλειτουργία των παγκρεατικών β -κυττάρων του παγκρέατος, διαταραχή της αίσθησης και της αντιμετώπισης της υπεργλυκαιμίας στο ΚΝΣ, η υπερβολική συσσώρευση λιπιδίων, και μειωμένη οξείδωση των λιπαρών οξέων που οφείλονται στην παχυσαρκία, η σωματική αδράνεια, και η γενετική προδιάθεση

Χαρακτηριστικά αυτού του τύπου διαβήτη είναι η διαταραχή στη, διαμεσολαβούμενη από την ινσουλίνη, πρόσληψη της γλυκόζης από τους μύες

(ινσουλινοαντίσταση- πρόβλημα στα κύτταρα υποδοχής όχι στην παραγωγή ινσουλίνης), η δυσλειτουργία των β-κυττάρων του παγκρέατος, η διαταραχή στην εκκριτική λειτουργία των λιποκυττάρων και διαταραχή στη ρύθμιση της ηπατικής παραγωγής και δράσης της γλυκόζης. Συχνό φαινόμενο είναι να υπάρχει υπεργλυκαιμία και ταυτόχρονα υψηλά επίπεδα ινσουλίνης καθώς τα κύτταρα αδυνατούν να χρησιμοποιήσουν τη γλυκόζη και αντισταθμιστικά αυξάνεται η παραγωγή ινσουλίνης.



Εικόνα 5: Η αντίσταση στην ινσουλίνη και δυσλειτουργία των β-κυττάρων προκαλούν υπεργλυκαιμία στον ΣΔ2

Φυσιολογικά, τα παγκρεατικά β-κύτταρα συνεχώς συνθέτουν ινσουλίνη, ανεξαρτήτως των επιπέδων γλυκόζης στο αίμα. Η ινσουλίνη είναι αποθηκευμένη στα χυμοτόπια και απελευθερώνεται μία φορά όταν αυξηθούν τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η ινσουλίνη είναι η κύρια ορμόνη που ρυθμίζει την πρόσληψη γλυκόζης από τα περισσότερα κύτταρα, συμπεριλαμβανομένων των μυοσκελετικών κυττάρων και των λιποκυττάρων. Η ινσουλίνη είναι επίσης ένα σημαντικό μήνυμα για τη μετατροπή της γλυκόζης σε γλυκογόνο για την αποθήκευση στο ήπαρ και στα σκελετικά μυϊκά κύτταρα. Μια μικρή μείωση στα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα οδηγεί σε μείωση στην έκκριση ινσουλίνης από τα β-κύτταρα και σε απελευθέρωση της γλυκαγόνης από τα α-κύτταρα, η οποία διεγείρει τη μετατροπή του γλυκογόνου προς γλυκόζη. Μετά από ολονύκτια νηστεία, η γλυκόζη παράγεται κυρίως από γλυκογονόλυση και γλυκονεογένεση. Αυτή η διαδικασία διαταράσσεται σε άτομα που πάσχουν από ΣΔ οδηγώντας σε αύξηση της γλυκόζης αίματος.

Άτομα με ΣΔ εμφανίζουν πολύ συχνά διάφορες επιπλοκές με κυριότερες τη νεφροπάθεια, αμφιβληστροειδοπάθεια, νευροπάθεια και καρδιαγγειακά νοσήματα. Η

αθηροσκλήρωση προκαλείται με τον ίδιο μηχανισμό που προκαλείται σε μη διαβητικά άτομα μόνο που οι διαταραχές επιταχύνονται σημαντικά. Επίσης σε άτομα με διαβήτη είναι συχνότερη η εμφάνιση υπέρτασης και δυσλιπιδαιμίας, που αποτελούν και αυτές οι διαταραχές παράγοντα κινδύνου για αθηροσκλήρωση και καρδιαγγειακά νοσήματα (9, 60).

Παρακάτω παρατίθενται τα διαγνωστικά κριτήρια για ΣΔ όπως έχουν διαμορφωθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO) και την Αμερικάνικη Διαβητολογική Εταιρεία (ADA) (12).

Πίνακας 2: Διαγνωστικά κριτήρια για τον ΣΔ και σύγκριση μεταξύ των δεδομένων του WHO (1999) και ADA (2003)

	WHO 1999	ADA 2003
Διαταραγμένη Ανοχή Γλυκόζης		
Γλυκόζη Νηστείας	<7,8 mmol/l (140 mg/dl)	Δεν απαιτείται
2-h Γλυκόζη	≥7,8 και <11,1 mmol/l (200 mg/dl)	≥7,8 mmol/l (140 mg/dl) και < 11.1 mmol/l (200 mg/dl)
Διαταραγμένη Γλυκόζη Νηστείας		
Γλυκόζη Νηστείας	>6,1 mmol/l (110 mg/dl) και < 7,0 mmol/l (126 mg/dl)	5,6 - 6,9 mmol/l (100-125 mg/dl)
2-h Γλυκόζη	και <7,8 mmol/l (140 mg/dl) αν μετρηθεί	Δεν απαιτείται, αλλά αν μετρηθεί <11.1 mmol/l (200 mg/dl)
Διαβήτης		
Γλυκόζη Νηστείας	≥7,0 mmol/l (126 mg/dl)	≥7,0 mmol/l (126 mg/dl)
2-h Γλυκόζη	≥11,1 mmol/l (200 mg/dl)	≥11,1 mmol/l (200 mg/dl)

1.8. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΚΙΝΑΣΗΣ (GCKR)

1.8.1 ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΚΙΝΑΣΗΣ (GK)

Η γλυκοκινάση είναι μια εξοκινάση (εξοκινάση IV), μια διαλυτή πρωτεΐνη που απαντάται κυρίως στον πυρήνα των ηπατοκυττάρων και στα α και β κύτταρα του παγκρέατος, και ελευθερώνεται στο κυτταρόπλασμα όταν αυξηθεί η συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα. Σημαντικό ρόλο σ' αυτό έχει και ο υποδοχέας της γλυκόζης GLUT-2, που βρίσκεται στην πλασματική μεμβράνη και εξισορροπεί τη συγκέντρωση γλυκόζης στο αίμα και στο κυτταρόπλασμα των ηπατοκυττάρων οδηγώντας σε αύξηση της γλυκοκινάσης για τον περαιτέρω μεταβολισμό της γλυκόζης. Οι κινάσες γενικότερα αποτελούν ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από ATP στο αντίστοιχο μόριο δέκτη. Σ' αυτή την περίπτωση δέκτης της φωσφορικής ομάδας που μεταφέρει η γλυκοκινάση είναι η D-γλυκόζη που μετατρέπεται σε 6-φωσφορική γλυκόζη. Για να δράσει η γλυκοκινάση απαιτείται Mg^{+2} ώστε να γίνει ευκολότερη η

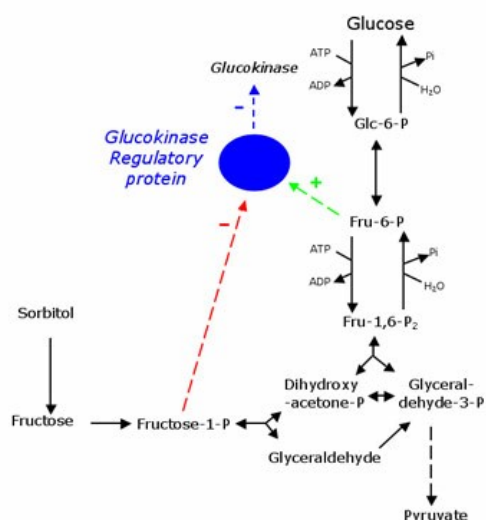
ένωση του μορίου της γλυκόζης με τη φωσφορική ομάδα του ATP. Ειδικά η γλυκοκινάση α) δρα μόνο στο ήπαρ ενώ οι εξοκινάσες γενικότερα βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα του οργανισμού, β) είναι εξειδικευμένη ως προς τη γλυκόζη, γ) φωσφορυλιώνει ταχύτερα τη γλυκόζη όταν η συγκέντρωσή της είναι υψηλή σε σχέση με τις υπόλοιπες εξοκινάσες, λόγω μεγαλύτερης K_m και επομένως μειώνεται η παραγωγή 6-φωσφορικής γλυκόζης όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι χαμηλή, δ) ενεργοποιείται από την ινσουλίνη, ε) παρουσία υψηλής συγκέντρωσης γλυκόζης αίματος η παραγωγή της 6-φωσφορικής γλυκόζης διεγείρει τη σύνθεση γλυκογόνου διατηρώντας τα επίπεδα ελεύθερης γλυκόζης χαμηλά αλλά χωρίς να αναστέλλει τη δράση της γλυκοκινάσης και έτσι συνεχίζεται η φωσφορυλίωση αν η συγκέντρωση της γλυκόζης συνεχίσει και παραμένει υψηλή, επομένως το ήπαρ μπορεί να μειώσει τα επίπεδα γλυκόζης αίματος όταν αυτά αυξηθούν σημαντικά (61). Η άλλη οδός που μπορεί να ακολουθήσει η 6-φωσφορική γλυκόζη είναι να οξειδωθεί για παραγωγή ενέργειας ή σε παθολογικές καταστάσεις να ενεργοποιήσει τον κύκλο των φωσφοπεντοζών με αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγής πουρινών και των προϊόντων αποικοδόμησής τους (ουρικό οξύ) (61,62). Μεταβολή της δραστηριότητας της GK και της ρύθμισής της συνδέεται με μη φυσιολογική γλυκαιμία, όπως αποδεικνύεται από φυσικές μεταλλάξεις. Περισσότερες από 190 μεταλλάξεις που αδρανοποιούν τη GK έχουν εντοπιστεί σε ασθενείς με MODY 2 (Mature Onset Diabetes of the Young 2). Αντίθετα, πέντε μεταλλάξεις που ενεργοποιούν την GK μπορούν να οδηγήσουν σε υπερινσουλιναιμική υπογλυκαιμία (63).

1.8.2 Η ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΗ ΠΡΩΤΕΪΝΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΚΙΝΑΣΗΣ

Η παραγωγή της γλυκοκινάσης (GK) ρυθμίζεται από κάποια ρυθμιστική πρωτεΐνη την GCKR, που συνδέεται στην πυρηνική μεμβράνη. Το αποτέλεσμα της σύνδεσης της GCKR με την γλυκοκινάση εξαρτάται από το μόριο που μπορεί να δεσμευτεί στην GCKR. Μπορεί να συνδεθεί 6-φωσφορική φρουκτόζη ή 1-φωσφορική φρουκτόζη, που είναι ανταγωνιστές. Αν συνδεθεί η 6-φωσφορική φρουκτόζη παρατηρείται αναστολή της δραστηριότητας της γλυκοκινάσης, μέσω της ενίσχυσης του δεσμού GCKR-GK ενώ με δέσμευση 1-φωσφορικής γλυκόζης συμβαίνει η αντίστροφη διαδικασία με απελευθέρωση της γλυκοκινάσης. Η 6-φωσφορική φρουκτόζη ευνοεί τη σύνδεση της GCKR στη μεμβράνη αλλά η γλυκόζη την ανταγωνίζεται και παρουσία γλυκόζης ευνοείται η παραγωγή γλυκοκινάσης μέσω

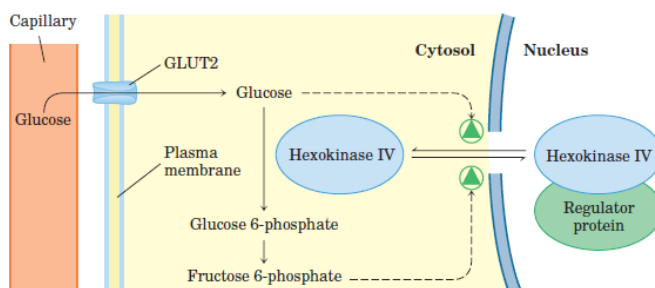
της αποσύνδεσης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης. Κατά τη διάρκεια νηστείας, όπου παρατηρείται μείωση της γλυκόζης πλάσματος, η 6-φωσφορική φρουκτόζη αναστέλλει τη γλυκοκινάση μέσω της GCKR και εξοικονομείται γλυκόζη για το ήπαρ. Στην εικόνα 6 που ακολουθεί φαίνεται το πώς επηρεάζεται η παραγωγή της GCKR από την 6-φωσφορική φρουκτόζη και την 1-φωσφορική φρουκτόζη.

Ο μηχανισμός δράσης της ρυθμιστικής πρωτεΐνης έχει ενδιαφέρον: η GCKR περιορίζει τη γλυκοκινάση στον πυρήνα απομονωμένη από άλλα ένζυμα. Όταν αυξηθεί η συγκέντρωση γλυκόζης στο εσωτερικό των κυττάρων εξισορροπείται με τη γλυκόζη που βρίσκεται στον πυρήνα μέσω των μεταφορέων στην πυρηνική μεμβράνη. Η γλυκόζη προκαλεί αποσύνδεση της GCKR και η γλυκοκινάση εισέρχεται στο κυτταρόπλασμα και αρχίζει να φωσφορυλιώνει τη γλυκόζη για τον περαιτέρω μεταβολισμό της (εικόνα 7) (64). Να σημειωθεί ότι η 1-φωσφοφρουκτόζη αποτελεί ενδιάμεσο μόριο για την εισαγωγή της φρουκτόζης στη γλυκολυτική πορεία.



Εικόνα 6: πώς επηρεάζεται η GCKR από την 1 και 6 φωσφορική φρουκτόζη και η GCKR επηρεάζει την γλυκοκινάση

Εικόνα 7: Ρύθμιση της γλυκοκινάσης μέσω της απομόνωσής της στον πυρήνα από τη GCKR

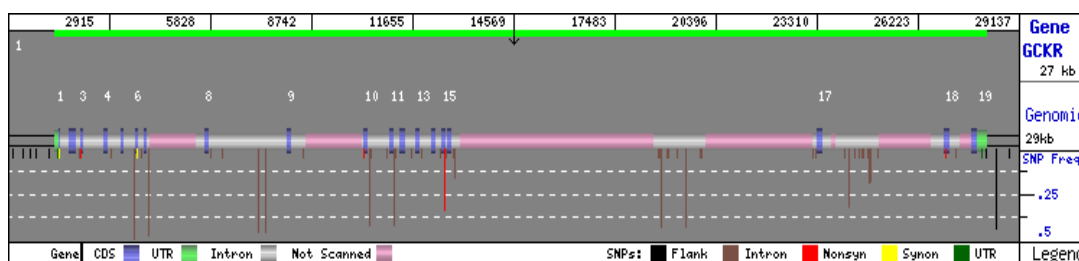


1.9 ΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ ΤΗΣ *GCKR*

1.9.1 ΔΟΜΗ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Η πρωτεΐνη GCKR κωδικοποιείται από το ανάλογο γονίδιο που εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 2 στη θέση 2p23. Έχει μήκος 26,85 kb και αποτελείται από 19 εξόνια.

Για το συγκεκριμένο γονίδιο έχουν βρεθεί 29 πολυμορφισμοί και οι κυριότεροι πέντε είναι (65,66) :



Εικόνα 8: το γονίδιο της GCKR

- ♦ **rs1260326 (655282T>C):** ο πολυμορφισμός αυτός εμφανίζει μέση συχνότητα 49% σε πληθυσμούς στην Ανατολική Ασία, Βόρεια Αμερική, Δυτική Αφρική και σε διάφορους πληθυσμούς μη ταυτοποιημένους. Οφείλεται σε παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη (CTG $\Rightarrow$ CCG) του γονιδίου και αντί για το αμινοξύ λευκίνη παράγεται το αμινοξύ προλίνη. Ο πολυμορφισμός αυτός σχετίζεται με αύξηση των επιπέδων γλυκόζης και τριγλυκεριδίων στο αίμα και εμφάνισης ΣΔ2.

- ♦ **rs704790 (656829G>A):** στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό παρατηρείται μετάλλαξη στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA με αποτέλεσμα μεταβολές κατά την αντιγραφή. Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός παρατηρείται με μέση συχνότητα 3% κυρίως στην Ανατολική Ασία και σε διάφορους άλλους πληθυσμούς.

- ♦ **rs2272415 (654205T>C):** ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός προκαλείται από μια συνώνυμη μετάλλαξη (GAT $\Rightarrow$ GAC) χωρίς να εμφανίζονται περαιτέρω διαταραχές αφού κωδικοποιείται το ίδιο αμινοξύ (ασπαραγίνη). Το ποσοστό εμφάνισής του είναι πολύ μικρό και παρατηρείται κυρίως στην Ανατολική Ασία.

- ♦ **rs814295 (656510A>G):** αποτελεί μετάλλαξη εσωνίου και το υπολειπόμενο αλληλόμορφο του πολυμορφισμού εμφανίζει συχνότητα 20% κυρίως στην Ανατολική Ασία, Βόρεια Αμερική, Δυτική Αφρική και σε διάφορους άλλους πληθυσμούς.

♦ **rs780094 (6563124T>C):** ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός προκαλείται από μια μετάλλαξη στο εσώνιο 16 στην περιοχή NM 001486 και η μέση συχνότητα εμφάνισης του υπολειπόμενου αλληλομόρφου C είναι 60%. Με το συγκεκριμένο πολυμορφισμό και ιδιαίτερα με το γονότυπο CC και τη σχέση που έχει με τη θνησιμότητα θα ασχοληθούμε παρακάτω στη μελέτη μας.

1.9.2 ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΓΛΥΚΟΖΗ ΝΗΣΤΕΙΑΣ

Οι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής δείχνουν ότι η ύπαρξη του γονότυπου CC οδηγεί σε αύξηση της γλυκόζης νηστείας αλλά ταυτόχρονα μειώνει τη γλυκόζη αίματος 2 ώρες μετά το τεστ ανοχής στη γλυκόζη ενώ το αντίθετο συμβαίνει σε άτομα με το γονότυπο TT. Ο πιθανός μηχανισμός που οδηγεί σε αυτό το αποτέλεσμα είναι ότι ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός (CC) οδηγεί σε αύξηση του GCKR και μείωση της φωσφορυλίωσης της γλυκόζης (με μείωση της γλυκοκινάσης) και του περαιτέρω μεταβολισμού της (67). Στη μελέτη ARIC παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας των β-κυττάρων του παγκρέατος παρουσία του C αλληλομόρφου (αύξηση του δείκτη HOMA-B) που μπορεί να εξηγήσει τη μείωση της μεταγευματικής γλυκόζης λόγω αύξησης της παραγωγής ινσουλίνης (68). Το ίδιο αποτέλεσμα έχουν δείξει και άλλες μελέτες που αφορούσαν το συγκεκριμένο πολυμορφισμό (67, 69, 70) αλλά και μια μεγάλη μετα-ανάλυση που αφορούσε το σακχαρώδη διαβήτη (71). Μια ακόμη μελέτη που έγινε σε Κινέζους έδειξε αύξηση της γλυκόζης νηστείας στο συγκεκριμένο πολυμορφισμό χωρίς όμως να υπάρχει στατιστική σημαντικότητα (72).

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΕΠΙΠΕΔΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΕΣΤ ΔΥΣΑΝΟΧΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ (OGTT)

Μετά από το τεστ δυσανοχής γλυκόζης παρατηρήθηκε σε άτομα με τον πολυμορφισμό rs780094 (αλληλόμορφο C) ότι υπήρχαν μειωμένα επίπεδα γλυκόζης δύο ώρες μετά τη φόρτιση με γλυκόζη. Αυτό το αποτέλεσμα είναι κοινό τόσο στη μελέτη ARIC (68) όσο και σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε 16853 άτομα στη Δανία (69) αλλά και σε μια μεγάλη μετα- ανάλυση (71).

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΗ

Σε έρευνες που αφορούσαν τον πολυμορφισμό rs780094 έχει βρεθεί ότι ταυτόχρονα με την αύξηση της γλυκόζης νηστείας στα άτομα με το C αλληλόμορφο, υπήρχαν και αυξημένα επίπεδα ινσουλίνης (68,69), μέσω της αύξησης της δραστηριότητας των β-κυττάρων του παγκρέατος όπως φαίνεται από το δείκτη HOMA-B (68,73). Άλλες μελέτες δεν έδειξαν διαφορά στην έκκριση ινσουλίνης (70) ενώ μείωση παρατηρήθηκε σε μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε Κινέζους Χαν όπου μειώθηκε η δραστηριότητα των β-κυττάρων μειώνοντας και την παραγωγή ινσουλίνης (67). Σε μια μετα- ανάλυση βρέθηκε ότι άτομα με τον συγκεκριμένο πολυμορφισμό είχαν μειωμένα επίπεδα ινσουλίνης 2 ώρες μετά το τεστ δυσανοχής γλυκόζης όμως τα ευρήματα ήταν χωρίς στατιστική σημαντικότητα ($p=1$) (71).

❖ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΙΝΣΟΥΛΙΝΟΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Το αλληλόμορφο C στον πολυμορφισμό rs780094 έχει βρεθεί να σχετίζεται θετικά με την ινσουλινοαντίσταση όπως φαίνεται από το δείκτη HOMA-IR. Στο αποτέλεσμα αυτό έχουν καταλήξει οι περισσότερες μελέτες που αφορούσαν το συγκεκριμένο πολυμορφισμό (68,69,70,71)

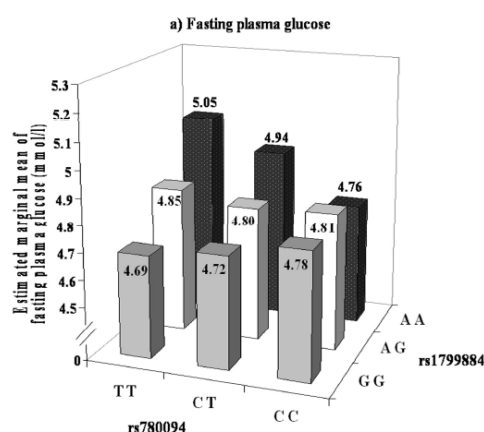
1.9.3 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ

Ο συγκεκριμένος πολυμορφισμός και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο C βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 ενώ το αλληλόμορφο T φαίνεται να σχετίζεται με μείωση του κίνδυνου εμφάνισης ΣΔ2 (69,70,71,72). Η μελέτη ARIC έδειξε ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του πολυμορφισμού και της εμφάνισης Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 μόνο όμως στα άτομα της λευκής φυλής. Σε άτομα της μαύρης φυλής βρέθηκε το αντίθετο αποτέλεσμα δηλαδή άτομα με το γονότυπο CC είχαν μικρότερα ποσοστά εμφάνισης Σακχαρώδη Διαβήτη Τύπου 2 σε σύγκριση με τα άτομα με γονότυπο TT (68).

Αν και ο πολυμορφισμός σχετίζεται θετικά με ΣΔ2 δε φαίνεται να επηρεάζει την εμφάνιση καρδιαγγειακών νοσημάτων για τα οποία ο ΣΔ2 αποτελεί παράγοντα κινδύνου (68).

1.9.4 Ο ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΣ rs780094 ΚΑΙ ΑΛΛΟΙ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΙ

Συσχέτιση αναφέρεται με τον πολυμορφισμό rs1799884 στο γονίδιο της γλυκοκινάσης καθώς με παρουσία και των δύο πολυμορφισμών φαίνεται να υπάρχει αθροιστική θετική επίδραση στις τιμές γλυκόζης νηστείας (72,74). Ο πολυμορφισμός rs1799884 και συγκεκριμένα το αλληλόμορφο Α έχει το ίδιο αποτέλεσμα με τον πολυμορφισμό rs780094 και το αλληλόμορφο του C καθώς φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα. Η αθροιστική δράση των δύο αυτών πολυμορφισμών φαίνεται και στο διάγραμμα που ακολουθεί.



Εικόνα 9: Οι πολυμορφισμοί rs780094 και rs1799884 και πως επηρεάζουν τα επίπεδα γλυκόζης νηστείας στο αίμα

Συγκεντρωτικά μπορούμε να πούμε ότι άτομα με το συγκεκριμένο πολυμορφισμό έχουν αυξημένα επίπεδα της GCKR και έτσι μειώνονται τα επίπεδα της γλυκοκινάσης μειώνοντας και τη φωσφορυλίωση της γλυκόζης σε 6- φωσφογλυκόζη. Με μείωση της 6- φωσφογλυκόζης μειώνεται και ο περαιτέρω μεταβολισμός της και αυξάνονται τα επίπεδα ελεύθερης γλυκόζης στο αίμα.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η διερεύνηση της επίδρασης του πολυμορφισμού rs780094 του γονιδίου GCKR στο προσδόκιμο επιβίωσης ηλικιωμένων ατόμων.

2.2 Η ΜΕΛΕΤΗ GHRAS

Οι κύριοι στόχοι της μελέτης GHRAS (Greek Health Randomized Aging Study) είναι:

1) να καταγραφεί η συχνότητα των καρδιαγγειακών παθήσεων, του διαβήτη και των παραγόντων κινδύνου της καρδιαγγειακής νόσου, όπως η υπερχοληστερολαιμία, η παχυσαρκία, η υπέρταση, 2) να καταγραφούν οι διατροφικές συνήθειες των ηλικιωμένων και 3) να διερευνήσει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κοινωνικοοικονομικών, ψυχολογικών, βιοχημικών παραγόντων, διατροφής και τρόπου ζωής στην κατάσταση υγείας των ηλικιωμένων ατόμων στην Ελλάδα. Στη μελέτη συμμετείχαν 788 άτομα που ήταν μέλη των ΚΑΠΗ Καλλιθέας, Νέας Σμύρνης και Μοσχάτου. Η συμμετοχή ήταν εθελοντική και τα άτομα που συμμετείχαν επιλέχθηκαν τυχαία από τα ΚΑΠΗ. Η συγκέντρωση των ατόμων έγινε μεταξύ Μαρτίου του 2004 και Ιουνίου του 2007. Το Νοέμβριο του 2009 έως και το Μάιο του 2010 έγινε τηλεφωνικός επανέλεγχος στα άτομα που είχαν συμπληρώσει 5 χρόνια από τη στιγμή που έγινε η πρώτη συνάντηση, δηλαδή τα άτομα που είχαν λάβει μέρος από το Μάρτιο του 2004 έως και το Δεκέμβριο του 2006. Συνολικά έγινε επανέλεγχος σε 687 άτομα. Στον επανέλεγχο ερωτήθηκαν για την παρούσα κατάσταση της υγείας τους και πως είχε εξελιχθεί κατά τη διάρκεια αυτών των χρόνων.

2.3 ΣΥΛΛΟΓΗ ΣΤΟΙΧΕΙΩΝ

Στην μελέτη αυτή αρχικά εξετάστηκαν:

- α) Βιοχημικές παράμετροι (μετά από 12ωρη νηστεία έγινε λήψη αίματος για γενική εξέταση αίματος, βιοχημικό έλεγχο και απομόνωση DNA)
- β) Ανθρωπομετρικές παράμετροι (Βάρος, Ύψος, Δείκτης Μάζας Σώματος)
- γ) Κλινικές παράμετροι (Αρτηριακή Πίεση)
- δ) Δημογραφικά και κοινωνικά χαρακτηριστικά (ηλικία, φύλο, τόπος διαμονής, οικογενειακή κατάσταση και μορφωτικό επίπεδο)
- ε) Ιατρικό ιστορικό (παρούσα φαρμακευτική αγωγή, ύπαρξη διαγνωσμένων παθήσεων, ύπαρξη περιστατικού εμφράγματος μυοκαρδίου, εγκεφαλικού, καρκίνου και ιστορικό χειρουργικών επεμβάσεων)
- στ) Διατροφικές συνήθειες (με ερωτηματολόγιο συχνότητας κατανάλωσης τροφίμων)

ζ) Καπνιστικές συνήθειες και κατανάλωση αλκοόλ

η) Κατάσταση μνήμης και παρουσία κατάθλιψης

2.4 ΛΗΨΗ ΑΙΜΑΤΟΣ

Μετά από 12ωρη νηστεία πραγματοποιείται λήψη 10ml αίματος από κάθε εθελοντή. Τα 5 ml αίματος συλλέγονται σε συλλέκτες με πήγμα για απομόνωση ορού και 5 ml αίματος συλλέγονται σε συλλέκτες με αντιπηκτικό (EDTA) για απομόνωση DNA. Δείγματα ορού και πύγματος απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80° C για μελλοντικές μετρήσεις .

2.5 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA

Η απομόνωση DNA έγινε από λευκοκύτταρα ολικού αίματος (5ml) με τη μέθοδο NaCl (75). Τα βήματα της μεθόδου περιγράφονται παρακάτω:

HMEPA 1η

1. Απομάκρυνση πλάσματος με πλαστική πιπέτα Pasteur μετά από φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 4°C).
 2. Μεταφορά 3ml κυττάρων αίματος σε σωλήνα Falcon 50ml.
 3. Προσθήκη διαλύματος Lysis I (αραιωμένο 1x) μέχρι τελικό όγκο 50ml.
 4. Ισχυρή ανακίνηση και επώαση σε πάγο για 20min (ανακίνηση κατά τη διάρκεια των 20min).
 5. Φυγοκέντρηση (10min, 2000rpm, 20 °C).
 6. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
 7. Προσθήκη 25ml Lysis I (αραιωμένο 1x) και ισχυρή ανακίνηση για διάλυση ιζήματος.
 8. Φυγοκέντρηση (10min, 2500rpm, 20 °C).
- Αν εξακολουθούν να υπάρχουν στο Falcon αρκετά ερυθρά αιμοσφαίρια (παρατηρείται κόκκινο-καφέ χρώμα) επαναλαμβάνονται τα βήματα 7 και 8.
9. Απομάκρυνση υπερκείμενου.
 10. Προσθήκη 3ml διαλύματος Lysis II και ισχυρή ανακίνηση.
 11. Προσθήκη 50μl πρωτεϊνάσης K (20mg/ml).
 12. Προσθήκη 150μl SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 20% και ήπια ανάδευση.
 13. Επώαση στους 56°C σε υδατόλουτρο για 8-12 ώρες.

HMEPA 2η.

1. Μεταφορά διαλύματος σε σωλήνα Falcon 15ml.

2. Προσθήκη 1ml NaCl 6M και ισχυρή ανακίνηση για 15-20sec.
 3. Φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 4 °C). Με την φυγοκέντρηση παρουσία της μεγάλης συγκέντρωσης άλατος που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες, γίνεται κατακρήμνιση των πρωτεϊνών. Το DNA είναι διαλυτό σε διαλύματα αλάτων.
 4. Ισχυρή ανακίνηση για διάλυση του ιζήματος και φυγοκέντρηση (10min, 3000rpm, 20 °C). Αν το υπερκείμενο δεν ήταν αρκετά διαυγές, επαναλήφθηκε η ανακίνηση και η φυγοκέντρηση.
 5. Μεταφορά υπερκείμενου με πλαστική Pasteur (χωρίς να πάρουμε από τη στοιβάδα φούσκες ή ίζημα) σε σωλήνα Falcon 50ml.
 6. Προσθήκη 10ml αιθανόλης 96% και ήπια ανάδευση. Σε αυτή τη φάση γίνεται ορατό το DNA. Συγκέντρωση DNA σε κουβάρι σε roller bench.
 7. Απομάκρυνση DNA από το διάλυμα με πιπέτα Pasteur, της οποίας το άκρο έχει κλείσει με θέρμανση.
 8. Πλύσιμο του DNA (εμβάπτιση της πιπέτας σε 70% αιθανόλη) και στέγνωμα (20min). Το επιπλέον βήμα καθαρισμού με αιθανόλη χρειάζεται για την απομάκρυνση άλατος που έχει καταβυθιστεί με την αιθανόλη.
 9. Μεταφορά του DNA σε σωλήνα eppendorf που περιέχει 0,5ml διαλύματος TE.
 10. Διαλυτοποίηση DNA σε roller bench και αποθήκευση (-20°C).
- Μετά την απομόνωση το DNA ελέγχεται για την παρουσία του πολυμορφισμού μέσω του συστήματος TaqMan, το οποίο είναι μια μέθοδος συνεχόμενης PCR σε πραγματικό χρόνο.

2.6 ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

♦ Lysis I (20x)

- ο 82,9gr NH₄CL (3,1M).
- ο 10,01gr KHCO₃ (200mM).
- ο 20ml EDTA (0,5M).
- ο Ανάδευση.
- ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι V_{τελ}=500ml.
- ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.
- ο Αποστείρωση.

♦ Lysis I (1x)

- ο 25ml Lysis I 20x.

ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.

ο Ανάδευση

♦ Lysis II

ο 0,61gr TrisHCL (10mM).

ο 11,69gr NaCL (400mM).

ο 2ml EDTA (0,5M).

ο Ανάδευση.

ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.

ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 8,4.

ο Αποστείρωση.

♦ Tris-EDTA (TE)

ο 0,61gr Tris Base 10Mm.

ο 1ml EDTA 0,05M.

ο Ανάδευση.

ο Προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι $V_{\text{τελ}}=500\text{ml}$.

ο Έλεγχος και ρύθμιση pH στο 7,4.

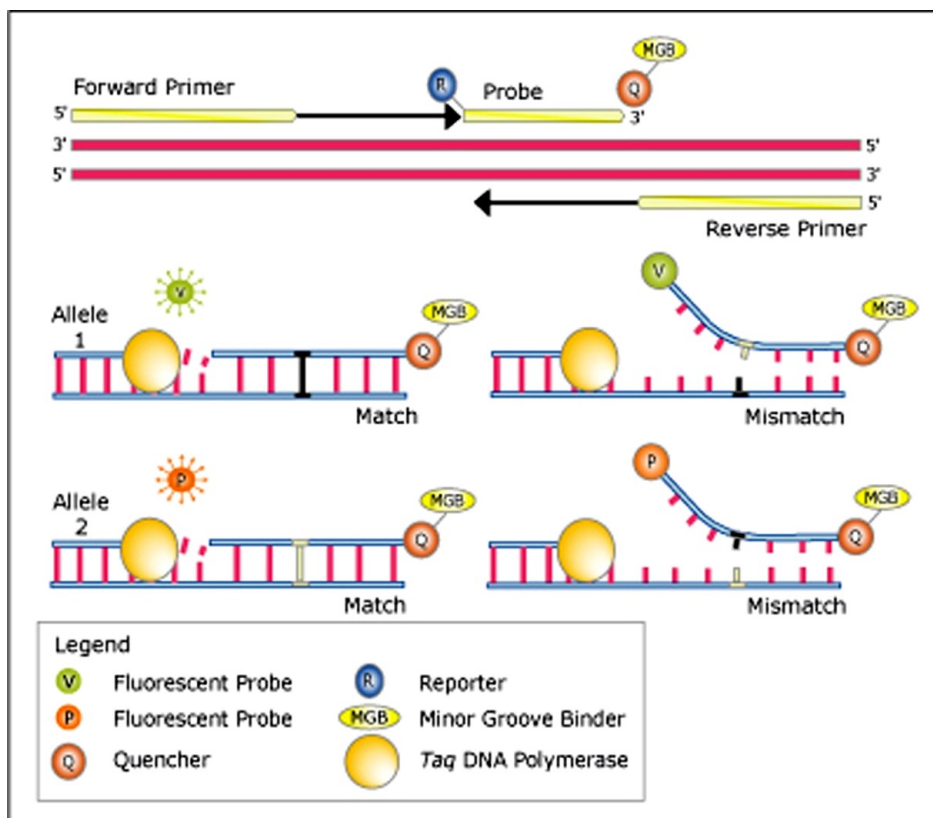
ο Αποστείρωση

2.7 ΜΕΘΟΔΟΣ TAQMAN

Μετά την απομόνωση, το DNA ελέγχεται για την παρουσία του πολυμορφισμού με τη μέθοδο Taqman.

Η μέθοδος Taqman είναι μια ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο, που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολυμορφισμών σε συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA. Η εφαρμογή της μεθόδου περιλαμβάνει έναν ανιχνευτή υβριδισμού (probe), που φέρει στο ένα άκρο του χρωστική φθορισμού αναφοράς (reporter) και στο άλλο άκρο χρωστική παρεμπόδισης φθορισμού (quencher). Οι χρωστικές φθορισμού που χρησιμοποιούνται είναι η 6-καρβόξυ φλουορεσκίνη (FAM) ή η χρωστική VIC ως “reporter”, και η τετραμεθυλ-6-καρβοξυροδαμίνη TAMRA ως “quencher”. Η μέθοδος Taqman περιλαμβάνει επίσης τους παράγοντες της κλασσικής PCR (εκκινητές, τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτιδία, ιόντα μαγνησίου και Taq πολυμεράση) και τα αντίστοιχα στάδια της αποδιάταξης, της σύνδεσης

και επιμήκυνσης των εκκινητών. Ο ανιχνευτής υβριδισμού συνδέεται με τον ένα από τους δύο εκκινητές της αντίδρασης και υδρολύεται από την πολυμεράση στο στάδιο της επιμήκυνσης, με αποτέλεσμα να εκπέμπεται σήμα φθορισμού αναφοράς (FAM ή VIC). Σε κάθε κυκλική επανάληψη των σταδίων πολλαπλασιάζεται το σήμα του φθορισμού, το οποίο ανιχνεύεται και ποσοτικοποιείται με τη χρήση ακτινών λέιζερ. Η αρχή της μεθόδου παρουσιάζεται στην εικόνα 9 (76).



Εικόνα 10: Συνοπτική περιγραφή της μεθόδου Taqman. Όταν ο ανιχνευτής υβριδισμού (probe) δεν έχει υβριδοποιηθεί ακόμη στη συμπληρωματική του αλληλουχία ο παρεμποδιστής (quencher) εμποδίζει την εκπομπή σήματος φθορισμού από τη χρωστική φθορισμού (reporter). Όταν η πολυμεράση υδρολύσει τους υβριδοποιημένους ανιχνευτές εκπέμπεται σήμα φθορισμού.

2.8 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Η στατιστική επεξεργασία πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο SPSS 18.0. Οι κατηγορικές μεταβλητές εκφράζονται ως απόλυτη τιμή ή/και ποσοστό (%).

Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση κατά Cox για να προσδιοριστεί η επιβίωση των ατόμων σε σχέση με τον πολυμορφισμό rs780094 και εφαρμόστηκε λογιστική παλινδρόμηση ώστε να εξεταστεί η επίδραση και άλλων παραγόντων στη μεταβλητή που εξετάζουμε (επιβίωση) καθώς και η στατιστική σημαντικότητα αυτών. Η κατανομή του πολυμορφισμού στο δείγμα συγκρίθηκε με την αναμενόμενη κατανομή στο δείγμα όπως προκύπτει από το δείκτη Hardy- Weinberg (HWE).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η μελέτη αφορούσε των επανέλεγχο 687 ατόμων που είχαν συμμετάσχει στη μελέτη GHRAS (Greek Health Randomized Aging Study). Από αυτά τα άτομα στοιχεία για την επιβίωσή τους είχαμε σε 413 άτομα ενώ με 274 άτομα δεν μπορέσαμε να επικοινωνήσουμε. Για τον προσδιορισμό του πολυμορφισμού rs780094 υπήρχαν στοιχεία για 393 άτομα (143 άντρες, 270 γυναίκες).

Παρακάτω παρουσιάζονται τα στοιχεία για τα 687 άτομα που είχαν συμπληρώσει 5 χρόνια από την πρώτη επίσκεψη και τα δημογραφικά χαρακτηριστικά των 413 ατόμων που είχαμε στοιχεία από τον επανέλεγχο.

Πίνακας 3: Δημογραφικά Χαρακτηριστικά Αρχικού Δείγματος

	n	Καρδιαγγειακό Νόσημα	Σακχαρώδης Διαβήτης	Ηλικία κατά τον επανέλεγχο (έτη)
Άντρες	210	62	39	74,7±7,5
%	30,6	29,5	18,6	
Γυναίκες	477	70	53	71,2± 6,8
%	69,4	14,7	11,1	
Σύνολο	687	132	92	72,3± 7,2
%	100	19,2	13,4	

Τα άτομα που είχαν συμπληρώσει 5 χρόνια από την πρώτη επίσκεψη (n= 687) εμφάνιζαν τα παρακάτω χαρακτηριστικά: αποτελούνταν κατά 30,6% από άντρες και 69,4% από γυναίκες. Το 19,2% αυτών έπασχαν από συστηματική καρδιαγγειακή νόσο (CVD) και 13,4% έπασχαν από Σακχαρώδη Διαβήτη 2. Η μέση ηλικία των ατόμων αυτών ήταν 72,3 έτη (τυπική απόκλιση: $\pm 7,2$ έτη) όπως φαίνεται και στον πίνακα 3.

Παρακάτω παρουσιάζονται τα στοιχεία των ατόμων για τα οποία είχαμε στοιχεία κατά τον επανέλεγχο. Τα άτομα που μελετήσαμε (n=413), αποτελούνταν από 143 άντρες (34,6%) και 270 γυναίκες (65,4%). Από αυτούς 81 άτομα (19,6%) έπασχαν από συστηματική καρδιαγγειακή νόσο (26,6% των ανδρών και 15,9% των γυναικών) και 51 άτομα (12,3%) έπασχαν από Σακχαρώδη Διαβήτη (17,5% των ανδρών και 9,6% των γυναικών). Η μέση ηλικία στο σύνολο των ατόμων ήταν 76,9 (τυπική απόκλιση: $\pm 7,1$) έτη. Η μέση ηλικία των ανδρών ήταν 79,7 (τυπική απόκλιση: $\pm 7,4$) έτη και των γυναικών 75,5 (τυπική απόκλιση: $\pm 6,5$) έτη (πίνακας 4). Βλέπουμε ότι οι γυναίκες εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά Σακχαρώδη Διαβήτη και καρδιαγγειακών νοσημάτων και είναι κατά 4,2 χρόνια μικρότερες ηλικιακά σε σχέση με τους άντρες.

Πίνακας 4: Δημογραφικά Χαρακτηριστικά Δείγματος Επανελέγχου

	n	Καρδιαγγειακό νόσημα	Σακχαρώδης Διαβήτης	Ηλικία πρώτης επίσκεψης (έτη)	Ηλικία κατά τον επανέλεγχο (έτη)
Αντρες	143	38	25	74,6± 7,3	79,7±7,4
%	34,6	26,6	17,5		
Γυναίκες	270	43	26	70,8± 6,5	75,5±6,5
%	65,4	15,9	9,6		
Σύνολο	413	81	51	72,2± 7,0	76,9±7,1
%	100	19,6	12,3		

3.2 ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΓΟΝΟΤΥΠΩΝ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs780094 ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΟ GCKR ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Στον πίνακα 5 βλέπουμε τα ποσοστά των γονοτύπων στο αρχικό δείγμα και στον πίνακα 6 τα ποσοστά των γονοτύπων στο δείγμα του επανελέγχου. Το 27% των ατόμων εμφανίζουν γονότυπο CC, 47,2% CT και 19,8% TT. Στα άτομα του επανελέγχου (n=393) το 28,1% εμφανίζει γονότυπο CC, 47,2% CT και 19,9% TT ενώ για 20 άτομα (4,8%) δεν έχουμε στοιχεία για το γονότυπο.

Πίνακας 5: Συχνότητα γονοτύπων στο αρχικό δείγμα

	Αντρες	%	Γυναίκες	%	Σύνολο	%
CC	54	25,7	132	27,7	186	27,0
CT	105	50,0	219	45,9	324	47,2
TT	36	17,1	100	20,9	136	19,8
Υποσύνολο	195	92,8	451	94,5	646	94,0
Σύνολο	210	100	477	100	687	100

Η αναλογία των γονοτύπων στο δείγμα είναι σύμφωνη με την ισορροπία Hardy-Weinberg ($p=0,775>0,05$).

Πίνακας 6: Συχνότητα γονοτύπων στο δείγμα του επανελέγχου

	n=393	%
CC	116	28,1
CT	195	47,2
TT	82	19,9
C	427	54,3
T	359	45,7

Στη συνέχεια αναλύονται οι γονότυποι ανά φύλο και παρατηρούμε ότι στους άντρες το 28,3% έχει γονότυπο CC, το 53,6% CT και το 18,1% TT. Για τις γυναίκες τα

ποσοστά είναι 30,2% CC, 47,4% CT και 22,4% TT. Ο γονότυπος που εξετάζουμε (CC) δεν βρέθηκε να σχετίζεται με το φύλο ($p=0,179$). Η συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων είναι : **C: 0,54 T:0,46**

Πίνακας 7: Συχνότητα γονοτύπων ανά φύλο στο δείγμα του επανελέγχου

	Άντρες	%	Γυναίκες	%	Σύνολο	%
CC	39	28,3	77	30,2	116	29,5
CT	74	53,6	121	47,4	195	49,6
TT	25	18,1	57	22,4	82	20,9
Σύνολο	138	100	255	100	393	100
C	152	55,1	275	53,9	427	54,3
T	124	44,9	235	46,1	359	45,7

3.3 ΕΛΕΓΧΟΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΟΥ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΟΥ rs780094 ΤΟΥ GCKR ΜΕ ΤΗΝ ΕΠΙΒΙΩΣΗ ΤΩΝ ΑΤΟΜΩΝ

Στη μελέτη εξετάστηκε η επιβίωση των ατόμων. Από τα 413 άτομα του επανελέγχου τα 365 επιβίωσαν στο διάστημα των 5 χρόνων ενώ 48 απεβίωσαν. Το 62,5% όσων απεβίωσαν ήταν άντρες και το 37,5% ήταν γυναίκες. Η μέση ηλικία θανάτου ήταν 83,6 (τυπική απόκλιση: $\pm 7,8$) έτη (πίνακας 8). Εξετάστηκε ακόμη η σχέση του φύλου με το ενδεχόμενο του θανάτου. Δε βρέθηκε να υπάρχει συσχέτιση του θανάτου με το φύλο ($p=0,278$) ούτε και όταν εξετάστηκε το κάθε φύλο ξεχωριστά (άντρες: $p=0,209$ γυναίκες: $p=0,352$). Όταν εξετάστηκε και ο Σακχαρώδης Διαβήτης ως συγχυτικός παράγοντας δεν είχαμε κάποια διαφορά στο αποτέλεσμα σε σχέση με το φύλο ($p=0,27$) αλλά και σε κάθε φύλο ξεχωριστά (άντρες: $p=0,205$ γυναίκες: $p=0,435$).

Πίνακας 8: Στοιχεία επιβίωσης κατά τον επανέλεγχο

	Επιβιώσαντες	Αποβιώσαντες	Σύνολο	B	95% Διάστημα εμπιστοσύνης	p-value
Άντρες	113	30	143	0,507	0,753-3,655	0,209
%	30,9	62,5	34,6			
Γυναίκες	252	18	270	0,397	0,645-3,434	0,352
%	69	37,5	65,4			
CVD	298	14	312			
%	81,6	29,2	75,5			
Σακχαρώδης Διαβήτης	44	7	51	0,05	0,371-2,981	0,925
%	12,1	14,6	12,3			
Ηλικία	76,0 $\pm$ 6,5	83,6 $\pm$ 7,8				
Ηλικία πρώτης επίσκεψης	71,3 $\pm$ 6,5	78,5 $\pm$ 7,8				
Σύνολο	365	48	413			
%	88,4	11,6	100			

Με τη χρήση της λογαριθμικής παλινδρόμησης εξετάζουμε τη σχέση του πολυμορφισμού rs780094 του γονιδίου *GCKR* (γονότυπος CC) με την επιβίωση των ατόμων του επανελέγχου λαμβάνοντας υπόψη την ηλικία της πρώτης επίσκεψης, το φύλο και την παρουσία ΣΔ2. Βρέθηκε να υπάρχει τάση για συσχέτιση του πολυμορφισμού με το ενδεχόμενο θανάτου ($B=0,439$ με 95% διάστημα εμπιστοσύνης 0,9-2,672) χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική ($p=0,114$) (πίνακας 9). Συγκεκριμένα ο γονότυπος CC αυξάνει 1,5 φορές την πιθανότητα θανάτου χωρίς όμως η συσχέτιση αυτή να είναι στατιστικά σημαντική. Παρατηρώντας και το 95% διάστημα εμπιστοσύνης βλέπουμε ότι περιέχει και την τιμή 1, ερμηνεύοντάς το σημαίνει ότι δεν παρατηρείται διαφορά στην επιβίωση των ατόμων σε σχέση με τον πολυμορφισμό rs780094. Συνυπολογίζοντας και το Σακχαρώδη Διαβήτη 2 σαν συγχυτικό παράγοντα δεν είχαμε κάποια διαφορά στο αποτέλεσμα ($p=0,116$).

Πίνακας 9: Συχνότητα πολυμορφισμών και επιβίωση

	Επιβιώσαντες	%	Αποβιώσαντες	%
CC	105	30,3	11	23,9
CT	169	48,7	26	56,5
TT	73	21	9	19,6
Σύνολο	347	100	46	100
β			0,439	
95% διάστημα εμπιστοσύνης			0,9-2,672	
p-value			0,114	

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη έγινε επανέλεγχος σε 413 ηλικιωμένα άτομα της μελέτης GHRAS που είχε πραγματοποιηθεί στην Αττική για να ελεγχθεί η επιβίωσή τους. Τα δεδομένα που συλλέχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί η σχέση του πολυμορφισμού rs780094 (γονότυπος CC) και η επιβίωση των ατόμων στα πέντε χρόνια που μεσολάβησαν από την πρώτη επίσκεψη.

Η συχνότητα εμφάνισης του αλληλομόρφου C του πολυμορφισμού rs780094 στο δείγμα βρέθηκε ίση με 54,3% που συμβαδίζει με το ποσοστό που εκτιμάται στον πληθυσμό (περίπου 60%) (66), χωρίς σημαντική διαφορά ανάμεσα στα δύο φύλα. Σύμφωνα με τα αποτελέσματά μας (πίνακας 9) υπήρχε τάση συσχέτισης του θανάτου με τον πολυμορφισμό, καθώς από τα άτομα που βρέθηκαν να έχουν αποβιώσει στην πενταετία το 23,9% ήταν ομόζυγα ως προς το αλληλόμορφο C, το 19,6% ήταν ομόζυγα ως προς το αλληλόμορφο T και το 56,5% εμφάνιζε ετεροζυγωτία (γονότυπος CT). Όμως δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα στα ευρήματά μας ($p=0,114$) για να επιβεβαιωθεί αυτή η τάση. Στη συνέχεια συνυπολογίσαμε και ως συγχυτικό παράγοντα το Σακχαρώδη Διαβήτη 2, που έχει βρεθεί να σχετίζεται θετικά με τον πολυμορφισμό που εξετάζουμε (69,70,71,77), αλλά η παρουσία ή η απουσία διαβήτη δε βρέθηκε να επηρεάζει τη σχέση του πολυμορφισμού με το ενδεχόμενο θανάτου ($p=0,116$). Εξετάζοντας και το φύλο και τη συσχέτιση που μπορεί να έχει με το ενδεχόμενο θανάτου δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση για κανένα από τα δύο φύλα ($p=0,278$) αν και οι άντρες που απεβίωσαν υπερέιχαν αριθμητικά σε σχέση με τις γυναίκες (30 έναντι 18), κάτι που συμφωνεί με τις θεωρίες που υποστηρίζουν ότι οι γυναίκες έχουν χαμηλότερα ποσοστά θνησιμότητας σε σχέση με τους άντρες τόσο σε μικρότερες όσο και σε μεγαλύτερες ηλικίες (78).

Όσον αφορά το συσχετισμό του πολυμορφισμού rs780094 και της επιβίωσης των ατόμων δεν υπάρχουν μελέτες που να εξετάζουν τη συγκεκριμένη υπόθεση. Στο δείγμα μας δεν βρέθηκε να υπάρχει σχέση μεταξύ του πολυμορφισμού και της παρουσίας ΣΔ2 όμως μελέτες έχουν αποδείξει ότι ο πολυμορφισμός rs780094 σχετίζεται θετικά με την εμφάνιση ΣΔ2. Συγκεκριμένα οι Dupuis J. et al. σε μια μετα-ανάλυση που έκαναν (MAGIC- Meta-Analyses of Glucose and Insulin-related traits Consortium) βρήκαν ότι υπήρχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση ($p=1,3 \times 10^{-9}$) του γονοτύπου CC και της εμφάνισης ΣΔ2 (71). Το ίδιο αποτέλεσμα έδειξε και μια μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε κινέζικο πληθυσμό από τους Cheng Hu et al. όπου με $p=5,3 \times 10^{-5}$ φάνηκε ότι η παρουσία του πολυμορφισμού αυτού σχετίζεται με την εμφάνιση ΣΔ2 (72).

Σχετικά με τη μελέτη μας να αναφερθεί ότι το δείγμα μας αποτελούνταν κατά 65,4% από γυναίκες και κατά 34,6% από άντρες ενώ στο γενικό πληθυσμό σε άτομα άνω των 65 ετών τα αντίστοιχα ποσοστά είναι 55,2% και 44,8%, το δείγμα είναι αντιπροσωπευτικό στην αναλογία των φύλων αλλά θα έπρεπε οι άντρες να εκπροσωπούνται περισσότερο ώστε η αναλογία να

πλησιάζει περισσότερο αυτή του γενικού πληθυσμού. Παρότι η μελέτη μας έδειξε ότι υπάρχει τάση ο πολυμορφισμός rs780094 να σχετίζεται με αύξηση της θνησιμότητας σε ηλικιωμένα άτομα δεν υπήρχε στατιστική σημαντικότητα στο αποτέλεσμά μας λόγω του σχετικά μικρού αριθμού των ατόμων που απεβίωσαν στην περίοδο που πραγματοποιήθηκε ο επανέλεγχος. Για ισχυρή στατιστική σημαντικότητα απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός ατόμων για την ομάδα των αποβιωσάντων.

Συμπερασματικά από την παρούσα μελέτη προέκυψε ότι:

- ☐ Υπάρχει τάση συσχέτισης του πολυμορφισμού rs780094 με το ενδεχόμενο θανάτου στους ηλικιωμένους χωρίς όμως τα ευρήματά μας να έχουν στατιστική σημαντικότητα.
- ☐ Ο πολυμορφισμός και το ενδεχόμενο θανάτου δεν σχετίζεται με το φύλο των εθελοντών.

Συνέχιση της μελέτης για συλλογή στοιχείων για όλα τα άτομα της μελέτης και παρακολούθηση των ατόμων και μετά των πρώτο επανέλεγχο θα μπορέσει να μας δώσει στοιχεία για την ύπαρξη ή όχι σημαντικής συσχέτισης του πολυμορφισμού rs780094 με το ενδεχόμενο θανάτου σε άτομα της τρίτης ηλικίας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. ΕΣΥΕ. *Η Ελλάδα σε αριθμούς*. 2005
2. Οργανισμός Ηνωμένων Εθνών (UN). *World Population Prospects: The 2008 Revision- Population Database*. esa.un.org/UNPP
3. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO). *World Health Statistics 2010*.
4. National Institute Of Aging. *Aging Under The Microscope: A Biological Quest*. NIH Publication No. 02-2756 June 2006 edition
5. Vander A., Sherman J., Luciano D. *Φυσιολογία του Ανθρώπου, Μηχανισμοί της Λειτουργίας του Οργανισμού*, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης (2001)
6. Marie-Pierre St-Onge and Dymrna Gallagher, *Body composition changes with aging: The cause or the result of alterations in metabolic rate and macronutrient oxidation? Nutrition*. 2010 February ; 26(2): 152–155.
7. Ahmed H. Abdelhafiz et al., *Chronic Kidney Disease in Older People: Physiology, Pathology or Both?*. Nephron Clin Pract 2010;116: 19–24
8. Pugh K.G., Wei J.Y. *Clinical Implications of Physiological Changes in the Aging Heart* Drugs Aging. 2001;18(4):263-76
9. Andreoli TE, Bennett JC, Carpenter CC, Plum F. *Cecil Παθολογία*. (Μουτσόπουλος Χ.). Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας. (2003).
10. Salles N. Basic Mechanisms of the Aging Gastrointestinal Tract Dig Dis 2007;25:112–117
11. Μελιδώνης Α., *Καρδιομεταβολικός Κίνδυνος*, Ιατρικές Εκδόσεις Παρισιάνος, (2007)
12. American Diabetes Association www.diabetes.org
13. Andrews N. et al, *Telomeres and Immunological Diseases of Aging Gerontology* 2010;56:390–403
14. Χανιώτη Φ., *Εγχειρίδιο Γηριατρικής*, Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας (1992)
15. Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO)., Fact sheet N° 310, February 2007
16. Weinert B. and Timiras P. *Physiology of Aging Invited Review: Theories of aging*, J Appl Physiol 95: 1706–1716, 2003
17. Charlesworth B., Fisher, Medawar, Hamilton and the Evolution of Aging, Genetics 156: 927–931 (November 2000)
18. Tosato M. et al., *The aging process and potential interventions to extend life expectancy* Clinical Interventions in Aging 2007;2(3) 401–412
19. Kanungo M., *A model for ageing*, Journal of Theoretical Biology Volume 53, Issue 2, 1975, Pages 253-261

20. Campisi J., *Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act!* Mech Ageing Dev. 2005 Jan;126(1):51-8.
21. Blackburn E, *Telomere states and cell fates*, Nature 408, 53-56 (2 November 2000)
22. Thomas von Zglinicki, *Oxidative stress shortens telomeres*, Trends in Biochemical Sciences Volume 27, Issue 7, 1 July 2002, Pages 339-344
23. Mehllhorn RJ. *Oxidants and antioxidants in aging*. In: Physiological Basis of Aging and Geriatrics (3rd ed.), edited by Timiras PS. Boca Raton, FL: CRC, 2003, p. 61–83
24. Ramiro E. Verdun & Jan Karlseder *Review Article Replication and protection of telomeres*, Nature 447, 924-931 (21 June 2007)
25. Licastro F et al., *Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases* Immunity & Ageing 2005, 2:8
26. Franceschi C. et al. *Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence.*, Ann N Y Acad Sci. 2000 Jun;908:244-54
27. Anis Larbi et al., *Aging of the Immune System as a Prognostic Factor for Human Longevity*, PHYSIOLOGY 23: 64–74, 2008;
28. Ahmad A. *Aging and Inflammation: Etiological Culprits of Cancer* Curr Aging Sci. 2009 ; 2(3): 174–186.
29. Trichopoulou A. et al., *Modified Mediterranean diet and survival: EPIC-elderly prospective cohort study* BMJ. 2005 Apr 30;330(7498):991
30. Franceschi C. et al *Genetics of Healthy Aging in Europe The EU-Integrated Project GEHA (Genetics of Healthy Aging)*, Ann. N.Y. Acad. Sci. 1100: 21–45 (2007).
31. James W. Vaupel, *Biodemography of human ageing*, NATURE. Vol 464/25 March 2010
32. Steven N. Austad, *Why Women Live Longer Than Men: Sex Differences in Longevity* GENDER MEDICINE/VOL. 3, No. 2, 2006
33. Blagosklonny M., *Why men age faster but reproduce longer than women: mTOR and evolutionary perspectives*, AGING, May 2010, Vol.2 No.5
34. D. Craig Willcox et al., *The Okinawan Diet: Health Implications of a Low-Calorie, Nutrient-Dense, Antioxidant-Rich Dietary Pattern Low in Glycemic Load*, journal of the American College of Nutrition, Vol. 28, No. 4_Supplement_1, 500S-516S (2009)
35. Holloszy J. and Fontana L., *Caloric Restriction in Humans*, Exp Gerontol. 2007 August ; 42(8): 709–712
36. Williams M., *Διατροφή: Υγεία, Ευρωστία & Αθλητική Απόδοση*, Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης (2003)
37. Warburton D. et al., *Health benefits of physical activity: the evidence*, CMAJ 2006;174(6):801-9

38. Nusselder W. et al., *Living healthier for longer: Comparative effects of three heart-healthy behaviors on life expectancy with and without cardiovascular disease* BMC Public Health 2009, **9**:487
39. Epel E. et al., *Accelerated telomere shortening in response to life stress* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Dec 7;101(49):17312-5.
40. Terry Grossman, *Latest advances in antiaging medicine*, Keio J Med 2005; 54 (2): 85–94
41. Erol A., *The Functions of PPARs in Aging and Longevity*, PPAR Res. 2007;2007:39654.
42. Kerry Kornfeld, Kimberley Evason, *Effects of Anticonvulsant Drugs on Life Span*, Arch Neurol. 2006;63:491-496
43. Puca A. et al., *A genome-wide scan for linkage to human exceptional longevity identifies a locus on chromosome 4*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Aug 28;98(18):10505-8
44. K. Christensen & J.W. Vaupel, *Determinants of longevity: genetic, environmental and medical factors*, Journal of Internal Medicine 1996; **240**: 333±341
45. Schächter F. et al., *Genetic associations with human longevity at the APOE and ACE loci*, Nature Genetics 6, 29 - 32 (1994)
46. Willcox B. et al., *FOXO3A genotype is strongly associated with human longevity*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Sep 16;105(37):13987-92
47. Blagosklonny M. et al, *Impact papers on aging in 2009*, AGING, March 2010, Vol.2 No.3
48. Albani D. et al., *A polymorphic variant of the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) receptor correlates with male longevity in the Italian population: a genetic study and evaluation of circulating IGF-1 from the "Treviso Longeva (TRELONG)" study*, BMC Geriatrics 2009, **9**:19
49. Gravina S. et al., *Identification of single nucleotide polymorphisms in the p21 (CDKN1A) gene and correlations with longevity in the Italian population*, AGING, May 2009, Vol.1 No.5
50. M. Bonafe et al. ,*What studies on human longevity tell us about the risk for cancer in the oldest old: data and hypotheses on the genetics and immunology of centenarians*, Experimental Gerontology 37 (2002) 1263–1271
51. Stig E. Bojesen and Børge G. Nordestgaard, *The common germline Arg72Pro polymorphism of p53 and increased longevity in humans*, Cell Cycle 7:2, 158-163; 15 January 2008
52. Eun-Joo Kim & Soo-Jong Um, *SIRT1: roles in aging and cancer*, BMB Rep. 2008 Nov 30;41(11):751-6

53. Lio D. et al., *Gender-specific association between -1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity*, Genes Immun. 2002 Feb;3(1):30-3.
54. Arking D. et al., *Association Between a Functional Variant of the KLOTHO Gene and High-Density Lipoprotein Cholesterol, Blood Pressure, Stroke, and Longevity*, Circ Res. 2005;96:412-418.
55. Sild M. et al., *Possible associations between successful aging and polymorphic markers in the Werner gene region*. Ann N Y Acad Sci. 2006 May;1067:309-10.
56. Blagosklonny M. et al. , *Aging: past, present and future*, AGING, January 2009, Vol.1 No.1
57. S. Michal Jazwinski, *Aging and longevity genes*, Acta Biochim Pol. 2000;47(2):269-79.
58. Pei-Yu Wang et al, *Long-lived Indy and calorie restriction interact to extend life span*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jun 9;106(23):9262-7
59. R.J. Mockett, R.S. Sohal, *Temperature-dependent trade-offs between longevity and fertility in the Drosophila mutant, Methuselah*. Experimental Gerontology 41 (2006) 566–573
60. Yi Lin and Zhongjie Sun, *Current views on type 2 diabetes*, Journal of Endocrinology (2010) 204, 1–11
61. Nelson D., Cox M., *Lehninger Principles of Biochemistry*, Fourth Edition
62. Δημόπουλος Κ., Αντωνοπούλου Σ., *Βασική Βιοχημεία*, Αθήνα 2000
63. Vladi V. Heredia et al., *Biochemical Basis of Glucokinase Activation and the Regulation by Glucokinase Regulatory Protein in Naturally Occurring Mutations*, J Biol Chem. 2006 Dec 29;281(52):40201-7
64. Iynedjian P., *Molecular Physiology of Mammalian Glucokinase*, Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009) 27 – 42
65. National Center for Biotechnology Information NCBI (SNP's) www.ncbi.nlm.nih.gov
66. Weisman Institute of Science www.genecards.org
67. Q. Qi et al., *Association of GCKR rs780094, alone or in combination with GCK rs1799884, with type 2 diabetes and related traits in a Han Chinese population* Diabetologia (2009) 52:834–843
68. Mark Bi et al., *Association of rs780094 in GCKR with Metabolic Traits and Incident Diabetes and Cardiovascular Disease: The ARIC Study*, PLoS One. 2010 Jul 22;5(7):e11690.
69. Sparsø T. et al., *The GCKR rs780094 polymorphism is associated with elevated fasting serum triacylglycerol, reduced fasting and OGTT-related insulinaemia, and reduced risk of type 2 diabetes*, Diabetologia (2008) 51:70–75

70. Marju Orho-Melander et al., *Common Missense Variant in the Glucokinase Regulatory Protein Gene Is Associated With Increased Plasma Triglyceride and C- Reactive Protein but Lower Fasting Glucose Concentrations*, *Diabetes* 57:3112–3121, 2008
71. Dupuis J. et al., *New genetic loci implicated in fasting glucose homeostasis and their impact on type 2 diabetes risk*, *Nat Genet.* 2010 Feb;42(2):105-16
72. Cheng Hu et al., *Effects of GCK, GCKR, G6PC2 and MTNR1B Variants on Glucose Metabolism and Insulin Secretion*, *PLoS One.* 2010 Jul 23;5(7):e11761
73. Claudia Ha Ting Tam et al., *Common Polymorphisms in MTNR1B, G6PC2 and GCK Are Associated with Increased Fasting Plasma Glucose and Impaired Beta-Cell Function in Chinese Subjects*, *PLoS One.* 2010 Jul 8;5(7):e11428.
74. Tam C. et al., *Interaction Effect Of Genetic Polymorphisms In Glucokinase (GCK) And Glucokinase Regulatory Protein (GCKR) On Metabolic Traits In Healthy Chinese Adults And Adolescents*, *Diabetes.* 2009 Mar;58(3):765-9.
75. Miller SA et al., *A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.* *Nucleic Acids Res* 1988;16:1215
76. Watson DE, Li B. *TaqMan applications in genetic and molecular toxicology.* *Int J Toxicol* 2005;24:139-45.
77. Haiqing Shen et al., *Glucokinase regulatory protein (GCKR) gene polymorphism affects postprandial lipemic response in a dietary intervention study*, *Hum Genet.* 2009 October ; 126(4): 567–574
78. U.S. Department of Health and Human Services NATIONAL INSTITUTE ON AGING, *An Aging World: 2008*